



شناسایی و بررسی کمپلکس های کیتوسان و مشتقات هیدرولیز شده آن با فلز روی

آتنا میربلوک، میر حسن رسولی صدقیانی، ابراهیم سپهر^۱، امیر لکزیان^۲، محمد حکیمی^۳

۱: به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد و دانشیار گروه علوم خاک دانشگاه ارومیه، ۲: استاد گروه علوم خاک دانشگاه فردوسی

مشهد، ۳: استاد گروه شیمی دانشگاه پیام نور مرکز مشهد

چکیده

امروزه استفاده از کیلیت‌های آلی روی برای افزایش قابلیت دسترسی آن در کشت آبی و خاکی، مورد توجه قرار گرفته است. به این منظور از کیتوسان و مشتقات هیدرولیز شده آن به عنوان کمپلکس کننده فلز روی استفاده شد. اطلاعات مربوط به FTIR به منظور شناسایی و تایید تشکیل کمپلکس‌ها بدست آمد. حلالیت و رسوب ترکیبات با تغییر pH در محیط آبی ارزیابی شدند. نتایج به دست آمده از اسپکتروسکوپی IR، تشکیل کمپلکس‌ها را تایید کردند. در بین کمپلکس‌های سنتز شده، کیتوسانی که به روش اسیدی هیدرولیز شده بود بالاترین حلالیت را داشت. همه کمپلکس های کیتوسان و مشتقاتش پایداری بالایی را با افزایش pH محیط نشان دادند.

واژه های کلیدی: کمپلکس های آلی، کیتوسان، روی

مقدمه

کیتوسان محصول دی استیله شدن کیتین است که از فراوان ترین گلیکان‌های طبیعی می‌باشد. کیتوسان به دلیل داشتن ویژگیهای فیزیکوشیمیایی (داشتن گروه های OH و NH₂ فعال) و بیولوژیکی (سازگاری بیولوژیکی و قابلیت زیست تجزیه پذیری) خاص و قابلیت پیوند با ترکیباتی چون کلسترول‌ها، چربی‌ها، پروتئین‌ها و یونهای فلزی، امروزه به عنوان یک عامل کیلیت کننده طبیعی در جانوران و گیاهان بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Senel and Mc Clure, 2004). از جمله کاربرد آن در زمینه حذف فلزات سنگینی چون مس، جیوه، آرسنیک و اورانیوم از فاضلاب‌ها و آبهای آلوده می باشد (Kang et al., 1999). در زمینه داروسازی، کیتوسان برای ارسال داروها به بخش های مناسب در یک سیستم بیولوژیکی به کار می رود که با گذشت زمان تخریب شده و شدت تخریب آن بر اساس فرآیند دی استیله شدن کنترل می شود. این ویژگی این امکان را ایجاد می کند که دارو در جایگاه مورد نظر در سیستم بیولوژیکی رها شود. با توجه به کمبود فلز روی در خاکها و گیاهان بیشتر مناطق کشاورزی دنیا، مخصوصا در خاکهای آهکی، که بخش عمده ای از خاکهای مناطق خشک و نیمه خشک ایران را نیز تشکیل می دهند (Alloway, 2008) و از طرفی اهمیت این فلز و نقش آن در بسیاری از سیستم های آنزیمی و ساختمانی گیاه، می توان از کیلیت کننده هایی چون کیتوسان برای نگهداری این فلز و رها شدن به موقع آن در هنگام نیاز گیاه بهره برد. تنها عاملی که استفاده از کیتوسان را به منظور کیلیتور عناصر کم مصرفی چون روی با تردید مواجه می کند حلالیت کم آن در آب می باشد. امروزه برای غلبه بر حلالیت کم کیتوسان، الیگوساکاریدهای کیتوسان از این پلی ساکارید تهیه می شوند. الیگو ساکاریدهای کیتوسان محصول تخریب کیتوسان هستند که با تغییر درجه استیلی شدن آن از ۲ به ۱۰، به آن استیل گلوکز آمین یا گلوکز آمین به دست می آیند. درجه استیلی شدن آنها با متدهای تخریب آنزیمی و شیمیایی انجام می شود. کیتوسان به خوبی در اسیدهای رقیق محلول و در آب نامحلول بوده و تلخ مزه است، ولی الیگومرهای کیتوسان با وزن مولکولی کم (۱ تا ۲۰ کیلو دالتون) در آب محلول بوده و تلخ مزه نیستند. این اولیگومرها به روش های اسیدی (Horowitz et al., 1957) و آنزیمی (Izume and Ohtakara, 1987) بدست می آیند. در هیدرولیز اسیدی مقدار زیادی از الیگومرهای کوچک با یک تا ۶ واحد گلوکز آمین تشکیل می شوند ولی هیدرولیز آنزیمی کیتوسان به



دلیل سادگی کنترل آن دارای ارجحیت است (Lin et al, 2002). پس از هیدرولیز، کیتوسانی با وزن مولکولی پایین (LMWC) تشکیل می شود که فعالیت بیولوژیکی بالاتر و حلالیت بیشتری دارد. وزن مولکولی کیتوسان از ۱۴۰ کیلو دالتون به ۵ تا ۲۰ کیلو دالتون خواهد رسید (Jeon et al., 2001). کاهش اندازه و افزایش حلالیت کیتوسان، استفاده از آن را به عنوان عامل کمپلکس کننده طبیعی برای عناصر کم مصرف در خاک و در محیط های هیدروپونیک اجتناب ناپذیر می کند. هدف از این مطالعه سنتز و شناسایی کیلیت های کیتوسان و مشتقات هیدرولیز شده آن با فلز روی و بررسی ویژگی های شیمیایی آنها به منظور کاربرد در افزایش فراهمی فلز روی در خاک می باشد.

مواد و روش ها

کیلیت های روی با کیتوسان، فرم هیدرولیز شده اسیدی کیتوسان و فرم هیدرولیز شده آنزیمی کیتوسان، طبق روش های استاندارد زیر در آزمایشگاه سنتز گردیدند.

سنتز کیتوسان- فلز: ۰/۳ گرم کیتوسان در ۳۰ میلی لیتر اسید استیک ۱ درصد به کمک هم زدن حل شد و نمک سولفات فلز با نسبت مولاری ۴:۱ به آن اضافه شد. pH محلول با اضافه کردن محلول ۰/۱ NH₃.H₂O مولار به ۷ افزایش یافته و محلول در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳ ساعت مخلوط شد. سپس در دمای اتاق سرد شده و با ۲۰۰ میلی لیتر استون خالص شد و در نهایت به وسیله فیلتر کردن، پودر سفید رنگ بدست آمد (Xiaohui et al, 2004).

کیتوسان هیدرولیز شده (اسیدی)-فلز: کیتوسان در اسید هیدروکلریدریک ۱ مولار حل شده و محلول حاصل تا ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ تا ۶ ساعت حرارت می بیند. کیتوسان هیدروکلراید با اتانول در نسبت حجمی ۱ به ۳ رسوب کرد (Kulikov et al, 2012). کیتوسان هیدرولیز شده با نمک سولفات روی به روش زیهوی و همکاران (۲۰۰۴) کمپلکس تشکیل داد.

کیتوسان هیدرولیز شده (آنزیمی)- فلز: ابتدا ۲۰۰ میلی لیتر کیتوسان ۲/۲ درصد با بافر استات سدیم با pH=4 مخلوط شده و سپس ۲۰ میلی لیتر آنزیم کیتیناز با ۱۰۰ U/ml به آن اضافه می شود. مخلوط در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت باقی می ماند تا هیدرولیز کامل شود (Ilyaina et al, 2000). کیتوسان هیدرولیز شده با نمک سولفات روی به روش زیهوی و همکاران (۲۰۰۴) کمپلکس تشکیل می دهد.

ویژگی های فیزیکی کیلیت ها: اندازه کیلیت ها، طول پیوندها و تایید تشکیل کمپلکس ها توسط FTIR اسپکتروسکوپی با دیسک KBr انجام شد.

حلالیت کیلیت ها: حلالیت کیلیت ها بر اساس مقدار جامد حل شده در آب تعیین شد. نمونه ها در بافر فسفات خنثی شده و سپس جامد نامحلول به وسیله سانتریفیوژ با دور ۶۰۰۰ و زمان ۳۰ دقیقه رسوب داده می شوند و در انتها برای حذف حلال سه بار با آب مقطر شسته شدند. کل ترکیبات محلول و غیر محلول در آن و در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد خشک شده (Ilyaina et al, 2000) و حلالیت طبق رابطه زیر محاسبه شد:

حجم نمونه / (وزن مواد جامد غیر محلول - کل وزن بخش جامد خشک شده)

پایداری کیلیت ها با تغییر pH: برای این منظور محلول کیتوسان را با استفاده از سود یک نرمال در معرض تغییر pH محیط قرار داده و pH ی که با شروع ایجاد رسوب در محیط همراه است، بدست آمد.

نتایج و بحث

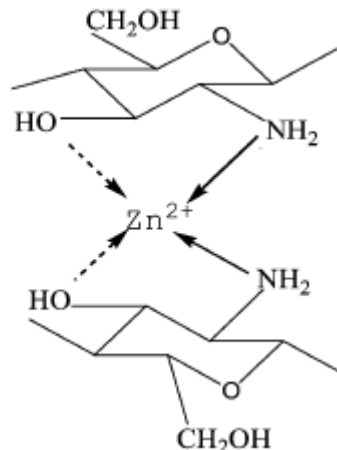
نتایج FTIR اسپکتروسکوپی کیتوسان و مشتقات اسیدی و آنزیمی آن به همراه کمپلکس های آنها با فلز روی در جدول آورده شده است. طیف های بدست آمده در کمپلکس کیتوسان و مشتقاتش با فلز روی تغییرات زیادی را نسبت به خود مشتقات نشان می دهد. جابجایی فرکانس ها در مقایسه بین کیتوسان و کمپلکس کیتوسان با فلز روی در پیوندهای C-N و C=O مشهود است. در مورد کیتوسان هیدرولیز شده اسیدی و آنزیمی این تغییر فرکانس در پیوندهای O-H نیز مشاهده می

شود. پیوند O-H در کمپلکس کیتوسان اسیدی با روی به فرکانس های پایین تر (3250) و در پیوند کیتوسان آنزیمی با روی به فرکانس های بالاتر (3448.5) شیفت پیدا کرده اند. این نشان می دهد که گروه های O-H بیشترین درگیری را در تشکیل کمپلکس دارند. پیوند های C=O بین فرکانس های ۱۵۰۰ تا ۱۶۰۰ شیفت دارند، تغییر شیفت در این فرکانس نشان پیوند روی با گروه کربن در ساختار کیتوسان می باشد. جذب هایی که در فرکانس های ۱۰۰۰ تا ۱۱۰۰ مشاهده می شود به دلیل گروه های C-N و درگیری آنها در تشکیل پیوند با فلز روی است. باندهای که در رنج ۴۲۰ تا ۴۳۵ مشاهده می شوند مربوط به پیوند O-Zn می باشند که در کیتوسان و مشتقات پیوند نشده اش این پیک ها وجود ندارند.

جدول ۱: پیوند های IR اسپکتروسکوپی انتخاب شده (cm^{-1}) کیتوسان، مشتقات آن و کمپلکس های آنها با فلز روی (دیسک KBr).

Type of derivatives	ν (O-H)	ν (C-H)	ν (C=O)	ν (C-N)	Zn-O
Chitosan	3421.5	2831.3	1604.7	1095.5	-
Chitosan - Zn	3421.5	2832.1	1596.9	1114.8	435.9
Acid Hydrolysis Chitosan	3444.6	2831.3	1604.7	1099.3	-
Acid Hydrolysis Chitosan - Zn	3250	2831	1535.2	1064.6	420.5
Enzymatic Hydrolysis Chitosan	3312.1	2814.2	1650.1	1123.2	-
Enzymatic Hydrolysis Chitosan - Zn	3448.5	2831.3	1600.8	1110.2	420

با توجه به نتایج بدست آمده از طیف سنجی IR و اینکه فلز روی معمولاً از چهار جهت با کیلیت پیوند برقرار می کند می توان در نسبت مولاری ۱ به ۱ کیتوسان به فلز، شکل فرضی زیر را برای این ساختار در نظر گرفت.



شکل ۱: ساختار فرضی کمپلکس کیتوسان با فلز روی

جدول ۲ حلالیت کیتوسان و مشتقاتش و کمپلکس های آن با فلز روی را نشان می دهد. کیتوسان حلالیت کمی در آب دارد و در اسیدهای ضعیف مثل استیک اسید محلول است. ولی بعد از هیدرولیز و شکسته شدن ساختار، حلالیت آن بین ۴۰ تا ۵۰ درصد افزایش می یابد. در نتیجه فرم های هیدرولیز شده کیتوسان قابلیت استفاده در محیط های هیدروپونیک و خاکی را خواهند داشت. با توجه به داده های موجود در ستون سوم جدول، مشاهده می شود که پایداری این ترکیبات به تغییرات pH نیز مناسب است. کلیه مشتقات و کمپلکس های آنها در pH های معمول خاک به صورت محلول باقی می مانند. در این بین، کمپلکس روی با کیتوسان هیدرولیز شده به روش آنزیمی تا pH های ۹ رسوب نکرده و بالاترین پایداری را در بین ترکیبات نشان داد. این نشان می دهد که استفاده از این ترکیبات در محیط های آبی و خاکی محدودیتی از نظر pH محیط نخواهیم داشت. در این مطالعه تشکیل کمپلکس و پایداری و حلالیت آنها در محیط به منظور کاربری کشاورزی مورد بررسی قرار گرفت و در ادامه تحقیقی لازم است که قابلیت جذب این عناصر توسط گیاهان مختلف مورد آزمون قرار گیرند.



جدول ۲: حلالیت و رسوب کیتوسان، مشتقات آن و کمپلکس های آنها با فلز روی

Type of derivatives	Solubility in water (%)	pH of solution	pH of precipitation
Chitosan	50	6.2	8
Chitosan - Zn	74	6	8.1
Acid Hydrolysis Chitosan	98	5.1	8.5
Acid Hydrolysis Chitosan - Zn	95	5	9
Enzymatic Hydrolysis Chitosan	88	5.5	7.1
Enzymatic Hydrolysis Chitosan - Zn	78	5.4	8.2

منابع:

- Alloway B.J. 2008. Zinc in soils and crop nutrition, 2nd edn. IZA and IFA, Brussels/Paris.
- Horowitz S.T., Roseman S., and Blumenthal H. 1957. The preparation of glucosamine oligosaccharides. J. Amer. Chem. Soc., 79: 5046-49.
- Ilyina A., Tikhonov V. E., Albulov A. I., & Varlamov V. P. 2000. Enzymatic preparation of acid-free-water-soluble chitosan. Process Biochemistry, 35: 563-568.
- Izume M., and Ohtakara A. 1987. Preparation of D-glucosamine oligosaccharides by enzymatic hydrolysis of chitosan. Agric. Boil. Chem., 51: 1189-1191.
- Jeon Y.J., Park P.-J., & Kim, S.-K. 2001. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. Carbohydrate Polymers, 44: 71-76.
- Kang W., Choi H.R., Kweon D.K. 1999. Stability constants of amidoximated chitosan-g-poly (acrylonitrile) copolymer for heavy metal ions. J Appl Polym Sci. 73(4): 469-76.
- Kulikov S., Tikhonov V., Blagodatskikh E., Bezrodnykh S., Lopatin R., Khairullin, Philippova S., Abramchuk Molecular weight and pH aspects of the efficacy of oligochitosan against meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA), Carbohydr. Polym. 87: 545-550.
- Lin H., Wang C., Xue and N., Ye. 2002. Preparation of chitosan oligomers by immobilized papain. Enz. Microbial. Techn. 31: 588-592.
- Senel S., and McClure S.J. 2004. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. Adv Drug Deliv Rev. 56(10): 1467-80.
- Xiaohui W., Yumin D., Hui L. 2004. Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan-Zn complex. Carbohydrate Polymers 56: 21-26.

Identify and evaluation of complexes of chitosan and its hydrolyzed derivatives, with zinc

A. Mirbolook, M. H. Rasouli-Sadaghiani, E. Sepehr¹, A. Lakzian², M. Hakimi³

1 :Ph.D. student, Professor and Assoc. Professor in Soil chemistry department of Urmia university

2 : Professor, Soil Science department of Ferdowsi University of Mashhad

3: Professor, Chemistry department of Payam Noor University of Mashhad

Abstract

The use of organic zinc chelators to increase the availability of Zinc in soil and hydroponics, is considered. For this purpose, the chitosan and hydrolyzed derivatives as chelator of zinc was used. Information on FTIR spectroscopy to identify and confirm the formation of the complex were obtained. Solubility and precipitation of components were evaluated by changing the pH in the aqueous system. The results of IR spectroscopy was confirmed the composition of complexes formation. Between the complexes synthesized, acidic hydrolyzed chitosan was the highest solubility. All complex of chitosan and its derivatives showed high stability by increasing the pH environment.

Key Word: organic complexes, chitosan, zinc