

تعیین درجه داستیلاسیون کیتوسان تهیه شده از پوست میگو

فرشته پورمراد*(Ph.D.)
محمد علی ابراهیم زاده*(Ph.D.)
سهیلا هنری
پونه ابراهیمی*(Ph.D.)
معصومه اورنگیان*(Ph.D.)

چکیده

سابقه و هدف : کیتین یک پلی ساکارید طبیعی بوده که به طور گسترده ای در پوست سخت پوستان مانند خرچنگ، میگو و قارچها یافت می شود. این ترکیب و مشتق دیگر آن کیتوسان، دارای کاربردهای پزشکی متعددی از جمله استفاده در صنعت داروسازی در تکنیک آزاد سازی دارویی و اثرات بهبود زخمها، کاهش کلسترول خون، ضد انعقاد خون و ضدتومور می باشد. پیش بینی شده که کایتوسان به عنوان پر مصرفترین ماده کلیدی سال 2005 میلادی بوده که 75 درصد این مصارف در زمینه زیست- پزشکی خواهد بود.

مواد و روشها : در این مطالعه به تهیه کیتین و کیتوسان (مشتق داستیله کیتین) از پوست میگو که به میزان فراوان در جنوب ایران و همچنین شمال کشور وجود دارد، پرداخته شده است. پوست میگو به طور متوالی با اسید و قلیا مخلوط و پس از صاف کردن، کیتین ناخالص تهیه شد. پس از شست و شو و خالص سازی آن را با سود مجاور نموده و کایتوسان حاصل گردید. عمل شست و شو و رسوبگیری چندین بار تکرار شده تا کیتوسان خالص تهیه گردد. کیتوسان به دست آمده با بازده قابل قبولی تهیه گردید.

یافته ها : الگوی الکتروفورز و IR (طیف مادون قرمز) آن با استاندارد مطابقت داشت. همچنین تهیه فیلم کیتوسان و بررسی طیف IR آن نشان داد که کیتوسان به دست آمده دارای درجه داستیلاسیون 76 درصد می باشد. بررسی طیف NMR (رزونانس مغناطیسی هسته ای) نیز تایید کننده بوده است.

استنتاج : نظر به تولید میگو در بخش های شمالی کشور، امکان راه اندازی خط تولید این ماده بسیار پر بها امکان پذیر می باشد.

واژه های کلیدی : کیتین، کیتوسان، پوست میگو، درجه داستیلاسیون

مقدمه

کیتین یک موکوپلی ساکارید بوده که به وفور در اسکلت خارجی بندپایان مانند میگو، خرچنگ و همچنین گیاهان پست از قبیل مخمرها یافت می شود. این ترکیب برای اولین بار توسط براکونوت¹ در سال 1811 تشریح

کیتین یک موکوپلی ساکارید بوده که به وفور در اسکلت خارجی بندپایان مانند میگو، خرچنگ و همچنین گیاهان پست از

1. Braconnot

E این تحقیق طی شماره 41-80 در شورای پژوهشی دانشگاه ثبت شده و با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شده است.
* متخصص شیمی دارویی، عضو هیأت علمی مرکز تحقیقات علوم دارویی (دانشیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران⁺ * ساری : کیلومتر 18 جاده خزرآباد، دانشکده داروسازی

** متخصص شیمی دارویی، عضو هیأت علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران *** متخصص
فماسیونیکس، عضو هیأت علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران
*** دکترای شیمی تجزیه، بخش آنالیز دستگاهی، دانشکده داروسازی ساری ***** دکتر داروساز
E تاریخ دریافت : 83/10/26 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : 84/2/4 تاریخ
تصویب: 84/8/11

بی‌حرکتی آنزیمی، لنزهای تماسی، بانداژ چشم، ارتوپدی، نخ جراحی، دندان‌پزشکی، کشاورزی به‌کار رفته و علاوه بر آن اثراتی چون توانایی جذب چربی، کاهش گلوکز، کلسترول و تری‌گلیسرید و ضد میکروبی نیز از آن‌گزارش شده است (16، 5-7). حلالیت اندک کیتوسان باعث محدودیت‌هایی در کاربرد این ماده ارزشمند شده است. کیتین در محلول 2 درصد و محلول‌های اسیدی غیرقابل حل بوده در حالی که کیتوسان با درجه داستیلاسیون مناسب، قابل حل می‌باشد. در بعضی موارد دیده شده که مشتقات کیتوسان با وزن مولکولی پایین در محدوده وسیعی از pH حلالیت بالایی در آب دارند. در حالی که مشتقات با وزن مولکولی بالا فقط در pH اسیدی حلالیت خوبی دارند و در pH تقریباً خنثی حلالیتشان کاهش می‌یابد (6). یک پارامتر مهم در کیتوسان درجه داستیلاسیون آن می‌باشد که با اندازه‌گیری نسبت واحدهای 2- استامید 2- داکسی D- گلوکوپیرانوز به 2- آمینو-2- داکسی D- گلوکوپیرانوز تعیین می‌شود. این نسبت اثر مستقیم بر میزان حلالیت کیتین و خاصیت محلول حاصل دارد. کیتوسان یک مشتق N- داستیلله

شد (1). کیتوسان یا 2- آمینو-2- داکسی-β-D- گلوکان با واحدهای تکرار شونده (1→4) α مشتقی از کیتین است که توسط روگت¹ در سال 1859 با عامل شناخته شده‌ای بروز نموده و بسیار شایع‌تر از نوع ثانویه می‌باشد. جوشاندن کیتین در محلول پتاس با غلظت مشخص به دست آمد (2) (تصویر شماره 1). البته روش‌های دیگر هم برای تهیه کیتین و کیتوسان طبق منابع دیگر دارای حق امتیاز (patent) وجود دارد که در واقع با تغییر شرایط کار مانند زمان واکنش و همزدن، غلظت اسید و باز و تکرار دفعات استخراج، سعی در بهینه‌سازی روش تهیه داشته‌اند (4،3). اهمیت کیتین در تهیه کیتوسان از آن جا است که کیتوسان در فرآورده‌های بالینی به دلیل سازگاری زیست‌شناسی با بقیه مواد، قابلیت هضم آسان، غیر سمی بودن، قدرت جذب بالا، و در دسترس بودن به عنوان یک حامل دارویی به کار می‌رود. از کیتوسان به عنوان یک حامل دارویی قرن‌بیستویکم نام برده شده است (16). کیتوسان با درجه خلوص مناسب در سیستم‌های آزادسازی دارویی، همودیالیز، پوست مصنوعی، مشمع‌های دارویی،

تمویر شماره 1 : کیتین (ساختار بالا) و کایتوسان (ساختار پائین)، کایتوسان مشتقی از کیتین بوده که از داستیلاسیون ناقص یا کامل آن در شرایط قلیائی به دست می آید.

1. Rouget

هدف این مطالعه در گام نخست به دست آوردن مناسبترین روش استخراج کیتین از پوست میگو (که به وفور در جنوب ایران و البته به طور پرورشی در شمال ایران وجود دارد) و سپس ارزیابی روشهای تهیه کیتوسان از کیتین حاصله می باشد. در مرحله بعد بازده تولید بررسی و در نهایت تعیین درجه داستیلاسیون آن با روشهای طیف رزونانس مغناطیسی هسته ای ¹H-NMR و ²FTIR می باشد.

مواد و روشها

کلیه مواد مورد استفاده از قبیل NaOH، HCl و کیتوسان استاندارد از شرکتهای معتبر مرک (آلمان) و فلوکا (سوئیس) خریداری شدند. طیف IR با استفاده از اسپکتروگراف مدل پرکین المر پرگامون 781 روی فیلم تهیه شده از کیتوسان تهیه شد. الکترو فورز توسط دستگاه مدل HELENA انجام شد. جهت مقایسه الگوی الکتروفورز نمونه های تهیه شده با استاندارد انجام شد. جهت تهیه طیف NMR از دستگاه NMR (مدل Bruker FT-400) استفاده شد.

میگو از جنوب ایران تهیه گردید. پوست میگو از بدن جدا و کاملاً شست و شو داده شد تا گل و لای آن گرفته شد. سپس قسمت اضافی و زائد پوست میگو

نسی یا کامل از کیتین می باشد. درجه داستیلاسیون را با وسایل مختلف و روشهای مختلف می توان اندازه گرفت که شامل طیف سنجی مادون قرمز IR، طیف سنجی ماورای بنفش (UV)، طیف سنجی پروتون (¹H-NMR)، طیف سنجی کربن 13 در حالت جامد (¹³C-NMR)، آزمون نین هیدرین، عیارسنجی با اسید برومیدریک، تعیین

پتانسیومتریک، کروماتوگرافی با کارکرد عالی، کروماتوگرافی با ژل نافذ، آنالیز حرارتی، کروماتوگرافی با گاز غیرقابل اشتعال، هیدرولیز اسیدی و اخیراً روش اسپکتروسکوپی نزدیک مادون قرمز می باشد. برای تعیین وزن مولکولی کیتوسان می توان از کروماتوگرافی با ژل نافذ استفاده نمود. همچنین می توان از تعیین میزان حساسیت اسمز غضا، روش افشاندن، کروماتوگرافی طرد ذرات و کروماتوگرافی انحصاری استفاده کرد (8-12).

کیتوسان در بخشهای مختلف صنعت داروسازی به اندازه ای اهمیت دارد که پیش بینی شده در سال 2005 میلادی یکی از پرفروشترین و مطرح ترین مواد اولیه تولید شده در جهان بوده و بازار جهانی را تحت الشعاع خود قرار دهد. 75 درصد کیتوسان تهیه شده کاربرد دارویی و بهداشتی خواهد داشت (16).

1. H-Nuclear Magnetic Resonance
2. Fourier Transform Infra-Red

و شو داده شد. برای آهک زدایی کردن ماده حاصل، این ماده به مدت 3 ساعت در محلول اسید کلریدریک 15 درصد با دمای 80 درجه حرارت داده شد و سپس صاف و شست و شو داده شد. برای از بین بردن چربی ماده حاصل به مدت 5 ساعت در محلول سود 15 درصد و دمای 70 حرارت داده شده و سپس صاف شده و با آب کافی شست و شو و خشک شد و 5/8 گرم پودر کیتین (58 درصد) به دست آمد.

1/5 گرم از پودر کیتین حاصله به مدت 1-3 ساعت در محلول سود 30، 45 و 60 درصد داده شد. پس از صاف کردن با قیف بوخنر و شست و شو با آب فراوان تا خنثی شدن کامل به مدت 3 ساعت در گرخانه قرار داده تا کاملاً آب خود را از دست داد. بازده در روش‌های مختلف از 60 تا 90 درصد به دست آمد.

مقدار 50 میلی گرم کیتوسان تهیه شده در مراحل قبل، در شش میلی لیتر محلول اسید استیک دو درصد حل گردید و بیست و چهار ساعت در بشر در بسته قرار داده شده تا حباب هوای موجود در محلول خارج و شفاف شود سپس این محلول روی یک سطح تفلون و داخل واشرهای پلاستیکی ریخته شد. پس از خشک کردن در دسیکاتور قرار داده شد و از این فیلم‌ها طیف FT-IR تهیه شد (13).

یافته‌ها

با استفاده از روش اول پس از خشک شدن کامل

هم گرفته شد و پس از شست و شوی کامل، در سایه و در حرارت معمولی اتاق خشک گردید. جسم خشک شده را تا حد امکان به صورت پودر در آورده تا در مراحل بعدی تهیه کیتین و کیتوسان استفاده گردد.

پوست میگو در محلول اسید کلریدریک 6 درصد به مدت 16 ساعت داخل یک بالن ته صاف هم زده شد ماده حاصله توسط قیف بوخنر صاف شد و سپس توسط آب کافی شست و شو تا خنثی‌سازی کامل انجام شد. سپس ماده حاصله در محلول سود 10 درصد به مدت 120 دقیقه واکنش داده شد. ماده حاصل صاف شد و توسط آب کافی شسته شده تا خنثی‌سازی کامل انجام شود. سپس این ماده در محلول اسید کلریدریک 4 درصد به مدت 12 ساعت هم زده شد

پس از صاف شدن و شست و شو با آب تا خنثی‌سازی کامل، ماده حاصل در محلول سود 8 درصد به مدت 90 دقیقه واکنش داده شد. ماده حاصل با قیف بوخنر صاف و با آب کافی شست و شو داده شد. پس از خشک شدن کامل پودر صورتی رنگ استیل‌کیتین حاصل شد. سپس پودر استیل‌کیتین در محلول سود 40 درصد به مدت 60 دقیقه واکنش داده شد و سپس صاف و با آب کافی شست و شو داده شد. پس از خشک شدن کامل 2/2 گرم پودر کیتین (22 درصد) حاصل گردید (16:3).

پوست میگو در محلول سود 10 درصد به مدت یک ساعت هم زده شد سپس صاف و با آب کافی شست

کمک تکرار مراحل قبل و شست و شو با اتر و اتانل، استفاده شده است. همچنین جهت تهیه کیتین از منبع مربوطه ابتدا آهک زدایی در محلول اسید کلریدریک رقیق و سپس پروتئین زدایی در محلول رقیق سود صورت گرفته است. بی‌رنگ کردن با پرمنگنات پتاسیم 0/5 درصد و محلول اگزالیک اسید یا در معرض نور خورشید قرار دادن نیز به کار گرفته شده است (3،14). در هر یک از روش‌ها سعی در بهینه‌سازی روش شده است. در این مطالعه علاوه بر تهیه کیتوسان و کمک در رسیدن به خود کفایی، جهت دستیابی به روش بهینه با تغییر غلظت و زمان آزمایش تلاش شده است. در این مطالعه پس از تهیه پودر از پوست میگو، جهت تهیه کیتین به دو روش اقدام شد. در روش اول پودر پوست میگو توسط اسید کلریدریک رقیق هم زده شد و سپس با سود رقیق واکنش داد شد و کیتین با بازده 22 درصد طی تکرار مراحل ضمن خالص سازی به دست آمد. در روش دوم ابتدا پودر در سود رقیق هم زده شد و سپس در اسید کلریدریک رقیق واکنش داده شد. طی تکرار مراحل کیتین با بازده 58 درصد حاصل شد. ماده دکلره کننده به دلیل رنگ زدایی در حین تکرار مراحل کار حذف گردید. پس از آن با تغییر مدت زمان آزمایش و قدرت قلیایی کیتوسان‌های متفاو تی تهیه شد که یکی از آنها دارای حلالیت مناسب به منظور تهیه فیلم و شناسایی (تهیه فیلم برای طیف مادون قرمز و تهیه طیف رزونانس مغناطیسی هسته‌ای) بود. کاربرد سود 30 درصد و واکنش به مدت یکساعت کیتوسان با راندمان 87/5 درصد را حاصل نمود. با کاربرد سود

2/2 گرم پودر کیتین با بازده 22 درصد و با روش دوم پودر کیتین به میزان 0/8 گرم و راندمان 8 درصد حاصل شد. در تهیه کیتوسان با درجات مختلف داستیلاسیون با کمک محلول سود 30، 45 و 60 درصد راندمان در روش‌های مختلف از 60 تا 90 درصد به دست آمد. استفاده از سود 30 درصد در زمان یک ساعت بالاترین بازده را تولید نمود. افزایش غلظت محلول سود به 60 درصد کیتوسان محلول در آب به دست آمد.

بحث

کیتوسان از نظر شیمیایی شباهت به سلولز که یک فیبرگیاهی است دارد. برخلاف سلولز، توانایی اتصال آن به چربی‌ها فوق العاده است؛ به طوری که به نام آهن‌ربای چربی‌ها نام گرفته است. اثرات عیدیه دیگر کایتوسان به عنوان یک ترکیب کاملاً ایمن و بدون اثرات جانبی، ارزش آن را صد چندان نموده است (1، 5-7). مطالعات نشان می‌دهد که در تهیه کیتین به صورت خالص مشکلاتی وجود داشته است. معمول با تکرار فرایند مخلوط کردن پوسته سخت پوستان مورد نظر با اسید و قلیای داغ و رنگ زدایی با محلول پرمنگنات پتاسیم در حرارت معمولی بوده است. به کارگیری اسید فرمیک غلیظ ناخالصی‌های رنگی را کاملاً از بین برده اما موجب داستیلاسیون کیتین در این مرحله خواهد شد. سپس کیتوسان توسط پتاس غلیظ در ظرف نیکی و تحت گاز نیتروژن در حرارت 80 درجه تهیه شده است. به منظور تهیه نمک هیدرو کلراید کیتوسان از اسید کلریدریک در حرارت 50 درجه و سپس خالص سازی به

مزایای روش FT-IR این است که برای مقادیر با درجه استیله پایین تر حساسیت بیشتری دارد (14). برای محاسبه درجه داستیلاسیون کیتوسان استاندارد با وزن مولکولی پایین با توجه به طیف FT-IR از فرمول زیر استفاده گردید (8،11،15).

$$DD = 100 - (A_{1657} / A_{3468}) \times 100 / 1.33$$

به طوری که A_{1657} و A_{3468} میزان جذب در موج 1657 (مربوط به گروه کربونیل آمید استیل) و 3468 (مربوط به گروه هیدروکسی به عنوان استاندارد داخلی) می‌باشد. مقدار عددی نسبت A_{1657} به A_{3468} برای کیتوسان کاملاً استیله شده می‌باشد. درجه داستیلاسیون دو نمونه استاندارد از کیتوسان با وزن مولکولی پایین و متوسط با توجه به فرمول بالا 57 و 54 درصد محاسبه گردید. در طیف FT-IR کیتوسان تهیه شده در این مطالعه اوج گروه کربونیل تقریباً حذف شده و صرفاً یک برآمدگی کوچک در این منطقه به‌طور ناچیز مشهود بود. با استفاده از فرمول زیر درجه داستیلاسیون آن محاسبه می‌شود.

$$DD = 100 - (A_{1675} / A_{3430}) \times 100 / 1.33$$

به طوری که A_{1675} و A_{3430} میزان جذب در موج 1657 (مربوط به گروه کربونیل آمید استیل) و 3430 (مربوط به باند گروه هیدروکسی به عنوان استاندارد داخلی) می‌باشد. بنابراین درجه داستیلاسیون نمونه تهیه شده 76 درصد می‌باشد.

$$DD = 100 - (0.38 / 1.19) * 100 / 1.33$$

از ابزارهای بسیار مناسب دیگر که به‌منظور شناسایی به کار می‌رود، استفاده از ^{13}C

غلیظتر (60 درصد) دستیابی به کیتوسان با قابلیت حل شدن فراهم شد. جهت تایید، مشاهده شد که کیتین در محلول ید دو درصد و محلول‌های اسیدی غیرقابل حل بوده از طرفی این ترکیب در حلال‌های آلی نیز نامحلول می‌باشد کیتوسان دارای قابلیت حل شدن، در محلول ید2 درصد، محلول‌های اسیدی و حلال‌های آلی محلول می‌باشد. برای شناسایی کیتوسان از روش‌های مختلف از جمله الکتروفورز، FT-IR و $^1\text{H-NMR}$ و $^{13}\text{C-NMR}$ استفاده می‌شود (4،8،9، 11، 12، 15، 16).

به منظور تهیه گراف‌های الکتروفورز از نمونه‌های کیتوسان به دست آمده، کلیه نمونه‌ها در اسید استیک 2درصد حل شد. صرفاً نمونه حاصل از هیدرولیز کیتین در محلول سود 60 درصد در این حالت محلول گردید. بنابراین به‌طور مقدماتی مشخص شد که در این نمونه عمل هیدرولیز تا حدی صورت گرفته که کیتوسان حاصل دارای حلالیت بالاتری بوده است. بررسی الگوی الکتروفورز این محصول با کیتوسان‌های استاندارد با وزن مولکولی مختلف (پایین، متوسط، بالا) تایید نمود که ترکیب حاصل کیتوسان می‌باشد.

مقایسه طیف مادون قرمز کیتین و کیتوسان استاندارد با محصولات به دست آمده نیز تایید دیگری مبنی بر دستیابی به کیتین و کیتوسان می‌باشد؛ به طوری که در طیف کیتین به علت وجود گروه کربونیل مربوط به آمید گروه استیل، اوجی در موج 1651 نشان می‌دهد که پس از هیدرولیز و حذف گروه استیل (در واقع تشکیل کیتوسان) به سمت حذف گروه کربونیل خواهد رفت. از

انتگرال پنج هیدروژن حاصل حدود 70 بوده که نشان می‌دهد به ازای هر یک هیدروژن، انتگرال 13/8 ظاهر می‌شود. پس می‌بایست هیدروژن گروه متیل سه برابر یعنی با انتگرال 41/5 ظاهر شود. با یک تناسب ساده می‌توان میزان داستیلاسیون این نوع کیتوسان استاندارد را 98/9 درصد محاسبه کرد.

در طیف کیتوسان با روش سود 60 درصد، پنج هیدروژن مربوطه در محدوده 3 تا 4 ppm و گروه متیل در ناحیه 1/9 ppm اوج نشان می‌دهد. انتگرال این پنج هیدروژن 90/42 به دست آمد. پس از محاسبه انتگرال هر نئیدروژن، پروتون‌های گروه متیل با انتگرال 54/24

ظاهر می‌شود. بنابراین میزان داستیلاسیون این نوع کیتوسان 76/9 درصد محاسبه می‌شود که در این جا می‌توان رابطه داستیلاسیون کیتوسان را بامیزان حلالیت آن نتیجه گرفت. جهت بررسی بیشتر این مقوله تهیه کیتوسان‌های با درجه استیلاسیون مختلف و تعیین این ضریب، ضروری به نظر می‌رسد. چنانچه ذکر شد سایر کیتوسان‌های به دست آمده از هیدرولیز کیتین در این مطالعه قابل حل در تری فلورواستیک اسید و D_2O نبوده و جهت بررسی ساختمان آنها نیاز به تهیه طیف NMR جامد می‌باشد که مقدور نیست.

حلالیت کیتوسان، خود زمینه دیگری از کارهای پژوهشی است که توسط محققین این مطالعه در دست

بررسی می‌باشد. ناگفته نماند که عدم دسترسی به بعضی از

NMR می‌باشد. اما از آن جا که به علت نبود پروب دستگاه در داخل کشور تهیه طیف حالت جامد مقدور نبود، صرفاً به این نکته اشاره می‌شود که گروه متیل در نمونه کیتین در حدود 20 ppm اوجی ظاهر خواهد نمود که پس از تبدیل آن به کیتوسان حذف می‌گردد (18-16).

در این کار همچنین طیف پروتون NMR نشان داد که پروتون‌های حلقه از H_1-H_6 در محدوده (3-5 ppm) ظاهر می‌شوند. از مجموع 11 پروتون موجود در هرواحد کیتوسان، 4 پروتون مربوط به گروه‌های هیدروکسی و آمین به علت جابه‌جا شدن با دوتریوم موجود در D_2O اوجی در طیف $H-NMR$ نخواهند داد و تنها اوج‌های مربوط به 7 پروتون باقیمانده مشاهده خواهند شد (12). در این مطالعه از کیتوسان استاندارد با وزن مولکولی متوسط و کیتوسان به دست آمده با روش سود 60 درصد در حلال تری فلورواستیک اسید و D_2O طیف $H-NMR$ گرفته شد. در گام اول شباهت طیف NMR حاصل از کیتوسان به دست آمده از این پژوهش با کیتوسان استاندارد، حاکی از قضاوت اولیه در تشکیل کیتوسان می‌باشد. چون طیف در حضور تری فلورواستیک اسید گرفته شده، دو پروتون که در محدوده 4/5 تا 5 ppm ظاهر می‌شوند در زیر اوج مربوط به HOD مخفی شده است. پس می‌توان از محدوده 3 تا 4 ppm که حاوی 5 پروتون به عنوان استاندارد داخلی است، استفاده نمود. در طیف کیتوسان با وزن مولکولی متوسط نشان داده شد که 5 پروتون در محدوده 3 تا 4 ppm ظاهر شده و اوج گروه متیل در ناحیه 1/9 ppm بوده است.

بدین وسیله از معاون محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران که هزینه انجام این تحقیق را تامین نموده اند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

دستگاه های پیشرفته محدودیتهایی را در ادامه تحقیق ایجاد خواهد کرد.

سپاسگزارى فهرست منابع

1. Paul W, Sharma C.P. Chitosan, a drug carrier for the 21st century (a review), S. T. P. *Pharma sciences* 2000; 10(1): 5- 22.
2. Rouget C. Des substances amyloides dans le tissu des animaux, Specialment Les Articles (Chitin) *Comp- Rend*; 1859; 48: 792- 795.
3. Horowitz S.T, Roseman S, Blumenthal H.J. The preparation of glucosamine oligosaccharides, *Journal of American Chemical Society*; 1957; 79: 5046-5049.
4. Teng W.T, Khor E, Tan T.K, Lim I.Y, Tan S.C. Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi. *Carbohydrate Research*; 2001; 332: 305- 316.
5. Hillyard I.W, Doczi Y, Kierman P.B. Anti acid and antiulcer properties of polysaccharide chitosan, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1985; 115: 1108-1112.
6. Majeti N.V, Kumar R. A review of chitin and chitosan applications, *Reactive and functional polymers*; 2000; 46: 1-27.
7. Mccurdy J.D. FDA and the use of chitin and chitosan derivative. In: Advance in chitin and chitosan, London, *Elsevier Applied Science*, 1992, 659- 662.
8. Domard A, Rinaudo M. Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan, *Int. J. Biol. Macromol*; 1983; 5: 49-52.
9. Dunn D.F, Liberman M.H. Chitin in sea anemone shells, *Science*; 1983; 221: 157- 159.
10. Kasai M.R, Arul J, Charlet G. Intrinsic viscosity- molecular weight relationship for chitosan, *Journal of polymer science, part B, Polymer Physics*; 2000; 38: 2591- 2598.
11. Khan T.A, Peh K.K, Ching H.S. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods, *J. Pharm Pharmaceut. Sci*; 2002; 5(3): 205- 212.
12. Kubota N, Tatsumoto N, Sano T, Toya K. A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents, *Carbohydrate Research*; 2000; 324: 268- 274.
13. Chatelet C, Damour O, Domard A. Influence of the degree of acethlation on some biological properties of chitosan film, *Biomaterials*; 2001; 22: 261-268.
14. <http://dalwoo.com/chitosan/preparation.htm>, Accessed Dec. 25, 2004.
15. Miya M, Iwamoto R, Yoshikawa S, Mima S. IR spectroscopic determination of CONH content in highly deacylated

- chitosan, *Int. J. Biol. Macromol*; 1980; 2: 323-325.
16. Zhao Z, Wang Z, Ye N, Wang S, A novel N. O-carboxymethyl amphoteric chitosan/poly (ethersulfone) composite MF membrane and its charged characteristics, *Desalination*; 2002; 144: 35-39.
17. <http://dalwoo.com/chitosan/spectra.htm>, Accessed Dec. 25, 2004.
18. Ottoy M, Varum K.M, Smidsrod O. Compositional heterogeneity of heterogeneously deacetylated chitosans, *Carbohydrate Polymers*; 1996; 29(1): 17-24.