Polymerization
Quarterly, 2015
Volume 5, Number 1
Pages 27-32
ISSN: 2252-0449

Determination of the Degree of Deacetylation in Chitosan and its Salts by Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

Farshid Ziaee
Iran Polymer and Petrochemical Institute, P.O. Box: 14975-112, Tehran, Iran

Received: 26 April 2014, Accepted: 20 May 2014

Abstract

Chemical reactions on the structure of polymers, especially natural polymers result in production of new properties. One of these cases is chitin deacetylation reaction for production of chitosan. Property and application of chitosan with extensive uses in food, cosmetic, healing and drug industries depend on the degree and percent of acetyl groups or in other words the degree deacetylation (DDA). Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (^{1}HNMR) is the simplest, most accurate and fastest method for quantitative determination of the degree of deacetylation in chitosan and its salts. In this method, the degree of deacetylation, ranging from 50 to 100%, with acceptable accuracy and repeatability is determined by a small amount of material without undergoing degradation and simple calculation. In addition, if the molecular weight of polymer is low, this test method can determine the number average degree of polymerization (DP_n) in chitosan and chitosan salts for use in biomedical and pharmaceutical applications.

Key Words

nuclear magnetic resonance spectroscopy,
chitosan,
chitin,
deacetylation,
characterization

(*) To whom correspondence should be addressed.
E-mail: f.ziaee@ippi.ac.ir

بسپارش
فصلنامه علمی- ترویجی
سال پنجم، شماره ۱
صفحه ۳۲-۲۷، ۱۳۹۴
ISSN: 2252-0449

تعیین درجه استیل‌زدایی کیتوسان و نمک‌های آن با طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته پروتون

فرشید ضیایی
تهران، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، صندوق پستی ۱۱۲-۱۴۹۷۵

دریافت: ۱۳۹۳/۲/۶، پذیرش: ۱۳۹۳/۲/۳۰

چکیده

واکنش روی ساختار پلیمرها، به‌ویژه پلیمرهای طبیعی، باعث به وجود آمدن خواص و کاربردهای جدید می‌شود. یکی از این موارد، انجام واکنش استیل‌زدایی کیتین و تبدیل آن به کیتوسان است. خواص و کاربرد پلیمر کیتوسان، که مصارف گسترده‌ای در صنایع غذایی، آرایشی، بهداشتی و دارویی دارد، به درصد گروه‌های استیل وابسته است و باید درصد گروه‌های استیل یا به عبارتی درجه استیل‌زدایی (DDA) آن مشخص باشد. از ساده‌ترین، دقیق‌ترین و سریع‌ترین روش‌های اندازه‌گیری مقدار گروه‌های استیل‌زدایی شده در کیتوسان و نمک‌های آن، روش طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته پروتون (^{1}HNMR) است. در این روش، با مقدار کم ماده و بدون تخریب آن و انجام محاسبات ساده می‌توان درصد گروه‌های استیل‌زدایی شده را در محدوده ۵۰ تا ۱۰۰٪ از DDA و با دقت و تکرارپذیری قابل قبولی معین کرد. به علاوه، در حالت کوتاه بودن زنجیر پلیمر، این روش می‌تواند درجه پلیمر شدن متوسط عددی کیتوسان و نمک‌های آن را برای مصارف زیست‌دارویی و پزشکی پوشش دهد.

فرشید ضیایی

واژگان کلیدی

طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته،
کیتوسان،
کیتین،
استیل‌زدایی،
شناسایی

* مسئول مکاتبات، پیام‌نگار:
f.ziaee@ippi.ac.ir

مقدمه

کیتین، از پلیمرهای طبیعی و از خانواده پلی ساکاریدهاست. با عمل استیل‌زدایی از ساختار آن، کیتوسان به‌دست می‌آید [۱]. این پلیمر نوآرایی شده و نمک‌های آن کاربردهای متنوعی در صنایع مختلف از جمله فرایندهای غذایی، محصولات آرایشی، مدیریت پسماند، تصفیه آب، التیام زخم (wound healing)، ترمیم بافت (tissue repair) و سامانه رهایش دارو دارد. بیشتر خواص فیزیکی و شیمیایی این پلیمر طبیعی به مقدار قابل توجهی به درجه استیل‌زدایی آن وابسته است. بنابراین، مقدار کیتوسان استیل‌زدایی شده در نوع مصرف و کاربرد آن حائز اهمیت است. در این ارتباط، در منابع علمی روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری درجه استیل‌زدایی معرفی شده است. این روش‌ها شامل تیتر کردن [۳-۲]، طیف‌سنجی زیرقرمز [۷-۴]، طیف‌سنجی فرابنفش [۹-۸]، تجزیه عنصری [۱۰]، طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته [۱۸-۱۱]، آبکافت گروه استیل [۱۹] و کروماتوگرافی ژل‌تراوایی [۲۰] هستند.

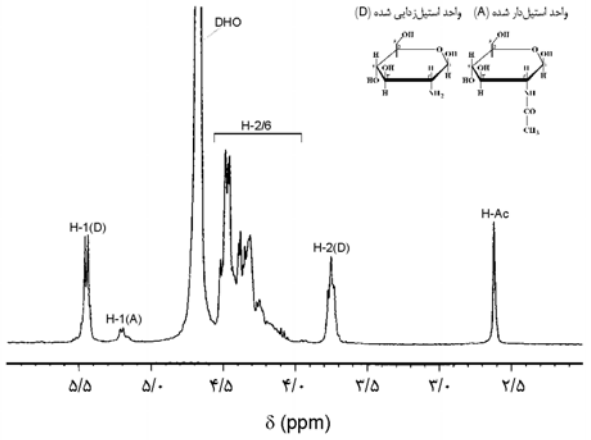
در این مقاله سعی شده است تا روش طیف‌سنجی ^{1}HNMR و قابلیت آن به عنوان مهم‌ترین ابزار مطالعه کمی و کیفی ساختار پلیمرها معرفی شود. برای کارآمدی هر چه بیشتر این مقاله، از مثال‌های پلیمرهای کیتوسان و دو نمک آن به نام‌های کیتوسان کلرید و کیتوسان گلوتامات استفاده شده است. اصولاً مطالعه هسته‌های پروتون (هیدروژن) با طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته، روش مهمی برای تعیین کمی ریزساختار مولکول‌ها و زنجیرهای پلیمری به‌شمار می‌رود. دستگاه‌های جدید NMR همراه با روش زیرقرمز تبدیل فوریه (FTIR) امکان به‌دست آوردن طیف‌های پروتون با قابلیت زیاد را آسان می‌کند. خوشبختانه مشاهده رزونانس‌های هسته‌های پروتون به دلیل فراوانی طبیعی و نسبت گردش مغناطیسی هسته هیدروژن زیاد، بسیار ساده است. اصولاً پژوهشگران ترجیح می‌دهند تا در گام نخست استفاده از این دستگاه، از ^{1}HNMR استفاده کنند و سپس طیف‌گیری سایر هسته‌ها را انجام دهند. گرچه محدوده جابه‌جایی شیمیایی این هسته اندک و در حدود ۱۲ ppm است. اما، در حالت عدم هم‌پوشانی پیک‌ها، می‌توان با تعداد پویش کم به طیف‌های با قابلیت دست یافت و محاسبات دقیقی را انجام داد [۲۱].

درجه استیل‌زدایی در کیتوسان

همان‌گونه که اشاره شد، ساده‌ترین، دقیق‌ترین و سریع‌ترین روشی که بتوان مقدار استیل‌زدایی کیتوسان را اندازه‌گیری کرد، روش ^{1}HNMR است. اصولاً در این روش نیازی به خالص‌سازی و حذف رطوبت، که در سایر روش‌ها دیده می شود، وجود ندارد و می‌توان کیتوسان‌هایی با درصد گروه استیل متفاوت، به‌ویژه در محدوده ۵۰ تا ٪۱۰۰ را اندازه گیری کرد. برای طیف‌گیری ^{1}HNMR از روش رزونانس مغناطیسی هسته مایع (liquid NMR) استفاده می‌شود و حلال مناسب برای کیتوسان، دوتریم اکسید است. برای انحلال بهتر، می‌توان از دوتریم کلرید (DCl) نیز استفاده کرد. مقدار دوتریم کلرید به مقدار گروه‌های آمینو در پلیمر بستگی دارد و برای سهولت در انحلال استفاده می‌شود. برای انحلال بهتر باید مقدار دوتریم کلرید بیشتری نسبت به واحدهای آمینو انتخاب شود. بنابراین، با دوتریم کلرید می‌توان کیتوسان‌هایی با وزن مولکولی و ترکیب درصد زیاد گروه‌های استیل زدایی شده حتی تا ٪۱۰۰ را نیز به حالت محلول درآورده و طیف‌گیری NMR را انجام داد.

شکل ۱ طیف ^{1}HNMR کیتوسان با جرم مولکولی حدود ۳۰۰۰ را نشان می‌دهد که در مخلوطی از حلال دوتریم اکسید و دوتریم کلرید حل شده و در دمای ۸۰°C به همراه ساختار شیمیایی واحدهای تکرار شونده آن نشان داده شده است.

همان‌طور که در این شکل دیده می شود، پروتون‌های گروه متیل از گروه استیل در ۲/۶ ppm دیده شده که می‌تواند مبنایی برای محاسبات قرار گیرد. باید توجه داشت، در سایر دماهای طیف‌گیری و درصدهای متفاوت دوتریم کلرید، جابه‌جایی شیمیایی پروتون‌ها تغییر می‌یابد. برای محاسبه درصد استیل‌زدایی کیتوسان در برخی مراجع از سطح زیر منحنی H-1(A) استفاده می‌شود. ولی، در مواردی که درصد استیل‌زدایی شده کیتوسان بیش از ٪۹۰ باشد، اندازه‌گیری سطح زیر منحنی این پیک به خاطر شدت کم آن با



شکل ۱- طیف ^{1}HNMR کیتوسان با وزن مولکولی ۳۰۰۰ در مخلوط حلال دوتریم اکسید و دوتریم کلرید در دمای ۸۰°C (A مربوط به واحد استیل‌دار شده و D مربوط به واحد استیل‌زدایی شده است) [۲۱].

خطا همراه است. پروتون‌های گروه متیل، که با H-Ac نمایش داده شده‌اند، سه برابر پروتون‌های H-1(A) هستند و جابه‌جایی شیمیایی کاملا متفاوت‌تری دارند که از این نظر در کلیه نمونه‌ها برای محاسبه مناسب‌تراند. بنابراین، شاخص اندازه‌گیری برای محاسبه درصد استیل کیتوسان یا به عبارتی درصد واحدهای استیل‌زدایی شده کیتوسان (DDA) را می‌توان از معادله (۱) محاسبه کرد:

$$DDA(\%) = (1-(\frac{1}{3}HAc/\frac{1}{6}H26))\times 100 \quad (۱)$$

همان‌گونه که اشاره شد، کیتوسان با وزن‌های مولکولی بیشتر به راحتی در دوتریم اکسید حل نمی‌شود. بدین منظور، باید از مخلوط دوتریم اکسید و یک اسید دوتریم‌دار مانند دوتریم کلرید یا استیک اسید دوتریم‌دار (CD_3COOD) که در مراجع به آن اشاره شده است، استفاده کرد [۲۲]. برای وزن‌های مولکولی کم کیتوسان، این امکان وجود دارد تا بدون استفاده از اسید دوتریم‌دار انحلال آن را در آب دوتریم‌دار انجام داد و طیف‌گیری کرد.

همان‌گونه که اشاره شد، کیتوسان با وزن‌های مولکولی بیشتر به راحتی در دوتریم اکسید حل نمی‌شود. بدین منظور، باید از مخلوط دوتریم اکسید و یک اسید دوتریم‌دار مانند دوتریم کلرید یا استیک اسید دوتریم‌دار (CD_3COOD) که در مراجع به آن اشاره شده است، استفاده کرد [۲۲]. برای وزن‌های مولکولی کم کیتوسان این امکان وجود دارد تا بدون استفاده از اسید دوتریم‌دار انحلال آن را در آب دوتریم‌دار انجام داد و طیف‌گیری کرد.

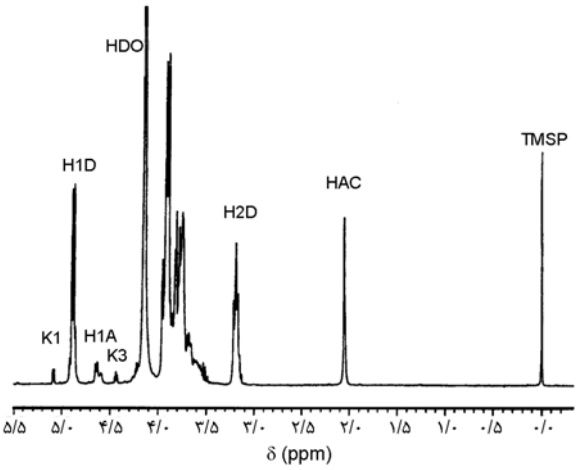
درجه استیل‌زدایی در برخی نمک‌های کیتوسان

افزون بر کیتوسان، مقدار درجه استیل‌زدایی شده در نمک‌های کیتوسان، مانند کیتوسان کلرید و کیتوسان گلوتامات نیز با ^{1}HNMR قابل بررسی و اندازه‌گیری است. نتایج به دست آمده می‌تواند در محصولات دارویی مهندسی شده بافت‌ها (tissue engineered medical products, TEMPs) کاملا مفید باشد. نمک‌های مزبور ممکن است در سامانه رهایش دارو، به عنوان داربست و همچنین در سلول‌ها و کپسولی شدن بافت‌ها کاربرد داشته باشند. نمک‌های کیتوسان در کاربردهای یادشده عموما دارای وزن‌های مولکولی یا درجه پلیمر شدن متوسط عددی (DPn) کم و در محدوده ۱۵ تا ۳۰ هستند. وزن مولکولی کم این پلیمرها باعث می‌شود تا انحلال‌پذیری آنها در حلال‌ها بهتر شود. این موضوع خود منجر به افزایش تحرک زنجیرها و کاهش گرانروی محلول می‌شود. کاهش وزن مولکولی عموماً با شکست زنجیر به‌وسیله محلول نیتریک اسید در آب دوتریم‌دار انجام می‌گیرد. همچنین، کاهش وزن مولکولی سبب می‌شود تا در طیف‌سنجی ^{1}HNMR سیگنال‌های جدیدی به واسطه گروه‌های انتهایی به وجود آید. به کمک این سیگنال‌ها می‌توان افزون بر مقدار واحدهای استیل‌زدایی شده، درجه پلیمر شدن متوسط عددی را نیز با ^{1}HNMR به دست آورد.

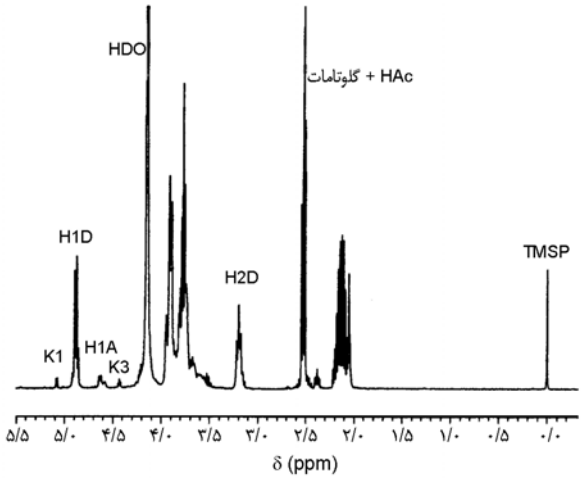
برای انجام آزمون ^{1}HNMR از نمک‌های معرفی شده کیتوسان، همانند مثال قبلی می‌توان از مخلوط آب دوتریم‌دار و دوتریم کلرید برای انحلال‌پذیری استفاده کرد. برای تهیه و به‌دست آوردن طیف‌های مطلوب می‌توان زاویه پالس°۳۰، زمان تاخیر s ۶ و تعداد پویش بیش از ۸ را انتخاب کرد. برای وضوح بهتر طیف‌ها، لازم است تا طیف‌گیری در دماهای بیش از ۷۰°C تنظیم شود. برای رسیدن به دمای تعادل لازم است تا پیش از انجام مراحل طیف‌گیری، نمونه حدود min ۱۰ درون دستگاه قرار گیرد و سپس طیف‌گیری انجام شود.

شکل‌های ۲ و ۳ به ترتیب مربوط به طیف‌های ^{1}HNMR کیتوسان کلرید و کیتوسان گلوتامات بوده که در دمای ۹۰°C به دست آمده‌اند. نمک کیتوسان کلرید باعث تغییری در طیف ^{1}HNMR نمی‌شود و اصولاً پیک پروتون جدیدی درون ساختار کیتوسان ایجاد نمی‌کند. اما در طیف ^{1}HNMR نمک کیتوسان گلوتامات، افزون بر پروتون‌های کیتوسان، پروتون‌های گروه گلوتامیک اسید نیز، که دارای گروه های متیلن و متین هستند، پیک خواهند داشت. تفاوت طیف دو نمک کیتوسان در شکل‌های ۲ و ۳ مشهود است. در اینجا از ماده مرجع TMSP (sodium 3-trimethyl silylpropionate-2,2′,3,3′-d_4) در طیف‌گیری استفاده شده است.

سطوح مرتبط سیگنال‌های پروتون در طیف ^{1}HNMR که می‌توان



شکل ۲- طیف ^{1}HNMR نمونه کیتوسان کلرید در حلال دوتریم اکسید و در دمای ۹۰°C [۲۳].



شکل ۳- طیف ^{1}HNMR نمونه کیتوسان گلوتامات در حلال دوتریم اکسید و در دمای ۹۰°C [۲۳].

آنها را در این شکل‌ها بررسی کرد، شامل K1، H1D، H1A، H2D و HAc است. لازم به ذکر است، پیک HAc تنها برای نمک کیتوسان کلرید قابل استفاده است و برای نمک کیتوسان گلوتامات به واسطه هم‌پوشانی با پروتون‌های واحد گلوتامیک اسید مفید نیست. بهتر است، برای نمونه‌های کیتوسان کلرید از میانگین سطوح زیر منحنی پیک‌های استیل‌زدایی شده H1D و H2D استفاده شود. این عمل باعث ازدیاد دقت در محاسبات DDA% می‌شود. به طور مشابه، از مجموع پیک‌های گروه استیل H1A و HAc/3 (سه پروتون در واحد HAc) استفاده می‌شود. این مجموع در نمونه کیتوسان گلوتامات به واسطه هم‌پوشانی قابل استفاده نیست. بنابراین، معادله گروه‌های استیل‌زدایی شده می‌تواند برای هر دو نمک یکسان باشد، ولی معادله گروه‌های استیل برای دو نمک کیتوسان متفاوت است.

معادله (۲) مربوط به گروه‌های استیل‌زدایی شده هر دو نمک است که می‌تواند استفاده شود:

$$D = \frac{K1 + (H1D + H2D)}{2} \qquad (۲)$$

برای محاسبه واحدهای استیل نمک‌های کیتوسان باید از معادلات جداگانه استفاده کرد. معادله (۳) مقدار واحدهای استیل در کیتوسان کلرید بوده و معادله (۴) مربوط به واحدهای استیل در کیتوسان گلوتامات است:

$$A = \frac{H1A + (\frac{HAc}{3})}{2} \qquad (۳)$$

$$A = H1A \qquad (۴)$$

بنابراین، با توجه به معادلات (۲) تا (۴) ارائه شده می‌توان درصد یا مقدار درجه استیل‌زدایی در نمک های کیتوسان را محاسبه کرد که در معادله (۵) قابل مشاهده است:

$$DDA\% = (\frac{D}{(D+A)}) \times 100 \qquad (۵)$$

همان گونه که اشاره شد، نمک‌های کیتوسان استفاده شده عموما دارای وزن مولکولی کمی هستند و می‌توان پروتون‌های انتهای زنجیر آنها را در طیف‌های ^{1}HNMR مشاهده کرد. هر چه وزن‌های مولکولی نمک‌های کیتوسان کمتر باشد، طبیعتاً شدت سیگنال‌های گروه‌های انتهای زنجیر پلیمر بیشتر شده و محاسبات دقیق‌تر خواهد بود [۲۱]. در اینجا، پروتون‌های واحد K1 به عنوان شاخص گروه‌های انتهای زنجیر شناخته می‌شود. بنابراین، به وسیله معادله (۶) می‌توان درجه پلیمر شدن متوسط عددی نمک‌های کیتوسان کلرید و کیتوسان گلوتامات را محاسبه کرد. طبیعتاً از حاصل‌ضرب درجه پلیمر شدن در جرم مولکولی واحد تکرار می‌توان وزن مولکولی متوسط عددی نمک‌های کیتوسان را محاسبه کرد:

$$DP_n = (\frac{K1 + A + D}{K1}) \qquad (۶)$$

نتیجه‌گیری

طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته، از کارآمدترین روش‌های تجزیه دستگاهی به شمار می‌رود که ابزاری نیرومند برای استفاده پلیمردانان در هویت‌شناسی پلیمرهاست. در مطالعه ریزساختار مواد پلیمری، هم از لحاظ کمی و هم از لحاظ کیفی می‌توان از روش‌های متنوع طیف‌سنجی NMR بهره برد. در این بین، گسترده‌ترین پژوهش‌های طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته روی هسته هیدروژن (پروتون) انجام می‌گیرد. از مواردی که به واسطه دقت و تکرارپذیری داده‌های ^{1}HNMR می‌توان انجام داد، تعیین گروه‌های استیل‌زدایی شده در ساختار کیتوسان و نمک‌های آن است. در این روش، پیک‌های شاخص در محدوده جابه‌جایی شیمیایی خاصی ظاهر شده و با یکدیگر هم‌پوشانی ندارند. علاوه بر تعیین درجه استیل‌زدایی در کیتوسان و نمک‌های آن با ^{1}HNMR، می‌توان وزن مولکولی متوسط عددی آنها را در حالت کوتاه بودن زنجیر پلیمر و مشاهده پیک‌های مربوط به گروه‌های انتهایی آن، معین کرد.

مراجع

1. Ravi Kumar M.N.V., A Review of Chitin and Chitosan Applications, *React. Funct. Polym.*, **46**, 1–27, 2000.
2. Terayama H., Method of Colloid Titration- A New Titration between Polymer Ions, *J. Polym. Sci.*, **8**, 243-253, 1952.
3. Broussignac P., Chitosan: A Natural Polymer not Well Known by the Industry, *Chim. Ind. Genie Chim.*, **99**, 1241-1247, 1968.
4. Domszy J.G. and Roberts G.A.F., Evaluation of Infrared Spectroscopic Techniques for Analysing Chitosan, *Makromol. Chem.,* **186**, 1671-1677, 1985.
5. Miya M., Iwamoto R., Yoshikawa S., and Mima S., IR Spectroscopic Determination of CONH Content in Highly Deacetylated Chitosan, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2**, 323-324, 1980.
6. Moore G.K. and Roberts G.A.F., Determination of the Degree of N-acetylation of Chitosan, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2**, 115-116, 1980.
7. Sabnis S. and Block L.H., Improved Infrared Spectroscopic Method for the Analysis of Degree of N-deacetylation of Chitosan, *Polym. Bull.*, **39**, 67-71, 1997.
8. Sannan T., Kurita K., Ogura K., and Iwakura Y., Studies on Chitin: 7. IR Spectroscopic Determination of Degree of Deacetylation, *Polymer*, **19**, 458-459, 1978.
9. Muraki E., Yaku F., Iyoda J., and Kojima H., Measurement of Degree of Deacetylation in D-glucosamine Oligosaccharides by UV Absorption, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1929-1930, 1993.
10. Tan S.C., Khor E., Tan T.K., and Wong S.M., The Degree of Deacetylation of Chitosan: Advocating the First Derivative UV-spectrophotometry Method of Determination, *Talanta*, **45**, 713-719, 1998.
11. Domard A., Determination of N-acetyl Content in Chitosan Samples by c.d. Measurements, *Int. J. Biol. Macromol.*, **9**, 333-336, 1987.
12. Hirai A., Odani H., and Nakajima A., Determination of Degree of Deacetylation of Chitosan by ^{1}HNMR Spectroscopy, *Polym. Bull.*, **26**, 87-/94, 1991.
13. Duarte M.L., Ferreira M.C., Marvao M.R., and Rocha J., Determination of the Degree of Acetylation of Chitin Materials by ^{13}C CP/MAS NMR Spectroscopy, *Int. J. Biol. Macromol.,* **28**, 359-363, 2001.
14. Raymond L., Morin F.G., and Marchessault R.H., Degree of Deacetylation of Chitosan Using Conductometric Titration and Solid-state NMR, *Carbohyd. Res.*, **246**, 331-336, 1993.
15. Varum K.M., Anthonsen M.W., Grasdalen H., Smidsrod O., Determination of the Degree of N-acetylation and the Distribution of N-acetyl Groups in Partially N-deacetylated Chitins (chitosans) by High-field NMR Spectroscopy, *Carbohyd. Res*., **211**, 17-23, 1991.
16. Shigemasa Y., Matsuura H., Sashiwa H., and Saimoto H., Evaluation of Different Absorbance Ratios from Infrared Spectroscopy for Analyzing the Degree of Deacetylation in Chitin, *Int. J. Biol. Macromol.*, **18**, 237-242, 1996.
17. Dahmane E.M., Taourirte M., Eladlani N., and Rhazi M., Extraction and Characterization of Chitin and Chitosan from *Parapenaeus longirostris* from Moroccan Local International J. Polym. Analysis Characterization, 2014.
18. Lavertu M., Xia Z., Serreqi A.N., Berrada M., Rodrigues A., Wang D., Buschmann M.D., and Gupta A., A Validated ^{1}HNMR Method for the Determination of the Degree of Deacetylation of Chitosan, *J. Pharmaceuti. Biomed. Anal.*, **32**, 1149-1158, 2003.
19. Niola F., Basora N., Chornet E., and Vidal P.F., A Rapid Method for the Determination of the Degree of N-acetylation of Chitin - Chitosan Samples by Acid Hydrolysis and HPLC, *Carbohydr. Res.*, **238**, 1-9, 1993.
20. Aiba S., Studies on chitosan: 1. Determination of the Degree of N-acetylation of Chitosan by Ultraviolet Spectrophotometry and Gel Permeation Chromatography, *Int. J. Biol. Macromol.*, **8**, 173-176, 1986.
21. Ziaee F., Application of Nuclear Magnetic Resonance in Polymers (In Persian), Iran Polymer and Petrochemical Institute, Tehran, 2013.
22. Tan S.C., Khor E., Tan T.K., and Wong S.M., The Degree of Deacetylation of Chitosan: Advocating the First Derivative UV-Spectrophotometry Method of Determination, *Talanta*, **45**, 713–719, 1998.
23. Standard Test Method for Determining Degree of Deacetylation in Chitosan Salts by Proton Nuclear Magnetic Resonance (^{1}HNMR) Spectroscopy, *Annual Book of ASTM Standard*, **13.01**, F 2260 – 03, 2008.