

## An overview of the introduction of chitosan and its different quaternization methods

Seyedeh Zahra Mirhosseini Roudbaraki<sup>1</sup>, Elaheh Aghaei Meybodi<sup>2</sup>,  
Seyed Vali Hosseini<sup>\*,3</sup>

1. M.Sc. Student of Fishery Products Processing, Dept. of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: [zahra.mirhoseini@ut.ac.ir](mailto:zahra.mirhoseini@ut.ac.ir)
2. M.Sc. in Organic Chemistry, Laboratory Expert, Dept. of Environment, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: [eliaaghaee1359@gmail.com](mailto:eliaaghaee1359@gmail.com)
3. Corresponding Author, Associate Prof., Dept. of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: [hosseinisv@ut.ac.ir](mailto:hosseinisv@ut.ac.ir)

### Article Info

#### Article type:

Full Length Research Paper

#### Article history:

Received: 12.22.2023

Revised: 01.13.2024

Accepted: 01.27.2024

#### Keywords:

Chemical modification,  
Chitin,  
Chitosan,  
Crustacean skeleton,  
Quaternization

### ABSTRACT

Chitin is one of the most abundant biopolymers after cellulose, which is present in the cell wall of fungi, the cuticle of insects, and in the exoskeleton of crustaceans such as crabs and shrimps. From the deacetylation of chitin, chitosan is obtained, whose characteristics strongly depend on the degree of deacetylation and its molecular weight. In fact, it can be said that chitosan is the most abundant amino polysaccharide in nature, which is also known as a non-toxic compound. Chitosan has received much attention due to its unique properties such as biocompatibility, biodegradability, antibacterial activity, etc. But due to its low solubility in physiological pH, it is not possible to benefit from many of its properties. Therefore, many attempts have been made to produce its derivatives that have the ability to dissolve in such a condition. One of the most important methods of increasing the solubility of chitosan is its chemical modification, which is done with the so-called quaternization technique. In this method, a modifying agent by establishing a covalent bond with carbon number two of chitosan (C<sub>2</sub>) increases its solubility in water and at physiological pH. In this article, while re-introducing the unique features of chitosan, various methods of preparing quaternized chitosan using some common chemical compounds such as GTMAC, EPTMAC, CH<sub>3</sub>I, DMS will be investigated and the characteristics and applications of the produced quaternized chitosan will be described.

Cite this article: Mirhosseini Roudbaraki, Seyedeh Zahra, Aghaei Meybodi, Elaheh, Hosseini, Seyed Vali. 2024. An overview of the introduction of chitosan and its different quaternization methods. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 13 (2), 121-142.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/japu.2024.22018.1840

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

## مروری بر معرفی کیتوزان و روش‌های مختلف کواترنایزاسیون آن

سیده زهرا میرحسینی رودبارکی<sup>۱</sup>، الهه آقایی میبیدی<sup>۲</sup>، سید ولی حسینی<sup>۳\*</sup>

- دانشجوی کارشناسی‌ارشد فراآوری محصولات شیلاتی، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: [zahra.mirhoseini@ut.ac.ir](mailto:zahra.mirhoseini@ut.ac.ir)
- کارشناسی‌ارشد شیمی آلی، کارشناس آزمایشگاه، گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: [eliaaghaee1359@gmail.com](mailto:eliaaghaee1359@gmail.com)
- نویسنده مسئول، دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: [hosseinisv@ut.ac.ir](mailto:hosseinisv@ut.ac.ir)

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی- پژوهشی	کیتین از فراوان‌ترین بیوپلیمر بعد از سلولز می‌باشد که در دیواره سلولی قارچ، کویکول حشرات و در اسکلت بیرونی سخت‌پوستانی از جمله خرچنگ و میگو وجود دارد. از داستیله کردن کیتین، کیتوزان حاصل می‌شود که ویژگی‌های آن به شدت به درجه استیل‌زدایی و وزن مولکولی آن بستگی دارد. در واقع می‌توان گفت کیتوزان به عنوان فراوان‌ترین آمینو پلی‌ساکارید در طبیعت است که به‌عنوان ترکیبی غیرسمی نیز شناخته می‌شود. کیتوزان به دلیل خواص منحصر به فردش از جمله زیست‌سازگاری، زیست تخریب‌پذیری، فعالیت ضدباکتریایی و... بسیار مورد توجه قرار گرفته است. اما به دلیل پایین بودن میزان حلالیت آن در pHهای فیزیولوژیک امکان بهره‌مندی از بسیاری از خواص آن وجود ندارد. از همین رو تلاش‌های بسیاری برای تولید مشتقاتی از آن که قابلیت حلالیت در چنین شرایطی را داشته باشند، صورت گرفته است. یکی از مهم‌ترین روش‌های افزایش حلالیت کیتوزان، اصلاح شیمیایی آن است که با تکنیک موسوم به کواترنایز کردن انجام می‌شود. در این روش یک عامل اصلاحگر با برقراری یک پیوند کووالانسی با کربن شماره دو کیتوزان (C <sub>2</sub> ) باعث افزایش قابلیت انحلال‌پذیری آن در آب و در pHهای فیزیولوژیک می‌شود. در این مقاله، ضمن معرفی مجدد ویژگی‌های منحصر به فرد کیتوزان، روش‌های مختلف تهیه کیتوزان کواترنایز شده با استفاده از برخی از ترکیبات شیمیایی رایج مانند GTMAC، EPTMAC، CH <sub>3</sub> I و DMS مورد بررسی قرار گرفته و خصوصیات و کاربردهای کیتوزان کواترنایز شده تولیدی تشریح خواهد شد.
واژه‌های کلیدی: اسکلت سخت‌پوستان، اصلاح شیمیایی، کواترنایزاسیون، کیتوزان، کیتین	

استاد: میرحسینی رودبارکی، سیده زهرا، آقایی میبیدی، الهه، حسینی، سید ولی (۱۴۰۳). مروری بر معرفی کیتوزان و روش‌های مختلف کواترنایزاسیون آن. نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان، ۱۳ (۲)، ۱۴۲-۱۲۱.

DOI: 10.22069/japu.2024.22018.1840



© نویسندگان

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

### مقدمه

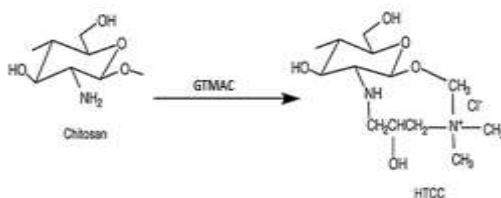
در سال ۱۸۱۱ برای اولین بار استخراج کیتین از قارچ توسط یک دانشمند فرانسوی به نام براکونوت (Braconnot) صورت گرفت (۱). این ماده در دیواره سلولی قارچ‌ها، کوتیکول حشرات و در اسکلت بیرونی سخت‌پوستان از جمله خرچنگ و میگو وجود دارد. حضور کیتین در پوسته میگو نقش حفاظتی را برای این موجود ایفا می‌کند و به دلیل وجود آنزیم تجزیه‌پذیر کیتوزاناز، به عنوان یک پلیمر طبیعی طبقه‌بندی می‌شود. کیتین شامل مونومرهای ۲-استامیدو-۲- $\beta$ -D-گلوکز (واحدهای N-استیل گلوکز آمین) می‌باشد که از طریق (۴→۱) $\beta$  به همدیگر پیوند داده شده است (۲). روگت (۱۸۵۹) از طریق فرآیند استیل‌زدایی کیتین در حضور NaOH، کیتوزان را تولید کرد. این ترکیب که به فرمول توصیفی پلی- $\beta$ -(۴→۱)-۲-آمینو-۲-D-گلوکز شناخته می‌گردد دارای ویژگی‌های خاصی می‌باشد که عمده آن به درجه استیل‌زدایی از کیتین و وزن مولکولی آن بستگی دارد (۳). در اصلاحات شیمیایی، کیتوزان ماده مفیدی است چون دارای گروه‌های آمین و هیدروکسیل فعال می‌باشد (۴). کیتوزان به دلیل خواص منحصر به فردش از جمله زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری، فعالیت ضدباکتریایی، فعالیت ضد توموری و غیرسمی بودن، برای تشکیل فیلم در زمینه پزشکی از جمله داروسازی، بسته‌بندی مواد غذایی، کشاورزی، تصفیه فاضلاب و... کاربرد دارد (۵، ۶). از آنجایی که در بیش‌تر نقاط جهان، منابع عمده اولیه تولید کیتین و کیتوزان (پوسته میگو و خرچنگ) را به عنوان زباله، دور می‌ریزند (۴)، بنابراین می‌توان با تمهیداتی اقدام به تولید کیتوزان به عنوان یک پلیمر کم‌هزینه، بی‌خطر و دوست‌دار محیط زیست کرد (۷). اما باید در نظر داشت که حلالیت کیتوزان در آب، قلیا و اکثر

حلال‌های آلی ضعیف است و به این دلیل تمام کاربردهای نام برده شده کیتوزان به وجود شرایط اندک اسیدی در محیط محدود می‌گردد (۸). از این‌رو، پژوهش‌گران به دنبال ارتقاء میزان حلالیت کیتوزان می‌باشند تا بتوان از قابلیت‌های متعدد این ماده ارزشمند حداکثر استفاده را برد. در حال حاضر روش‌های چندی برای اصلاح کیتوزان و تهیه مشتقاتی از آن به منظور برآورد هدف برشمرده، مورد استفاده قرار می‌گیرد که شامل آسیلاسیون، آلکیلاسیون، فسفریلاسیون، کربوکسیلاسیون و کواترنایزاسیون است (۹).

کواترنایزاسیون یکی از مهم‌ترین روش‌هایی است که برای افزایش حلالیت کیتوزان در آب و pHهای فیزیولوژیک به کار می‌رود. چهارتایی کردن کیتوزان شامل قرار دادن یک گروه آبدوست از طریق سه روش جایگزینی مستقیم آمونیوم چهارتایی، واکنش با ترکیبات اپوکسی که منجر به باز شدن حلقه می‌شود و N-آلکیلاسیون می‌باشد. کواترنایزاسیون با وارد کردن یک آمونیوم چهارتایی بر روی ساختار کیتوزان یا خارج از آن، از طریق واکنش‌های شیمیایی با گروه‌های آمینه و هیدروکسیل اولیه، تحت شرایط آزمایشی وسیع اتفاق می‌افتد به عبارت دیگر کواترنایز کردن تبدیل آمین به آمونیوم چهارتایی می‌باشد. در واقع در طی کواترنایزاسیون، یک عامل اصلاحگر با برقراری یک پیوند کووالانسی با C<sub>2</sub> ساختار کیتوزان باعث محلول شدن آن در آب می‌شود. کیتوزان کواترنایز شده به دلیل خصوصیات منحصر به فردش از جمله زیست‌سازگاری، تجزیه‌زیستی، فعالیت بیولوژیکی بالاتر نسبت به کیتوزان غیرکواترنایز شده و البته میزان سمیت کم‌تر (در مقایسه با کیتوزان) کاربردهای متعددی دارد (۱۰). با توجه به پژوهش‌های متعددی که طی سال‌های اخیر از طریق اصلاح شیمیایی

a. گلیسیدیل تری متیل آمونیوم کلرید GTMAC: GTMAC به عنوان یکی از پراستفاده‌ترین ماده مشتق‌کننده، برای سنتز N-(۲-هیدروکسی پروپیل)-۳-تری متیل آمونیوم کلرید کیتوزان (HTCC) یا HACC<sup>۱</sup>، استفاده شده است (شکل ۱). HTCC از واکنش بین کیتوزان و GTMAC در حضور آب، الکل قلیایی و یا اسید سنتز می‌شود. این محصول کاربردهای متعددی در صنایع مختلف دارد و پژوهش‌گران زیادی در این زمینه پژوهش‌هایی انجام داده‌اند (جدول ۱).

سطح کیتوزان به‌منظور افزایش قابلیت انحلال آن در pHهای فیزیولوژیک و آب شده است، و نظر به وجود ضرورت چنین نیازی در بین جامعه مصرف‌کنندگان آن (عمدتاً صنایع دارویی و بهداشتی)، مقاله حاضر بنا دارد تا به بررسی چهار مورد از موادی را که بیش‌تر از سایرین برای کوآترنایز کردن کیتوزان مورد استفاده قرار گرفته است از جمله GTMAC<sup>۱</sup>، EPTMAC<sup>۲</sup>، CH<sub>3</sub>I<sup>۳</sup> و DMS<sup>۴</sup> را مورد کنکاش قرار داده و خصوصیات هر ماده و کیتوزان کوآترنایز شده را بیان نماید.



شکل ۱- طرح واکنش کیتوزان چهارتایی (HTCC) (۱۱).

Figure 1. Reaction scheme of quaternary chitosan (HTCC) (11).

جدول ۱- نمونه‌هایی از پژوهش‌های انجام شده در خصوص کاربرد HTCC (کیتوزان کوآترنایز شده با GTMAC).

Table 1. Examples of research conducted regarding the use of HTCC (Quaternized chitosan with GTMAC).

منبع Source	کاربرد/هدف از تحقیق Application/purpose of the research	ردیف Row
(۱۲)	تهیه نمک آمونیوم چهارتایی محلول در آب کیتوزان و مطالعه اثرات میکروبیوستاتیک آن بر علیه یکسری باکتری‌ها/ فعالیت ضد باکتریایی بالاتر علیه استافیلوکوکوس اورئوس و اشیشیا کلی در شرایط قلیایی	1
(۱۳)	تهیه یک روش نساجی ضدمیکروبی بادوام از کیتوزان چهارتایی/ کاهش جمعیت و فعالیت استافیلوکوکوس اورئوس و اشیشیاکلی	2
(۱۰)	تهیه یک جاذب با پیوند نمک کیتوزان و گلوکارآلدئید / جاذب خوب برای حذف کروم (VI) از محلول آبی	3
(۱۴)	تهیه سیستم هیدروژل (HTCC / گلیسروفسفات) حساس به دما و pH / استفاده به عنوان حامل هوشمند دارو	4
(۱۵)	تهیه پلیمر HTCC جهت بررسی فعالیت ضدمیکروبی آن/فعالیت ضد باکتریایی علیه استافیلوکوک اورئوس، استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین و استافیلوکوک اپیدرمیدیس	5
(۱۱)	تهیه نانوکامپوزیت HTCC - بنتونیت جهت استفاده کم‌تر از HTCC / کاربرد در حذف کروم (VI) از محلول‌های آبی	6

- 1- Glycidyl trimethyl ammonium chloride
- 2- 2,3-Epoxypropyltrimethyl ammonium chloride
- 3- Methyl iodide
- 4- Dimethyl sulfate
- 5- N-(2-hydroxypropyl)-3-trimethylammonium chloride chitosan
- 6- Hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride chitosan

برای واکنش نیز گزینه بازی نخواهد بود و حدوداً زمان ۱۰ ساعته برای این موضوع کافی است (۱۱). در ایران نیز از این ماده جهت کواترنایز کردن کیتوزان استفاده کردند و سپس آن را در تهیه هیدروژلی جهت کاربرد در دارورسانی به چشم به کار بردند (۱۶).

#### بررسی خصوصیات کیتوزان کواترنایز شده با ماده

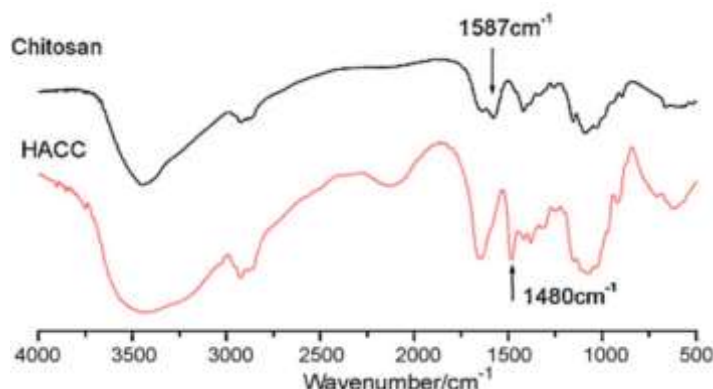
##### GTMAC

تست <sup>۲</sup>FITR: تست FTIR جهت تعیین گروه‌های عاملی (آمینو استیل، CH-OH) کیتوزان و معمولاً برای شناسایی وجود گروه‌های آمینه کواترنایز شده بر روی زنجیره‌های کیتوزان کواترنایز شده (HACC) مورد استفاده قرار می‌گیرد که برای این منظور نمونه (کیتوزان و یا کیتوزان کواترنایز شده) را به شکل قرص مخلوط با پتاسیم برمید آماده‌سازی و سپس در شرایط یکسان در طول موج  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  از آن‌ها طیف FTIR تهیه می‌شود که طبق مطالعه استفان و همکاران (۲۰۱۲)، پیک‌های مهم و قابل مشاهده در نمونه کیتوزان عبارتند از باندهای جذبی در ناحیه  $3480-3440$ ،  $3270-3260$  و  $2960-2878$  که مربوط به گروه‌های NH، OH و CH می‌باشند و باندهای اطراف  $1640$ ،  $1560$  و  $1380$  به آمید I، II و III اختصاص دارند، در حدود  $1155$  ساختار کششی نامتقارن C-O-C و در  $1034$  ساختار کششی C-O و در  $700-670$  گروه عاملی OH مشاهده می‌شود (۱۷). همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود در طیف HACC، خمش N-H در ناحیه حدود  $1587\text{ cm}^{-1}$  به دلیل تغییر جزئی آمین اولیه کیتوزان به آمین ثانویه، ضعیف می‌شود. پیک جدیدی تقریباً در ناحیه  $1480\text{ cm}^{-1}$  مشاهده می‌شود که مربوط به گروه‌های متیل موجود در قسمت آمونیوم‌دار ترکیب است و در واقع با خمش نامتقارن زاویه‌ای گروه‌های متیل هیدروژن چهارتایی مطابقت دارد. پیک‌های مشخصه

باید در نظر داشت که در فرآیند کواترنایز کردن یکی از فاکتورهایی که باید در نظر گرفته شود، درجه جایگزینی ( $DS^1$ ) است که در میزان حلالیت کیتوزان کواترنایز شده تأثیر دارد. مقدار GTMAC مورد استفاده، دمای محیط واکنش و مدت زمان واکنش از جمله پارامترهایی هستند که بر درجه جایگزینی مؤثر هستند. افزایش مقدار GTMAC باعث بهبود درجه جایگزینی می‌شود اما از طرفی اگر مقدار GTMAC اضافه شده به محلول کیتوزان بیش از حد افزایش یابد، باعث کاهش درجه جایگزینی می‌شود. در همین راستا پژوهشی توسط رویها و همکاران (۲۰۱۲) انجام شده که مطلب فوق را تأیید می‌کند. رویها و همکاران (۲۰۱۲) در آزمایش خود از مقادیر مختلفی از ماده GTMAC استفاده کردند و دریافتند که مقدار  $15$  گرم GTMAC به عنوان سطح بهینه در آزمایش است و استفاده بیش از این مقدار، باعث کاهش درجه جایگزینی می‌شود. هم‌چنین آن‌ها علت بروز این کاهش را به پلیمریزاسیون بین ملکولی GTMAC مربوط دانستند. از طرفی دیگر نتایج حاصله نشان داد که در دماهای نسبتاً بالا، به دلیل بهبود فعالیت کیتوزان، واکنش بین کیتوزان و GTMAC راحت‌تر انجام می‌شود و بنابراین درجه جایگزینی بیش‌تر می‌شود. در این پژوهش با افزایش دما تا  $80$  درجه سانتی‌گراد، درجه جایگزینی افزایش یافت که به حدود  $86$  درصد رسید اما دمای بالاتر از آن باعث کاهش درجه جایگزینی شد که علت آن را به تجزیه کیتوزان در دمای بالاتر از  $80$  درجه سانتی‌گراد مربوط دانستند. در مورد مدت زمان واکنش نیز هرچه مدت زمان طولانی‌تر باشد، چون ترکیبات واکنش‌گر فرصت بیش‌تری جهت واکنش در اختیار دارند، بنابراین واکنش کامل‌تر انجام شده و در نتیجه درجه جایگزینی نیز افزایش می‌یابد. البته یادآور می‌گردد که مدت زمان

هیدروکسیل در حوالی طول موج  $3400\text{ cm}^{-1}$  پیک وسیع‌تری نسبت به کیتوزان نشان می‌دهد و این بیانگر آن است که GTMAC ترکیب مناسبی برای اصلاح کیتوزان جهت افزایش حلالیت آن در pH های فیزیولوژیک می‌باشد (۱۰، ۱۱، ۱۳ و ۱۴).

تقریباً بین  $1079\text{ cm}^{-1}$  و  $1154\text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاشات پل‌های اکسیژنی ساکاریدی ساختاری که شامل ساختار کششی C-O است در HACC تغییری نکرد که وجود گروه‌های آمین چهارتایی در سایت‌های  $\text{-NH}_2$  در زنجیره‌های کیتوزان را اثبات می‌کند. طیف مربوط به HACC به دلیل افزایش تعداد گروه‌های

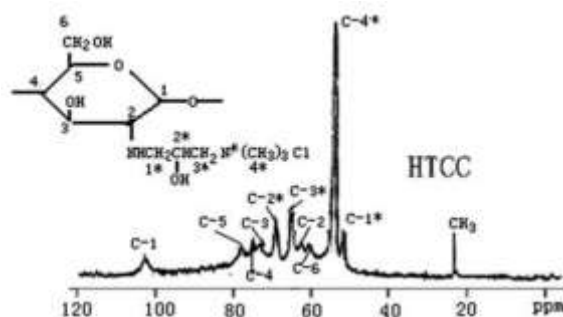


شکل ۲- طیف FTIR کیتوزان و HACC (۱۵).

Figure 2. FTIR spectrum of chitosan and HACC (15).

مشاهده می‌شود مواجه کیتوزان با ترکیب GTMAC در محیط واکنش منجر به جایگزینی ترکیب مذکور با هیدروژن موجود در گروه عاملی  $\text{NH}_2$  زنجیره‌های کیتوزان شده است که نتیجه این عمل در پیک ppm  $6\text{W}/8$  (C-2\*) نشان داده شده است (گروه آمینو کوآترنایز شده در سایت‌های  $\text{-NH}_2$  روی زنجیره‌های کیتوزان) (۱۱).

تست  $^{13}\text{C-NMR}$  در حال حاضر مؤثرترین تکنیک برای تعیین ساختار مشتقات کیتوزان، ارزیابی آن با کمک تکنیک NMR می‌باشد. از طریق این تکنیک به تشخیص میزان جایگزینی GTMAC و ایجاد گروه‌های آمین چهارتایی در ساختار کیتوزان اقدام می‌گردد. شکل ۳ نمونه‌ای از این تست را بر روی کیتوزان کوآترنایز شده نشان می‌دهد. همان‌طوری که

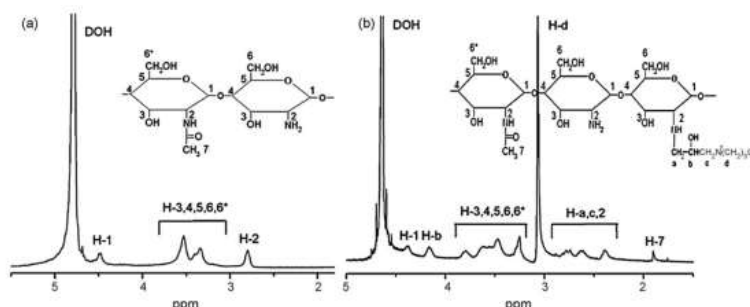


شکل ۳- طیف  $^{13}\text{C-NMR}$  کیتوزان کوآترنایز شده (۱۱).

Figure 3.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of quaternized chitosan (11).

وجود دارد و این نشان‌دهنده کوآترنایز شدن کیتوزان است که این پیک در طیف کیتوزان دیده نمی‌شود (شکل ۴) (۱۵).

تست  $^1\text{H-NMR}$ : طبق مطالعه پنگ و همکاران (۲۰۱۰)، در طول موج ۳/۲۱ ppm یک پیک مشخص هیدروژن که مربوط به گروه‌های تری متیل آمونیوم  $(-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3)$  است، در طیف کیتوزان کوآترنایز شده



شکل ۴- طیف  $^1\text{H-NMR}$  کیتوزان (a) و کیتوزان چهارتایی شده (b) (۱۵).

Figure 4.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of chitosan (a) and quaternized chitosan (b) (15).

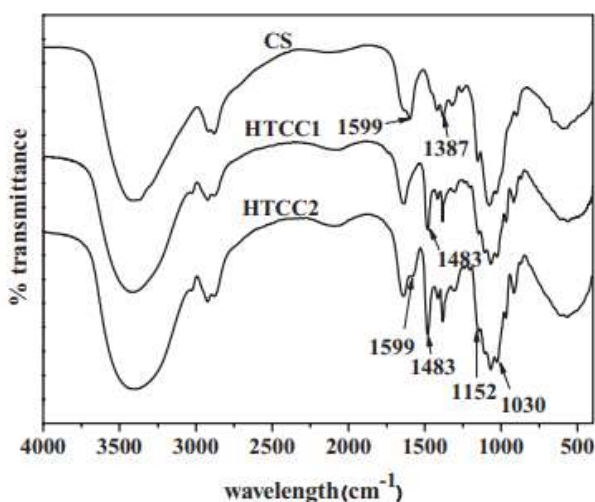
کوآترنایز کردن کیتوزان تحت گرمایش معمولی نیز انجام شده که نسبت به گرمایش حاصل از مایکروویو، زمان‌بر بوده و نیاز به انرژی بیش‌تری هم دارد (۱۹). در این روش اصلاح شیمیایی کیتوزان با EPTMAC باعث جایگزینی تک N در موقعیت C<sub>2</sub> کیتوزان می‌شود (۲۰) در این مورد نیز درجه جایگزینی تا حد زیادی تحت‌تأثیر نسبت‌های مولی EPTMAC به کیتوزان می‌باشد که به‌طورکلی با توجه به مطالعات انجام شده، درجه جایگزینی (DS) در HTCC تولید شده با گرمایش مرسوم به‌طور میانگین ۹۵ درصد و با گرمایش مایکروویو حدود ۸۷ درصد می‌باشد. جدول ۲ برخی از پژوهش‌های انجام‌شده در رابطه با کوآترنایز کردن کیتوزان با EPTMAC را نشان می‌دهد.

بررسی خصوصیات کیتوزان کوآترنایز شده با ماده EPTMAC  
تست FTIR: لیو و همکاران (۲۰۱۰) بر روی حالت‌های مختلفی از کیتوزان (CS) و کیتوزان کوآترنایز شده (با شیوه حرارت‌دهی مرسوم HTCC1

b. ۲ و ۳- اپوکسی پروپیل تری متیل آمونیوم کلرید (EPTMAC) به‌عنوان یک ماده مشتق‌کننده برای سنتز کلرید کیتوزان N- (۲- هیدروکسی پروپیل)- (۳- تری متیل آمونیوم کلرید کیتوزان (HTCC))، استفاده می‌شود. در این روش ابتدا کیتوزان در ایزوپروپیل الکل پراکنده شده تا جایی که pH آن به ۹ برسد، هم‌زمان EPTMAC در آب حل شده و سپس در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به سوسپانسیون کیتوزان اضافه می‌گردد و سپس به‌مدت ۶ ساعت در همین حالت، بهم زده می‌شود. آن‌گاه مخلوط واکنش با استن رسوب داده می‌شود. پس از انجام اعمال فوق، محلول دیالیز شده و سپس با سیستم فریزدرایر خشک می‌شود. بدین شکل کیتوزان کوآترنایز شده حاصل می‌شود، برای کوتاه شدن زمان واکنش به جای گرمایش مرسوم، از تابش امواج مایکروویو نیز می‌توان استفاده کرد (۱۸). در واقع تابش مایکروویو به‌دلیل گرمایش سریع و نفوذ انرژی، روشی کارآمدتر و سازگار با محیط زیست برای به‌دست آوردن کیتوزان محلول در آب می‌باشد. البته

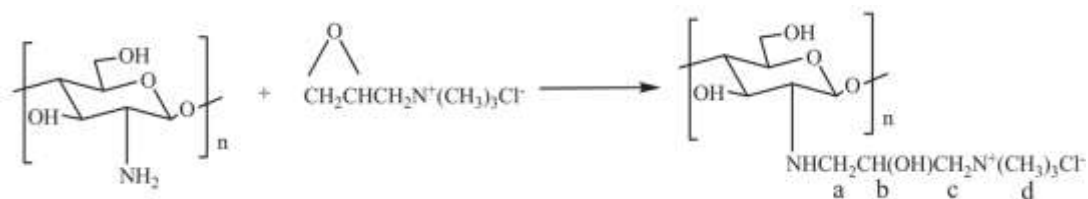
کوآترنایز شده در طول موج  $1483\text{ cm}^{-1}$  پیک‌های ظاهر شد که متعلق به گروه‌های متیل می‌باشد. پیک‌های موجود در طول موج  $1030$  و  $1152$  مربوط به الکل اولیه و ثانویه در هر دو نمونه کیتوزان کوآترنایز شده نسبت به کیتوزان اصلی تغییر نکردند. بر اساس اطلاعات به دست آمده نتیجه گرفتند که اصلاح شیمیایی کیتوزان با EPTMAC باعث جایگزینی تک N در موقعیت  $C_2$  کیتوزان شده و تهیه کیتوزان کوآترنایز شده با شیوه حرارت‌دهی مرسوم بهتر از روش مایکروویو می‌باشد (شکل ۶) (۱۸).

در مقایسه با حرارت‌دهی با مایکروویو (HTCC2) تست FTIR را انجام دادند (شکل ۵). نتایج نشان داد که پیک مشخصه مربوط به ارتعاش خمشی  $NH_2$  در کیتوزان ( $1599\text{ cm}^{-1}$ ) در طیف HTCC2 ضعیف شد اما در طیف HTCC1 ناپدید شد. همچنین در طیف HTCC2، پیک ظاهر شده در ناحیه  $1599\text{ cm}^{-1}$  نسبت به طیف HTCC1 شدت کمتری دارد که نشان‌دهنده این است که درجه جایگزینی نمک آمونیوم کوآترنایز شده در کیتوزان تحت تابش مایکروویو کمتر است. در دو نمونه کیتوزان



شکل ۵- طیف FTIR کیتوزان و دو کیتوزان چهارتایی شده (۱۸).

Figure 5. FTIR spectrum of chitosan and two quaternized chitosans (18).



شکل ۶- طرح واکنش کیتوزان چهارتایی (HTCC) (۱۸).

Figure 6. Reaction scheme of quaternary chitosan (HTCC) (18).



جدول ۲- نمونه‌هایی از تحقیقات پژوهش‌گران در رابطه با کوآترنایز کردن کیتوزان با EPTMAC.

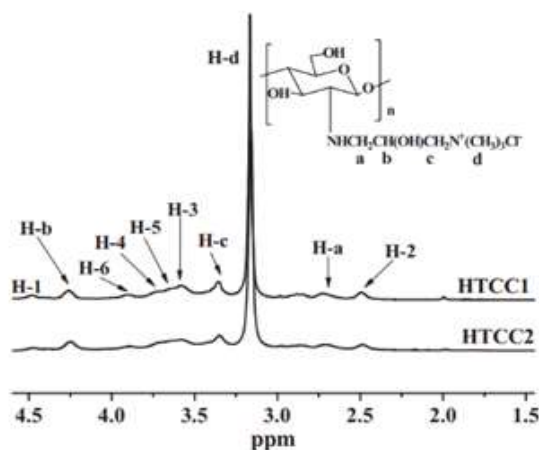
Table 2. Examples of researchers' research regarding the quaternization of chitosan with EPTMAC.

منبع Source	کاربرد/هدف از تحقیق Application/purpose of the research	ردیف Row
(۲۱)	بهبود ویژگی‌های آزادسازی رنگ آبی درخشان از دانه‌های کلسیم آلزینات / کپسوله کردن دانه‌های کلسیم آلزینات با کیتوزان کوآترنایز شده	1
(۲۲)	تهیه نانوذرات کیتوزان کوآترنایز شده-آلزینات/ استفاده برای تحویل خوراکی پروتئین به دلیل ایجاد بار سطحی مثبت و افزایش زمان تماس مواد فعال با اپی‌تلیوم و افزایش جذب	2
(۲۳)	پیوند متقابل بین پلی‌وینیل‌الکل کوآترنایز شده و کیتوزان کوآترنایز شده و گلوکارآلدئید/ استفاده به عنوان معرف اتصال عرضی برای تهیه غشا کامپوزیتی تبادل‌آنیونی	3
(۲۴)	تهیه نانوکامپوزیت QC/REC (کیتوزان کوآترنایز شده (QC)، رکتوریت (REC) / استفاده به عنوان حامل‌های غبروبروسی	4
(۲۵)	تهیه نانوکامپوزیت QCMC/REC (کیتوزان کوآترنایز شده ترکیب شده با کربوکسی متیل (QCMC)، رکتوریت (REC)) / گسترش کاربرد آن به عنوان حامل‌های آزادسازی کنترل شده دارو و عامل ضد میکروبی به دلیل وجود پیوند هیدروژنی و برهمکنش‌های الکترواستاتیکی بین این دو	5
(۲۶)	ترکیب کیتوزان کوآترنایز شده و پلی‌آکریل‌آمید (PAM) و پلی‌استایرن (PS) / تهیه غشای تبادل‌آنیونی با استحکام بالا	6
(۲۷)	پیوند سه نوع نمک آمونیوم چهارتایی از جمله DMDEPAC <sup>۱</sup> ، EPTMAC و DMOEPAC <sup>۲</sup> به ذرات اتریفیکاسیون سلولز نانوکریستالی (NCC) <sup>۳</sup> و سپس اضافه کردن ذرات NCC اصلاح شده به کیتوزان / تولید فیلم‌های نانوکامپوزیتی دارای استحکام کششی بهبود یافته، توانایی ضدباکتریایی بالاتر و پتانسیل بالا برای کاربرد در بسته‌بندی مواد غذایی	7
(۲۸)	تهیه مجموعه‌ای از غشاهای تبادل‌آنیونی از کیتوزان کوآترنایز شده با EPTMAC / تشکیل یک کانال انتقال یون عالی جهت بهبود کارایی مهاجرت -OH	8

و H-6 نسبت داده شدند. از سوی لیو و همکاران (۲۰۱۰) نتیجه مشابه با لوباکی و همکاران (۱۹۹۱) و لی و همکاران (۲۰۰۴) در خصوص این‌که جابه‌جایی شیمیایی در مقادیر ppm ۲/۷۱، ۴/۲۵، ۳/۳۵ متعلق به H-a، H-b و H-c از گروه‌های جایگزین هستند، به‌دست آوردند (۱۸، ۲۰ و ۲۹).

تست H-NMR: با توجه به شکل ۷، دو طیف H-NMR مربوط به HTCC به دست آمده با گرمای مرسوم و با روش تابش مایکروویو مشابه می‌باشند و قوی‌ترین پیک در ppm ۳/۱۴ است که مربوط به پروتون‌های متیل نمک آمونیوم کوآترنایز شده می‌باشد و پیک‌های ۴/۵۱، ۲/۴۸، ۳/۵۹، ۳/۷۱، ۳/۶۵ و ۳/۸۹ ppm به ترتیب به H-1، H-2، H-3، H-4، H-5

- 1- N,N-dimethyl-N-dodecyl-N-(1,2-epoxypropyl) ammonium chloride
- 2- N,N-dimethyl-N-octadecyl-N-(1,2-epoxypropyl) ammonium chloride
- 3- Nanocrystalline cellulose

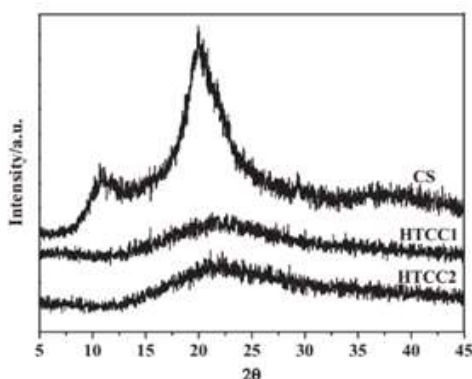


شکل ۷- طیف H-NMR دو کیتوزان چهارتایی شده (۱۸).

Figure 7. H-NMR spectrum of two quaternized chitosans (18).

حلقه پیرانوئیدی در کیتوزان پیوند زده می‌شود و باعث از بین رفتن تقارن و نظم زنجیره کیتوزان و پیوند هیدروژنی درون مولکولی بین ظرفیت  $\text{NH}_2$  و OH می‌شود (۳۰). همین‌طور در خصوص اثر تابش مایکروویو باید توجه داشت که امواج مایکروویو تبلور را با شدت کم‌تری نسبت به گرمایش معمول از بین می‌برد و به همین دلیل است که پیک پراش گسترده HTCC1 کمی ضعیف‌تر از HTCC2 است و علت آن می‌تواند این باشد که زمان مصرف شده و درجه جایگزینی نمک‌های آمونیوم کوآترنایز شده در روش استفاده از تابش مایکروویو کم‌تر است (۱۸).

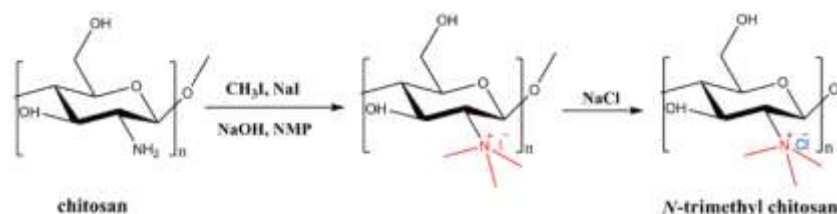
تست XRD: آنالیز XRD بر مبنای پراش پرتو ایکس و بر اساس قانون براگ (Bragg law) شکل گرفته است و عموماً برای مطالعه مواد با ساختار کریستالی استفاده می‌شود. طبق مطالعات انجام شده و نتایج حاصل در مورد آنالیز XRD، همان‌طور که در شکل ۸ مشخص شده است کیتوزان دارای دو پیک کریستالی مشخص در  $20^\circ$  و  $11^\circ$  می‌باشد و کیتوزان کوآترنایز شده با EPTMAC دارای یک پیک پراش گسترده در  $22^\circ$  می‌باشد که نشان‌دهنده یک ساختار آمورف است و دلیل آن، این است که گروه آمونیوم چهارتایی کلرید آمونیوم ۳،۲- اپوکسی پروپیل تری متیل بر روی سایت‌های  $\text{NH}_2$  در موقعیت  $\text{C}_2$



شکل ۸- الگوهای XRD کیتوزان و دو کیتوزان چهارتایی شده (۱۸).

Figure 8. XRD patterns of chitosan and two quaternized chitosans (18).

توسط موزارلی و تانفانی فرآیند آماده‌سازی کامل  $N,N,N$ -تری متیل کیتوزان کلرید (TMC)<sup>۱</sup> گزارش شد (۳۱). از آنجایی که TMC دارای حلالیت خوب در طیف وسیعی از مقادیر pH، فعالیت ضدباکتریایی و خواص جذب بالا و... می‌باشد، پژوهش‌گران زیادی سعی در تولید آن کرده‌اند. علت بالا بودن میزان حلالیت TMC نسبت به کیتوزان اصلی این است که تعداد گروه‌های آمینه آب‌دوست در زنجیره اصلی پس از کوآترنایز شدن در TMC بیش‌تر می‌شود (شکل ۹).



شکل ۹- طرح واکنش کیتوزان چهارتایی (TMC) (۳۰).

Figure 9. Reaction scheme of quaternary chitosan (TMC) (30).

(۲۰۰۲) گزارش دادند که استفاده از NaOH به جای دی متیل آمینو پیریدین (DMAP)<sup>۴</sup> به‌عنوان پایه باعث تولید TMC با درجه جانشینی بالا می‌شود و همین‌طور باعث می‌شود که با افزایش دما، سرعت تخریب افزایش یابد (۳۴). DMAP مشتق پیریدین است و دارای خاصیت بازی است و استفاده از DMAP به‌عنوان پایه باعث تولید کیتوزان کوآترنایز شده با درجه جانشینی پایین می‌شود و با افزایش دما، هیچ تخریبی مشاهده نمی‌شود و اگر از NaOH و DMAP به‌طور هم‌زمان استفاده شود باعث تولید محصول با درجه جانشینی پایین همراه با تخریب می‌شود. کورتی و همکاران (۲۰۰۳) نیز متیلاسیون کیتوزان را با متیل یدید انجام دادند، آن‌ها نیز این واکنش را در حضور NaOH انجام دادند و دریافتند که میانگین درجه کوآترنایزاسیون کیتوزان

c. یدومتان ( $CH_3I$ ): متیل یدید یا یدومتان ( $CH_3I$ )، نوعی ترکیب آلی است و در فرآیندهای سنتز آلی به‌عنوان دهنده متیل عمل می‌کند.  $CH_3I$  یکی از مواد مورد استفاده جهت کوآترنایز کردن کیتوزان نیز می‌باشد. متیل یدید در آب نامحلول است و کیتوزان اولیه هم فقط در pH اسیدی محلول است اما با اختلاط این دو، کیتوزان کوآترنایز شده حاصل، در هر pH ای محلول خواهد بود. تری متیل کیتوزان یدید اولین بار در سال ۱۹۷۷ تعریف شد و در سال ۱۹۸۵

به همین منظور دومرد و همکاران (۱۹۸۶) گزارش دادند که TMC مستقیماً از واکنش بین کیتوزان و متیل یدید ( $CH_3I$ ) در حلال NMP<sup>۲</sup> (این حلال مایعی بی‌رنگ است که با آب و اکثر حلال‌های آلی رایج قابل اختلاط است، در واقع حلالی است که توانایی حل کردن مواد مختلف را دارد که افزودن این حلال به نفع واکنش چهارتایی شدن کیتوزان می‌باشد) در دمای اتاق تحت شرایط قلیایی به‌دست می‌آید، در تهیه این محصول همراه با متیل یدید، NaOH نیز اضافه می‌شود (۳۲). هاممن و همکاران (۲۰۰۱) نیز برای تهیه کیتوزان کوآترنایز شده به این روش، این مراحل را طی کردند، آن‌ها کیتوزان را در NMP و  $NaI$  در شرایط تاریک حل کردند و سپس NaOH و  $CH_3I$  را اضافه کردند (۳۳). سنیمان و همکاران

- 1-  $N,N,N$ -trimethylchitosan
- 2-  $N$ -methyl-2-pyrrolidone
- 3- Sodium iodide

4- Dimethylaminopyridin

تحت تأثیر شرایط واکنش، قلیایی بودن محیط و در دسترس بودن متیل‌یدید می‌باشد (۳۵).

از سویی دیگر در استفاده از  $\text{CH}_3\text{I}$  برای کواترنایز کردن کیتوزان، ابتدا کیتوزان در متانول ۴۲ درصد حل شده و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت تحت هم‌زدن ثابت قرار می‌گیرد، سپس  $\text{NaCl}$  و  $\text{CH}_3\text{I}$  در فواصل ۴ ساعت در نسبت‌های مشخص تحت هم‌زدن مداوم اضافه شده و مخلوط حاصل در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت رفلاکس شده و کیتوزان کواترنایز شده با استن رسوب داده می‌شود و سپس در شرایط خلا در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک می‌گردد و در نهایت کیتوزان کواترنایز شده حاصل می‌شود و سپس با استفاده از کیتوزان کواترنایز شده حاصل و ترکیب آن با  $\text{NMPC}^1$  (برای تهیه  $\text{NMPC}$ ، محلول کیتوزان در اسیداستیک یخچالی تهیه شده و اسید فسفریک محلول در آب به صورت قطره‌ای با هم‌زدن مداوم اضافه شده و سپس دمای ظرف واکنش با رفلاکس به ۷۰ درجه افزایش یافت و فرمالدئید نیز به صورت قطره‌ای به مدت یک ساعت اضافه شد) و پلی‌وینیل الکل (PVA) در محیط آبی، غشاهای کامپوزیتی نانومتخلخل باردار را تهیه کردند و سپس برای ایجاد منافذ در ماتریکس غشا، این غشای تهیه شده در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد در متانول ژله شدند (۷). با توجه به این‌که استفاده از کامپوزیت‌های پلیمری زیستی از جمله  $\text{NMPC-QC/PVA}$  ارزان و بی‌خطر برای محیط زیست هستند و از طرفی دارای رسانایی یونی و قابلیت نگهداری آب می‌باشند، استفاده از کیتوزان و کواترنایز کردن آن و کاربردش در تهیه غشاهای کامپوزیتی مورد استقبال قرار گرفته است. هم‌چنین بریتو و آسیس (۲۰۰۷) از  $\text{TMC}$  به دلیل خواص ضدباکتریایی و زیست‌سازگاری که با محیط زیست

دارد، برای تشکیل فیلم و بسته‌بندی مواد غذایی استفاده کردند و پی‌بردند که این نوع بسته‌بندی، سرعت بی‌کیفیت شدن ماده غذایی در طی نگهداری را کاهش می‌دهد (۳۶). در زمینه پزشکی نیز کاربرد  $\text{TMC}$  مورد بررسی قرار گرفت و دیده شد که  $\text{TMC}$  می‌تواند به عنوان یک حامل ژن غیرویروسی با کارایی انتقال بالاتر، به دلیل داشتن وزن ملکولی بالا عمل کند، در حالی‌که کارایی انتقال کیتوزان اصلی به دلیل پایین بودن وزن ملکولی‌اش، کم است (۳۷). بعد از تهیه کیتوزان کواترنایز شده با استفاده از  $\text{CH}_3\text{I}$ ، گروهی از پژوهش‌گران جهت اطمینان از ارتقای خواص کیتوزان کواترنایز شده نسبت به کیتوزان اصلی و جهت اطلاع از علت این ارتقا، یکسری از فاکتورهای مربوط به آن را مورد بررسی قرار دادند، که در این‌جا بخشی از آن‌ها بیان شده است.

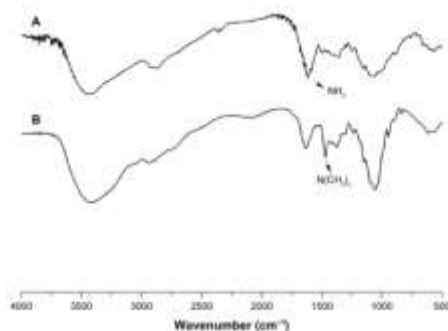
حلالیت  $\text{TMC}$  تحت تأثیر درجه استیلاسیون، وزن ملکولی کیتوزان اصلی، درجه جایگزینی و  $\text{-O}$ -متیلاسیون می‌باشد، طوری‌که هرچه درجه استیلاسیون کم‌تر باشد، احتمال تشکیل نمک آمونیوم چهارتایی در طول متیلاسیون کم‌تر می‌شود در نتیجه حلالیت کاهش می‌یابد (۳۸)، از طرفی موزارلی و تانفانی نیز با پژوهش خود این مسأله را اثبات کردند (۳۱). در مورد ارتباط میزان حلالیت با درجه جایگزینی که مهم‌ترین شاخص ارزیابی حلالیت در آب است نیز هرچه این جایگزینی در هنگام ترکیب کیتوزان با  $\text{CH}_3\text{I}$  بیش‌تر باشد، میزان حلالیت نیز بیش‌تر خواهد بود، اما به طور میانگین با توجه به پژوهش‌های صورت گرفته درجه جایگزینی (DS) با استفاده از این ماده حدود ۴۴ درصد خواهد بود (۳۹). در مورد درصد دی‌متیلاسیون نیز پژوهش‌ها نشان داد که افزایش درصد دی‌متیلاسیون بر میزان حلالیت تأثیر منفی دارد چرا که  $\text{N,N}$ -دی متیل کیتوزان نامحلول ایجاد می‌شود (۴۰). بنابراین باید توجه داشت که در فرآیند تهیه  $\text{TMC}$ ،

حرارتی کیتوزان، با وارد کردن جانشین‌ها به گروه آمینه کاهش می‌یابد (۴۲). با توجه به موفقیت‌آمیز بودن پروژه‌های انجام شده و ارتقای خواص TMC نسبت به کیتوزان اصلی، استفاده از کوآترنایز کردن کیتوزان با ماده  $\text{CH}_3\text{I}$  می‌تواند برای اهداف مختلفی توصیه شود.

#### بررسی خصوصیات کیتوزان کوآترنایز شده با ماده

##### $\text{CH}_3\text{I}$

تست FTIR: هو و همکاران (۲۰۱۳) گزارش دادند که در طیف FTIR کیتوزان کوآترنایز شده (TMC) (شکل ۱۰) در طول موج  $1473 \text{ cm}^{-1}$  پیک ارتعاش تغییر شکل جدید  $\text{N-CH}_3$  ظاهر می‌شود که نشان‌دهنده این است که هیدروژن  $\text{NH}_2$  در کیتوزان تا حدی جایگزین شده است که این خود تأییدی بر تشکیل TMC می‌باشد (۴۳).



شکل ۱۰- طیف FTIR کیتوزان (A) و کیتوزان چهارتایی شده (TMC) (B) (۴۳).

Figure 10. FTIR spectrum of chitosan (A) and quaternized chitosan (TMC) (B) (43).

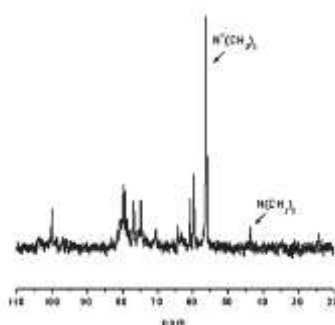
تست  $\text{H-NMR}$  و  $\text{C-NMR}$ : طبق مطالعات انجام شده (شکل ۱۲)، مجموعه پیک‌های  $4/5$  تا  $5/5 \text{ ppm}$  مربوط به اتم هیدروژن متصل به  $\text{C}_1$  حلقه گلوکوپیرانوز می‌باشد و پیک‌های موجود در محدوده  $2/8$  تا  $3/3 \text{ ppm}$  به اتم‌های هیدروژن گروه‌های متیل مربوط به گروه‌های آمین دی و تری متیله نسبت داده شدند (۳۵).

نسبت مونومتیلاسیون و دی متیلاسیون باید کاهش یابد.

در مورد خواص ضدباکتریایی TMC نیز طبق آزمایش‌های انجام شده، فعالیت ضدباکتریایی TMC بیش‌تر از کیتوزان اصلی است چون در مورد فعالیت ضدباکتریایی، مکانیسم اثر به این صورت است که بین بار مثبت در گروه آمین کیتوزان و بار منفی در سطح سلول باکتری برهمکنش ایجاد می‌شود و از آنجایی که بعد از کوآترنایز شدن، بار مثبت افزایش می‌یابد برای همین خواص ضدباکتریایی TMC بیش‌تر است (۴۱).

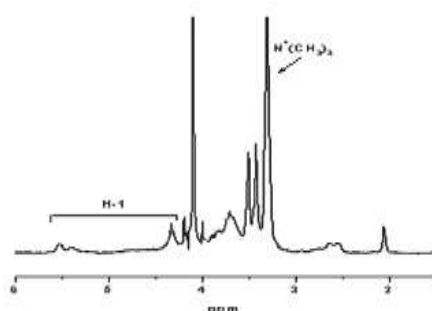
در مورد پایداری حرارتی، TMC خواص آبدوستی بیش‌تری نسبت به کیتوزان اصلی دارد و وقتی محتوای آب افزایش یابد، برهمکنش زنجیره‌ای TMC ضعیف می‌شود بنابراین پایداری حرارتی کاهش می‌یابد. پس می‌توانیم نتیجه بگیریم که پایداری

تست  $\text{H-NMR}$  و  $\text{C-NMR}$ : در طیف  $\text{C-NMR}$  نمونه کیتوزان کوآترنایز شده با  $\text{CH}_3\text{I}$  (شکل ۱۱)  $44$  و  $56$  به ترتیب به گروه‌های آمینه دی و تری متیله  $\text{N}$ ،  $\text{N}$ ،  $\text{N}$ -تری متیل کیتوزان نسبت داده می‌شود که بسیار غنی از گروه‌های آمین چهارتایی (گروه‌های آمین تری متیله) می‌باشد و در مورد طیف



شکل ۱۱- طیف C-NMR کیتوزان کوآترنایز شده (۳۵).

Figure 11. C-NMR spectrum of quaternized chitosan (35).



شکل ۱۲- طیف H-NMR کیتوزان کوآترنایز شده (۳۵).

Figure 12. H-NMR spectrum of quaternized chitosan (35).

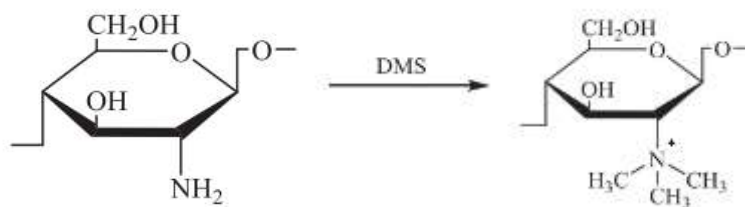
توسعه کاربردهای آن به دلیل افزایش حلالیت‌اش، در زمینه‌های مختلفی از آن استفاده کردند. متیلاسیون شدید کیتوزان باعث تولید مشتق  $N,N,N$ -تری متیل (TMCh) می‌شود که با داشتن بارهای مثبت دائمی در زنجیره‌ها به عنوان نتیجه چهارتایی شدن گروه‌های آمینه در موقعیت  $C_2$  در ساختار کیتوزان مشخص می‌شود. TMCh را می‌توان با افزودن کوآلانس‌ی یک جایگزین حاوی یک گروه آمونیوم چهارتایی یا با چهارتایی کردن گروه‌های آمینه پلیمر اصلی سنتز کرد (شکل ۱۳) (۳۵ و ۴۴).

بریتو و آسیس (۲۰۰۷) برای تهیه TMC با استفاده از DMS، سوسپانسیونی از کیتوزان و مقداری DMS و آب دیونیزه را به‌عنوان پایه در نظر گرفتند و سپس مقداری NaCl و NaOH را به سوسپانسیون اضافه کردند و سپس با همزن مغناطیسی، این مواد را با هم

**d. دی متیل سولفات (DMS):** با وجود کارآمد بودن این ماده یک معرف بسیار فرار، سرطان‌زا و گران‌قیمت است از این‌رو ماده دیگری برای کوآترنایز کردن کیتوزان و در واقع برای تهیه TMC به کار می‌رود که دی متیل سولفات (DMS) نام دارد (۴۴). DMS به عنوان یک عامل متیلاسیون نسبت به  $CH_3I$  کارآمدتر و مقرون به صرفه‌تر است و سمیت کم‌تر و نقطه جوش بالاتری نیز دارد و برخلاف  $CH_3I$  که طی واکنش به NMP نیاز دارد، این معرف در طی واکنش به هیچ حلالی نیاز ندارد، در واقع استفاده از DMS برای تهیه کیتوزان کوآترنایز شده با خلوص بالاتر به کار می‌رود، زیرا در TMC حاصل از به‌کارگیری  $CH_3I$ ، جدا کردن کامل یون‌های هالید از محلول دشوار است (۳۸). در همین راستا گروهی از پژوهش‌گران با استفاده از DMS، کیتوزان را کوآترنایز کردند و با

به مدت زمان مشخص مخلوط کرده و زمانی که مخلوط واکنش به دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد رسید، رفلاکس اعمال شد و مشتقات به دست آمده را به مدت سه روز برای دیالیز در کیسه دیالیز قرار دادند و محصول نهایی را با استن رسوب دادند و پس از شستشوی کامل، مشتقات فیلتر شده و در خلاء خشک کردند. آن‌ها در طی این آزمایش به این نتیجه رسیدند که شدت کوترنایز شدن کیتوزان به دما و زمان وابسته است، طوری که بیش‌ترین درجه جایگزینی برای کیتوزانی است که کوترنایزاسیون آن در دمای اتاق به مدت ۶ ساعت انجام شده است (۴۴). آبشزاده و همکاران (۲۰۱۱) نیز در ایران، از همین روش و از همین ماده، جهت تهیه کیتوزان کوترنایز شده استفاده کردند و سپس آن را در تهیه یک سیستم هیدروژل متشکل از مشتقات کیتوزان و پلی وینیل پیرولیدون به کار بردند، که این هیدروژل کاندید مناسبی برای تهیه سیستم‌های تحویل دارو و ... می‌باشد (۴۵). جیا و همکاران (۲۰۰۱) نیز از کیتوزان کوترنایز شده

به این روش به عنوان یک عامل ضد باکتری استفاده کردند که در واقع این فعالیت به دلیل برهم‌کنش یونی بین بارهای مثبت کیتوزان و بارهای منفی سطح باکتری می‌باشد (۴۶). از طرفی طبق پژوهش‌های انجام‌شده بر TMC پی بردند که این یک پلی‌الکترولیت محلول در آب است که باعث افزایش جذب روده‌ای داروهای هیدروفیل و ماکرومولکول می‌شود (۴۷). با توجه به مطالعات انجام شده، به طور میانگین درجه جایگزینی (DS) در صورت استفاده از DMS، ۵۲/۵ درصد می‌باشد. طبق پژوهش‌های صورت گرفته، کیتوزان کوترنایز شده حاصل از به‌کارگیری دی متیل سولفات مانند کیتوزان کوترنایز شده حاصل از  $\text{CH}_3\text{I}$  کاربردهای فراوانی در زمینه‌های مختلف دارد. از طرفی طبق این توضیحات می‌توان به این نتیجه رسید که دی متیل سولفات به‌عنوان یک عامل متیلانت جایگزین ارزان‌تر و با سمیت کم‌تر برای تهیه کیتوزان کوترنایز شده می‌باشد.

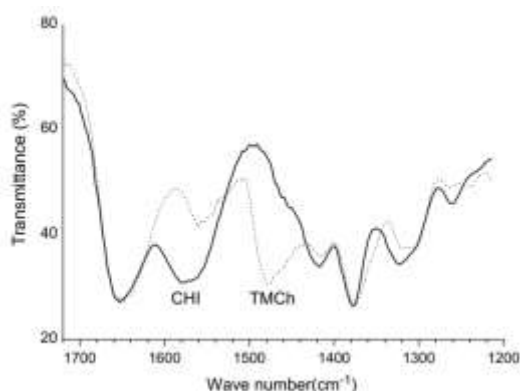


شکل ۱۳- طرح واکنش کیتوزان چهارتایی (TMCh) (۳۸).

Figure 13. Reaction scheme of quaternary chitosan (TMCh) (38).

بررسی خصوصیات کیتوزان کوترنایز شده با ماده DMS تست FTIR: طبق مطالعه انجام گرفته و مقایسه طیف FTIR کیتوزان کوترنایز شده با کیتوزان، مشخص شد که بین این دو تفاوت وجود دارد که نشان‌دهنده متیلاسیون کیتوزان است. در طیف کیتوزان کوترنایز شده در طول موج  $1475 \text{ cm}^{-1}$  پیکی وجود دارد که به تغییر شکل زاویه‌ای نامتقارن پیوندهای C-H گروه‌های متیل نسبت داده می‌شود که این پیک در طیف کیتوزان وجود ندارد، از طرفی پیک مربوط به تغییر شکل زاویه‌ای پیوند N-H گروه‌های آمینه در هر دو طیف وجود دارد که در کیتوزان در طول موج  $1577 \text{ cm}^{-1}$  و در کیتوزان کوترنایز شده در طول موج  $1559 \text{ cm}^{-1}$  دیده می‌شود که باید در نظر گرفت به دلیل N- متیلاسیون این پیک در طیف کیتوزان کوترنایز شده ضعیف‌تر است (شکل ۱۴) (۴۸).

بررسی خصوصیات کیتوزان کوترنایز شده با ماده DMS تست FTIR: طبق مطالعه انجام گرفته و مقایسه طیف FTIR کیتوزان کوترنایز شده با کیتوزان، مشخص شد که بین این دو تفاوت وجود دارد که نشان‌دهنده متیلاسیون کیتوزان است. در طیف کیتوزان کوترنایز شده در طول موج  $1475 \text{ cm}^{-1}$  پیکی وجود دارد که به تغییر شکل زاویه‌ای نامتقارن پیوندهای

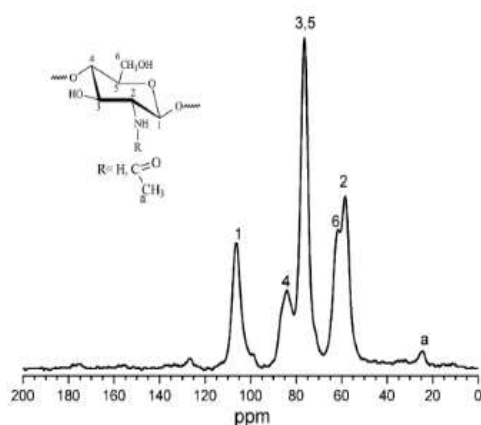


شکل ۱۴- طیف FTIR کیتوزان (—) و کیتوزان چهارتایی شده (---) (TMCh) (۴۸).

Figure 14. FTIR spectrum of chitosan (—) and quaternized chitosan (TMCh) (---) (48).

نمونه‌ای بیش‌تر باشد، شدت پیک در ۲۴ ppm بالاتر است (۴۹). از طرفی در صورت بالا بودن درجه استیلاسیون، در ۱۷۵ ppm نیز پیکی ظاهر خواهد شد که به‌دلیل وجود یک اتم کربن در گروه کربونیل می‌باشد، اما در مطالعه بریتو و آسیس (۲۰۰۷) به‌دلیل کم بودن درجه استیلاسیون، این پیک مشاهده نشد (۴۴).

تست  $C-NMR$ : در نمونه کیتوزان (شکل ۱۵)، پیک ۲۴/۴ ppm به اتم کربن بخش‌های متیل گروه‌های استامیدو نسبت داده شده است و دو پیک در ۶۰ ppm مربوط به  $C_6$  و  $C_2$  می‌باشد و پیک در ۷۶/۴ ppm مربوط به  $C_5$  و  $C_3$  می‌باشد و پیک در ۸۴ ppm  $C_4$  به نسبت داده شده و پیک در ۱۰۶/۲ ppm مربوط به  $C_1$  است. نکته‌ای که باید به آن توجه کرد این است که هرچه درجه استیلاسیون



شکل ۱۵- طیف  $C-NMR$  کیتوزان (۴۴).

Figure 15.  $C-NMR$  spectrum of chitosan (44).

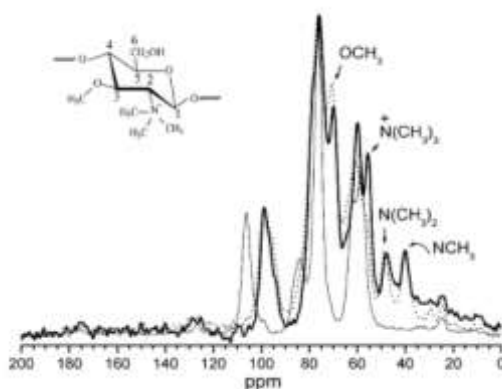
گروه‌های  $N,N$ -دی متیله و  $N$ -متیله - مونو متیله نسبت داده شد (۴۴). کورتی و همکاران (۲۰۰۳) نیز در ۴۴ ppm پیکی مشاهده کردند و آن را به گروه‌های

بعد از کواترنایز کردن، تغییراتی در طیف  $C-NMR$  ایجاد شد (شکل ۱۶) که همان‌طور در شکل می‌بینید پیک‌های ۴۰ ppm و ۴۸/۵ ppm به ترتیب به اتم‌های کربن



دقیقه (T15M) انجام شده است در شکل ۱۶ نمایش داده شده است که شدت پیک در ppm ۵۵/۶ برای نمونه R6H بیش‌تر است یعنی در دمای اتاق درجه جایگزینی بیش‌تر است. از آن‌جایی که پیک کواترنایز شده T15M با پیک‌های کربنی گلوکوپیرانوز C<sub>2</sub> و C<sub>6</sub> در ppm ۶۰ هم‌پوشانی دارند می‌توانیم نتیجه بگیریم که درجه کواترنایز شدن در T15M نسبت به R6H پایین‌تر است. در ppm ۷۰ پیک دیگری نیز مشاهده می‌کنید که برای نمونه T15M شدیدتر است و آن را به اتم کربن سایت‌های O-متیلاسیون نسبت دادند که چنین نتیجه‌ای اثر منفی استفاده از دما در واکنش را نشان می‌دهد (۴۴).

N,N-دی متیله نسبت دادند اما به دلیل پایین بودن وضوح طیف قادر به تشخیص پیک گروه N-مونو متیله نبودند (۳۵). در سال ۲۰۰۷ بریتو و آسیس در مطالعه خود به نتایجی در خصوص پیک ppm ۳۵/۹ (آمین‌های نوع دوم) و ppm ۴۷/۵ (آمین‌های نوع سوم) رسیدند (۴۴). هولاپا و همکاران (۲۰۰۴) طی پژوهش خود دریافتند که پیک در ppm ۵۵/۶ معادل سه کربن از گروه‌های N,N,N-تری متیله می‌باشد (۵۰) که در سال ۲۰۰۷ بریتو و آسیس نیز به همین نتیجه رسیدند (۴۴). تفاوت بین نمونه‌ای که متیلاسیون در دمای محیط به مدت ۶ ساعت (R6H) و نمونه‌ای که متیلاسیون در دمای ۷۰ درجه به مدت ۱۵

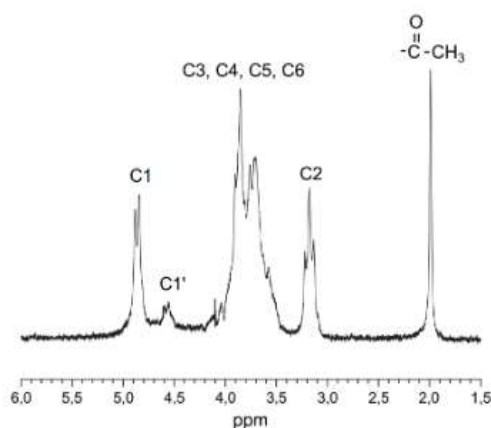


شکل ۱۶- طیف C-NMR از نمونه‌های R6H (—) و T15M (...). طیف کیتوزان (-) برای مقایسه اضافه شده است (۴۴).

Figure 16. C NMR spectrum of R6H (—) and T15M (...) samples. The spectrum of chitosan (-) is added for comparison (44).

می‌باشد، پیک در ppm ۳/۱۸ مربوط به هیدروژن متصل به کربن ۲ حلقه گلوکوپیرانوز، پیک در ppm ۱/۹۹ مربوط به اتم‌های هیدروژن بخش متیل گروه‌های استامیدو می‌باشد (۴۴).

تست H-NMR در طیف مربوط به نمونه کیتوزان (شکل ۱۷) پیک‌های بین ۴/۵ تا ۵ ppm مربوط به هیدروژن متصل به کربن آنومریک ۱ است، پیک‌های بین ۳/۴ تا ۴ ppm مربوط به هیدروژن‌های متصل به اتم‌های کربن ۳، ۴، ۵ و ۶ واحد گلوکوپیرانوز

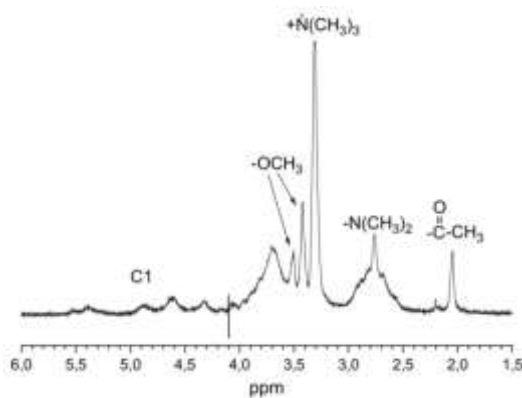


شکل ۱۷- طیف H-NMR کیتوزان (۴۴).

Figure 17. H-NMR spectrum of chitosan (44).

هیدروژن یک گروه متیل به نیتروژن کواترنایز شده می‌باشد و از نسبت مساحت زیر این پیک که نسبت داده شده به اتم هیدروژن متصل به  $C_1$  می‌باشد، می‌توان مقادیر درجه جایگزینی را به دست آورد (۳۵، ۴۴ و ۴۸).

طبق مطالعاتی که انجام شد (شکل ۱۸) بعد از کواترنایز شدن در ناحیه بین ۲/۴۷ و ۳/۳۷ ppm شواهدی بر مبنای وقوع  $N$ -متیلاسیون وجود دارد و علی‌رغم این نتایج فقط پیک ۳/۳ ppm مستقیماً با پدیده کواترنایز شدن مرتبط است که مربوط به اتصال



شکل ۱۸- طیف H-NMR کیتوزان کواترنایز شده (۴۴).

Figure 18. H-NMR spectrum of quaternized chitosan (44).

که روش کواترنایزاسیون (چهارتایی کردن) یکی از مناسب‌ترین آن‌ها است. کواترنایزاسیون با وارد کردن یک آمونیوم چهارتایی بر روی ساختار کیتوزان یا خارج از آن، از طریق واکنش‌های شیمیایی با گروه‌های آمین و هیدروکسیل اولیه، تحت شرایط آزمایشی وسیع اتفاق می‌افتد. در این مقاله به تشریح

### نتیجه‌گیری

در کشور ایران منابع فراوانی از پوست میگو جهت تولید کیتوزان در دسترس می‌باشد که کاربردهای متنوعی در صنایع مختلف دارد. اما همانطوری‌که بیان شد، برای بهره‌بردن از تمامی قابلیت‌های کیتوزان نیازمند به اصلاح سطح آن است

در متیل‌دار کردن مقدار بار مثبت به میزان بیشتری افزایش پیدا کرده در نتیجه فعالیت ضدباکتریایی بالاتری دارد. در مقایسه بین  $\text{CH}_3\text{I}$  و  $\text{DMS}$  نیز،  $\text{DMS}$  کارآمدتر و به صرفه‌تر است چرا که  $\text{CH}_3\text{I}$  فرار، سرطان‌زا و گران می‌باشد در حالی که  $\text{DMS}$  سمیت کم‌تر و نقطه جوش بالاتری دارد و برخلاف  $\text{CH}_3\text{I}$ ، برای انجام واکنش به حلال نیازی ندارد. از طرفی کیتوزان کوآترنایز شده حاصل از به‌کارگیری  $\text{DMS}$ ، خلوص بالاتری دارد زیرا جدا کردن کامل یون‌های هالید از محلول در  $\text{TMC}$  حاصل از استفاده از  $\text{CH}_3\text{I}$  دشوار است. با وجود این، پژوهش‌های اخیر به‌سمت استفاده از دی‌متیل‌کربنات ( $\text{DMC}$ )<sup>1</sup> به‌عنوان یک عامل متیلاسیون کم‌هزینه و سازگار با محیط زیست مطرح شده است که می‌تواند آینده تولید کیتوزان کوآترنایز شده را به‌طور کامل پوشش دهد.

چهار ماده شیمیایی پرکاربرد در کوآترنایز کردن کیتوزان (شامل  $\text{GTMAC}$ ،  $\text{EPTMAC}$ ،  $\text{CH}_3\text{I}$  و  $\text{DMS}$ ) پرداخته شد. با توجه به مطالعات صورت گرفته، با این‌که میزان درجه جایگزینی در کیتوزان کوآترنایز شده با  $\text{EPTMAC}$  بالاتر است اما به‌دلیل گران بودن این ماده و از طرفی سمی بودن آن، توصیه به استفاده از آن نمی‌شود و هم‌چنین کیتوزان کوآترنایز شده با این ماده نسبت به کیتوزان کوآترنایز شده با مواد دیگر، عملکرد ضعیف‌تری دارد. بر اساس پژوهش‌های انجام شده کیتوزان کوآترنایز شده که از واکنش با  $\text{CH}_3\text{I}$  و یا  $\text{DMS}$  حاصل می‌شود، نسبت به کیتوزان کوآترنایز شده که از واکنش  $\text{GTMAC}$  و یا  $\text{EPTMAC}$  حاصل می‌شود، فعالیت ضدباکتریایی بالاتری در برابر باکتری‌ها دارد که این فعالیت به‌علت برهمکنش بین بار مثبت در گروه آمینو کیتوزان و بار منفی در سطح سلول باکتری می‌باشد که

## منابع

1. Patrúlea, V., Ostafe, V., Borchard, G., & Jordan, O. (2015). Chitosan as a starting material for wound healing applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 97, 417-426.
2. Ramya, R., Sudha, P. N., & Mahalakshmi, J. (2012). Preparation and characterization of chitosan binary blend. *Int. J. Sci. Res. Publ.* 2 (10), 1-9.
3. Chillo, S., Suriano, N., Lamacchia, C., & Del Nobile, M. A. (2009). Effects of additives on the rheological and mechanical properties of non-conventional fresh handmade tagliatelle. *Journal of Cereal Science*, 49 (2), 163-170.
4. Yamada, M., & Honma, I. (2004). A Biopolymer Composite Material as an Anhydrous Proton-Conducting Membrane. *Angewandte Chemie International Edition*, 43 (28), 3688-3691.
5. Du, W. L., Xu, Z. R., Han, X. Y., Xu, Y. L., & Miao, Z. G. (2008). Preparation, characterization and adsorption properties of chitosan nanoparticles for eosin Y as a model anionic dye. *Journal of Hazardous Materials*, 153 (1-2), 152-156.
6. Dehghani, S., Hosseini, S. V., & Regenstein, J. M. (2018). Edible films and coatings in seafood preservation: A review. *Food Chemistry*, 240, 505-513.
7. Saxena, A., Kumar, A., & Shahi, V. K. (2006). Preparation and characterization of N-methylene phosphonic and quaternized chitosan composite membranes for electrolyte separations. *Journal of Colloid and Interface Science*, 303 (2), 484-493.
8. Avadi, M. R., Sadeghi, A. M. M., Tahzibi, A., Bayati, K. H., Pouladzadeh, M., Zohuriaan-Mehr, M. J., & Rafiee-Tehrani, M. (2004). Diethylmethyl chitosan as an antimicrobial agent: Synthesis, characterization and antibacterial effects. *European Polymer Journal*, 40 (7), 1355-1361.

1- Dimethyl carbonate

9. Rinaudo, M. (2010). New way to crosslink chitosan in aqueous solution. *European Polymer Journal*, 46 (7), 1537-1544.
10. Spinelli, V. A., Laranjeira, M. C., & Fávere, V. T. (2004). Preparation and characterization of quaternary chitosan salt: adsorption equilibrium of chromium (VI) ion. *Reactive and Functional Polymers*, 61 (3), 347-352.
11. Ruihua, H., Bingchao, Y., Zheng, D., & Wang, B. (2012). Preparation and characterization of a quaternized chitosan. *Journal of Materials Science*, 47, 845-851.
12. Qin, C., Xiao, Q., Li, H., Fang, M., Liu, Y., Chen, X., & Li, Q. (2004). Calorimetric studies of the action of chitosan-N-2-hydroxypropyl trimethyl ammonium chloride on the growth of microorganisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 34 (1-2), 121-126.
13. Lim, S. H., & Hudson, S. M. (2004). Application of a fiber-reactive chitosan derivative to cotton fabric as an antimicrobial textile finish. *Carbohydrate Polymers*, 56 (2), 227-234.
14. Wu, J., Su, Z. G., & Ma, G. H. (2006). A thermo- and pH-sensitive hydrogel composed of quaternized chitosan/glycerophosphate. *International Journal of Pharmaceutics*, 315 (1-2), 1-11.
15. Peng, Z. X., Wang, L., Du, L., Guo, S. R., Wang, X. Q., & Tang, T. T. (2010). Adjustment of the antibacterial activity and biocompatibility of hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride chitosan by varying the degree of substitution of quaternary ammonium. *Carbohydrate Polymers*, 81 (2), 275-283.
16. Pakzad, Y., Fathi, M., Omidi, Y., Mozafari, M., & Zamanian, A. (2020). Synthesis and characterization of timolol maleate-loaded quaternized chitosan-based thermosensitive hydrogel: A transparent topical ocular delivery system for the treatment of glaucoma. *International Journal of Biological Macromolecules*, 159, 117-128.
17. Beil, S., Schamberger, A., Naumann, W., Machill, S., & van Pée, K. H. (2012). Determination of the degree of N-acetylation (DA) of chitin and chitosan in the presence of water by first derivative ATR FTIR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 87 (1), 117-122.
18. Luo, J., Wang, X., Xia, B., & Wu, J. (2010). Preparation and characterization of quaternized chitosan under microwave irradiation. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 47 (9), 952-956.
19. Ge, H. C., & Luo, D. K. (2005). Preparation of carboxymethyl chitosan in aqueous solution under microwave irradiation. *Carbohydrate Research*, 340 (7), 1351-1356.
20. Li, H., Du, Y., Wu, X., & Zhan, H. (2004). Effect of molecular weight and degree of substitution of quaternary chitosan on its adsorption and flocculation properties for potential retention-aids in alkaline papermaking. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 242 (1-3), 1-8.
21. Shi, X. W., Du, Y. M., Li, J., Su, X. L., & Yang, J. H. (2006). Release characteristics of brilliant blue from calcium-alginate beads coated with quaternized chitosan. *Journal of Microencapsulation*, 23 (4), 405-415.
22. Li, T., Shi, X. W., Du, Y. M., & Tang, Y. F. (2007). Quaternized chitosan/alginate nanoparticles for protein delivery. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 83 (2), 383-390.
23. Xiong, Y., Liu, Q. L., Zhang, Q. G., & Zhu, A. M. (2008). Synthesis and characterization of cross-linked quaternized poly (vinyl alcohol)/chitosan composite anion exchange membranes for fuel cells. *Journal of Power Sources*, 183 (2), 447-453.
24. Wang, X., Pei, X., Du, Y., & Li, Y. (2008). Quaternized chitosan/rectorite intercalative materials for a gene delivery system. *Nanotechnology*, 19 (37), 375102.

25. Wang, X., Liu, B., Ren, J., Liu, C., Wang, X., Wu, J., & Sun, R. (2010). Preparation and characterization of new quaternized carboxymethyl chitosan/rectorite nanocomposite. *Composites Science and Technology*, 70 (7), 1161-1167.
26. Wang, J., & He, R. (2015). Formation and evaluation of interpenetrating networks of anion exchange membranes based on quaternized chitosan and copolymer poly (acrylamide)/ polystyrene. *Solid State Ionics*, 278, 49-57.
27. Liu, Y., Li, M., Qiao, M., Ren, X., Huang, T. S., & Buschle-Diller, G. (2017). Antibacterial membranes based on chitosan and quaternary ammonium salts modified nanocrystalline cellulose. *Polymers for Advanced Technologies*, 28 (12), 1629-1635.
28. Zeng, X., Wang, L., Wang, J., & Qu, Z. (2021). Construction of ordered OH-migration channels in anion exchange membrane by synergizes of cationic metal-organic framework and quaternary ammonium groups. *International Journal of Energy Research*, 45 (7), 10895-10911.
29. Loubaki, E., Ourevitch, M., & Sicsic, S. (1991). Chemical modification of chitosan by glycidyl trimethylammonium chloride. Characterization of modified chitosan by <sup>13</sup>C- and <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *European Polymer Journal*, 27 (3), 311-317.
30. Chang, C., Chen, S., & Zhang, L. (2011). Novel hydrogels prepared via direct dissolution of chitin at low temperature: structure and biocompatibility. *Journal of Materials Chemistry*, 21 (11), 3865-3871.
31. Muzzarelli, R. A., & Tanfani, F. (1985). The N-permethylation of chitosan and the preparation of N-trimethyl chitosan iodide. *Carbohydrate Polymers*, 5 (4), 297-307.
32. Domard, A., Rinaudo, M., & Terrassin, C. (1986). New method for the quaternization of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 8 (2), 105-107.
33. Hamman, J. H., Stander, M., & Kotze, A. F. (2002). Effect of the degree of quaternisation of N-trimethyl chitosan chloride on absorption enhancement: in vivo evaluation in rat nasal epithelia. *International Journal of Pharmaceutics*, 232 (1-2), 235-242.
34. Snyman, D., Hamman, J. H., Kotze, J. S., Rollings, J. E., & Kotze, A. F. (2002). The relationship between the absolute molecular weight and the degree of quaternisation of N-trimethyl chitosan chloride. *Carbohydrate Polymers*, 50 (2), 145-150.
35. Curti, E., de Britto, D., & Campana-Filho, S. P. (2003). Methylation of chitosan with iodomethane: effect of reaction conditions on chemoselectivity and degree of substitution. *Macromolecular Bioscience*, 3 (10), 571-576.
36. de Britto, D., & de Assis, O. B. (2007). Synthesis and mechanical properties of quaternary salts of chitosan-based films for food application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41 (2), 198-203.
37. Xu, T., Xin, M., Li, M., Huang, H., & Zhou, S. (2010). Synthesis, characteristic and antibacterial activity of N, N, N-trimethyl chitosan and its carboxymethyl derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 81 (4), 931-936.
38. Wu, M., Long, Z., Xiao, H., & Dong, C. (2016). Recent research progress on preparation and application of N, N, N-trimethyl chitosan. *Carbohydrate Research*, 434, 27-32.
39. Verheul, R. J., Amidi, M., van der Wal, S., van Riet, E., Jiskoot, W., & Hennink, W. E. (2008). Synthesis, characterization and in vitro biological properties of O-methyl free N, N, N-trimethylated chitosan. *Biomaterials*, 29 (27), 3642-3649.
40. Jintapattanakit, A., Mao, S., Kissel, T., & Junyaprasert, V. B. (2008). Physicochemical properties and biocompatibility of N-trimethyl chitosan: effect of quaternization and dimethylation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70 (2), 563-571.
41. Je, J. Y., & Kim, S. K. (2006). Chitosan derivatives killed bacteria by disrupting

- the outer and inner membrane. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (18), 6629-6633.
42. Holme, H. K., Foros, H., Pettersen, H., Dornish, M., & Smidsrød, O. (2001). Thermal depolymerization of chitosan chloride. *Carbohydrate Polymers*, 46 (3), 287-294.
43. Hu, X. J., Liu, Y., Zhou, X. F., Zhu, Q. L., Bei, Y. Y., You, B. G., ... & Fan, Y. J. (2013). Synthesis and characterization of low-toxicity N-caprinoyl-N-trimethyl chitosan as self-assembled micelles carriers for osthole. *International Journal of Nanomedicine*, 3543-3558.
44. de Britto, D., & Assis, O. B. (2007). A novel method for obtaining a quaternary salt of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 69 (2), 305-310.
45. Abashzadeh, S., Hajimiri, M. H., Atyabi, F., Amini, M., & Dinarvand, R. (2011). Novel physical hydrogels composed of opened-ring poly (vinyl pyrrolidone) and chitosan derivatives: Preparation and characterization. *Journal of Applied Polymer Science*, 121 (5), 2761-2771.
46. Jia, Z., & Xu, W. (2001). Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. *Carbohydrate Research*, 333 (1), 1-6.
47. Kotzé, A. F., Lueßen, H. L., de Leeuw, B. J., Verhoef, J. C., & Junginger, H. E. (1998). Comparison of the effect of different chitosan salts and N-trimethyl chitosan chloride on the permeability of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Journal of Controlled Release*, 51 (1), 35-46.
48. de Britto, D., & Campana-Filho, S. P. (2004). A kinetic study on the thermal degradation of N, N, N-trimethylchitosan. *Polymer Degradation and Stability*, 84 (2), 353-361.
49. Duarte, M. L., Ferreira, M. C., Marvao, M. R., & Rocha, J. (2001). Determination of the degree of acetylation of chitin materials by <sup>13</sup>C CP/MAS NMR spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 28 (5), 359-363.
50. Holappa, J., Nevalainen, T., Savolainen, J., Soininen, P., Elomaa, M., Safin, R., ... & Järvinen, T. (2004). Synthesis and characterization of chitosan N-betainates having various degrees of substitution. *Macromolecules*, 37 (8), 2784-2789.