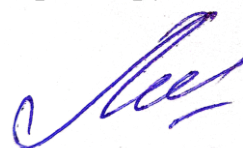


**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

На правах рукописи



Малинкина Ольга Николаевна

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ СТРУКТУРООБРАЗОВАНИЯ И
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА L- И D-АСКОРБАТОВ
ХИТОЗАНА**

1.4.4. «Физическая химия»

диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук, профессор
Шиповская А.Б.

Саратов – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ	стр.
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	12
1.1 Физико-химические свойства и структурные особенности солевой формы хитозана	12
1.2 Гидродинамические характеристики солей хитозана	19
1.3 Реологические свойства умеренно-концентрированных и концентрированных растворов хитозана	21
1.4 Влияние природы противоиона на свойства растворов солей хитозана....	23
1.4.1 Перспективность аскорбатов хитозана	24
1.4.2 Диастереоизомерия аскорбиновой кислоты	25
1.5 Влияние хиральности биологически активных материалов на их функциональные свойства	28
1.5.1 Стереоспецифическое поведение биообъектов	29
1.5.2 Хиральные хитозансодержащие материалы	31
1.6 Оптическая активность хитозана в растворах и пленках	34
1.7 Сорбционные свойства конденсированного хитозана и его солей	37
1.8 Гидрогелевые хитозансодержащие материалы	41
Заключение по литературному обзору	42
2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	43
2.1 Объекты исследования	43
2.1.1 Используемые вещества	44
2.1.2 Растворяющие среды	45
2.1.3 Получение растворов хитозана, кислот и вспомогательных реагентов	45
2.1.4 Получение порошков солевой формы хитозана	45
2.1.5 Получение кремнийхитозансодержащих глицерогидрогелей	46
2.1.6 Выделение твердой фазы глицерогидрогелей	46
2.2 Методы исследования	47
2.2.1 Физико-химические и спектроскопические методы	47
2.2.2 Калориметрическое определение теплоты растворения	48
2.2.3 Паросорбционное определение свободной энергии смешения	49
2.2.4 Оптические методы	51
2.2.5 Вискозиметрические методы	53
2.2.6 Методы исследования поверхностно-морфологических свойств	54

2.2.7 Методы исследования биологических свойств	55
2.2.7.1 Методы оценки биологической активности в отношении биообъектов животного происхождения	55
2.2.7.2 Методы оценки биостимулирующей активности в отношении биообъектов растительного происхождения	57
3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	59
3.1 Формирование и структурные особенности хиральных солей <i>L</i> -(<i>D</i> -)аскорбата хитозана	59
3.1.1 Взаимодействие хитозана с <i>L</i> -(<i>D</i> -)аскорбиновой кислотой в водном растворе при донорно-акцепторном солеобразовании	59
3.1.2 Спектральные характеристики <i>L</i> -(<i>D</i> -)аскорбатов хитозана	61
3.1.3 Структурные и морфологические характеристики <i>L</i> -(<i>D</i> -)аскорбатов хитозана	66
3.2 Сорбционные свойства <i>L</i> - и <i>D</i> -аскорбатов хитозана	72
3.2.1 Кинетика сорбции паров воды	72
3.2.2 Изотермы сорбции	74
3.2.3 Свободная энергия Гиббса смешения	76
3.3 Оптические свойства <i>L</i> - и <i>D</i> -аскорбатов хитозана	79
3.3.1 УФ-спектроскопия	79
3.3.2 Спектроскопия кругового дихроизма	81
3.3.3 Спектроскопия оптического вращения	83
3.4 Реологические свойства растворов <i>L</i> -(<i>D</i> -)аскорбатов хитозана	86
3.4.1 Вискозиметрические свойства разбавленных растворов	86
3.4.2 Влияние ионной силы на гидродинамические параметры макро клубков	88
3.4.3 Температурная зависимость предельного числа вязкости	94
3.4.4 Ротационная вискозиметрия умеренно-концентрированных растворов ..	97
3.4.5 Влияние ионной силы на реологические параметры умеренно-концентрированных растворов	99
3.5 Получение и физико-химические свойства глицерогидрогелей <i>L</i> - и <i>D</i> -аскорбата хитозана	103
3.5.1 Влияние компонентного состава на время гелеобразования	103
3.5.2 Влияние условий золь-гель процесса на время гелеобразования	105

3.5.3 Влияние изоформы аскорбиновой кислоты на время гелеобразования ..	107
3.5.4 Реокинетика гелеобразования кремнийхитозансодержащих систем	107
3.5.5 Потенциал поверхности и морфоструктура глицерогидрогелей	110
3.5.6 Модель пространственной сетки глицерогидрогелей	112
3.6. Биотестирование <i>L</i> - и <i>D</i> -аскорбатов хитозана	114
3.6.1 Тестирование на биообъектах животного происхождения	114
3.6.1.1 Ранозаживляющая активность	117
3.6.2 Тестирование на биообъектах растительного происхождения	121
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	124
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	126
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	129
Приложение А.....	150
Приложение Б	154
Приложение В	155

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Аминополисахарид хитозан (ХТЗ) относится к классу *D*-аминоглюканов и, вследствие катионногенной природы, комплекса биологически ценных свойств и коммерческой доступности, весьма перспективен для создания биосовместимых материалов медицинского назначения и безопасных агробиопрепаратов [1–7]. Согласно современным представлениям биологическая активность ХТЗ зависит от молекулярной массы полисахарида и совокупного заряда, реализующегося по H^+ -опосредованному механизму и снижающегося с понижением степени деацетилирования макроцепей или при их ковалентном сшивании [8–13]. Поэтому в практическом плане для получения препаратов агро-медико-биологического назначения наиболее перспективны водорастворимые солевые комплексы ХТЗ–кислота [14–18]. Традиционно в качестве доноров H^+ при солеобразовании применяют водные растворы неорганической (соляной) или органических одноосновных кислот (уксусной, реже муравьиной) [19–21]. С целью расширения спектра полезных свойств ионных солей ХТЗ проводится активный поиск альтернативных источников донора протона из класса фармакопейных органических кислот [22–32]. В зависимости от условий получения, типа используемой кислоты, её мольного отношения к аминогруппам солевые формы ХТЗ могут отличаться количеством кристаллизационной воды, конформацией макромолекул, полиморфной модификацией надмолекулярной структуры, размерами элементарной ячейки кристаллитов и кинетической стабильностью [33, 34]. В ряде работ [35–38] отмечается также влияние природы используемой для растворения ХТЗ кислоты (pK , полярность, функциональность, молекулярный объем) на степень связывания, заряд, конформационное состояние и гидродинамическое поведение ионогенных макромолекул в растворе, их способность к ассоциации и, соответственно, упорядочению в конденсированной фазе, а также характеристики хитозансодержащих материалов. Для оценки термодинамических параметров донорно-акцепторного взаимодействия ХТЗ–кислота и функциональных особенностей солей хитозана в растворе и твердофазном состоянии наиболее информативны структурно-чувствительные методы, такие как вискозиметрия и изотермическая сорбция паров воды [39–43].

Другой важной особенностью является молекулярная, а в твердофазном состоянии и структурная хиральность данного аминогликана [44–48]. Традиционно хирооптические свойства ХТЗ используются при создании стационарных фаз [49] и селекторов [50] для хроматографического и электрофоретического разделения рацематов, хелатирующих подложек для стереоселективных металлических катализаторов [51], либо хиральных доноров водородных связей для активации электрофилов в асимметрическом органокатализе [52], а также синтеза N-производных посредством функционализации аминогрупп макромолекул хиральными биологически активными веществами [53–55]. Мы полагаем, что управление хиральной организацией аминополисахарида открывает широкие возможности для формирования на его основе материалов с заданной стереоструктурой и контролируемыми сайтами комплементарно-специфических взаимодействий. Например, эффективность ингибирующего действия в отношении *S. aureus* и *E. coli* хиральных солевых комплексов ХТЗ с CH_3COOH (раствор, пленка) определяется не только молекулярной массой полимера и кислотностью среды, но и оптической активностью препарата [56–58]. *R*-(*S*)-изомеры 2-(2,4-дихлорфеноксипропионовой кислоты и их комплексы с ХТЗ проявляют антибатную селективность в отношении разрушения клеток зеленых водорослей *Chlorella pyrenoidosa* [59]. Оказалось, что в присутствии полимера токсичность гербицидно-активного *R*-энантиомера существенно меньше, чем «балластного» *S*-энантиомера. Хемомеханические системы на основе π -катионных комплексов ХТЗ с *D*-изомером дибензоилвинной кислоты претерпевают в модельной биосреде уменьшение объема на 94%, а с *L*-изомером – лишь на 20% [60]. Если используется оптически неактивная (ахиральная) кислота данный эффект утрачивается.

Таким образом, в практическом плане для создания стереоспецифических препаратов медико-биологического и агро-химического применения наиболее перспективны водорастворимые солевые комплексы ХТЗ с хиральными биологически активными кислотами [7, 23, 26–28, 37, 38, 54, 61], в частности, аскорбиновой (АК) [62–73]. Так, кислотные соли ХТЗ и АК улучшают доставку фармпрепаратов [64–67] и терапию болезни Крона [68]. Нанесение оболочки из аскорбата хитозана подавляет рост микроорганизмов и значимо продлевает срок хранения плодов [69–73]. Представляется, что протекающее при образовании аскорбатов хитозана ионное комплексообразование аукохромных

NH₂-групп с кислотным остатком органической кислоты должно сопровождаться образованием оптически активных хромофоров и влиять на конформацию макроцепи, морфологию и физико-химические свойства солевой формы ХТЗ, значимо расширяя при этом спектр биологически полезных свойств хитозансодержащих материалов.

Степень разработанности темы исследования. Несмотря на то, что для АК характерно существование двух пар *L*- и *D*-изомерных форм, в исследованиях используют преимущественно *L*-изомер (витамин С), выбранный по принципу наибольшей биологической активности в индивидуальном состоянии [62–73]. Между тем, сочетание *L*-АК с ХТЗ, построенным из *D*-аминоглюкопиранозных циклов, сопровождается формированием гетерокомплекса полимер–кислота (*D-L*), не соответствующего принципам гомохиральности (*L-L*, либо *D-D*) биологических форм живой материи. Также стоит отметить, что в последние годы обнаружена биологическая активность *D*-аскорбиновой кислоты (*D*-АК), которая является более мощным (эффективным) усилителем биодоступности железа [74] и отличается от *L*-формы температурой плавления, реакционной способностью и системой меж- и внутримолекулярных контактов [75]. Однако в большинстве современных исследований отсутствует детальное сравнение надмолекулярной структуры и физико-химических свойств двух изомерных солевых комплексов *D*-аминоглюкан + *L*-(*D*-)АК. При этом, различия в конфигурации молекул *L*- и *D*-АК могут оказывать существенное влияние как на общую хиральность полимерной системы и свойства получаемых на ее основе материалов, так и на характер их биологических эффектов. Таким образом, нам представляется, что присущие биосистемам гомохиральные конфигурации должны формироваться для солевого комплекса *D*-аминоглюкана с *D*-изомером АК. Данное предположение и предопределило постановку настоящего исследования.

Цель исследования: выявление закономерностей влияния изомера аскорбиновой кислоты при получении солевой формы хитозана на энергетику формирования, конформационные особенности, спектральные, термодинамические и физико-химические характеристики хиральных солевых комплексов аминополисахарид–кислота, перспективных для получения биоматериалов и агробиопрепаратов.

Для достижения поставленной цели в работе сформулированы и решены следующие **научные задачи**:

- оценка термодинамических характеристик взаимодействия хитозана с *L*- и *D*-диастереомерами аскорбиновой кислоты при донорно-акцепторном солеобразовании полимер–кислота, комплексное исследование физико-химических свойств и структурных особенностей *L*- и *D*-аскорбатов хитозана;
- построение изотерм сорбции паров воды хиральными солями *L*- и *D*-аскорбата хитозана, анализ термодинамических и кинетических параметров сорбции с применением моделей Ленгмюра и Флори-Хаггинса, термического уравнения сорбции и уравнения Гиббса-Дюгема;
- изучение влияния стереоизомерии кислотного остатка на хирооптические и конформационные характеристики макромолекул *L*- и *D*-аскорбата хитозана в водной среде;
- получение концентрационной и температурной зависимости вязкости растворов хитозана в *L*- и *D*-аскорбиновой кислоте в широкой области мольного соотношения полимер–кислота, ионной силы среды и температуры;
- сравнительный анализ гелеобразования смесевых композиций на основе солевых комплексов хитозана с *L*- и *D*-аскорбиновой кислотой;
- оценка прикладного потенциала хиральных солей хитозана с *L*- и *D*-диастереомерами аскорбиновой кислоты на широком круге биообъектов.

Научная новизна диссертационной работы. На основании комплексного анализа влияния диастереомерной формы аскорбиновой кислоты на термодинамику взаимодействия, пространственную структуру, надмолекулярное упорядочение, сорбционные свойства, конформационные особенности и биологическую функциональность гетеро- (*D–L*) и гомохиральных (*D–D*) солевых комплексов хитозан–кислота впервые установлено, что:

- взаимодействие хитозана с *D*-аскорбиновой кислотой энергетически и стерически более выгодно чем с *L*-диастереомером кислоты;
- пространственное упорядочение и конформация макроцепей солевой формы хитозана с *L*- и *D*-диастереомерами аскорбиновой кислоты определяются стереоконфигурацией хирального лиганда;
- абсолютные значения энергии Гиббса смешения, термодинамическое сродство компонентов и устойчивость системы хиральная соль + вода увеличиваются в ряду *D–D* → *D–L*-солей;

- стереоизомерия кислотного лиганда влияет на кинетику формирования органо-неорганических глицерогидрогелей, морфоструктуру и прочность взаимопроникающих гибридных сеток в золь-гель материале.

Теоретическая и практическая значимость работы. Обнаруженные особенности донорно-акцепторного взаимодействия хитозана с изомерами аскорбиновой кислоты, обеспечивающие эффекты соле- и структурообразования, физико-химических свойств, хирооптических характеристик и биологической активности *L*- и *D*-аскорбата хитозана, открывают принципиальные возможности управления хиральной структурой полимерной системы для разработки комплементарно-селективных и субстрат-специфичных биоматериалов, а также многофункциональных агробιοпрепаратов.

На основе водных растворов *L*-(*D*-)аскорбата хитозана и глицериновых растворов тетраглицеролата кремния (фармакологически активного золь-гель предшественника) разработаны гелеобразные композиции широкого спектра биологического действия, перспективные для регенеративной медицины, фармакологии, косметологии. Получены порошкообразные препараты солевых комплексов ХТЗ с *L*-(*D*-)АК с выраженным ростостимулирующим действием в отношении тест-растений, перспективные для агробιοтехнологий. По результатам работы получено 4 патента РФ.

Материалы диссертации используются в учебном процессе при чтении лекций, выполнении лабораторных и учебно-исследовательских работ дисциплины «Биоразлагаемые полимеры» для студентов Института химии СГУ, специализирующихся по направлению подготовки 04.03.01 «Химия», профиль «Химия низко- и высокомолекулярных соединений».

Положения, выносимые на защиту:

1. Взаимодействие хитозана с *L*- или *D*-аскорбиновой кислотой в водной среде сопровождается образованием диастереомерных солевых комплексов и энергетически/стерически более выгодно для *D*-антипода кислоты. Гомохиральные (*D*-*D*)-соли, в отличие от гетерохиральных (*D*-*L*)-солей, характеризуются меньшим количеством кристаллизационной воды, высокой степенью кристалличности и более уплотненной надмолекулярной структурой с развитой системой меж- и внутримолекулярных контактов.

2. Изотермы сорбции *L*- или *D*-аскорбатом хитозана паров воды удовлетворительно аппроксимируются суперпозицией изотерм

Ленгмюра/Флори–Хаггинса и термическим уравнением сорбции. Гидрофильность, термодинамическое сродство и устойчивость системы сорбент + вода, идентифицированные по предельной величине и энергии сорбции, константе адсорбционного равновесия, сорбционной емкости локализованной воды и энергии Гиббса смешения, увеличиваются в ряду $(D-D) \rightarrow (D-L)$ -солей.

3. Хирооптические эффекты диастереомерных солей определяются стереоконфигурацией хирального лиганда. *L*- и *D*-изоформы хитозана различаются значениями молярной эллиптичности эффекта Коттона ($\pi \rightarrow \pi^*$ переход), длиной волны максимума дихроичной полосы, числовыми характеристиками дисперсии удельного оптического вращения и типом морфоструктур при стереоспецифической хиральной кристаллизации.

4. Температурный коэффициент предельного числа вязкости, термодинамическое качество растворителя и гидродинамический объем макро клубков уменьшаются в ряду $(D-D) \rightarrow (D-L)$ -солей, вследствие чего *D*-аскорбат хитозана характеризуется меньшей вязкостью концентрированных растворов, более уплотненной конденсированной фазой и возможностью формирования более прочных гибридных гидрогелевых структур.

Личный вклад автора заключался в формировании направлений исследования, поиске и анализе литературных источников, выборе объектов и методов исследования, постановке и выполнении основных экспериментов по ключевым направлениям работы, обобщении и анализе полученных результатов, их обсуждении, а также написании публикаций и диссертации. Математическую обработку данных парсорбционного анализа проводили совместно с к.х.н. Шмаковым С.Л. (Институт химии).

Автор благодарит сотрудников Центра коллективного пользования СГУ за получение СЭМ-изображений и ИБФРМ РАН г. Саратов – за предоставление данных ТЭМ-микроскопии и КД-спектроскопии.

Достоверность результатов проведенных исследований подтверждается использованием современных взаимодополняющих методов и аппаратуры, многоплановостью исследования и использованием статистической обработки экспериментальных данных, соответствием полученных результатов основным закономерностям физико-химических свойств полимерных систем отсутствием противоречий с литературными

источниками, а также публикацией основных положений диссертационного исследования в профильных высокорейтинговых реферируемых журналах.

Публикации. Основные положения диссертации отражены в 19 публикациях, из них 12 статей в журналах, рекомендованных ВАК и индексируемых в международных базах *Web of Science* и *Scopus*, 3 статьи в книжных периодических научных изданиях, 4 патента РФ.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы представлены на Восьмой Всероссийской Каргинской конференции «Полимеры» (2024, 2020), Общероссийской конференции «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана» (2025, 2021), XXXI Симпозиуме по реологии (2024), Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология» (2023), Всероссийской конференции «Поверхностные явления в дисперсных системах» (2023), International School and Conference «Saint-Petersburg OPEN» (2020, 2019), V Международной конференции стран СНГ «Золь-гель синтез и исследование неорганических соединений, гибридных функциональных материалов и дисперсных систем» (2018), International Conference «Saratov Fall Meeting» (2017–2015) и др.

Объём и структура диссертационной работы. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, изложения полученных результатов и их обсуждения (6 подглав), заключения, списка литературы из 250 наименований и приложения. Работа изложена на 155 страницах, включает 52 рисунка и 21 таблицу.

Работа выполнена на кафедре полимеров на базе ООО «АКРИПОЛ» Института химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского».

Финансовая поддержка работы осуществлялась в рамках госзадания Минобрнауки России в сфере научной деятельности № 4.1212.2014/К (2014–2016), грантов РНФ № 17-73-10076 «Хиральные полимерные матрицы: получение, физико-химические свойства, взаимодействие с биообъектами» (2017–2019) и № 22-23-00320 «Хиральные донорно-акцепторные системы на основе солей хитозана и изоформ органических лигандов для создания комплементарно-селективных биоматериалов» (2022–2023), гранта ФСИ «Разработка биodeградируемых биотрансплантатов–пластырей на основе кремнийхитозансодержащих глицерогидрогелей» (2019–2020).

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Физико-химические свойства и структурные особенности солевой формы хитозана

Большинство характерных свойств аминополисахарида хитозана (ХТЗ) связаны с высоким содержанием первичных аминогрупп ($pK_a = 6.0-6.5$) [1–6, 17, 40], приобретающих положительный заряд при $pH < 6$ и преобразующие хитозан в водорастворимый катионный полиэлектролит. Поэтому количество отвечающих за гидрофобные свойства *N*-ацетильных групп и их распределение в макромолекуле сополимера [11–13, 76] влияют на растворимость, межцепочечные взаимодействия и конформацию цепей [10, 33, 77–79]. Молекулярное моделирование *in silico* сольватированных хитозановых цепей показывает обратно пропорциональную зависимость гибкости полисахаридной цепи от степени ацетилирования [78, 79], обусловленную влиянием химического окружения в положении C2 на ориентацию молекул воды. Так, образование водородных связей между молекулами воды и звеньями *N*-ацетилглюкозамина происходит через атомы водорода, со звеньями протонированного *N*-глюкозамина – кислорода (рисунок 1.1 а).

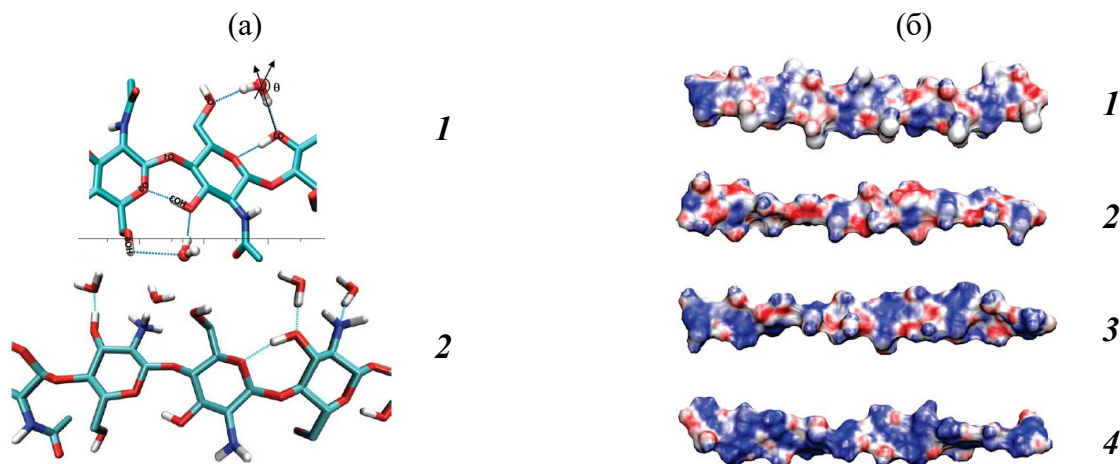


Рисунок 1.1. Молекулярное моделирование *in silico* ориентации молекул воды вокруг *N*-ацетилглюкозамина (1) [78] и *N*-глюкозамина (2) [79] (а); распределения электростатического потенциала (положительный – синий, отрицательный – красный) на поверхности изолированной макромолекулы хитина (1), хитозана (2–4) в водном растворе при высоком (2), нейтральном (3) и низком значении pH среды (4) (б) [78].

В высокоориентированных областях макромолекулы ХТЗ принимают конформацию расширенной двойной спирали [78–81]. При этом конформация индивидуальной цепи стабилизирована внутримолекулярными водородными связями $O3 \cdots O5$, а соседние цепи – межмолекулярными H -контактами посредством гидрофобного взаимодействия $N2 \cdots O6$ [13, 77]. Визуализация равновесной

конформации цепей хитина и хитозана на основе вычисленной свободной энергии сольватации и торсионных углов показывает появление ослабленных дву- и пятикратных спиральных фрагментов при снижении pH среды [78] (рисунок 1.1 б).

На свойства солевых форм данного аминополисахарида (растворы, гели, порошки и др.), как и основного хитозана, влияют молекулярная масса (\bar{M}_n , кДа) [10, 56, 58, 82, 83], полидисперсность [84], степень деацетилирования полимера (СД, мольн.%) [10–13, 77, 83, 85] и характер распределения ацетилированных звеньев по цепи [10, 13, 76], а также ионная сила растворяющей водно-кислотной смеси (I , мМ) [35–39, 83, 86–92], объем и геометрия противоиона [7, 24, 26, 37, 39, 43, 86, 93–98]. Для оценки молекулярной структуры ХТЗ и его солей традиционно используют ультрафиолетовую (УФ) [99, 100], инфракрасную (ИК) [9, 23, 27, 30, 31, 35, 37, 38, 63, 93, 100–112] и ядерно-магнитно-резонансную (ЯМР) спектроскопию [107, 113, 114], элементный анализ (ЭА) [85], дифракцию рентгеновского излучения (РСА) [34, 80, 81, 94, 115–120], реже – круговой дихроизм (КД) [108, 110, 121] и дисперсию оптического вращения (ДОВ) [28, 47, 56–58, 122–129].

В зависимости от типа используемой кислоты-растворителя, ее концентрации и способа получения солевых форм хитозана японской научной группой Ogawa на основе данных РСА и C^{13} ЯМР соли ХТЗ классифицированы на соли I и III (безводные, 2-х и 5-ти кратные спирали, соответственно), II и IIa типа (гидратированные, 2-х и 4-х кратные спирали, соответственно), отличающиеся не только количеством кристаллизационной воды, но и конформацией макроцепей, структурно-полиморфной модификацией, размерами элементарной ячейки и кинетической стабильностью [81, 95, 114, 115, 117] (рисунок 1.2).

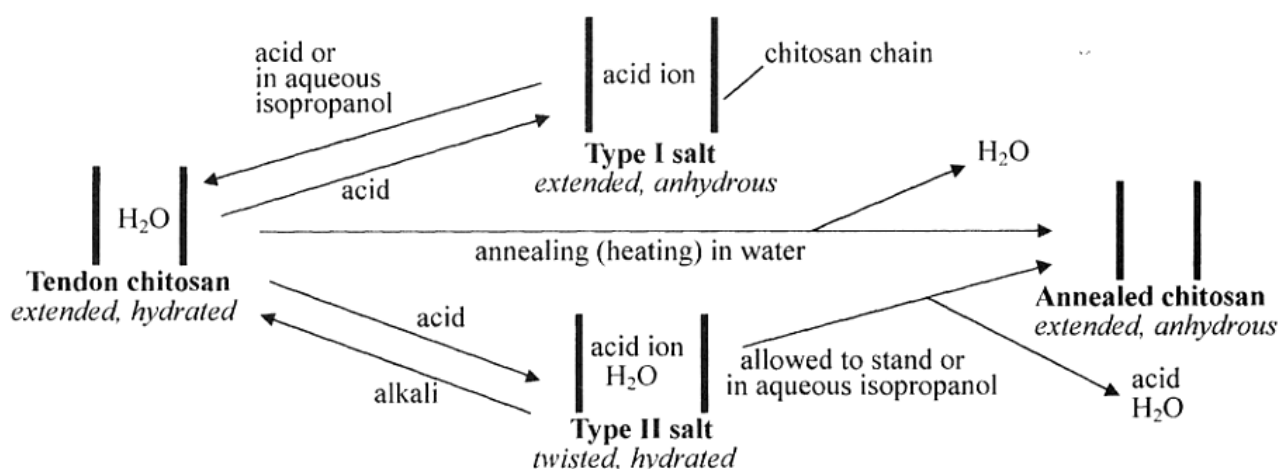


Рисунок 1.2. Схема формирования солей ХТЗ I и II типов [94].

Например, малеинаты и салицилаты хитозана относятся к высококристаллическим безводным солям I типа (между цепями хитозана встроен только анион), а гидрохлориды, ацетаты, формиаты, пропионаты, лактаты, бутираты, тартраты и фумараты являются гидратированными солями II типа (кроме аниона между цепями ХТЗ присутствуют молекулы воды). Соли I типа устойчивы к высокой влажности и обратимо переходят в исходный полиморф только в среде 75% изопропанола. При образовании солей II и III типов происходит конформационное изменение макромолекул хитозана. Конформация солей II типа менее стабильна, поскольку в релаксированной двукратной спирали отсутствует внутрицепочечная водородная связь, но возможна стабилизация анионами [80, 93, 94]. При хранении в солях II типа наблюдается спонтанная дегидратация, причем время перехода в безводную полиморфную форму хитозана снижается при увеличении гидрофобности монокарбоновой кислоты и повышении относительной влажности [80, 117]. Поэтому соли хитозана с соляной и молочной кислотами (II типа) стабильны при высокой влажности и в 75% изопропаноле [93]. Соли IIa типа (гидратированный кристалл) получены с HI при низкой температуре [81]. Кристаллическая элементарная ячейка этой соли представлена правозакрученной спиралью из четырех асимметричных единиц дисахарида. Соли III типа (безводный кристалл) образуются с фенольными органическими кислотами (моно- и дигидроксibenзойная кислоты) и представлены левозакрученной пятикратной спиралью [95]. Возможно, данный факт отчасти объясняет формирование фрактальной структуры в гетерогенных системах хитозан – салициловая/ацетилсалициловая кислота [112, 130].

Молекулярная структура дегидратированных полиморфов содержит всего лишь две молекулы воды на один период идентичности и по сравнению с гидратированными солями, например, с традиционно используемыми для растворения ХТЗ монокарбоновыми кислотами (HCOOH , CH_3COOH), стабилизирована многочисленными Н-связями с участием алифатических атомов водорода гликозидных звеньев [81, 94]. Экваториальные дифракционные профили гидратированных модификаций хитозана характеризуются четкими интенсивными рефлексами при углах отражения $2\theta \sim 10$ и $20\text{--}22$ град, безводных кристаллов – уменьшением интенсивности и смещением данных рефлексов в область $2\theta \sim 15$ и $22\text{--}24$ град [33, 34]. Разложение *in silico* широких перекрывающихся дифракционных профилей солей хитозана на 5 гауссовых пиков показало, что при

снижении содержания воды интенсивность рефлекса при $2\theta = 10$ град существенно снижается [120] (рисунок 1.3 а).

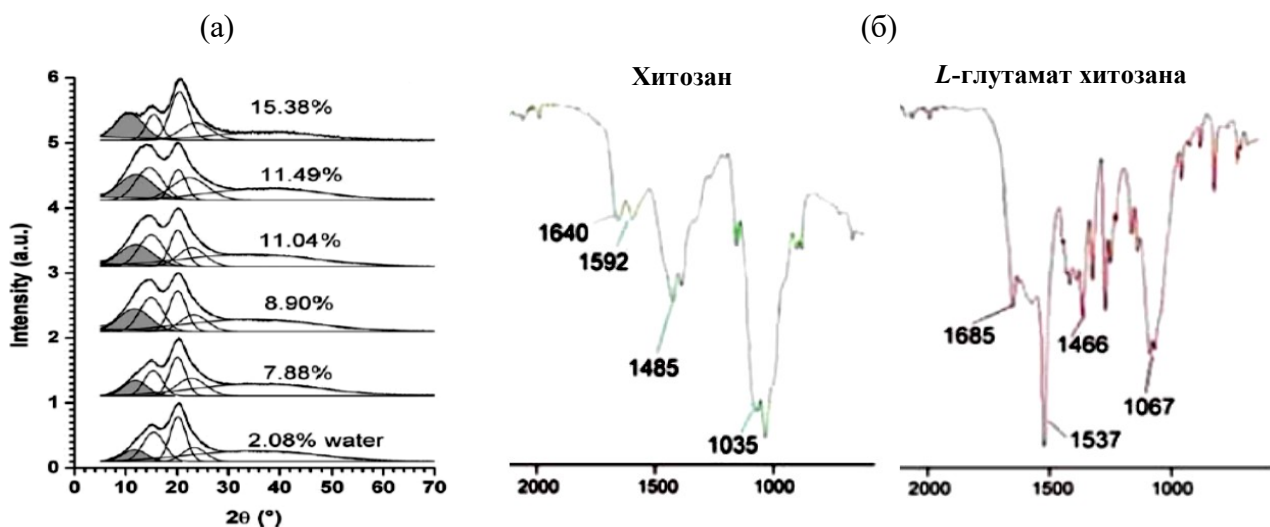


Рисунок 1.3. Дифрактограммы хитозана с разным содержанием воды (а) [120]; Фрагменты ИК-спектров ХТЗ и *L*-глутамата ХТЗ (б) [109].

В большинстве исследований для идентификации солевой формы ХТЗ используют методы ЭА, ИК- и ЯМР-спектроскопии. Посредством ИК-спектроскопии образование комплексов хитозан–кислота путем электростатического взаимодействия протонированной группы $-\text{NH}_3^+$ и аниона кислоты $-\text{COO}^-$ доказывают по появлению полос Амид I в диапазоне частот при $1640\text{--}1530\text{ см}^{-1}$, характерных для асимметричных ($1650\text{--}1550\text{ см}^{-1}$) и симметричных валентных колебаний ($1420\text{--}1300\text{ см}^{-1}$) карбоксилат-анионов, и смещению полосы Амид II асимметричных ($1640\text{--}1535\text{ см}^{-1}$) и симметричных деформационных колебаний N–H ($1520\text{--}1490\text{ см}^{-1}$) в $-\text{NH}_3^+$ (рисунок 1.3 б) [109]. Согласно литературным данным в ИК-спектре исходного хитозана основной формы полоса Амид II (N–H) проявляется в диапазоне $1598\text{--}1592\text{ см}^{-1}$ [103]. Доказательство отнесения указанных полос к деформационным колебаниям первичной аминогруппы получено на примере низкомолекулярного аналога элементарного звена хитозана – *D*-глюкозамина – по наличию интенсивной полосы при $\sim 1560\text{ см}^{-1}$ [101]. Уменьшение количества свободных аминогрупп хитозана при увеличении степени их сшивания глутаровым альдегидом сопровождалось снижением интенсивности полосы при 1584 см^{-1} [120]. В спектрах солей хитозана с неорганическими или органическими кислотами наблюдается смещение этой полосы на $30\text{--}80\text{ см}^{-1}$ (в зависимости от типа кислоты) в низкочастотную область по сравнению с полосой поглощения неассоциированных аминогрупп, а также значимое уменьшение интенсивности этой полосы вплоть до реализации только

перегиба на спектральной линии (таблица 1.1). Установлено *in silico*, что варьирование диапазона положения полосы протонированной аминогруппы зависит от величины положительного заряда на атоме азота [103].

Таблица 1.1 – Положение полосы Амид II в ИК-спектрах комплексов ХТЗ–кислота

Кислота	Формула	pK_{a1}/pK_{a2}	ν , cm^{-1}	Ссылка
–	–	–	1572	[23]
			1588–1558	[106]
			1590	[35, 107]
			1598–1592	[103]
Соляная	HCl	–7.0	1514	[93]
			1519	[37]
Щавелевая	HOOC-COOH	1.25/4.28	1517	[107]
L-Аспарагиновая	HOOCCH(NH ₂)CH ₂ COOH	1.99/3.86	1537	[108, 109]
D-Аспарагиновая			1560	[27]
L-Глутаминовая	HOOCCH(NH ₂)(CH ₂) ₂ COOH	2.10/4.07	1550	[27]
p-Аминобензойная	NH ₂ C ₆ H ₄ COOH	2.42	1567	[108, 109]
Винная	HOOCCH(OH)CH(OH)COOH	2.89/4.40	1526	[110]
Гентизиновая	3,4-(HO) ₂ C ₆ H ₃ COOH	2.91	1517	[107]
Салициловая	HO-C ₆ H ₄ COOH	2.97/13.82	1552	[111]
Бензиловая	(C ₆ H ₅) ₂ (HO)C(COOH)	3.05	1540	[31]
Лимонная	HOOCCH ₂ C(OH)COOH- CH ₂ COOH	3.13/ 4.76/6.39	1537	[110]
			1514	[106]
			1517	[107]
L-Яблочная	HOOCCH(OH)CH ₂ COOH	3.40/5.20	1560	[37]
p-Нитробензойная	NO ₂ C ₆ H ₄ COOH	3.41	1514	[106]
			1517	[107–109]
Ацетилсалициловая	CH ₃ COOC ₆ H ₄ COOH	3.50	1557	[110]
Терефталевая	HOOC-C ₆ H ₄ -COOH	3.54/4.34	1524	[18]
Муравьиная	HCOOH	3.75	1517	[110]
Гликолевая	HOCH ₂ COOH	3.83	1514	[93, 106]
			1517	[106]
			1524	[107]
L-Молочная	CH ₃ CH(OH)COOH	3.86	1514	[23]
			1527	[106]
			1552	[37]
			1560	[38]
L-Аскорбиновая	C ₆ H ₈ O ₆	4.10/11.06	1517	[107]
			1523	[110]
			1544	[63]
Янтарная	HOOC(CH ₂) ₂ COOH	4.2/5.6	1538	[35]
			1557	[9]
Галловая	3,4,5-(HO) ₃ C ₆ H ₂ COOH	4.5	1514	[111]
Уксусная	CH ₃ COOH	4.76	1514	[93, 106]
			1517	[107]
			1536	[37]
			1560	[38]
Бутиловая	CH ₃ (CH ₂) ₂ COOH	4.82	1514	[93]
Валерьяновая	CH ₃ (CH ₂) ₃ COOH	4.82		
Пропионовая	CH ₃ CH ₂ COOH	4.88	1514	[106]
			1537	[23]

Полоса Амид III при $1315\text{--}1320\text{ см}^{-1}$ относится к валентному колебанию связи C–N в N-ацетилглюкозаминных звеньях, поскольку отсутствует в ИК-спектрах глюкозамина [101], в связи с чем эффективность деацетилирования, как правило, оценивают по снижению интенсивности полосы Амид III и увеличению интенсивности полосы Амид II при 1590 см^{-1} [97, 102, 105]. Результаты элементного анализа также позволяют определить степень деацетилирования хитозана из среднего массового соотношения между углеродом и азотом [85]. Например, соотношение C/N = 5.48 согласно работе [43] соответствует СД = 80.3 мольн.%.

ЯМР-спектроскопия является распространённым методом исследования структуры гликанов в растворах, используя подход «снизу вверх» (от деполимеризованных олигосахаридов к полисахаридам). Однако в спектрах гомополисахаридов, в отличие от гетерополисахаридов, наблюдается сильное перекрытие резонансных сигналов [102, 131]. ^1H ЯМР-спектры гетерополисахарида хитозана в диапазоне $\delta \sim 5.0\text{--}2.0$ м.д. имеют сигналы (необменных) протонов, связанных с атомами углерода, которые не подвергаются обмену с растворителем (рисунок 1.4 а).

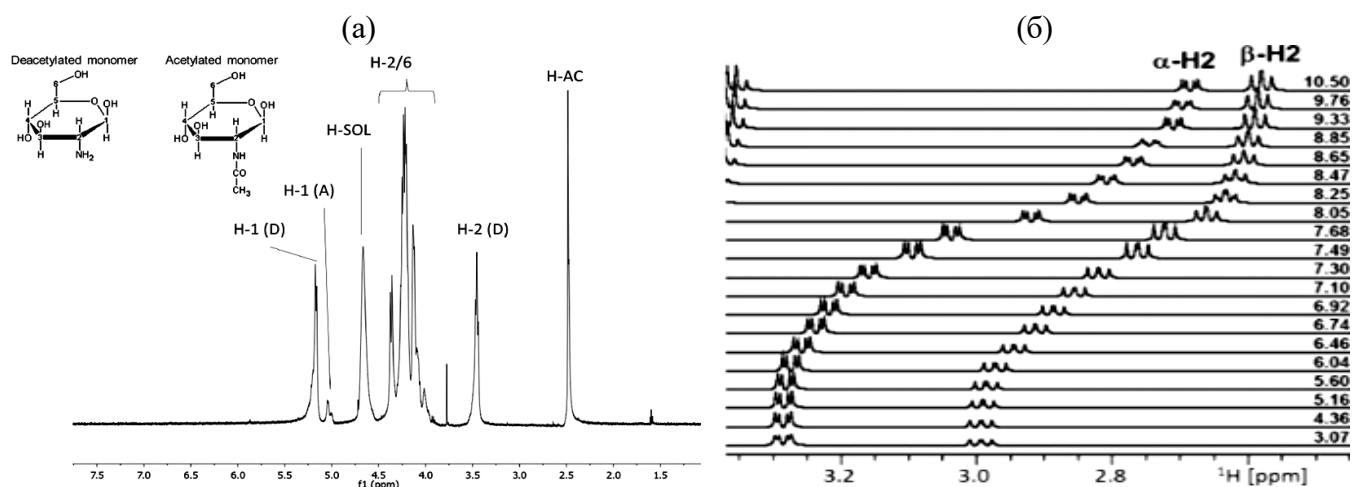


Рисунок 1.4. ^1H ЯМР-спектр раствора хитозана при 40°C (а) [114] и ^1H ЯМР-титрование раствора глюкозамина при 25°C , растворитель $\text{H}_2\text{O} : \text{D}_2\text{O} = 9 : 1$ (б) [132].

Характерными сигналами для звена хитина являются $\delta \sim 4.6$ м.д. (H1) и $\delta \sim 2.1$ м.д. (N-ацетильная группа), для хитозана – $\delta \sim 4.9$ м.д. (H1) и $\delta \sim 3.2$ м.д. (H2 глюкозамина) [114]. Причем, химический сдвиг H2 глюкозамина находится в зависимости от pH среды, т.е. от степени протонирования аминогрупп (рисунок 1.4 б), что используется для определения рКа (для глюкозамина $\text{pK}_a = 7.84$ и 7.44 для $\alpha\text{-H2}$ и $\beta\text{-H2}$, соответственно) [132]. Для биомакромолекул изменение рКа (снижение рКа карбоксилатов и повышение рКа аминогрупп) отражает участие

ионизируемых групп в водородной связи или электростатических взаимодействиях (образование солевого мостика), которые стабилизируют ионы [133].

В работе [132] показано, что прямое ^1H ЯМР-детектирование обменных протонов аминогрупп глюкозамина возможно за счет замедления скорости реакции обмена протонов с растворителем при снижении температуры (рисунок 1.5 а) и pH (рисунок 1.5 б), что приводит и сдвигу резонансов NH_3^+ в сторону более высоких частот ($\delta \sim 8.3 - 8.4$ м.д.).

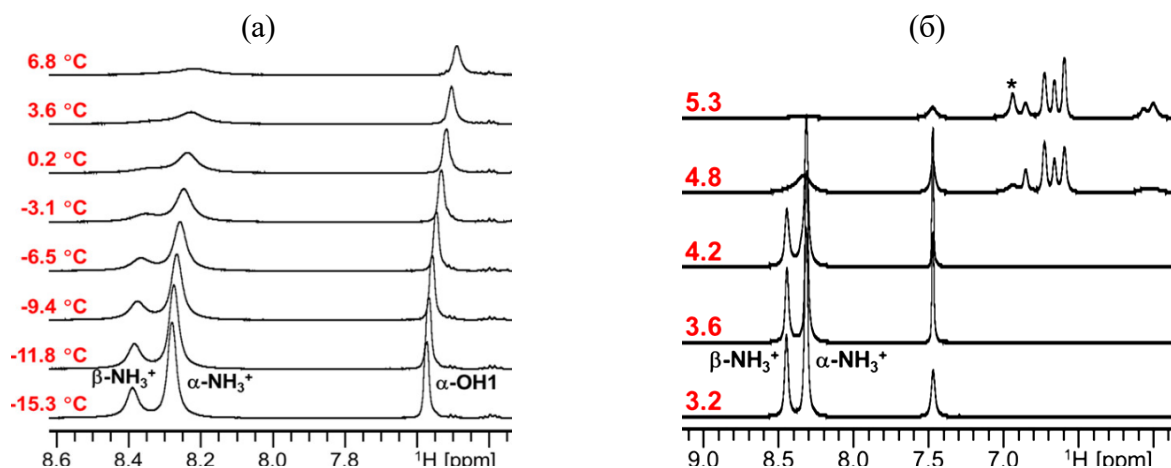


Рисунок 1.5. ^1H ЯМР-спектры глюкозамина в зависимости от температуры при pH=3.6 (а) и pH при -14.5°C (б), растворитель D_2O : ацетон- $\text{d}_6 = 85 : 15$, pH систем измеряли при 25°C до добавления ацетона- d_6 [132].

В работе [131] оптимизирован состав растворителя для обнаружения при 25°C и обеспечения высокого разрешения резонансов обменных амидных протонов (N-ацетилглюкозамина) $_{1-4}$ при $\delta \sim 7.9 - 8.4$ м.д. (рисунок 1.6).

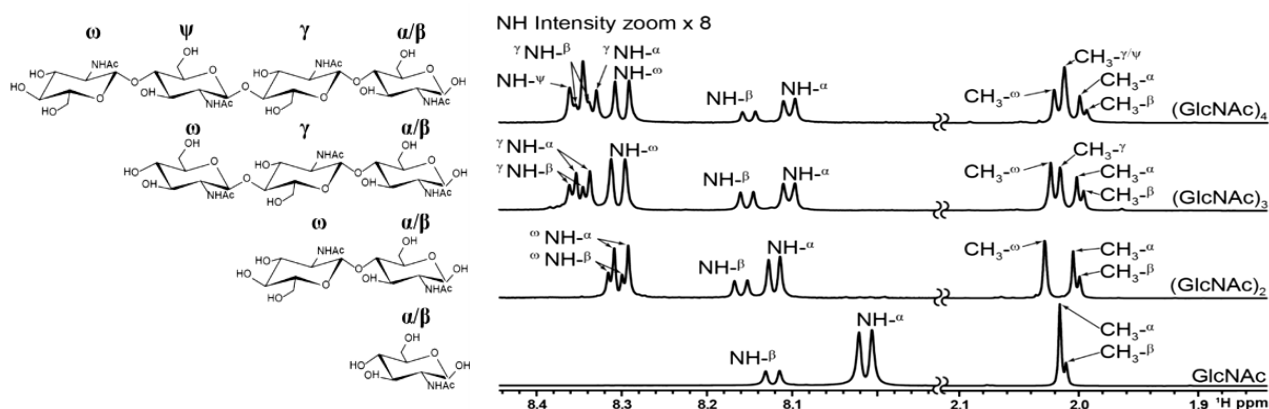


Рисунок 1.6. ^1H ЯМР-спектр олигосахаридов (N-ацетилглюкозамина) $_{1-4}$, растворитель H_2O : ДМСО- $\text{d}_6 = 7 : 3$; 25°C [131].

Следует отметить, что совокупность температурного коэффициента ($\Delta\delta/\Delta T$) амидных протонов и изменение pK_a является качественным показателем водородных связей в пептидах и белках [134].

1.2 Гидродинамические характеристики солей хитозана

К основным гидродинамическим характеристикам макромолекул в разбавленных растворах, получаемым методом капиллярной вискозиметрии, относятся: характеристическая вязкость или предельное число вязкости ($[\eta]$, дл/г) и константа Хаггинса (k_x), имеющих физический смысл гидродинамического объема макро клубка и термодинамического качества растворителя, соответственно [40, 135]. Вследствие полиэлектролитной природы и повышенной жёсткости цепи, обусловленной гликозидными связями, размеры макромолекулярных клубков хитозана находятся в зависимости как от физико-химических характеристик самого полимера: молекулярной массы и степени деацелирования [84, 92, 135–138] (рисунок 1.7 а), так и от степени протонирования аминогрупп (α' , мольн.%) [139] (рисунок 1.7 б).

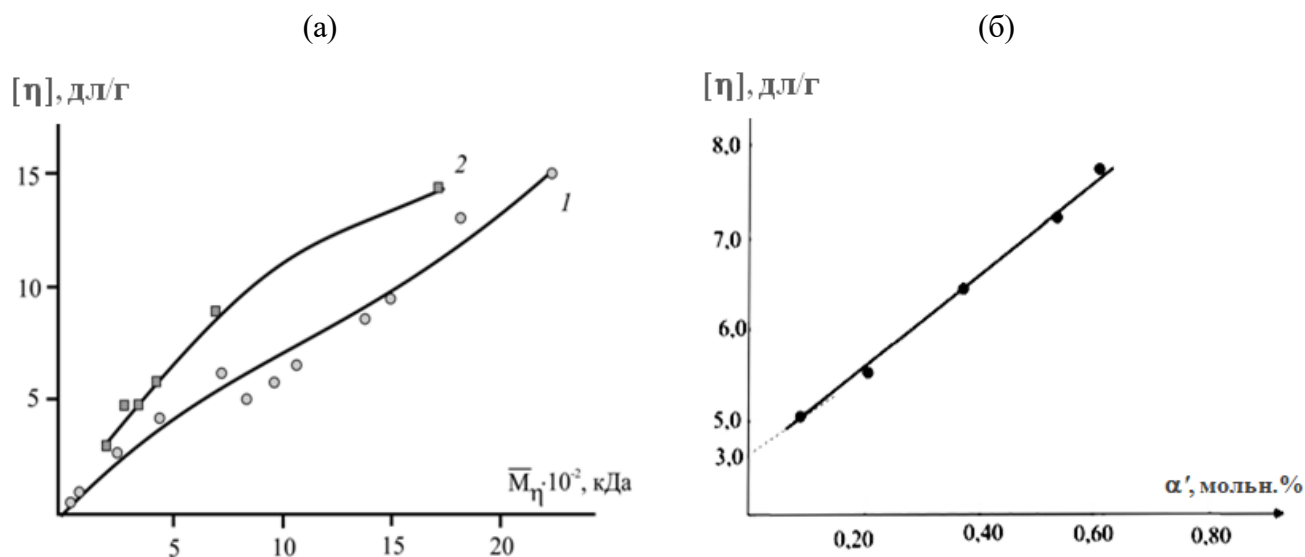


Рисунок 1.7. Зависимость предельного числа вязкости $[\eta]$ растворов ХТЗ от средневязкостной молекулярной массы \bar{M}_n (а) и степени протонирования α' (б) в CH_3COOH без/с $\text{NaCl}/\text{CH}_3\text{COONa}$; СД = 75 (1) [84, 137] и 91–93 мольн.% (2) [92, 136, 137], в CH_3COOH для ХТЗ с $\bar{M}_n = 130$ кДа и СД = 84 мольн.% (б) [139].

На основании экспериментов по светорассеянию показано, что конформация макромолекул хитозана в Na-ацетатном буфере при увеличении молекулярной массы может изменяться от формы «палочки» до гауссова клубка сравнительно большого размера [77]. В работе [135] установили самоассоциацию макроцепей за счет гидрофобных взаимодействий ацетилированных звеньев хитозана в аммониево-ацетатном буфере, т.е. в условиях, препятствующих образованию водородных связей. При этом, увеличение количества глюкозацетамидных звеньев повышает жесткость макроцепи [92, 135]. Кроме того, способность

функциональных групп образовывать внутри- и межмолекулярные водородные связи, стабилизирующие конформацию макромолекулы и приводящие к возможной ассоциации макроцепей [40, 83, 87, 88, 135, 139–141] вносит дополнительный вклад в конформацию макромолекул хитозана.

Как правило, традиционными растворителями хитозана являются водно-кислотные растворы одноосновных неорганических и органических кислот: соляной, уксусной, муравьиной [19–32, 88, 135–146]. В работе [146] показано, что сила кислоты–растворителя влияет не только на максимально достижимую степень протонирования (α'_{\max} , %) макромолекул ХТЗ ($C_{\text{HCl}}/C_{\text{ХТЗ}} = 0.8$, $C_{\text{CH}_3\text{COOH}}/C_{\text{ХТЗ}} = 7.0$), но и на характер концентрационной зависимости степени протонирования (рисунок 1.8).

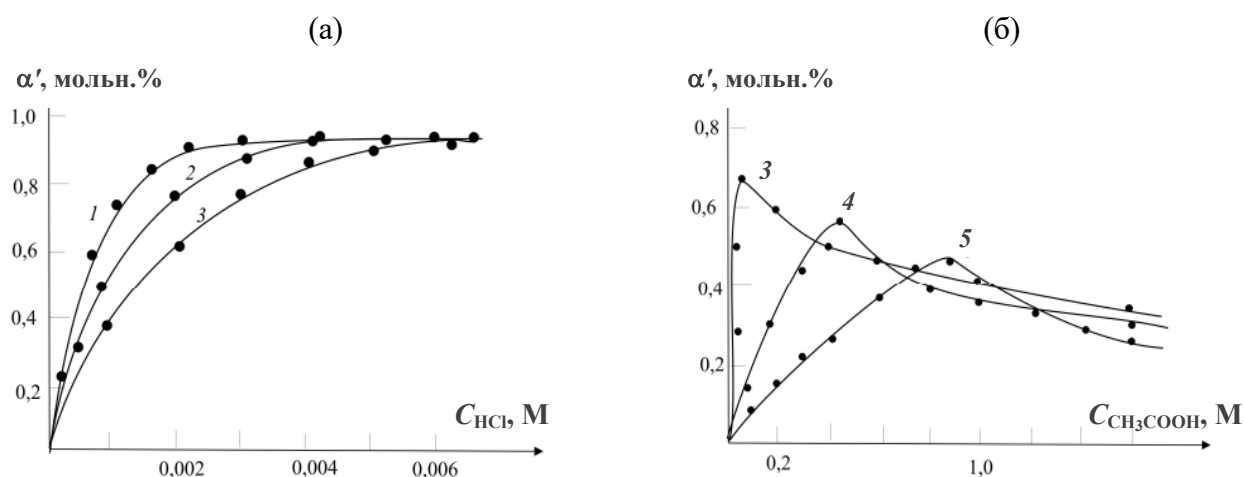


Рисунок 1.8. Зависимость степени протонирования ХТЗ ($\bar{M}_\eta = 80$ кДа, СД = 80 мольн.%) от концентрации HCl (а) и CH_3COOH (б) для $C_{\text{ХТЗ}} = 0.0025$ (1), 0.005 (2), 0.0075 (3), 0.075 (4) и 0.125 М (5) [146].

Экстремальную зависимость $\alpha' = f(C_{\text{CH}_3\text{COOH}})$ авторы объясняют уменьшением степени диссоциации кислоты (слабого электролита) с увеличением ее концентрации в растворе, а снижение α'_{\max} в более концентрированных по полимеру растворах – уменьшением доступности звеньев. Показано, что при α'_{\max} наблюдается максимально возможная доступность гликозидной связи ХТЗ для взаимодействия с ферментом за счет отсутствия надмолекулярных эффектов [146].

Немаловажным аспектом конформационного состояния макромолекул хитозана является ионная сила растворяющей смеси (I , мМ) и добавка индифферентного электролита [35–39, 83, 86–92]. Так, в водно-кислотных растворах полимера при низкой ионной силе наблюдается полиэлектролитный эффект вследствие отталкивания одноименно заряженных глюкозаминных звеньев с протонированными аминогруппами $-\text{NH}_3^+$ [88, 144, 145]. Увеличение ионной

силы, например введением соли-электролита или повышением концентрации кислоты, приводит к поджатию клубков в результате экранирования зарядов макроиона низкомолекулярными противоионами [88, 91]. Общепринято, что экранирование большинства макроионов для полиэлектролитов происходит уже при $I = 50$ мМ и дальнейшее повышение содержания низкомолекулярного электролита не имеет сильного влияния на радиус инерции ($\langle R_G \rangle$, нм) клубков и концентрацию кроссовера (C^* , г/дл). Однако, определенная *in silico* персистентная длина (l_p , нм) при $I \rightarrow \infty$ в значительно снижается (таблица 1.2) [88].

Таблица 1.2 – Влияние ионной силы растворителя на гидродинамические параметры хитозана ($\bar{M}_\eta = 850$ кДа, СД = 93 мольн.%) [88]

Состав растворителя, М			I, мМ	[η], дл/г	$\langle R_G \rangle$, нм	l_p , нм	C^* , г/дл
CH ₃ COOH	CH ₃ COONa	NaCl					
0.5	–	–	9	3.0	162	81	0.28
	0.1	–	120	1.0	113	40	0.78
		0.1	240	0.8	105	35	0.90
		0.3	460	0.7	101	32	0.98
<i>in silico</i>			∞	–	–	24	–

В ряде работ [76, 86, 135–148] отмечают значительное (до 80%) падение вязкости при длительном хранении растворов хитозана. Такую кинетическую нестабильность вязкостных свойств растворов хитозана авторы связывают с деструкцией макромолекул в результате кислотного гидролиза гликозидных связей [84]. Однако, исследования последних лет показали, что основными причинами изменения вязкостных свойств являются конформационные перестройки макроцепей [86, 136, 145, 147] и изменение надмолекулярной структуры полимера, в том числе и агрегация [76, 148], не затрагивающее молекулярную массу образца. В работе [142] приведены веские доказательства протекания в разбавленных растворах ХТЗ в хорошем растворителе фазового разделения типа «жидкость–кристалл» вследствие ионной агрегации (ассоциации) макроцепей. Так, самопроизвольно выделившаяся твердая фаза из раствора ХТЗ в Na-ацетатном буфере, хранившегося более 1800 сут, имеет высоко-кристаллическое состояние, $\chi = 82\%$ [142].

1.3 Реологические свойства умеренно-концентрированных и концентрированных растворов хитозана

Физико-химические свойства полимерного раствора в значимой степени зависят от концентрации полимера. Показателями перехода из режима разбавленных растворов (изолированные макроклубки) к умеренно-концентрированным

(взаимопроникающие клубки – ассоциаты) является концентрация кроссовера (C^* , г/дл), а в режим концентрированных (связанные ассоциаты, микродомены) – концентрация образования флуктуационной сетки зацепления (C_e , г/дл). В отличие от растворов неионогенных полимеров, для растворов хитозана при переходе от трансляционного механизма массопереноса при концентрации полимера $C_{II} < C^*$ (область I) к механизму рептации при $C_{II} \geq C_e$ (область III) наблюдается расширение переходной области II при $C^* < C_{II} < C_e$ в результате электростатического отталкивания протонированных аминогрупп, что снижает число возможных контактов поликатионов (рисунок 1.9) [20, 87, 88, 149–154].

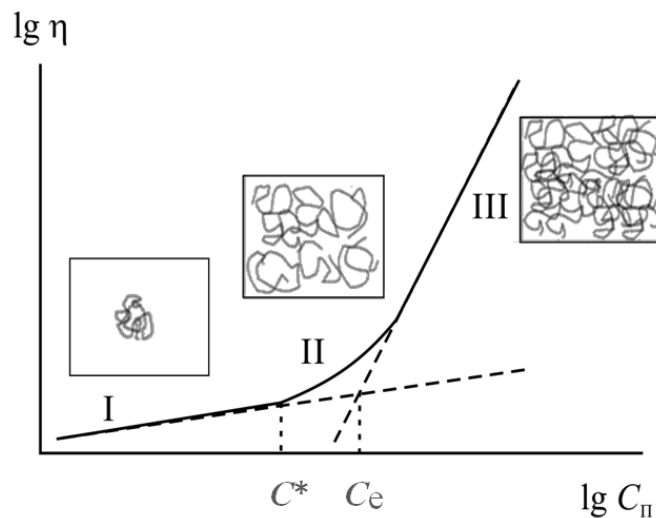


Рисунок 1.9. Концентрационные режимы раствора полимера: I – разбавленный при $C_{II} < C^*$, II – полуразбавленный при $C_{II} \geq C^*$, III – концентрированный при $C_{II} \geq C_e$. Теоретически для классических растворов полимеров наклон прямолинейного участка I равен 1 (или $C^* = 1/[\eta]$), для участка III – 3.5 для гибкоцепных, 4.9 для полужесткоцепных и 6 для жесткоцепных [87, 88, 149].

В диапазоне переходных концентраций растворов хитозана (область II) доля поликатионов увеличивается. Наблюдается также повышение и концентрации противоионов, сопровождающее увеличение ионной силы среды и, как следствие, экранированием электростатического отталкивания сегментов макроцепей. Реализуемое в таких условиях постепенное сжатие макромолекул сопровождается формированием физической сетки флуктуационного характера. В области высоких концентраций полимера электростатические взаимодействия поликатионов практически полностью экранированы. Узлы флуктуационной сетки образуются локальным трением частей макромолекул с полностью компенсированным зарядом, которые соответствуют состоянию макромолекул аналогичного неионогенного полимера (область III).

Критическая концентрация является мерой размера и конформации полимерного клубка, поэтому чем выше молекулярная масса и более жесткая конформация, тем ниже C^* [87, 88, 149–154]. Кроме того, концентрация перекрывания для растворов полиэлектролитов находится в сильной степенной зависимости от ионной силы среды $C^* \sim I^{1/3}$. Поэтому считается, что в концентрированных растворах хитозана и слабых кислотах (например, CH_3COOH), увеличение концентрации не оказывает заметного влияния на структуру и эффективность лабильных узлов флуктуационной сетки зацепления [149].

1.4 Влияние природы противоиона на свойства растворов солей хитозана

Вискозиметрические свойства растворов хитозана и конформационное состояние макромолекул определяются не только значением pK кислоты, pH и ионной силой растворяющей среды, но и молекулярной структурой (полярность, функциональность) и объемом противоиона водно-кислотной среды [7, 24, 26, 35–40, 43, 86–88, 93, 96–98, 108–110, 143, 155, 156]. Например, в солевых комплексах аминополисахарида со специфическими кислотами, кроме водородных, классических кулоновских и гидрофобных взаимодействий, характерных для солей ХТЗ с традиционными кислотами-растворителями (CH_3COOH , HCOOH), возможны специфические кулоновские (в виде ионных ассоциатов) и ион-дипольные меж- и внутримолекулярные контакты [37, 43, 97, 156] (рисунок 1.10). Это приводит к формированию специфических пространственно-сшитых структур, определяющих конформационные особенности, надмолекулярное упорядочение и стереоселективные свойства получаемых солей.

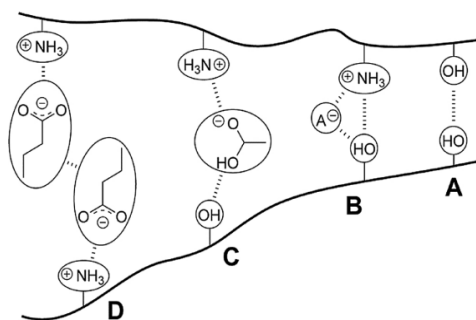


Рисунок 1.10. Схема возможных взаимодействий полимерных цепей (пунктирные линии) в солевых пленках хитозана при низкой влажности за счет водородных связей (А), ион-дипольных (В), кулоновских в виде ионных ассоциаций (С) и гидрофобных взаимодействий (D) [43, 97].

При этом, применение биологически активных органических кислот позволяет, с одной стороны, варьировать свойства получаемых материалов для наилучшего соответствия области применения, а с другой – объединить

биохимические активности макромолекулы аминополисахарида и аниона кислоты с возможным синергетическим эффектом [7, 9, 22–32, 35–38, 61, 93, 108, 109].

1.4.1 Перспективность аскорбатов хитозана

Использование водных растворов биологически активных органических кислот фармацевтического назначения, обеспечивающих донорно-акцепторное взаимодействие при получении солей хитозана, например аскорбиновой (АК), является перспективным для практических приложений медицины и фармакологии [62–73, 157–167]. Установлено, что кислотные соли ХТЗ и АК улучшают доставку фармпрепаратов [64–67] и терапию болезни Крона [68]. Нанесение оболочки из аскорбата хитозана подавляет рост микроорганизмов и значительно продлевает срок хранения плодов [69–73]. Также комплексы ХТЗ–АК проявляют специфичную адсорбцию к жирным кислотам [157, 158], селективную цитотоксичность в отношении атипичных клеток [63, 65], высокую хелатирующую способность к тяжелым металлам и радионуклидам [159, 160], противовоспалительную [70, 161, 162] и антибактериальную активности [163], характеризуются проявлением высокой мукоадгезии [164, 165], повышением индекса пролиферации эндотелиальных клеток [67], усилением антиоксидантных свойств [69, 72, 73, 166], а также эффективны при заживлении ран различной этиологии [64, 70, 161, 162, 167]. Установлено, что работа мукоадгезии и проникающая способность в слизистую оболочку полости рта и в монослой клеток кишечника усиливается в ряду солей ХТЗ гидрохлорид → лактат → аскорбат [164]. При этом получение аскорбата хитозана в присутствии восстановителя посредством реакции Шиффа понижает его антибактериальную активность за счет уменьшения совокупного заряда макромолекулы [166]. Таким образом, для биомедицинских приложений оптимальным является ионное солеобразование с переносом протона к аминогруппам ХТЗ, обеспечивающих биологическую активность полимерной системы.

Большая часть исследований системы на основе ХТЗ и АК проведена с биологически активной *L*-формой кислоты (витамин С). Зачастую в исследовательских работах даже не указывается изоформа используемой кислоты. Возможно, это объясняется классическим представлением о фармакологической активности только *L*-изомера АК, а именно, природный *L*-изомер АК выступает в качестве кофермента гидроксилаз в ряде метаболических процессов, участвует в метаболизме фолиевой кислоты, проявляет антиоксидантную активность, стимулирует синтез коллагена и пролиферацию фибробластов, участвует во всех

фазах заживления ран [168–170]. Между тем, *D*-антипод АК тоже проявляет биологическую активность [74] и может быть весьма перспективен при разработке препаратов с новыми функциональными качествами.

1.4.2 Диастереоизомерия аскорбиновой кислоты

Поскольку АК относится к классу оптически активных веществ с двумя хиральными атомами углерода (C4 и C5), то имеет две пары (диа)стереоантиподов, из которых коммерчески доступны природный *L*-изомер (витамин С) и его синтетический *D*-диастереоантипод (*D*-АК), характеризующиеся противоположной конфигурацией хирального центра при C5 [75, 171–176] (рисунок 1.11).

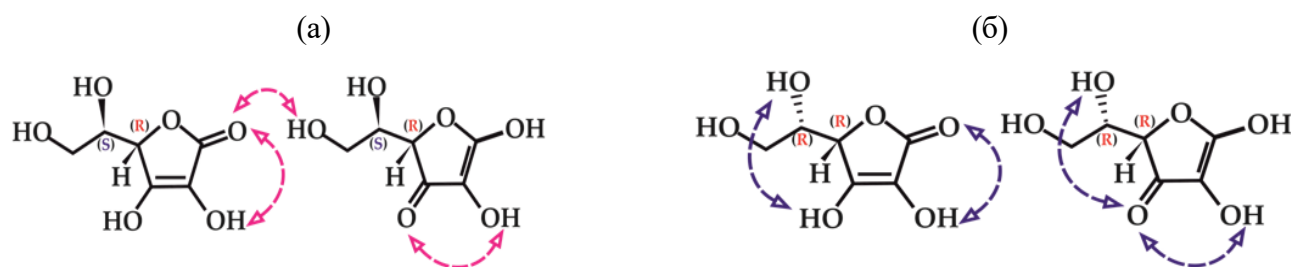


Рисунок 1.11. Схема образования меж- и внутримолекулярных водородных связей в индивидуальных диастереомерах *L*- (а) и *D*-АК (б) [75].

Оба диастереомера имеют жесткое практически плоское лактонное кольцо с окислительно-восстановительной эндиольной группировкой, обуславливающей кислотные свойства водного раствора АК за счет ионизации енольного гидроксила при C3 и формирования резонансно-стабилизированного аскорбат-аниона. В молекулах *L*- и *D*-АК длины и углы связей между атомами кольца, C2-OH и C3-OH близки, но углы в боковой цепи существенно различаются, что влияет на ионизационную способность *L*- и *D*-АК [172]. В силу обращения конфигурации C5 эписмеры АК различаются температурой и энтальпией плавления, растворимостью в воде, первой константой ионизации pK_{a1} , параметрами элементарной ячейки и системой меж- и внутримолекулярных контактов (рисунок 1.11). Так, в *D*-АК, помимо характерных для *L*-АК внутримолекулярных водородных связей между C2-OH и функциональных фрагментов C1 или C3 и межмолекулярных H-связей C1 и C6-OH, реализуются C5-OH...C3 внутримолекулярные взаимодействия [75, 173–175].

L-АК и ее соли (E300–304), *D*-АК и ее натриевая соль (E315–316) разрешены к применению в качестве пищевых антиоксидантов и стабилизаторов окраски. Однако, *D*-АК обладает только 5% биологической активности витамина С, более слабым супрессорным эффектом в отношении лейкомиических клеток человека и невысокой коллагенстимулирующей активностью [174, 175]. Это связано с тем, что

восстановительные и кислотные свойства аскорбиновых эпимеров обусловлены фурановым кольцом, группой ендиола и карбонилем в положении С1, тогда как биологический эффект связан с боковой цепью [168–170]. Однако, *D*-изоформа является более мощным усилителем биодоступности железа и повышает стабильность других антиоксидантов (например *L*-АК) в смесях [75]. Последнее, возможно, реализуется за счет разницы, хотя и не очень большой, в силе этих кислот (таблица 1.3).

Таблица 1.3 – Физико-химические свойства диастереоизомеров *L*-(*D*-)АК

Параметр	<i>L</i> -АК	<i>D</i> -isoАК
Тривиальное название/ код Е	Аскорбиновая кислота Витамин С/Е300	Изоаскорбиновая кислота Эриторбиновая/Е315
Название ИЮПАК	(5R) - [(1S) -1,2-дигидроксиэтил] - 3,4-дигидроксифуран-2 (5H) -он	(5R) - [(1R) -1,2-дигидроксиэтил] -3,4-дигидроксифуран-2 (5H) -он
$[\alpha]_{589\text{ нм}}^{25^\circ\text{C}}$, град·мл/дм·г (СН ₃ ОН)	+48	-48
pK_{a1}	4.26	4.18
Растворимость в воде, г/л	333	100
$T_{пл}$, °С	192.1	169.5
Энтальпия плавления, кДж/моль	43.54	40.86
Энтропия растворения, кДж/моль·К	-53	-52

Таким образом, *L*-АК в три раза более растворима в воде и менее кислотная, чем *D*-АК. Разность в кислотности между *L*- и *D*-АК можно обосновать тем, что более кислотная группа С3-ОН будет усиливать внутримолекулярную водородную связь с С5-ОН. Кроме того, ожидается, что межмолекулярные взаимодействия между молекулами *D*-АК в конденсированном состоянии будут слабее, чем в *L*-АК, поскольку температура плавления и термодинамические параметры плавления и растворения меньше, чем для *L*-аскорбиновой кислоты (таблица 1.3).

Диастереомеры имеют одинаковые функциональные группы и групповые частоты, но спектральные различия проявляются в некоторых «сдвинутых» полосах поглощения, и эти различия обеспечивают разные спектральные «отпечатки пальцев», которые полезны в качестве библиотечных стандартов для дифференциации изомеров. Так ИК-спектроскопия *L*-АК и *D*-изоАК в области валентных колебаний связей О–Н и межмолекулярной водородной связи (3550–3300 см⁻¹) показывает четыре [172, 173] и два интенсивных пика [75], соответственно (рисунок 1.12). Однако, в случае *D*-изоАК данные полосы поглощения смещены в более низкочастотную область, поскольку вовлечены в образование внутримолекулярной водородной связи. Таким образом, ИК-

спектроскопия подтверждает, что в двух эписмерах существует различный набор меж- и внутримолекулярных контактов, который строго связан с конфигурацией С5.

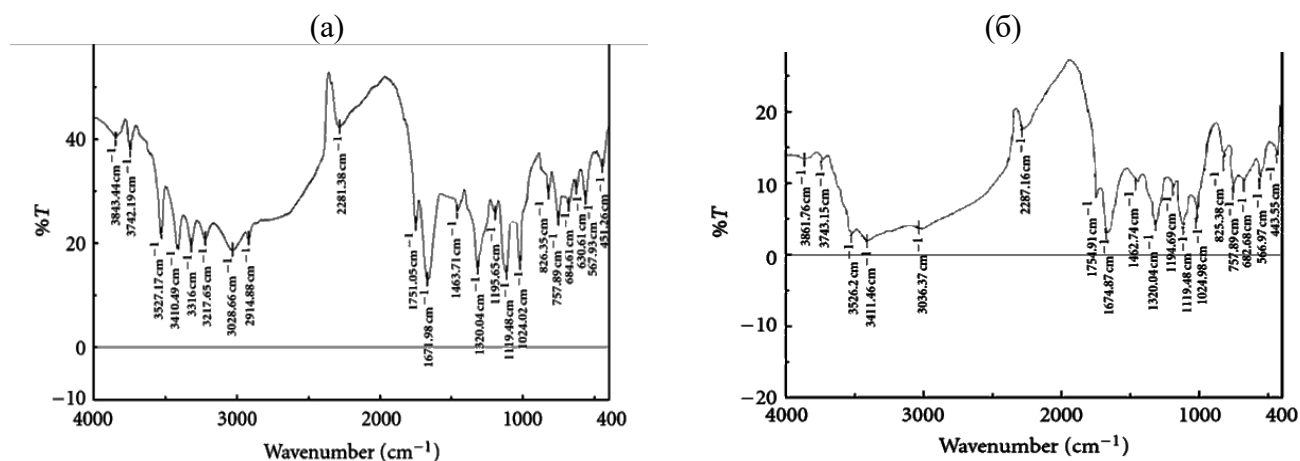


Рисунок 1.12. ИК-спектр *L*- (а) и *D*-аскорбиновой кислоты (б) [173].

Такие различия в конфигурации и распределении водородной связи приводят к различному поведению двух эписмеров, особенно в их способности взаимодействовать с одинаковыми молекулами [174–176]. Так, взаимодействие с уранил ацетатом (негативное контрастное вещество ТЭМ-микроскопии) в щелочной среде приводит к выпадению нерастворимых кристаллов диураната в случае *L*-АК и образование стабильного яркоокрашенного комплекса с *D*-АК. Комплекс с никотиновой кислотой, стабилизированный Н-связями $-\text{COO}^- \cdots \text{HO}-\text{C5}$, образует только *L*-АК [176]. Однако различия в способности *L*- и *D*-АК образовывать комплексы с цианидом калия или фенолом и детоксикацию столбнячного токсина не были обнаружены [174, 175]. Установлено влияние *L*-(*D*-) изомерной формы АК в составе поверхностно-активных эфиров с моно- [75] и дикарбоновыми кислотами (рисунок 1.13) [171] на их структурные и физико-химические свойства, а также на термодинамику самосборки в водной среде. Так, температура плавления, гидрофильность, длина и площадь поперечного сечения молекул *D*-эфиров меньше, чем *L*-эфиров. Значения критической концентрации и температуры мицеллообразования, а также параметр упаковки для *D*-производных превосходят аналогичные параметры для *L*-эфиров [75, 171].

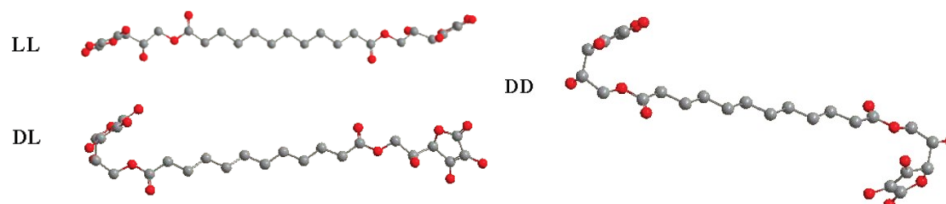


Рисунок 1.13. Предлагаемые молекулярные структуры Кори–Полинга–Колтуна диэфиров *L-L*-, *D-L*- и *D-D*-АК и додекандиовой кислоты [171].

Анализ литературы показывает влияние хиральности *L*-(*D*-)АК на макросвойства и фазовое поведение формируемых производных, следовательно, использование диастереоизомеров АК для формирования гетеро- (*D-L*) и гомохиральных солей (*D-D*) с *D*-аминоглюканом хитозана является потенциальным инструментом управления их функциональными характеристиками и биологическими эффектами.

1.5 Влияние хиральности биологически активных материалов на их функциональные свойства

Хиральность – основная характеристика живой материи, выполняет важную роль во многих биохимических процессах (комплементарное распознавание, кодирование генетической информации и т.п.) и проявляется на разных иерархических уровнях организации вещества: от молекулярного до супрамолекулярного [6, 44, 45, 177, 178]. Молекулярная хиральность реализуется вследствие несимметричного упорядочения химических групп, ковалентно связанных с центральным атомом. Супрамолекулярная хиральность возникает вследствие несимметричного взаимодействия ахиральных молекулярных компонентов в нековалентном «ансамбле» (молекулярная самосборка) и генерируется такими межмолекулярными нековалентными взаимодействиями, как водородные связи, электростатические, гидрофобные и π - π взаимодействия, дисперсионные и Ван-дер-Ваальсовские силы [178]. Эволюционно природа предпочла только определенный тип хиральности, выбрав преимущественно *L*-аминокислоты в качестве основного компонента белков и ферментов или *D*-сахара в качестве основных компонентов ДНК, РНК и полисахаридов. Известно, что нарушение комплементарного взаимодействия молекулы-лиганда фармпрепарата с рецепторами клеток-мишеней при использовании рацематов *L* + *D*-изоформ лекарственного вещества может приводить к разнонаправленным эффектам: от положительного терапевтического действия до развития генетических мутаций. Поэтому, при разработке биологически активных полимерных материалов хиральной архитектуры (волокна, мембраны, гели и др.) и хиральными функциями (разделение энантиомеров, стереоспецифический катализ, биодатчики и т.п.) для медико-биологического и фармакологического применения (тканевая инженерия, регенеративная медицина, направленная доставка лекарств и т.п.) необходимо учитывать взаимосвязь пространственной структуры и биологической активности [6, 44, 45, 177–182] (рисунок 1.14).

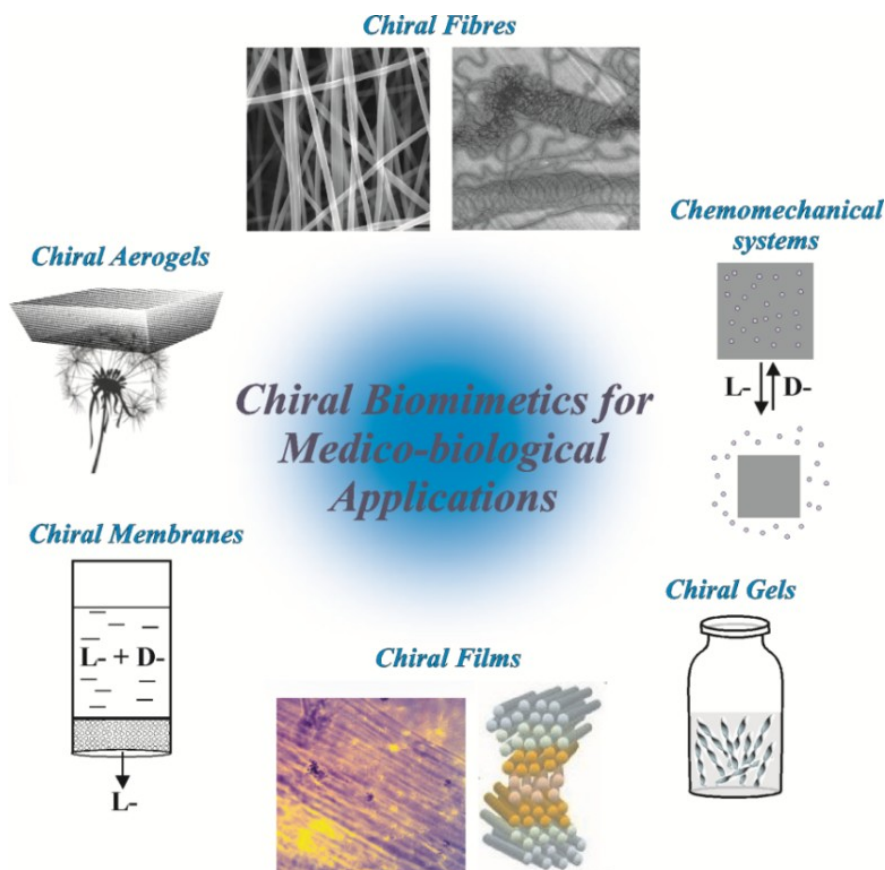


Рисунок 1.14. Перспективные направления применения хиральных биологически активных полимерных материалов [179].

Например, известно, что гетерохиральные гидрогелевые структуры на основе смесей поли ($L+D$)пептидов [180], поли ($L+D$)лактидов [181] или L -пептида с поли D -лактидом [182] существенно отличаются физико-механическими характеристиками от гомохиральных гидрогелей, полученных из индивидуальных энантиомеров.

1.5.1 Стереоспецифическое поведение биообъектов

К немаловажным факторам, определяющим связь структура – биоактивность и влияющих на биосовместимость материалов и их взаимодействие с клетками живого организма, относятся такие химико-физические свойства, как химический состав, поверхностный заряд, смачиваемость и топография поверхности (морфоструктура, шероховатость) [183–185]. Исследования *in vitro* показали, что культуры клеток показывают дифференцированное поведение на энантиоморфных поверхностях [180, 184, 185]. Например, обнаружена стереоспецифическая адгезия и пролиферация соматических клеток на кристаллах R,R - тартрата Са по сравнению с S,S -поверхностью [184] (рисунок 1.15 а), макрофагов – на золотых поверхностях, модифицированных N -изобутирил L -цистеином (Cys) по сравнению с D -Cys [185] (рисунок 1.15 б).

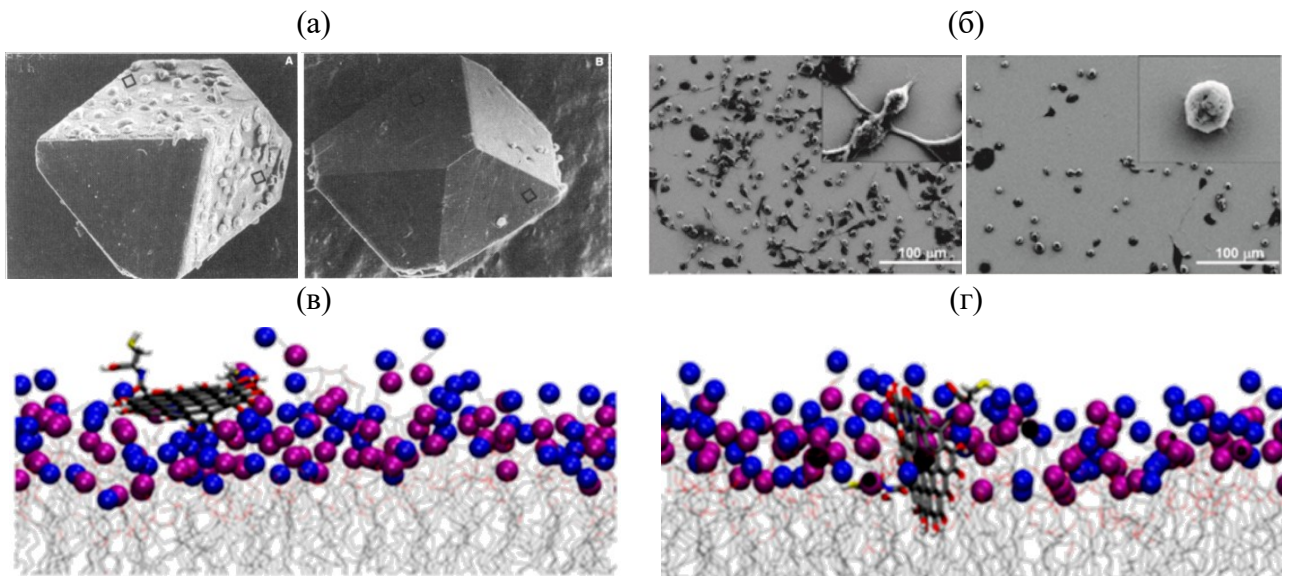


Рисунок 1.15. Поведение соматических (а) и иммунных клеток (б) на энантиоморфных поверхностях кристаллов R,R - и S,S -тартрата Ca (а) [184] и поверхностях, модифицированных N -изобутирил- L - и D -Cys (б) [185]. Наиболее вероятные *in silico* расположения L - (в) и D -Cys-GNSs (г) относительно билипидной мембраны [186].

Исследования *in silico* взаимодействия хиральных графеновых наноллистов (GNSs), покрытых L - или D -Cys, с билипидными мембранами показали, что D -Cys-GNSs имеют более сильную тенденцию к накоплению в клеточной мембране и, как правило, ароматическая часть располагалась перпендикулярно плоскости бислоя, в то время как покрытые L -Cys-GNSs не входили в бислой (рисунок 1.15 в, г) [186]. Вследствие чего, было сделано предположение, что поверхностная модификация L - (D -)Cys-GNSs должна по-разному влиять на мембранные структуры клеточной стенки прокариот и эукариот. Оценка биосовместимости *in vitro* L - (D -)Cys-GNSs с клетками печени подтвердила, что несмотря на их низкую цитотоксичность наблюдаются различия данного показателя между стереоизомерами: L -Cys-GNSs имеют более высокую общую биосовместимость, чем D -Cys-GNSs [187]. Однако, в присутствии индивидуальных L - (D -)Cys выявлена противоположная закономерность: D -Cys обладает лучшей биосовместимостью, проявляя терапевтическое действие при любых концентрациях, в то время как L -Cys в больших концентрациях показывает токсичность. Аналогичное стереоспецифическое поведение было отмечено при исследовании адгезии нейронных и мезенхимальных клеток костного мозга на поверхности гидрогелевого субстрата, модифицированного монослоем L - (D -)Cys [188]. Мезенхимальные стволовые клетки на поверхности гидрогеля L -Cys дифференцируются преимущественно в адипоциты (жировые клетки), на D -

остеобласты. На поверхности комбинированного Янус-гидрогеля поли *L*-(*D*-)лизина фибробласты проявляют хемотаксис, предпочитая *D*-энантиомерсодержащий участок [189]. Химическая функционализация поверхности *L*-(*D*-)маннозой, *L*-(*D*-)пеницилламином или *L*-(*D*-)пентаацетатом маннозы позволяет селективно разделять смеси злокачественных и здоровых клеток [190]. Таким образом, стереоспецифическое поведение клеток обуславливает высокий интерес к хиральным биологически активным материалам.

Следует отметить, что специфическую биологическую роль *D*-изомеров биологически активных веществ, в частности, аминокислот (АМК) уже не считают редким явлением. Исследования последнего десятилетия выявили отклонение от заявленной ранее «хиральной чистоты» биосистем, в частности, принципа построения природных белков только из *L*-аминокислот. Обнаружено, что *D*-АМК входят в состав клеточной стенки прокариот, участвуют в нормальном метаболизме и в процессах регуляции жизнедеятельности эукариот, найдены в гормонопродуцирующих клетках млекопитающих и дентине зубов человека [191]. При этом физиологическое поведение и активность в организмах *D*-АМК существенно отличаются от *L*-АМК. Предполагается, что *D*-АМК образуются в результате внутренней рацемизации, участвуют в регуляции нейротрансмиссии, врожденного иммунитета и барьерной функции живого организма [192]. Установлено, что при терапии некоторых заболеваний эффективным является не природный биологически активный *L*-изомер вещества, а его синтетический *D*-антипод [193]. Высокая эффективность *D*-АМК выявлена при разрушении биоплёнок и снижении антибиотикорезистентности живого организма, что открыло новые направления для разработки персонализированных антимикробных препаратов [194]. Включение *D*-АМК в состав синтетических диастереомерных пептидов обеспечило их более высокую биостабильность и синергическую эффективность в отношении злокачественных клеток человека [192, 193]. Таким образом, формирование солевых комплексов ХТЗ со структурой и свойствами, кодируемыми хиральностью, является перспективным направлением получения биомедицинских материалов не только с улучшенными, но и принципиально новыми биологическими функциями [191–194].

1.5.2 Хиральные хитозансодержащие материалы

Традиционно хиральность аминополисахарида ХТЗ используют при создании хиральных стационарных фаз [49] и хиральных селекторов [50] для

хроматографического и электрофоретического разделения рацематов посредством формирования переходных диастереомерных комплексов различной стабильности между энантиомером и хиральным субстратом. Созданы фотонные наноструктурированные хитозановые мембраны с перестраиваемыми хирооптическими свойствами, открывающие новые возможности для оптического зондирования и шаблонирования [49, 52, 53], а также твердо- и жидкофазные энантиоселективные мембраны для хиральной ультрафильтрации рацемических смесей оптически активных веществ [46, 51, 195, 196]. Например, с помощью технологии импринтинга *L*-фенилаланина [195] или *L*-тирозина [196] в хитозановую матрицу получены мембраны для разделения стереохимических соединений из водных растворов. В асимметрическом синтезе спиральная конформация молекул ХТЗ, выполняя роль стереодифференцирующего фактора, создает возможность получения микропористых матриц в качестве макрохелатирующих подложек–лигандов для стереоселективных металлических катализаторов [51–53]. Ковалентно модифицированные *L*-(*D*-)фукозой аминокислоты ХТЗ показывают специфическое сродство с лектином синегнойной палочки [197]. В работе [198] на основе смеси хитозана и бетулинового альдегида под действием УЗ-излучения получены гомохиральные гидрогели. Сравнение данных ИК- и КД-спектроскопии, рентгеновской дифракции и поляризационной оптической микроскопии (ПОМ) показало, что движущей силой гелирования является супрамолекулярное упорядочение бетулина в кластеры, играющих роль сшивающих узлов цепей ХТЗ.

Конъюгаты ХТЗ с ДНК обладают аномальной оптической активностью, благодаря чему используются в качестве чувствительных элементов (биодатчиков) биосенсорных устройств [199]. Синергетический эффект взаимодействия ХТЗ с хиральными графеновыми квантовыми точками (GQDs) на поверхности углеродного электрода привел к разработке электрохимических датчиков для хирального распознавания энантиомеров АмК (исследования проведены на примере триптофана) [200]. Показано, что роль полисахарида состоит в обеспечении хиральности микросреды пленочной поверхности электрода (дифференцирующей энергетическое состояние энантиомера), а хиральные GQDs существенно усиливают электрохимический сигнал. В работе [59] обнаружено влияние ХТЗ на энантиоселективную биодоступность хирального гербицида дихлорпропаTM ((*R*)-2-(2,4-дихлорфенокси)пропановая кислота) при культивировании *Chlorella pyrenoidosa* в его среде: в присутствии ХТЗ гербицидно активный *R*-энантиомер проявлял меньшую токсичность, чем балластный *S*-энантиомер.

Весьма перспективны исследования в области так называемых хемомеханических гидрогелей на основе хиральных солевых комплексов ХТЗ с *L*-(*D*-)дибензоилвинной кислотой. *D*-гидрогели способны уменьшать свой объем на 94% (рисунок 1.16) в водной среде при незначительном изменении ее химического состава, *L*-гидрогель сжимается лишь на 20%, а если в качестве лиганда взять оптически неактивную кислоту данный эффект утрачивается [60]. Такие системы могут быть использованы в качестве хемомеханических гель-приводов и датчиков для получения «умных» материалов, выполняющих функцию «химической пробки» или «химического штопора», «депо» генетического материала или биологически значимых соединений с последующим их высвобождением в зоне запланированной локализации после сокращения объема.

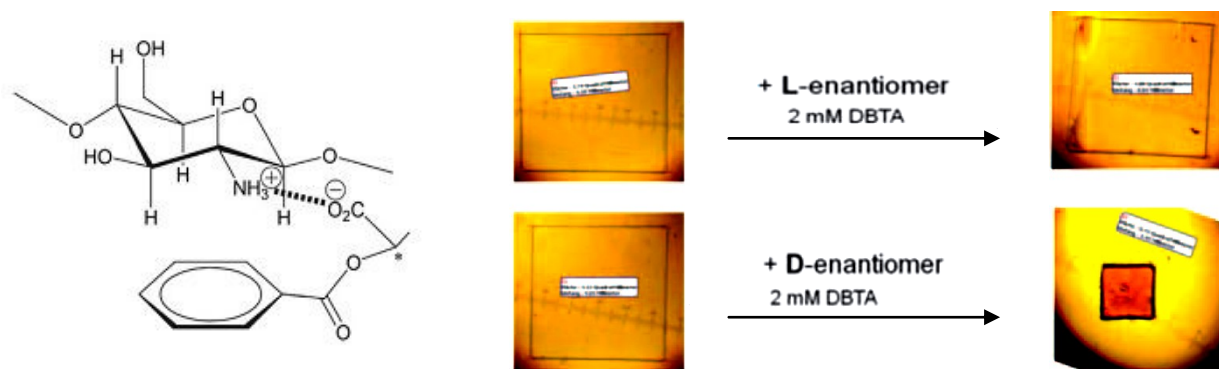


Рисунок 1.16. Макроскопические изменения размеров гидрогелевой пластины на основе хитозана и *L*- и *D*-дибензоилвинной кислотой в водной среде [60].

В публикациях последних лет также сообщалось о хитозансодержащих хирооптических рН-зависимых переключателях [44, 52, 53], импринтированных материалах для энантиоселективного разделения рацемических смесей лекарственных средств [46, 49, 51], гидро/аэрогелях с супрамолекулярной хиральной архитектурой [55, 61, 198], а также неинвазивных измерительных приборах, основанных на линейных и нелинейных оптических эффектах [50, 200, 201].

Таким образом, актуальность фундаментальных исследований в области хиральных полисахаридсодержащих систем медико-биологического назначения связана, прежде всего, с необходимостью разработки научных основ формирования биосовместимых материалов с заданной энантиоморфной архитектурой и управляемыми сайтами комплементарно-стереоспецифических взаимодействий. Практическая значимость определяется перспективой создания биоматериалов с принципиально новыми функциональными свойствами: от прецизионных матриц для тканевой инженерии, регенеративной медицины и тераностики до персонализированных лекарственных средств.

1.6 Оптическая активность хитозана в растворах и пленках

Для большинства биологически активных соединений существует тесная взаимосвязь между биологической активностью и их пространственной структурой [6, 44, 45, 177, 178], для установления которой используют такие спектрально-оптические методы как спектрополяриметрия в УФ- и видимой области спектра, УФ-спектроскопия в ближней области спектра, позволяющие регистрировать тонкие изменения в структуре вещества. Благодаря наличию в глюкопираных циклах макромолекул асимметрически замещенных атомов углерода ХТЗ относится к классу оптически активных полимеров. Однако, относительно оптической активности хитозана, как и хитина, в литературе имеются весьма ограниченные сведения [28, 47, 56–58, 108, 110, 121–129].

В работе [127] по значению удельного оптического вращения растворов ($[\alpha]_D$) оценивали продукты деацетилирования хитина в щелочной среде. Растворы всех полученных образцов в 10% CH_3COOH показывали левовращение, а наибольшее значение абсолютной величины $[\alpha]_D$ наблюдалось для образца, приготовленного при наименьшей длительности щелочного гидролиза. В статье [122] установлено, что водные растворы олигомеров глюкозамина с количеством аминоглюкопиранозных звеньев $n = 2-8$ характеризуются положительными значениями $[\alpha]_D$, а с $n = 10-15$ – отрицательными. С увеличением мономерных звеньев $[\alpha]_D$ уменьшается, достигая нулевого значения при $n = 9$, а затем возрастает по модулю, но уже в области отрицательных значений. В работах [124, 125] обнаружено, что дисперсии оптического вращения (ДОВ) позволяют оценить характеристическую концентрацию перекрывания макромолекулярных клубков в растворах ХТЗ (1% CH_3COOH), находящуюся в хорошем согласии с результатами, полученными другими методами [76]. Показано также, что величина $[\alpha]_D$ растворов слабо зависит от степени деацетилирования ХТЗ и заметно меняется лишь для образцов с СД > 80 мольн.%.

При переходе от растворов ХТЗ к пленочным надмолекулярным структурам отмечается возрастание абсолютных величин удельного оптического вращения [129]. Так, в статье [121] на примере спектров КД пленок хитина показано увеличение молярной эллиптичности и изменение знака полосы $n \rightarrow \pi^*$ перехода по сравнению со спектрами КД растворов мономера N-ацетил-D-глюкозамина и димера хитобиозы. В этой же работе проведен сравнительный анализ спектров КД хитина и хитозана с СД = 100 мольн.% (с целью исключения влияния ацетамидных групп),

полученных из растворов в гексафторизопропанол. Показана определяющая роль внутри- и межмолекулярных водородных контактов в реализации конформации макроцепей данных полисахаридов в блочном состоянии. На примере пленок ацетата ХТЗ установлена возрастающая зависимость модуля оптической активности с увеличением молекулярной массы полисахарида вследствие уменьшения подвижности структурных элементов и степени их упорядочения при фиксации макромолекул в пленочном материал [57].

Возрастание оптической активности отмечалось при формировании молекулами хитозана с линейными двухцепочечными молекулами ДНК β - и α -семейств нетипичных жидкокристаллических комплексов [128, 199]. При этом в полосе поглощения внешнего хромофора появляется аномально большая оптическая активность, на порядок и более превышающая абсолютные величины $[\alpha]_{\lambda}$ растворов индивидуальных молекул этих же полимеров.

Имеющиеся в литературе сведения касаются, как правило, спектрополяриметрического поведения хитозана в присутствии уксусной и соляной кислот (классические растворители). В статье [123] изучено влияние температуры, рН и ионной силы растворяющей среды на величину удельного оптического вращения растворов ($[\alpha]_{\lambda}$). В работах [56, 57] получены кривые ДОВ растворов хитозана в ацетатном буфере 0.33 М CH_3COOH + 0.2 М CH_3COONa для образцов полимера различной молекулярной массы (рисунок 1.17).

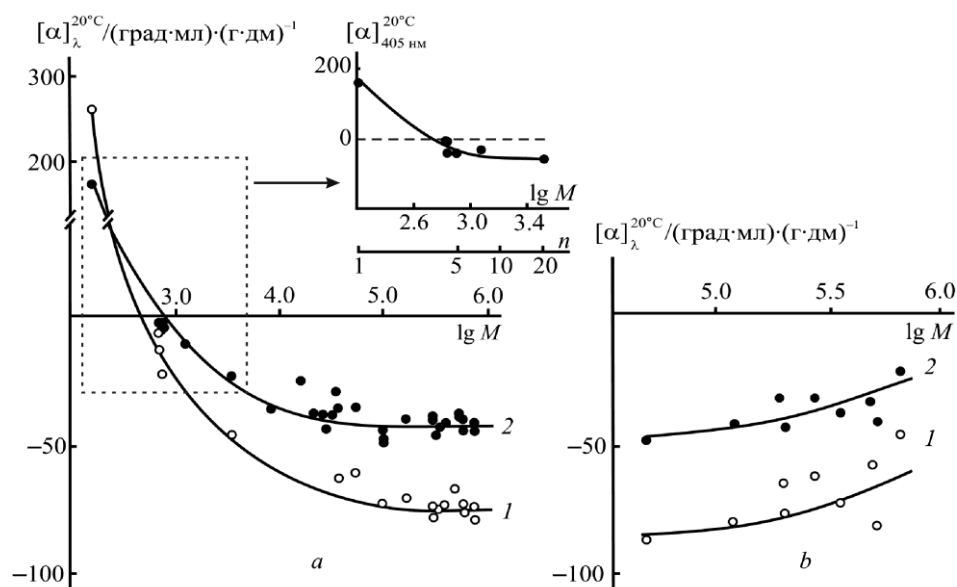


Рисунок 1.17. Зависимость удельного оптического вращения растворов (а) и пленок (б) ацетата ХТЗ от молекулярной массы при $\lambda = 313$ (1) и 405 нм (2). На вкладке – заштрихованная область зависимости $[\alpha]_{\lambda} - \lg M$ для олигомеров ацетата ХТЗ с числом аминоклюкопиранозных звеньев $n \sim 4 - 20$ [57].

На зависимости $[\alpha]_{\lambda} = f(\lg M)$ наблюдаются три области: постоянство значений $[\alpha]_{\lambda}$ для растворов высокомолекулярных образцов хитозана, относительно слабое их изменение для низкомолекулярных образцов и резкое – для олигомеров. Переход к низкомолекулярному аналогу мономерного звена хитозана – *D*-глюкозамину, как и в работе [122], – характеризуется инверсией знака вращения с достижением больших положительных значений $[\alpha]_{\lambda}$.

Таким образом, из литературных источников известно, что растворы хитозана в органических и неорганических кислотах имеют исключительно отрицательные значения удельного оптического вращения [54, 56, 57, 123–125]. Положительные же значения $[\alpha]$ характерны для растворов олигомеров хитозана, начиная с тетрамера, у которых преобладает противовирусная активность, в отличие от антибактериального действия полимеров хитозана, и мономеров *D*-глюкозамина и *N*-ацетил-*D*-глюкозамина – аналогов мономерного звена ХТЗ [56].

1.7 Сорбционные свойства конденсированного хитозана и его солей

Учитывая гидрофильность солевых форм ХТЗ, информативным методом оценки специфических особенностей хиральной организации *L*- и *D*-аскорбатов ХТЗ может рассматриваться сорбционный анализ. К настоящему времени установлено, что сорбция воды гидрофильными биополимерами является неидеальным (аномальным) процессом вследствие ряда их структурных особенностей [42, 43, 202–210]. Наличие аморфных структур позволяет молекулам сорбата (как правило, парами или жидкой воды), обладающим значительно большей подвижностью по сравнению с высокомолекулярным веществом, проникать (диффундировать) в полимерную матрицу, раздвигая цепи и увеличивая свободный объем, вызывая тем самым релаксационные явления в набухающем полимере [204]. Активными центрами сорбции выступают функциональные фрагменты ($-\text{O}-$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$ и $-\text{NH}_3^+$) аморфной фазы полимера [41, 42, 207, 208, 210]. Кроме того, возможна специфическая адсорбция посредством межмолекулярных ориентационных взаимодействий активных центров сорбции [97]. Вследствие особенностей надмолекулярного упорядочения сорбция воды основными и солевыми формами ХТЗ (как и другими гидрофильными биополимерами) протекает, преимущественно, по механизму аномальной диффузии, сопровождаясь в набухающем полимере релаксационными явлениями (конформационными изменениями), молекулярным упорядочением (эффект энтропии) и формированием прочных связей полимер–сорбат (эффект энтальпии)

или их комбинацией [43, 208]. Известно также, что влияние молекулярной массы $\bar{M}_\eta = 10\text{--}600$ кДа и степени деацетилирования (СД = 73–92 мольн.%) на сорбционные и транспортные свойства хитозана незначительно [203, 209, 210]. Это связывают с малым вкладом концевых групп в сорбционную емкость хитозансодержащих сорбентов и неучастием в процессе сорбции кристаллической фазы образцов [203, 207–209]. Наряду с этим установлено значимое влияние на сорбционную емкость аниона кислоты–растворителя ХТЗ. Так, снижение степени сорбции солевых плёнок ХТЗ в ряду гидрохлорид–ацетат–бутират объясняется увеличением pK_a и, как следствие, снижением совокупного заряда макромолекулярной цепи [43].

Изотермы сорбции водяного пара хитозансодержащих сорбентов имеют ярко выраженный S-образный характер, а механизм сорбции удовлетворительно описывается в рамках полимолекулярной адсорбции Брунауэра–Эммета–Теллера (ВЕТ) и термического уравнения сорбции (ТЭС). Согласно данным ЯМР-спектроскопии и термогравиметрическому анализу (ТГА) адсорбированная вода в полимерной матрице может находиться в трех состояниях (модах): первично адсорбированных (связанных) молекул на активных центрах полимера, вторично адсорбированных (кластерных) молекул на активных центрах и растворенных молекул в аморфной фазе полимера [41, 205, 207]. Первично адсорбированная мода определяется классической моделью Ленгмюра, описывающей сорбцию как локальную квазихимическую реакцию между одной молекулой сорбата и одним адсорбционным центром эквипотенциальной поверхности сорбента, приводящей к адсорбционному насыщению с образованием монослоя:

$$W_p = \frac{W_m \cdot k_S p}{1 + k_S p}, \quad (1.1)$$

где W_p – количество адсорбированного вещества (моль⁻¹) при парциальном давлении p (Па); W_m – емкость монослоя (моль⁻¹); k_S – константа адсорбционного равновесия, характеризующая энергию взаимодействия сорбат – сорбент (Па⁻¹). Однако модель мономолекулярной адсорбции имеет ограниченную применимость и справедлива только в области низкой активности пара, при $p/p_S < 0.4$.

При средних значениях относительного давления паров воды, $p/p_S = 0.4 \div 0.7$, происходит вынужденная конденсация молекул сорбата на сайтах следующего энергетического уровня согласно механизму полимолекулярной адсорбции, что описывается моделью ВЕТ:

$$W_p = \frac{W_m \cdot k^* \cdot \frac{p}{p_s}}{\left(1 - \frac{p}{p_s}\right) \cdot \left[1 + \frac{p}{p_s} (k^* - 1)\right]}, \quad (1.2)$$

$$-\Delta G = RT \cdot \ln k^*, \quad (1.3)$$

где k^* – отношение констант равновесия мономолекулярной адсорбции и конденсации пара; $-\Delta G$ – разность энергии Гиббса процессов адсорбции и конденсации (Дж/моль). Уравнение ВЕТ достаточно хорошо передает ход зависимости изотермы сорбции для большинства гидрофильных систем до $p/p_s < 0.7$, т.е. до зоны кластерообразования [210]. Модифицированная трехпараметрическая модель ВЕТ, учитывающая сорбцию на ограниченном числе сорбционных слоев, позволяет удовлетворительно моделировать активность до $p/p_s < 0.8$ [202, 206].

Так же известно уравнение Гутгенхайма–Андерсона–де'Бера (GAB), которое представляет собой расширенное уравнение ВЕТ и успешно применяется для оценки сорбции воды крахмалом, микрокристаллической целлюлозой (МКЦ) и хитозаном [202].

$$W_p = \frac{W_m \cdot C_G \cdot k^{**} \cdot \frac{p}{p_s}}{\left(1 - C_G \cdot \frac{p}{p_s}\right) \cdot \left[1 + C_G \cdot \frac{p}{p_s} (k^{**} - 1)\right]}, \quad (1.4)$$

где k^{**} и C_G – безразмерные параметры, связанные с теплотой сорбции монослоя и промежуточного слоя, соответственно. Таким образом, уравнение GAB включает в себя дополнительный параметр C_G , который учитывает слои сорбированных молекул на границе монослой–объемная вода. Параметры k^{**} и C_G могут быть определены как:

$$k^{**} = B_1 \cdot \exp \left[\frac{H_1 - H_m}{RT} \right], \quad (1.5)$$

$$C_G = B_2 \cdot \exp \left[\frac{H_L - H_m}{RT} \right], \quad (1.6)$$

где H_1 – теплота сорбции воды в первом сорбированном монослое (Дж/моль); H_m – теплота сорбции воды в промежуточном слое (Дж/моль) и H_L – теплота конденсации воды (Дж/моль); B_1 и B_2 – безразмерные константы. В ряде исследовательских работ, посвященных сорбционным свойствам хитозансодержащих материалов [208], оценивалась эффективность сорбционных моделей. В результате определено, что из вышеперечисленных уравнений (1.1, 1.2

и 1.4) модель GAB позволяет более точно описать изотерму сорбции и определить число молекул воды, входящих в кластеры. Так было рассчитано, что при $p/p_s \approx 0.6$ на одно мономерное звено хитозана в аморфной фазе адсорбируется две молекулы воды, а повышение влажности до $p/p_s \approx 0.8 \div 0.9$ приводит к кластеризации до четырех молекул воды [43, 208].

Предложенная в работах отечественной научной группы [205] феноменологическая модель гигроскопичности для гидрофильных полимеров включает сумму трех изотерм, каждая из которых характеризует соответствующее состояние (моду) адсорбированной воды в биополимере: в виде свободных молекул в матрице полимера (W_1), первично (W_2) и вторично адсорбированных молекул на активных центрах (W_3):

$$W_1 = \Gamma p, \quad (1.7)$$

$$W_2 = \frac{W_m \cdot (\alpha - \beta) \cdot \frac{p}{p_s}}{1 + (\alpha - \beta) \cdot \frac{p}{p_s}}, \quad (1.8)$$

$$W_3 = \frac{W_m \cdot \beta \cdot \frac{p}{p_s}}{1 - \beta \cdot \frac{p}{p_s}}, \quad (1.9)$$

где Γ – коэффициент Генри (моль/(Па·л)); C_m – «ленгмюровская» емкость (моль⁻¹); α и β – эффективные безразмерные параметры адсорбционного взаимодействия первичных и вторичных активных центров с молекулой воды, соответственно, зависящие также от интенсивности растворения воды в матрице биополимера. С целью упрощения выражения, полагая, что $W_1 \ll W_2 + W_3$, изотерма сорбции в данной модели описывается уравнением (1.10), по сути являющимся уравнением GAB (1.4):

$$W_p = \frac{W_m \cdot \alpha \cdot \frac{p}{p_s}}{\left(1 - \beta \cdot \frac{p}{p_s}\right) \cdot \left[1 + (\alpha - \beta) \cdot \frac{p}{p_s}\right]}. \quad (1.10)$$

Очевидно, что при $\beta = 1$ уравнение (1.10) переходит в уравнение BET (1.2). В работе [205] показано хорошее согласие экспериментальных изотерм сорбции хитина и хитозана растительного и животного происхождения при значении параметра $\beta = 0.7 \div 0.8$.

В работах российской научной группы д.х.н. Чалых А.Е. [41, 207] изотермы сорбции пленок хитозана описываются моделью двойной сорбции и представляют собой суперпозицию изотерм Ленгмюра и Флори-Хаггинса, характеризующие

локализованную (связанную с функциональными группами) и нелокализованную (несвязанную, свободно мигрирующую) моду сорбированных молекул воды, соответственно. Проведенное математическое разложение реальных изотерм позволило провести расчет согласно теории полимерных растворов Флори-Хаггинса и параметра парного взаимодействия $\chi_{1,2}$ [207, 211], чувствительного к составу мономерного звена полисахарида, и интеграла кластеризации в рамках статической теории Цимма-Ландберга (рисунок 1.18).

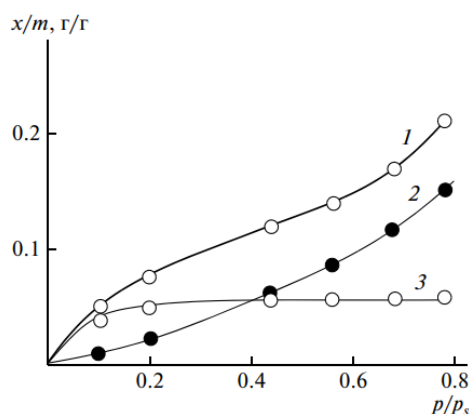


Рисунок 1.18. Разложение экспериментальной изотермы сорбции паров воды пленкой хитозана (1) на изотермы Флори-Хаггинса (2) и Ленгмюра (3) [207].

Стоит отметить, что сравнение сорбционного поведения аминополисахаридов хитина [206], хитозан-глюканового комплекса [206] и хитозана [202, 206–208] с другими полисахаридами, например крахмалом [205], хлопковой [206] и МКЦ [202], показывает отсутствие существенных различий (с учетом степени кристалличности и СД) в способности связывать молекулы воды при низких значениях парциального давления пара. Это возможно, если молекулы воды взаимодействуют, в основном, с гидроксильными группами полимера. Рассчитанные параметры C_G уравнения ГАВ для МКЦ и ХТЗ близки и равны 0.740 ± 0.005 [202]. Данный факт подтверждается результатами ИК-спектроскопии гидратированных образцов и обусловлен разницей в полярности связи $H \cdots O$ и $H \cdots N$. Наблюдаемая незначительная разница в значениях параметра k^{**} для МКЦ и ХТЗ (8 и 10, соответственно) обосновывается возможным взаимодействием молекул воды с аминогруппами ХТЗ при высокой влажности [202].

Таким образом, при низкой влажности сорбция воды в хитозансодержащих материалах осуществляется в аморфной фазе полимера на первичных центрах сорбции, как правило гидроксильных группах, и регулируется механизмом Фика. Показано, что при относительных давлениях ниже 0.7 гидроксильные группы хитозана играют основную роль в фиксации двух молекул воды на одно звено

глюкозамина [208]. При более высокой активности паров воды нарушаются полимер–полимерные водородные связи, что приводит к увеличению доступных для взаимодействия первичных центров сорбции (гидроксильные и аминогруппы) и молекулярной подвижности макромолекул (пластифицирующий эффект), вследствие чего молекулы воды связываются с другими молекулами воды, в том числе несвязанными с первичными центрами сорбции (кластеризация воды). Наблюдаемое отклонение от фиковского поведения свидетельствует об аномальной диффузии за счет эффектов пластификации (выше 50% [208]) и кластеризации воды (выше 60% влажности [207]). Развитие пластифицирующего эффекта при гидратации способствует потере газобарьерных свойств пленок и мембран ХТЗ при относительной влажности больше 80% [208]. Хорошее согласие с экспериментальными изотермами сорбции в широком диапазоне активности воды показывают модели, которые учитывают все состояния молекул воды (три моды) в матрице гидратированного биополимера.

1.8 Гидрогелевые хитозансодержащие материалы

Возрастающий интерес к хиральным гидрогелевым материалам обусловлен их биофизической близостью живым организмам, высокоразвитой поверхностью и способностью проявлять стереокомплементарность с рецепторами клеточных мембран и хиральным биомacroмолекулам, что позволяет использовать гидрогели в качестве имитации 3D-среды для оценки адгезии и плотности распространения клеток и в тканевой инженерии [1–6, 14–18, 44–46, 53–55, 182–190]. Органо-неорганические гибридные гидрогели являются перспективными материалами для медицины и фармакологии [212–215]. Такие гидрогели получают введением предшественника неорганической фазы (алкоксисоединений кремния $\text{Si}(\text{OR})_4$) в раствор полимера с образованием в результате золь-гель синтеза неорганической сетки силоксановых $\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$ связей на матрице органического темплата, определяющая состав и структуру гидрогелевой системы [212, 213]. Существенным преимуществом золь-гель технологии является возможность «*one pot*» получения монолитных гидрогелей. При использовании в качестве прекурсора тетраглицеролатата Si формируются глицерогидрогели в условиях, близких к физиологическим [214, 215]. Использование ионно-сшитой биологически активной хитозансодержащей матрицы позволяет получать биосовместимые глицерогидрогели с высокими мукоадгезивными, бактериостатическими и иммунокоррегирующими свойствами. Стоит отметить, что Si относится к

эссенциальным элементом ($C_{Si} = 10^{-3}\%$, потребность 30 мг/сут) и является энхансером кальция. Биологическая роль Si обусловлена образованием комплексов со структурообразующими полисахаридами соединительных тканей, придающие им механическую прочность. Стенки артерий у новорожденных содержат 0.007% Si, в 35 лет – 0.0025%, при атеросклерозе в местах разрушения артерий, где происходит отложение жиров, обызвествление и изменение эластичной ткани, $C_{Si} \rightarrow 0$. При дефиците Si отмечено развитие таких патологических изменений соединительных тканей и дегенеративных заболеваний, как остеопороз, атеросклероз, туберкулез, сердечно-сосудистая болезнь, болезнь Альцгеймера.

Поэтому кремнийорганические глицерогидрогели представляют интерес для внедрения в медицинскую практику как перспективная биологически активная основа для фармакокомпозиций местного и наружного действия [214, 215]. Они обладают комплексом положительных свойств: нетоксичностью, экономичностью и простотой получения, устойчивостью при хранении (не требуют консервантов), структурной совместимостью с липидной составляющей клеточных мембран, способностью предохранять ткани от высыхания и отека, повышать их оксигенацию и ускорять пролиферативно-репаративные процессы. В то же время высокая транскутанная активность глицеролатов Si и глицерогидрогелей на их основе по отношению к различным лекарственным и биологически активным веществам увеличивает эффективность действия фармакокомпозиций и снижает дозу вводимых в них переносчиков [214, 215].

Заключение по литературному обзору

Таким образом, проведенный литературный анализ позволяет констатировать, что исследование влияния хирального органического лиганда *L*- и *D*-АК на формирование, структурные и физико-химические особенности гетеро- (*D-L*) или гомохиральных (*D-D*) солевых комплексов *D*-глюкан–кислота в растворе, гидрогеле и твердофазном состоянии, а также сравнение их биологической функциональности на широком круге биообъектов представляет фундаментальный научный и практический интерес. Представляется также, что несмотря на меньшую биологическую активность *D*-диастереомера АК, следует ожидать значимо более высокий синергетический эффект как в процессах структурообразования, так и в биологической функциональности для гомохиральных солевых комплексов *D*-глюкан – *D*-АК.

2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Объекты исследования

2.1.1 Используемые вещества

Основные вещества. В работе использовали три образца хитозана: низкомолекулярные в форме гидрохлорида со средневязкостной молекулярной массой $\bar{M}_\eta = 40$ кДа (ХТЗ-40, ЗАО «Биопрогресс», РФ) и $\bar{M}_\eta = 60$ кДа (ХТЗ-60, Golden Shell, КНР) и высокомолекулярный хитозан с $\bar{M}_\eta = 200$ кДа (ХТЗ-200, ЗАО «Биопрогресс», РФ). Значение \bar{M}_η образцов хитозана определяли вискозиметрически и рассчитывали по уравнению Марка–Куна–Хаувинка $[\eta] = 1.38 \cdot 10^{-4} \cdot \bar{M}_\eta^{0.85}$ [136, 138], где $[\eta]$ – характеристическая вязкость (дл/г) раствора ХТЗ в 0.33 М $\text{CH}_3\text{COOH} + 0.2$ М CH_3COONa при $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Количество СГ в образцах ХТЗ-40 и ХТЗ-60, определенное потенциометрическим титрованием, составило 63 ± 7 мольн.%. Степень деацелирования используемых образцов хитозана, определенная потенциометрическим титрованием по стандартной методике, составила 82 ± 2 мольн.%, содержание влаги – 7 ± 1 мас.%.

Для формирования солевых комплексов использовали коммерчески доступные диастереоизомеры аскорбиновой кислоты: *L*-аскорбиновую (*L*-АК, с 99% основного вещества, ЗАО «Мелиген», РФ) и *D*-изоаскорбиновую (*D*-АК, с 98% основного вещества, ЗАО «База химреактивов №1», РФ).

Вспомогательные вещества: 98% CH_3COOH и 36% HCl (ООО «НПО «Завод химических реагентов», РФ); $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ и NaCl (ЗАО «База химреактивов №1», РФ); 98% H_2SO_4 (ЗАО «База химреактивов №1», РФ); 75% гликолевая кислота (ГК, Sigma-Aldrich Inc., США); тетраглицеролаты кремния в 3-х мольном избытке глицерина $\text{Si}(\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_3)_4 \cdot 3 \text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ (ИОС УрОРАН, г. Екатеринбург, РФ); сок *Алоэ вера*.

Реагенты для пробоподготовки: 96% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (ЗАО «База химреактивов №1», РФ); ацетон (ЗАО «Экос 1», РФ); *L*-ментол (Alfa Aesar, США), KCl (ЗАО «База химреактивов №1», РФ); фиксаналы HCl и NaOH (ЗАО «База химреактивов №1», РФ); дейтерированная D_2O (ЗАО «База химреактивов №1», РФ); Milli-Q и дистиллированная вода с $\text{pH} = 6.5 \pm 0.5$.

Объектами исследования выбраны хиральные соли *L*- и *D*-аскорбата хитозана (ХТЗ·*L*-(*D*-)АК) в морфологической форме разбавленных ($C_{\text{ХТЗ}} = 0.02\text{--}1.0$ г/дл), умеренно-концентрированных ($C_{\text{ХТЗ}} = 1.0\text{--}5.0$ г/дл) и концентрированных растворов

($C_{\text{ХТЗ}} = 5.0\text{--}15.0$ г/дл), глицерогидрогелей ($C_{\text{ХТЗ}} = 4.0$ г/дл), а также в твердофазном порошкообразном состоянии, полученном из соответствующих растворов и глицерогидрогелей. Выбор глицерогидрогелей в качестве объекта исследований обусловлен высокой перспективностью их биомедицинского применения.

Хиральные соли получали в диапазоне мольного соотношения кислота–полимер $[-\text{NH}_2]/[\text{АК}] = 0.01\text{--}1.6$ осново-моль/моль. Солевые комплексы полимер–кислота D -глюкан · L -АК считали гетеро- (D - L), D -глюкан · D -АК – гомохиральными (D - D).

2.1.2 Растворяющие среды

Для растворения гидрохлорида ХТЗ использовали дистиллированную воду для ХТЗ – $0.6\text{--}9.0$ г/дл растворы L -(D -)АК. Для сравнения использовали классические растворяющие среды: буферный раствор 0.33 М $\text{CH}_3\text{COOH} + 0.2$ М CH_3COONa , традиционно используемый для определения \bar{M}_η хитозана [40, 136, 138, 139, 144, 145, 146], 0.33 М CH_3COOH и 0.04 Н HCl [87, 92, 140] (таблица 2.4). Выбор концентрации 0.04 Н HCl обусловлен практически полным протонированием аминогрупп макромолекул ХТЗ для разбавленных растворов.

Таблица 2.4 – Физико-химические параметры водно-кислотных растворяющих сред, используемых для приготовления растворов ХТЗ

Состав растворяющей среды			Физико-химический параметр		
Компонент	C , г/дл	C , М	I , мМ	pH	n_D^{25}
Вода	–	–	–	6.5	1.3333
$\text{CH}_3\text{COOH} + \text{CH}_3\text{COONa}$	$2.0 + 1.6$	$0.33 + 0.20$	200	4.4	1.3362
CH_3COOH	2.0	0.33	2.4	3.1	1.3336
HCl	0.15	0.04	35.2	1.4	1.3326
L -АК	0.6	0.034	1.6	3.2	1.3338
	1.0	0.057	2.1	3.1	1.3340
	2.0	0.114	3.0	3.0	1.3354
	6.0	0.340	5.2	2.5	1.3417
	9.0	0.511	6.4	2.5	1.3470
D -АК	0.6	0.034	1.6	2.9	1.3340
	1.0	0.057	2.1	2.7	1.3343
	2.0	0.114	3.0	2.6	1.3356
	6.0	0.340	5.2	2.4	1.3418
	9.0	0.511	6.4	2.2	1.3472

Ионную силу (I , мМ) растворяющей среды рассчитывали по формуле:

$$I = 0.5 \sum C_i Z_i^2, \quad (2.11)$$

где C_i – молярная концентрация ионов с учетом pK_a (М), Z_i – заряд иона. Ионную силу водных растворов L -(D -)АК варьировали введением $0.005\text{--}1.0$ М NaCl .

2.1.3 Получение растворов хитозана, кислот и вспомогательных реагентов

Получение разбавленных растворов ХТЗ проводили диспергированием воздушно-сухой навески полимера (с учетом влажности) в расчетном объеме дистиллированной воды или растворяющей смеси при перемешивании на магнитной мешалке в течение 30 мин, выдерживали 1 сут при $25\pm 2^\circ\text{C}$ без доступа света и фильтровали через фильтр Шотта №160.

Умеренно-концентрированные и концентрированные растворы ХТЗ готовили диспергированием воздушно-сухой навески порошка полимера (с учетом влажности) в расчетном объеме дистиллированной воды с последующим добавлением расчетного количества соответствующей кислоты (в виде порошка или раствора) при перемешивании верхнеприводной мешалкой. Подготовленные составы выдерживали 1 сут при $25\pm 2^\circ\text{C}$ без доступа света.

Для обеспечения тождественности условий сравнительного анализа образцов гидрохлорида ХТЗ разной \bar{M}_n и оценки влияния Cl^- на пространственную структуру исследуемых образцов в отдельных опытах использовали водные растворы гидрохлорида *L*-(*D*-)аскорбата ХТЗ-200 (ХТЗ-200 + *L*-(*D*-)АК+HCl), которые получали добавлением 0.1 Н HCl в раствор в ХТЗ-200 в *L*-(*D*-)АК до достижения той же степени замещения NH_2 -групп, что и в образце гидрохлорида ХТЗ-40. В специальных экспериментах показано, что в данных условиях реализуется максимально возможная степень протонирования аминогрупп полимера, $(-\text{NH}_3^+)_{\text{max}}$.

В экспериментах использовали свежеприготовленные и хранившиеся в течение 2–320 сут при 4.0 ± 0.5 и $22\pm 2^\circ\text{C}$ растворы полимера. При приготовлении растворов ХТЗ для биологических исследований навеску полимера предварительно стерилизовали в ламинарном боксе Biological Safety Cabinets (NuAire, Франция) в течение 15 мин и использовали бидистиллированную воду, дополнительно дегазированную кипячением. Растворы кислот и других низкомолекулярных реагентов готовили по общепринятым методикам.

2.1.4 Получение порошков солевой формы хитозана

Порошки хиральных солей ХТЗ-40·*L*-(*D*-)АК и ХТЗ-200·*L*-(*D*-)АК получали из растворов с $C_{\text{ХТЗ}} = 3.0$ г/дл лиофилизацией на BenchTop 2K (VirTis, США) при -57°C и давлении 2–5 мм рт. ст. Образцы подвергали диализу против воды с использованием трубчатой мембраны Cellu-Sep (Sigma-Aldrich Inc., США) с пределом 12–14 кДа. Модуль диализной ванны 1 : 100, время диализа – 36 ч. Диализат заменяли каждые 8 ч

до достижения $pH = 5.0$. Образцы диализованных порошков вновь лиофильно сушили как описано выше и хранили в эксикаторе при нулевой влажности.

2.1.5 Получение кремнийхитозансодержащих глицерогидрогелей

Гелеобразующие композиции получали смешением растворов ХТЗ-40(-200) + *L*-(*D*-)АК и тетраглицеролата кремния $Si(C_3H_7O_3)_4 \cdot 3 C_3H_8O_3$ в массовом соотношении от 1 : 1 до 13 : 1. Смесевые композиции тщательно перемешивали в течение 1–2 мин и оставляли для протекания золь-гель процесса при 4.0 ± 0.5 и $20 \pm 2^\circ C$ (стандартные температуры хранения медицинских препаратов: в холодильном шкафу LKPrv 1420-10 (Liebherr, Австрия) и в лаборатории, соответственно) и $37.0 \pm 0.5^\circ C$ (в термошкафу UT-4610 (Ulab, РФ), физиологическая температура). Время гелеобразования фиксировали по времени полной потери текучести системы методом «переворачивания колбы». Концентрацию компонентов контролировали гравиметрически и выражали в г/дл, состав смеси композиции – массовым соотношением темплат/прекурсор ($C_{ХТЗ}/C_{Si}$). Варьирование pH и ионной силы среды (I , мМ) осуществляли также введением небольших порций NaOH, HCl, ГК или NaCl в количествах, не вызывающих осаждения полимера.

Гелеобразующую композицию на основе ХТЗ-40(-60) + *L*-(*D*-)АК с добавкой сока *Алоэ вера* получали смешением исходного раствора аскорбата ХТЗ, $Si(C_3H_7O_3)_4 \cdot 3 C_3H_8O_3$ и сока *Алоэ вера* в массовом соотношении 4 : 1 : 1 и оставляли при $20 \pm 2^\circ C$ для гелеобразования в течение 18 ± 2 ч. Сок *Алоэ вера* получали из предварительно вымытых листьев 3-х летнего растения механическим отжимом и фильтровали через бумажный фильтр. Выход сока *Алоэ вера* составил ~58 мл сока/100 г листьев, сухих веществ в соке – ~1 мас. %.

2.1.6 Выделение твердой фазы глицерогидрогелей

Из полученных гидрогелей выделяли твердую фазу (ксерогели) экстракцией в 96% C_2H_5OH в течение 24 ч в сочетании с криобработкой при $-15^\circ C$ (mdF-U3286S, Sanyo Electric, Япония) в течение 48 ч с повторной реэкстракцией. Выбор этанола обусловлен его осадительной способностью для хитозана и полиолата кремния. Образцы ксерогелей хранили в эксикаторе над $CaCl_2$.

Для выделения твердой фазы солевой формы полимера из растворов ХТЗ-40(-200) + *L*-(*D*-)АК, ХТЗ-200 + *L*-(*D*-)АК + HCl с $C_{ХТЗ} = 4.0–5.0$ г/дл в среде оптически активного осадителя исходный раствор смешивали с 5% раствором *L*-ментола в 96% C_2H_5OH или в смеси этанол–ацетон в объемном соотношении 1 : 1 и оставляли в воздушной атмосфере при $20 \pm 2^\circ C$ в течение 24 ч до полного испарения жидкой среды.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Физико-химические и спектроскопические методы

Гравиметрические измерения проводили на аналитических весах OHAUS SC 2020 (OHAUS, США), точность взвешивания ± 0.0001 г. Влажность определяли на анализаторе влажности ANDMX-50 (A&D, Япония), точность взвешивания ± 0.0001 г. Водородный показатель (рН) измеряли на рН-метре Mettler Toledo Five Easy FE20 (MTD, Германия). Показатель преломления (n_D^{25}) определяли на рефрактометре Mettler Toledo RM40 (MTD, Сингапур).

Элементный анализ проводили на анализаторе Vario Micro Cube (Elementar, Германия). С и Н анализировали методом Прегля в токе O_2 , N – методом Дюма в кварцевой трубке в атмосфере CO_2 в присутствии CuO и Cu , Cl – методом Шёнигера в токе O_2 . Погрешность определения составила ± 0.5 мас.%. Содержание C/N/H элементов рассчитывали на беззольную пробу.

ИК-Фурье-спектры регистрировали на спектрометре Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Fisher Scientific, США) с разрешением в 4 см^{-1} , используя усреднение из 32 сканов в диапазоне $4000\text{--}500\text{ см}^{-1}$ методом НПВО. Спектры обрабатывали в программе OPUS и сравнивались по наличию и положению характеристических частот поглощения. Соотнесение колебательных полос поглощения к функциональным группам выполнено с привлечением корреляционных таблиц.

Спектры ЯМР 1H и 2D [$^1H\ ^{13}C$] HSQC регистрировали на спектрофотометре Bruker Avance II 600 (Bruker, США), оборудованном инвертированным широкополосным датчиком ВВІ, подавляющим сигнал воды. Спектры 2D [$^1H\ ^1H$] ROESY регистрировали на спектрофотометре Varian-400 (Varian, США). Во всех экспериментах использовалось в среднем 32 сканирования со временем релаксации 1 с в диапазоне частот 5.4–2.0 м.д. Для пробоподготовки анализируемых систем использовали D_2O . Температура измерения составила $40^\circ C$.

Рентгеновские дифрактограммы получали на дифрактометре ДРОН–3 (НПП Буревестник, РФ) с излучением $Cu_{K\alpha}$ при $U = 22$ кВ и $I_a = 20$ мА и автоматической регистрацией данных. Монохроматизацию осуществляли с использованием Ni-фильтра. Степень кристалличности (χ , %) рассчитывали как отношение интегральной интенсивности суммарного рассеяния кристаллитов к полному рассеянию от аморфных и кристаллических областей графическим интегрированием, используя ПО QCAD 3.15 [47].

Качественное и количественное определение компонентов исходных и хранившихся растворов индивидуальной АК и растворов ХТЗ в АК проводили на хромато-масс-спектрометре TRACE GC-DSQ (Thermo Fisher Scientific, США) и жидкостном хроматографе Стайер UV/VIS (ЗАО НПО «Техноком», РФ), соответственно. В качестве стандартов применяли библиотечные масс-спектры NIST (2011) и Wiley, ПО Xcallibur. Подвижная фаза – гелий 99.995%, сканирование в интервале 45–300 а.е.м. при 70–200°C (скорость нагрева 5°C/мин). Содержание АК определяли по методу внешнего стандарта (свежеприготовленные растворы АК, стабилизированные добавлением 5.0% ЭДТА, х.ч.). Хроматографическая колонка Phenomenex Luna 5u C18(2) (Phenomenex, США), подвижная фаза – 0.01 М Н₃РO₄ : СН₃СN = 99 : 1, скорость потока 800 мкл/мин при 210 нм.

2.2.2 Калориметрическое определение теплоты растворения

Теплоту растворения (ΔH , кДж/моль) определяли в адиабатической калориметрической системе (УЛК «Термохимия», РБ) по величине температурного скачка в процессе растворения навесок полимера и кислоты в бидистиллированной воде. Чувствительность термодатчика 10^{-3} град, повторность трёхкратная. Параметры измерения: время выхода калориметрической системы на стационарный режим – 5 мин, число измерений – 100, интервал измерений – 10 с. Определение действительной величины температурного скачка $\Delta T = T_2 - T_1$, не искаженной тепловым обменом, проводили графическим способом через равноудаленную точку от начальной (T') и конечной температуры (T'') главного периода (рисунок 2.19). Теплоту растворения (ΔH , кДж/моль) ХТЗ в водном растворе АК рассчитывали по формуле:

$$\Delta H = \frac{-\Delta T \cdot [(m_{\text{ХТЗ}} + m_{\text{Н}_2\text{О}} + m_{\text{АК}}) \cdot c_{\text{Н}_2\text{О}} + K_H] \cdot M_{\text{ХТЗ}}}{m_{\text{ХТЗ}} \cdot 1000}, \quad (2.12)$$

где ΔT – изменение температуры в результате растворения ХТЗ в растворе АК (°С); $m_{\text{ХТЗ}}$, $m_{\text{АК}}$ и $m_{\text{Н}_2\text{О}}$ – масса навесок ХТЗ, АК и масса воды (г); $c_{\text{Н}_2\text{О}}$ – теплоемкость воды, 4.2 Дж/(г·К); $M_{\text{ХТЗ}}$ – молярная масса ХТЗ (г/моль); K_H – постоянная калориметра (Дж/К), которую определяли по известной теплоте растворения навески КСl:

$$K_H = \frac{-\Delta H_{\text{КСl}}}{\Delta T} - (m_{\text{Н}_2\text{О}} + m_{\text{КСl}}) \cdot c_{\text{Н}_2\text{О}}, \quad (2.13)$$

где $\Delta H_{\text{КСl}}$ – интегральная теплота растворения КСl (Дж).

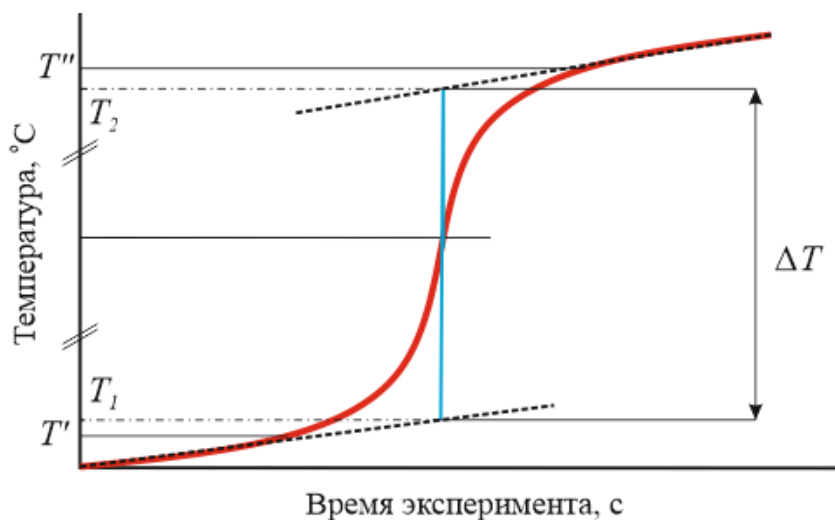


Рисунок 2.19. Схема графического определения действительной величины температурного скачка ΔT по кинетической зависимости теплоты растворения.

Реальную теплоту растворения в водных растворах АК в случае гидрохлорида ХТЗ-40 определяли за вычетом теплоты растворения порошка ХТЗ-40 в воде (ΔH_0 , кДж/моль).

Потенциометрическое титрование проводили на автоматическом титраторе Mettler Toledo G20 (МТD, Германия) при $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Индикаторный электрод – стеклянный DGi115SC, встроенный электрод сравнения – хлорид-серебряный. В качестве титранта использовали 0.05 Н NaOH, концентрацию уточняли по фиксааналу 0.1 Н HCl. Начальный объем раствора – 40 мл. Точки эквивалентности определяли как максимумы производной кривой титрования $\Delta p\text{H}/\Delta V = f(V)$.

Степень протонирования (α' , мольн.%) определяли по формуле:

$$\alpha' = \frac{\Delta V_{\text{NaOH}} \cdot T_{\text{NaOH}}}{v_{\text{ХТЗ}}} \cdot 100, \quad (2.14)$$

где ΔV_{NaOH} – объем раствора NaOH, пошедшего на титрование связанной АК (мл); T_{NaOH} – титр раствора NaOH (Н); $v_{\text{ХТЗ}}$ – количество вещества ХТЗ (моль).

2.2.3 Паросорбционное определение свободной энергии смешения

Сорбцию водяного пара измеряли изопиестическим методом при 20°C [42], давление паров воды (p , кПа) в эксикаторах создавали растворами серной кислоты разной концентрации (таблица 2.5).

Образцы выдерживали при постоянном относительном давлении водяного пара (p/p_s , где p_s – давление насыщенного пара воды, 2.31 кПа) в течение 28–33 сут до установления сорбционного квазиравновесия.

Таблица 2.5 – Давление пара над водными растворами серной кислоты при $20 \pm 1^\circ\text{C}$

Концентрация H_2SO_4 , %	Плотность, ρ , г/см ³	Парциальное давление пара, p , кПа	Относительное давление пара, p/p_s
15	1.102	2.14	0.92
20	1.139	2.03	0.88
25	1.178	1.88	0.81
30	1.219	1.69	0.73
35	1.255	1.48	0.64
40	1.303	1.27	0.55
45	1.348	1.04	0.45
50	1.395	0.79	0.34

Степень сорбции (W_t , мас.%) определяли отношением массы сорбированной воды к начальной массе порошка (с учетом остаточной влажности образцов) при каждом значении p/p_s . Значение максимально достижимой степени сорбции (W_{eq} , г воды/г соли) и начальную скорость сорбции ($V_s = dW_t/dt$, г/с) определяли из уравнения линейной регрессии кинетической зависимости сорбции в координатах $t/W_t = f(t)$ согласно эмпирическому уравнению Шотта:

$$\frac{t}{W_t} = \frac{dt}{dW_t} + \frac{1}{W_{\text{eq}}} \cdot t, \quad (2.15)$$

Параметр n , характеризующий механизм массопереноса вещества, определяли по эмпирической зависимости степени заполнения сорбента W_t/W_{eq} в линеаризованном виде [207, 208]:

$$\ln \left(\frac{W_t}{W_{\text{eq}}} \right) = \ln K_n + n \ln t, \quad (2.16)$$

где K_n – специфическая константа скорости (ч^{-n}); t – время (ч).

Математическую обработку изотерм сорбции в силу специфики (вогнутость вниз при малых p/p_s и вверх при больших p/p_s) проводили по термическому уравнению сорбции (TES) согласно работе [42]:

$$a = a_0 \exp \left[- \left(\frac{-\Delta\mu_1}{E} \right)^n + \alpha (T - T_0) \right], \quad (2.17)$$

где a – величина сорбции при парциальном давлении пара p и температуре T ; a_0 – количество водяного пара, сорбированного при давлении насыщенного пара p_s и температуре T_0 (г воды/г соли); E – характеристическая энергия сорбции (Дж/моль); $n = 0.3-0.33$ – диапазон распределения Вейбулла; α – коэффициент термической сорбции (K^{-1}). Слагаемое с «коэффициентом термосорбции» опускали в силу постоянства температуры сорбции.

Начальный участок изотермы сорбции обрабатывали по уравнению изотермы Ленгмюра с использованием рассчитанных значений сорбционной ёмкости

порошков (W_m , г/г) и константы сорбционного равновесия (K_S , Па⁻¹) в координатах $p/W_{eq} = f(p)$:

$$\frac{p}{W_{eq}} = \frac{1}{W_m \cdot K_S} + \frac{p}{W_m}, \quad (2.18)$$

Изотерму Флори–Хаггинса (моду нелокализованной воды) получали вычитанием расчётной изотермы Ленгмюра (мода локализованной воды) из экспериментальной изотермы сорбции и обрабатывали по уравнению

$$\omega_1 = \frac{\varphi}{1-\varphi} \cdot \frac{\rho_w}{\rho_p}, \quad \varphi = \lg \frac{\varphi}{p/p_s} + (1-\varphi)^2 \chi_{12} + 1, \quad (2.19)$$

где ω_1 – массовая доля растворенной воды; ρ_w и ρ_p – плотность воды и полимера соответственно; φ – объемная доля воды, сорбированной полимером; χ_{12} – параметр Хаггинса парного взаимодействия.

Среднюю свободную энергию Гиббса смешения системы ($\Delta \bar{G}_{см}$, Дж/г) рассчитывали интегрированием уравнения Гиббса–Дюгема с использованием уравнения TES и полученной изотермы Флори–Хаггинса согласно работам [42, 211].

$$\Delta G_{см} = \omega_1 \cdot \Delta \mu_1 + \omega_2 \cdot \Delta \mu_2, \quad (2.20)$$

где ω_1 и $\omega_2 = 1 - \omega_1$ – весовые доли растворителя и полимерного компонента в образующемся при сорбции растворе; $\Delta \mu_1$ и $\Delta \mu_2$ – разность химических потенциалов растворителя и полимера (Дж/моль), соответственно, которые определяли по следующим соотношениям:

$$\Delta \mu_1 = \frac{1}{M_1} RT \ln \frac{p}{p_s}, \quad (2.21)$$

$$\Delta \mu_2 = - \int_{\Delta \mu_1'}^{\Delta \mu_1} \frac{\omega_1}{\omega_2} d(\Delta \mu_1) - \int_{-\infty}^{\Delta \mu_1'} \frac{\omega_1}{\omega_2} d(\Delta \mu_1), \quad (2.22)$$

где $\Delta \mu_1'$ – наименьшее экспериментально полученное значение потенциала (Дж/моль); M_1 – молекулярная масса растворителя (г/моль). Первое слагаемое (2.22) определяли методом трапеций, второе – с помощью приближенной линейности в ПО Maxima [216].

2.2.4 Оптические методы

Спектры кругового дихроизма (КД) регистрировали на спектрометре Chirascan (Applied Photophysics, США) с УФ-детектором в диапазоне длины волны $\lambda = 200$ –600 нм при 25°C. Использовали термостатированные кварцевые кюветы (Hellma Analytics, Германия). Источником света служила ксеноновая лампа мощностью 150 Вт. Спектры КД снимали в режиме сканирования с

временем обнаружения 0.5 с и шагом 1 нм с последующим вычитанием базовой линии (спектр растворителя H₂O). Полученные сигналы КД обрабатывались с использованием ПО Pro-Data. Спектры КД были представлены как разница в поглощении света с левой и правой круговой поляризацией и выражены в единицах удельной эллиптичности ($[\theta]_{\lambda, \text{нм}}^{25^\circ\text{C}}$, град·мл/дм·г).

$$[\theta]_{\lambda, \text{нм}}^{25^\circ\text{C}} = \frac{\Delta\theta \cdot 100}{C_{\text{ХТЗ}} \cdot l}, \quad (2.23)$$

где $\Delta\theta$ – измеренный угол эллиптичности света (град); $C_{\text{ХТЗ}}$ – концентрация раствора (г/дл); l – длина оптического пути (1 дм). Для записи КД и ДОВ спектров готовили водные растворы с концентрацией 0.5 г/дл. В КД-экспериментах исходные растворы разбавляли дистиллированной водой Milli-Q в разведении 1 : 250.

Параллельно с измерениями КД контролировались спектры УФ-поглощения растворов исследуемых веществ, которые регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-2550 (Shimadzu, Япония) в диапазоне длины волны 190–600 нм с использованием кварцевых кювет с длиной оптического пути 10 мм при комнатной температуре (рабочие растворы ХТЗ в *L*-(*D*)-АК с концентрацией полимера $C_{\text{ХТЗ}} = 5 \cdot 10^{-3}$ г/дл и $C_{\text{АК}} = 10 \cdot 10^{-3}$ г/дл). Разностный спектр поглощения определяли вычитанием спектров оптической плотности раствора полимера и раствора кислоты. Положение максимума поглощения уточнено методом второй производной.

Спектры оптической активности (кривые дисперсии оптического вращения, ДОВ) растворов регистрировали на спектрополяриметре СПУ-Е (ИСЗФ СО РАН, РФ) в диапазоне длины волны $\lambda = 280$ –710 нм и на автоматическом спектрополяриметре PolAArg 3001 (Optical Activity, Англия) в интервале длины волны $\lambda = 365$ –589 нм в термостатируемой кювете при температуре 25°C. Источник света – ртутная лампа высокого давления ДРШ-250 (РФ). Удельное оптическое вращение растворов ($[\alpha]_{\lambda, \text{нм}}^{25^\circ\text{C}}$, град·мл/дм·г) определяли по формуле:

$$[\alpha]_{\lambda, \text{нм}}^{25^\circ\text{C}} = \frac{(\alpha - \alpha_0) \cdot 100}{C_{\text{ХТЗ}} \cdot l}, \quad (2.24)$$

где α и α_0 – измеряемые углы оптического вращения раствора и растворителя (град); $C_{\text{ХТЗ}}$ – концентрация полимера в растворе (г/дл); l – длина оптического пути (дм). Погрешность измерения углов оптического вращения составила ± 0.001 град.

Экспериментальные кривые ДОВ обрабатывали с применением одночленного уравнения Друде:

$$[\alpha]_{\lambda}^T = \frac{K}{\lambda^2 - \lambda_0^2}, \quad (2.25)$$

где K и λ_0 – вращательная и дисперсионная константы (град·мл·нм²/дм·г и нм, соответственно). Для определения вращательной константы по уравнению (2.25) использовали полученные из КД-спектров значения λ_0 .

2.2.5 Вискозиметрические методы

Вискозиметрические исследования проводили в вискозиметре Уббелоде (Technoglas Laboratorium apparatuur, Нидерланды) с диаметром капилляра 0.56 мм при 25.0±0.1°С в интервале температур 25–45°С с шагом 5.0±0.1°С. Время термостатирования составляло 15–20 мин. Измеряли время истечения раствора полимера (t , с) и растворяющей среды (t_0 , с) с точностью ±0.1 с и в трехкратной повторности. Число вязкости ($\eta_{уд}/C_{ХТЗ}$, дл/г) рассчитывали по формуле:

$$\eta_{уд}/C_{ХТЗ} = \frac{t - t_0}{t_0 \cdot C_{ХТЗ}}, \quad (2.26)$$

где $C_{ХТЗ}$ – концентрация полимера (г/дл). В случае наблюдения прямолинейной зависимости $\eta_{уд}/C_{ХТЗ} = f(C_{ХТЗ})$ определение предельного числа вязкости ($[\eta]$, дл/г) проводили по уравнению Хаггинса (2.27), криволинейной – по уравнению Фуосса

(2.28) при условии $[\eta] = \lim_{C_{ХТЗ} \rightarrow 0} (\eta_{уд}/C_{ХТЗ})$ и $[\eta]^{-1} = \lim_{\sqrt{C_{ХТЗ}} \rightarrow 0} (\eta_{уд}/C_{ХТЗ})^{-1}$, соответственно.

$$\eta_{уд} = [\eta]C_{ХТЗ} + k_X([\eta] C_{ХТЗ})^2, \quad (2.27)$$

$$\eta_{уд}^{-1} = ([\eta] C_{ХТЗ})^{-1} + B([\eta] \sqrt{C_{ХТЗ}})^{-1}, \quad (2.28)$$

где k_X – безразмерная константа Хаггинса, B – константа Фуосса (г/дл)^{-1/2}.

Температурный коэффициент предельного числа вязкости (δ_T , К⁻¹) определяли как тангенс угла наклона зависимости $\ln[\eta] = f(T)$.

Реограммы вязкости $\lg \eta = f(\lg \tau)$ снимали на ротационном вискозиметре Rheotest RH-4.1 (RheoTest Messgerate Medingen GmbH, Германия) с рабочим узлом «цилиндр-цилиндр» (измерительная система Н1 и Н2) в области напряжений сдвига $\lg \tau = 0.1$ –3.2 [дПа] при 25.0±0.5°С, время термостатирования – 30 мин. Для растворов ХТЗ-40 с концентрацией $C_{ХТЗ} = 2.0$ г/дл использовали внутренний цилиндр Н1, для растворов с $C_{ХТЗ} > 7.0$ г/дл – внутренний цилиндр Н2. Для

получения реограмм вязкости хранившихся систем пробы анализируемой смеси отбирали через определенные промежутки времени. Вязкость систем, хранившихся при $20 \pm 2^\circ\text{C}$, измеряли сразу после термостатирования. Пробу системы, хранившейся при $4.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$, предварительно выдерживали в условиях комнатной температуры в течение 3 ч, затем термостатировали в рабочем узле вискозиметра и проводили измерения. Относительное число вязкости ($\lg \eta_{t=i} / \lg \eta_{t=0}$) определяли как отношение значения в момент времени t ($\lg \eta_{t=i}$) к значению в начальный момент времени ($\lg \eta_{t=0}$).

Температурную зависимость модулей упругости (G' , Па) и потерь (G'' , Па) снимали на вискозиметре Physica MCR 302 (Anton Paar, Германия) с рабочим узлом «плоскость-плоскость» при амплитуде 1%, частоте 1 Гц и скоростью нагрева $2^\circ\text{C}/\text{мин}$.

2.2.6 Методы исследования поверхностно-морфологических свойств

Измерение потенциала поверхности (ζ , мВ) проводили на приборе Surface Potential Sensor (Nima KSV, Финляндия). В качестве токопроводящей подложки использовали предварительно очищенные алюминиевые пластинки, собственный потенциал которых учитывали при определении потенциала поверхности образцов.

Сканирующую электронную микроскопию (СЭМ) проводили на электронном микроскопе MIRA // LMU (Tescan, Чехия) при напряжении 7 кВ, токопроводимости 60 пА. На поверхность образцов напыляли слой Au толщиной 5 нм на высоковакуумной установке магнетронного распыления K450X (Emitech, Германия) при токе распыления 20 мА в течение 1 мин.

Просвечивающую электронную микроскопию (ТЭМ) выполняли на просвечивающем электронном микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss, Германия) при 120 кВ на базе ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН, г. Саратов. Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме ULTRACUT UCT (Reichert, Австрия). Фотосъемку проводили встроенной цифровой камерой Jeol (JEOL, Япония) и цифровой камерой бокового ввода Veleta (SIS, Германия).

Поляризационную оптическую микроскопию (ПОМ) осуществляли на поляризационном микроскопе LaboPol-2 (Labor-Microscopes, РФ) со скрещенными поляризатором и анализатором, источник света галогенная лампа (12 В, 30 Вт), цифровой окуляр DMC 300 (Scopetek, Китай).

2.2.7 Методы исследования биологических свойств

2.2.7.1 Методы оценки биологической активности в отношении биообъектов животного происхождения

Антибактериальную активность *in vitro* (A_i , %) ХТЗ-40 + L-(D-)АК оценивали методом диффузии в агар в отношении штаммов тест-культур микроорганизмов *Staphylococcus aureus* (209 P) и *Escherichia coli* (113-13) по формуле:

$$A_i = (d_i / d_0) \cdot 100\%, \quad (2.29)$$

где d_i и d_0 – диаметры зоны подавления роста тест-культуры исследуемыми растворами и стандартом – 0.05 г/дл раствором хлоргексидина биглюконата (ООО «Южфарм», РФ), применяющимся в медицине в качестве наружного асептического средства. Для определения диаметра зоны ингибирования роста микроорганизмов анализируемые системы фотографировали Canon Coolpix L 810 (Nikon, Япония). Для получения статистически значимого результата проводили три параллельных эксперимента. Морфологию бактериальных клеток, выращенных в мясопептонном бульоне анализировали на просвечивающем электронном микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss, Германия). Целые клетки и их срезы контрастировали уранилацетатом $UO_2(CH_3COO)_2$ и цитратом свинца $Pb_3(C_6H_5O_7)_2$ по Рейнольдсу. Фотосъемку проводили встроенной цифровой камерой Jeol (JEOL, Япония) и цифровой камерой бокового ввода Veleta (SIS, Германия). $[-NH_2]/[AK] = 1.6$ осново-моль/моль, начальная концентрация составила $C_{ХТЗ} = 15.0$ г/дл, $C_{AK} = 9.0$ г/дл, разведение – 1 : 2, 1 : 4 и 1 : 8.

Цитотоксичность *in vitro* ХТЗ-40 + L-(D-)АК оценивали в отношении клеток нормальных человеческих дермальных фибробластов (НЧДФ) по стандартной методике биотестирования. Относительную флуоресценцию красителя Alamar Blue (Sigma-Aldrich, США) определяли на спектрофотометре Gemini XPS Microplate Reader (Molecular Devices, США) при 560 и 635 нм после 4 ч инкубации. $[-NH_2]/[AK] = 1.0$ осново-моль/моль, $C_{ХТЗ}/C_{Si} = 4.8$. Начальная концентрация составила $C_{ХТЗ} = 0.1$ г/дл, $C_{AK} = 0.1$ г/дл, разведение – 1 : 10 и 1 : 14.

Ранозаживляющую активность *in vivo* изучали на модели ожоговой или резаной раны у половозрелых белых нелинейных альбиносов крыс Wistar по средней линейной скорости заживления (V , мм/сут) и убыли площади раневой поверхности (ΔS , %) планиметрическим методом [217]:

$$V = \frac{2 \cdot (S_0 - S_t)}{t \cdot (P_0 + P_t)}, \quad (2.30)$$

где S_0 и S_t , P_0 и P_t – площадь и периметр раневой поверхности при предшествующем измерении и через промежуток времени t (мм^2 и мм соответственно), определяли графическим интегрированием в ПО QCAD 3.15.

Термические ожоги III Б степени воспроизводили контактным высокотемпературным способом в межлопаточной области крыс (18 крыс-самок с массой тела 220–250 г) в проекции шейно-грудного отдела. На 3-и сутки после нанесения ожога сформировавшийся струп и патологически измененные ткани удаляли методом острой некрэктомии, при этом средняя площадь поверхности раны составляла $\sim 300 \text{ мм}^2$. Контрольную группу ($n=6$) составляли крысы, которых лечили препаратом «Левомеколь-вет» (ООО НПП «Агрофарм», РФ) ежедневно 1 раз в сутки до выздоровления. В экспериментальных группах на рану однократно наносили глицерогидрогель на основе ХТЗ-40 + L-АК ($n=6$) или ХТЗ-40 + D-АК ($n=6$). Раневая поверхность не изолировалась от внешней среды и заживление проходило под струпом. $[-\text{NH}_2]/[\text{АК}] = 1.6$ осново-моль/моль, $C_{\text{ХТЗ}} = 15.0 \text{ г/дл}$, $C_{\text{АК}} = 9.0 \text{ г/дл}$.

Резаные раны со средней площадью $260 \pm 10 \text{ мм}^2$ ($0.75 \pm 0.05\%$ от площади поверхности тела) моделировали иссечением кожного покрова хирургическим лезвием по трафарету без повреждения подкожно-мышечного слоя в дорсальной области крыс (25 самцов с массой тела $170 \pm 10 \text{ г}$ и площадью тела $350 \pm 50 \text{ см}^2$). В контрольной группе ($n=5$) животные лечения не получали (отрицательный контроль). В экспериментальных группах на рану однократно наносили глицерогидрогель на основе ХТЗ-40 + L-АК ($n=5$) или ХТЗ-40 + D-АК ($n=5$), ХТЗ-60 + L-АК ($n=5$) или ХТЗ-60 + D-АК ($n=5$) с добавкой сока *Алоэ вера*. Раневая поверхность не изолировалась от внешней среды и заживление проходило под струпом. Наблюдение за состоянием раны проводили до выздоровления животных. $[-\text{NH}_2]/[\text{АК}] = 1.0$ осново-моль/моль, $C_{\text{ХТЗ}} = 5.3 \text{ г/дл}$, $C_{\text{АК}} = 5.3 \text{ г/дл}$, $C_{\text{Алоэ вера}} = 16.7 \text{ г/дл}$, $C_{\text{ХТЗ}}/C_{\text{Si}} = 8.0$.

Показатели роста и развития определяли по изменению живой массы лабораторных животных. Взвешивание проводили до и после завершения эксперимента на лабораторных весах ВК-600 (АО «Масса-К», РФ) с ценой деления 0.01 г. Рассчитывали прирост массы (%) и среднесуточный привес (%/сут).

Животные были выращены в питомнике вивария ФГБОУ ВО СГМУ им. Разумовского В.И. Минздрава России (г. Саратов) и содержались по одной особи в клетке в стандартных условиях на обычном рационе. При работе с экспериментальными животными руководствовались «Общими этическими принципами экспериментов на животных» (2001) и требованиями Европейской конвенции 2010/63/EU от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. Все болезненные для крыс манипуляции выполняли под наркозом после внутримышечной инъекции препарата Zoletil (Virbac, Франция) в дозе 0.07 мг/100 г веса в условиях асептики. Эвтаназия животных не осуществлялась.

Статистический анализ проводили для трехкратных повторов эксперимента при использовании ПО STATISTICA 8.0. (StatSoft, РФ). Статистическую значимость различий измеряемых показателей оценивали с помощью непараметрического критерия для малых групп Манна-Уитни. Количественные показатели представлены в виде $\bar{x} \pm x$, где \bar{x} – среднеарифметическое значение, а x – отклонение от среднеарифметического значения. Критический уровень значимости – $p < 0.05$.

2.2.7.2 Методы оценки биостимулирующей активности в отношении биообъектов растительного происхождения

Биостимулирующую активность *in vitro* порошков хиральных солей ХТЗ·L-(D-)АК изучали на растительных объектах класса эукариот двух типов: низшие (хлорофициевые *Scenedesmus quadricauda*) и высшие растения (двудольные *Linum usitatissimum*).

Культивирование альгологически чистой культуры зелёной пресноводной хлорококковой водоросли *S. quadricauda* проводили в водной среде с добавкой исходного порошка ХТЗ-40 (контроль) и хиральных солей ХТЗ-40·L-(D-)АК (эксперимент) в соответствии с ISO 8692-2012 [218] с некоторыми изменениями. Для создания стрессовых условий вместо питательной среды Прата использовали дистиллированную воду. В отдельных опытах установлено, что данная степень разбавления не лимитирует рост тест-культуры водорослей. Использовали суспензию 5-ти суточной культуры *S. quadricauda*, находящейся в экспоненциальной фазе роста, численность клеток в пробе – 25 тыс. кл./см³, время культивирования – 72 ч. Относительную флуоресценцию (*I*, отн. ед.) хлорофилла как показатель численности клеток измеряли на флуоресцентном спектрометре

LS 55 Perkin–Elmer (Analytical Sciences, США). Повторность трёхкратная. Биостимулирующее действие (ΔI , %) оценивали по процентному отклонению относительной флуоресценции хлорофилла в экспериментальной среде и в контроле. $[-NH_2]/[AK] = 1.0$ осново-моль/моль, начальная концентрация составила $C_{ХТЗ} = 10^{-3}$ г/дл и $C_{AK} = 10^{-3}$ г/дл, разведение – 1 : 10 и 1 : 100.

Проращивание тест-семян *Linum usitatissimum* проводили в лабораторных контейнерах, наполненных универсальным почвогрунтом (PlanTerra, РФ) без (контроль) и с добавкой порошков хиральных солей ХТЗ-40·L-(D-)АК, ХТЗ-200·L-(D-)АК (эксперимент). Для получения экспериментального почвогрунта в него вносили порошки хиральных солей из расчёта 5 г/50 см³, увлажняли дистиллированной водой, перемешивали, выдерживали 3 сут до полного растворения порошков и использовали в эксперименте. Тест-семена высевали методом прямого внесения в почву из расчёта 50 шт./50 см³ и выращивали в течение 7 сут в темной камере для снижения фотосинтетической активности с целью выявления биостимулирующего воздействия исследуемых добавок в неблагоприятных условиях (этиолирования). Увлажнение субстрата осуществляли дистиллированной водой на 1-е и 5-е сут в объёме 5 см³/50 см³. Всхожесть (%) [32]. Повторность трехкратная. $[-NH_2]/[AK] = 1.0$ осново-моль/моль, начальная концентрация растворов ХТЗ-40 + L-(D-)АК, ХТЗ-200 + L-(D-)АК для получения порошков составила $C_{ХТЗ} = 5.0$ г/дл и $C_{AK} = 5.0$ г/дл, разведение с субстратом – 1 : 10.

3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1 Формирование и структурные особенности хиральных солей *L*-(*D*-)аскорбата хитозана

На примере двух образцов ХТЗ со средневязкостной молекулярной массой 40 и 200 кДа исследовано влияние диастереомерной формы (*L*- и *D*-) АК на энергетику формирования, структуру и надмолекулярное упорядочение гетеро- (*D*-*L*) и гомохиральных (*D*-*D*) солевых комплексов полимер-кислота [219–222].

3.1.1 Взаимодействие хитозана с *L*-(*D*-) аскорбиновой кислотой в водном растворе при донорно-акцепторном солеобразовании

Процесс взаимодействия ХТЗ с *L*- и *D*-АК в водной среде характеризуется отрицательными значениями энтальпии растворения (таблица 3.6). При этом тепловой эффект при растворении ХТЗ в *L*-АК меньше, чем при растворении в среде *D*-АК.

Таблица 3.6 – Энтальпия растворения и степень протонирования ХТЗ в водном растворе *L*- и *D*-АК при донорно-акцепторном солеобразовании, $[-\text{NH}_2]/[\text{АК}] = 1.0$ осново-моль/моль

Параметр	Система ХТЗ + <i>L</i> -(<i>D</i> -)АК + H ₂ O			
	ХТЗ-40		ХТЗ-200	
	<i>L</i> -АК	<i>D</i> -АК	<i>L</i> -АК	<i>D</i> -АК
ΔH , кДж/моль	-23.1 ± 2.1	-31.0 ± 2.4	-16.3 ± 1.4	-19.8 ± 1.7
α' , мольн.% ^a	72.6 ± 0.6 ($58.5 \pm 0.4 +$ 14.1 ± 0.2)	74.0 ± 0.5 ($57.4 \pm 0.3 +$ 16.6 ± 0.2)	69.8 ± 0.5 ($54.6 \pm 0.3 +$ 15.2 ± 0.2)	69.6 ± 0.6 ($52.3 \pm 0.3 +$ 17.3 ± 0.3)
pH	3.0 ± 0.1	2.9 ± 0.1	4.4 ± 0.1	4.3 ± 0.1

^a – Суммарная степень протонирования в условиях $(-\text{NH}_3^+)_{\text{max}}$, в скобках – степень протонирования NH₂-групп полимера в водной среде HCl и АК, соответственно.

В результате взаимодействия аминополисахарида хитозана ($pK_a = 6.3 \pm 0.2$ [1–6, 40]) с *L*- или *D*-АК ($pK_{a1}(\text{L-АК}) = 4.26$, $pK_{a1}(\text{D-АК}) = 4.18$, $pK_{a2}(\text{L-АК}) \sim pK_{a2}(\text{D-АК}) \sim 11.6$) в водной среде формируются диастереомерные солевые комплексы *L*- и *D*-аскорбата ХТЗ вследствие протонирования свободных –NH₂ групп. Равновесные реакции ионизации можно представить следующим образом (рисунок 3.20):

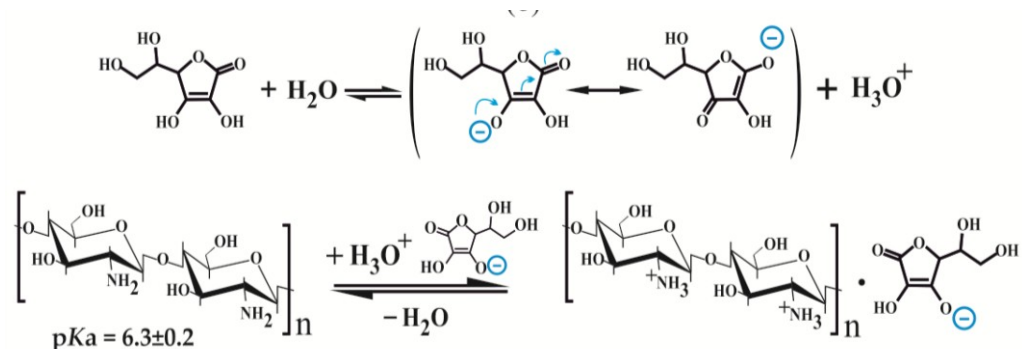


Рисунок 3.20. Схема формирования резонансно-стабилизированного сопряженного основания АК (аниона аскорбата) и аскорбата ХТЗ.

Влияние диастереоизомерной формы АК на степень связывания с аминогруппами оценивали потенциометрическим титрованием при варьировании мольного соотношения $[-NH_2]/[AK]$ (рисунок 3.21, таблица А1 Приложения А). Установлено, что при увеличении мольного соотношения $[-NH_2]/[AK]$ значение степени протонирования α' для системы ХТЗ-200 + L -(D -)АК повышается, причем для L -АК это значение немного выше, чем для D -АК (рисунок 3.21 б). Для системы гидрохлорид ХТЗ-40 + L -(D -)АК с увеличением $[-NH_2]/[AK]$ степень связывания с АК снижается, $\alpha'_{L-АК} < \alpha'_{D-АК}$ (рисунок 3.21 а).

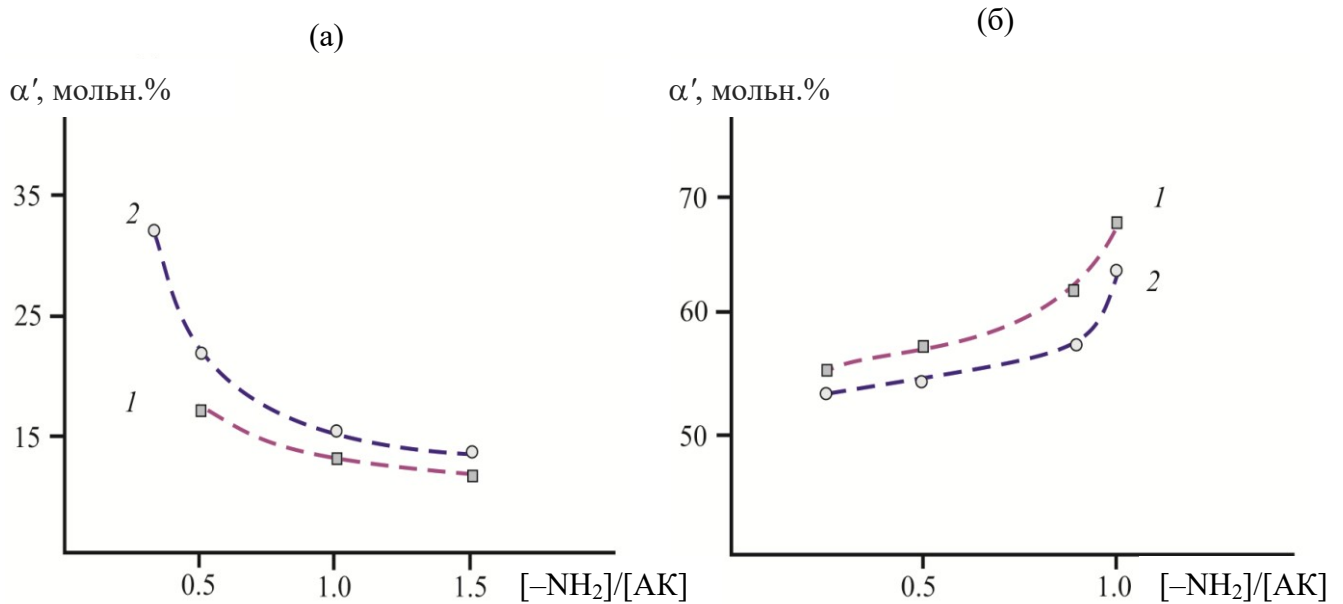


Рисунок 3.21. Зависимость степени протонирования NH_2 -групп ХТЗ-40 (а) и ХТЗ-200 (б) в водной среде L -(1) и D -АК (2) от мольного соотношения $[-NH_2]/[AK]$. Для ХТЗ-40 степень протонирования рассчитана без учета HCl .

Однако в условиях максимально возможного протонирования (в присутствии, например, сильной кислоты HCl) доля $(-NH_3^+)_{max}$ групп ХТЗ не превышает 75 мольн.%, а степень связывания аминогрупп полимера с D -АК в D -солевых комплексах немного выше, чем с L -АК (таблица 3.6). Стоит отметить, что в водном растворе в составе используемого коммерческого образца гидрохлорида ХТЗ-40 (содержание хлорид-ионов 63 ± 7 мольн.%) присутствие свободных $-NH_2$ групп, доступных для протонирования, было установлено экспериментально при оценке формульного состава $(\sim NHCOCH_3)_{0.2}(\sim NH_2 \cdot HCl)_{0.56-0.68}(\sim NH_2)_{0.12-0.24}$ и хорошо согласуется с данными элементного анализа воздушно-сухих порошков, выделенных из соответствующих растворов (будет рассмотрено в подглаве 3.1.2, таблица 3.11).

3.1.2 Спектральные характеристики *L*-(*D*-)аскорбатов хитозана

Обнаруженные отличительные особенности солевых комплексов ХТЗ + *L*-АК и ХТЗ + *D*-АК в растворе отражаются и на физико-химических параметрах их твёрдой фазы [219, 220].

Элементный анализ показал, что соотношение C/N в порошках *L*-(*D*-)аскорбатов ХТЗ, выделенных из эквимольных растворов, значительно больше по сравнению с исходным полимером (таблица 3.7). При стехиометрическом пересчете содержания элементов на усредненное элементарное звено полимера (формульная единица) установлено, что в *L*-солях ХТЗ-40 и ХТЗ-200 содержится большее количество кристаллизационной воды, чем в *D*-солевых комплексах. Согласно классификации солей хитозана (безводные и гидратированные), предложенной в работе [81] такое отличие позволяет предположить отнесение ХТЗ·*L*-(*D*-)АК к солям I типам.

Таблица 3.7. Содержание элементов и формульные единицы исходных порошков ХТЗ и его хиральных солей с *L*- и *D*-АК, $[-\text{NH}_2]/[\text{АК}] = 1.0$ осново-моль/моль

Образец		Содержание, мас.%				C/N	Формульная единица
Полимер	Кислота	C	H	N	Cl		
ХТЗ-40	–	34.42	6.72	6.28	9.55	5.48	$\text{C}_{6.4}\text{H}_{11.4}\text{NO}_{4.2}\text{Cl}_{0.6} \times 1.8 \text{H}_2\text{O}$
	<i>L</i> -АК	33.08	6.66	4.71	7.16	7.03	$\text{C}_{6.4}\text{H}_{11.4}\text{NO}_{4.2}\text{Cl}_{0.5} \times 0.3 \text{L-C}_6\text{H}_8\text{O}_6 \times 3.0 \text{H}_2\text{O}$
	<i>D</i> -АК	34.91	6.35	4.63	7.04	7.54	$\text{C}_{6.4}\text{H}_{11.4}\text{NO}_{4.2}\text{Cl}_{0.5} \times 0.4 \text{D-C}_6\text{H}_8\text{O}_6 \times 2.3 \text{H}_2\text{O}$
ХТЗ-200	–	39.10	7.32	7.14	–	5.48	$\text{C}_{6.4}\text{H}_{11.4}\text{NO}_{4.2} \times 1.5 \text{H}_2\text{O}$
	<i>L</i> -АК	39.51	6.14	3.91	–	10.10	$\text{C}_{6.4}\text{H}_{11.4}\text{NO}_{4.2} \times 0.9 \text{L-C}_6\text{H}_8\text{O}_6 \times 1.7 \text{H}_2\text{O}$
	<i>D</i> -АК	39.85	6.57	5.29	–	7.54	$\text{C}_{6.4}\text{H}_{11.4}\text{NO}_{4.2} \times 0.4 \text{D-C}_6\text{H}_8\text{O}_6 \times 1.4 \text{H}_2\text{O}$

Спектральные характеристики солей определяли ИК-Фурье-спектроскопией порошков и ЯМР-спектроскопией (включая 2D [^1H , ^1H] ROESY и 2D [^1H , ^{13}C] HSQC) водных растворов [219, 220].

ИК-спектры ХТЗ-40 и ХТЗ-200 показывают все типичные для данного полимера характеристические частоты колебаний, в частности, включенных в систему водородных контактов –ОН и –NH связей (широкие полосы 3600–3300 см^{-1}), –NHCO– (1638 см^{-1} , Амид I) и валентных колебаний C–N вторичной аминогруппы (1315 и 1324 см^{-1} , Амид III), C–O и C–C связей глюкопиранозного кольца (1149–1033 см^{-1}) (рисунок 3.22, спектры I и I', таблица 3.8) [100, 101, 108, 166].

В ИК-спектрах ХТЗ-200·*L*-(*D*-)АК (рисунок 3.22 б, спектры 2' и 3', таблица 3.8) появляется составная полоса Амид II, характерная для асимметричных деформационных колебаний N–H и валентных колебаний C–N

протонированных (ассоциированных) аминогрупп ($-\text{NH}_3^+$) при 1535 и 1530 см^{-1} , что подтверждает солеобразование ХТЗ-200 с L -(D -)АК [93, 108, 109] (см. таблицу 1.1). В спектрах солей ХТЗ-40· L -(D -)АК, полученных из гидрохлорида ХТЗ-40, наблюдается сдвиг данной полосы при 1537 см^{-1} в низкочастотную область: 1525 и 1532 см^{-1} (рисунок 3.22 а, спектры 2 и 3, таблица 3.8).

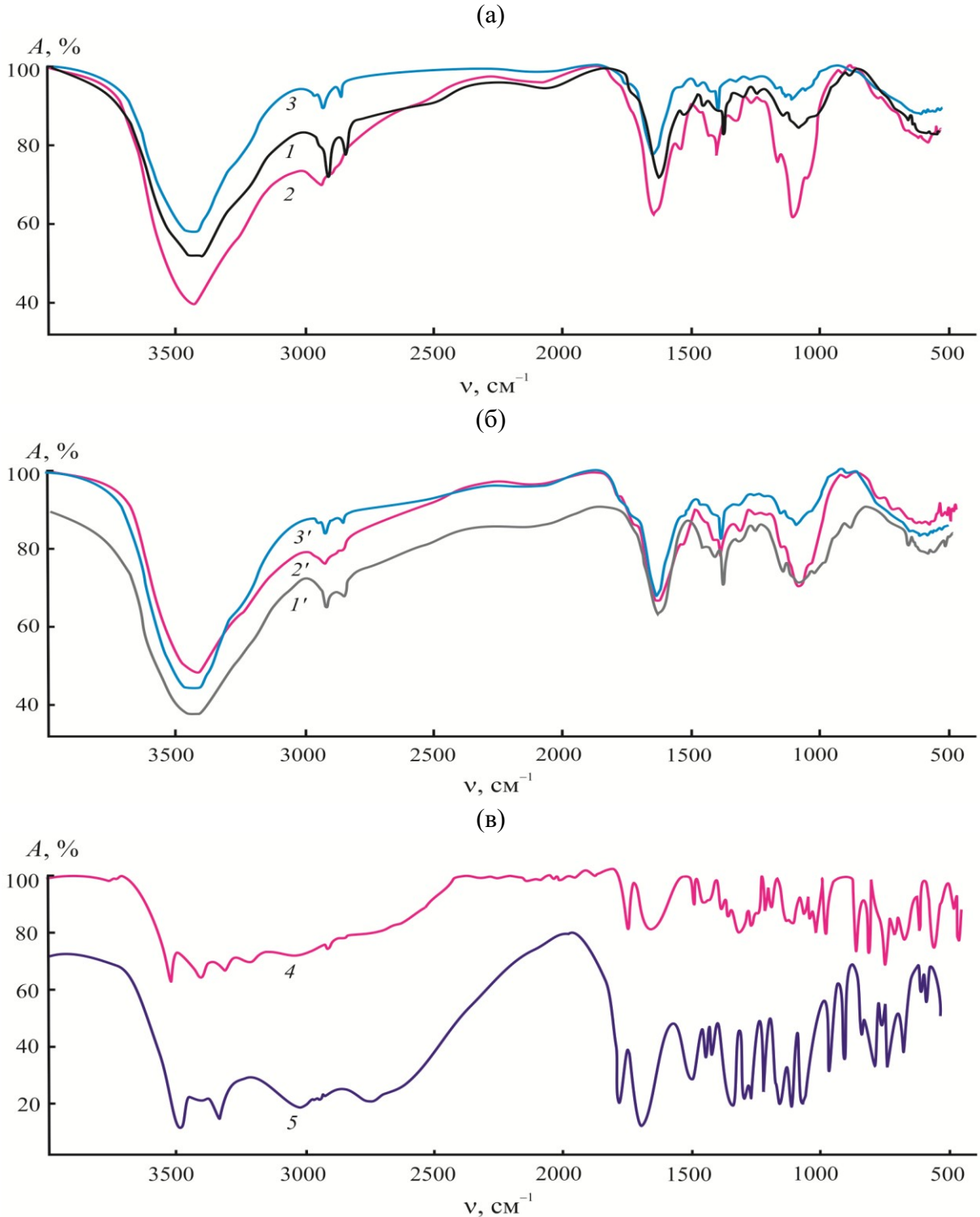


Рисунок 3.22. ИК-спектры исходного порошка ХТЗ (1 , $1'$) и его хиральных солевых комплексов с L - (2 , $2'$) и D -АК (3 , $3'$) для образцов ХТЗ-40 (а) и ХТЗ-200 (б) и индивидуальных изомеров (в) L - (4) и D -АК (5), $[-\text{NH}_2]/[\text{АК}] = 1.0$ осново-моль/моль.

Отличительной особенностью ИК-спектров *L*- и *D*-аскорбатов ХТЗ-40(-200) от ИК-спектров исходных образцов ХТЗ-40(-200) является сдвиг полос поглощения валентных колебаний N–H, O–H и C=O, а так же деформационных колебаний C=O полосы Амид I в область низких частот (таблица 3.8). Как известно, низкочастотное смещение характеристических полос является следствием формирования водородных связей [6, 26]. Это могут быть H-связи между соседними цепями полимера или удалёнными по цепи «изгибными» сегментами одной и той же макромолекулы, между макроцепями и молекулами воды [26–28]. Кроме того, возможны меж- и внутримолекулярные контакты между макромолекулами полимера и свободными функциональными группами молекул кислоты [37, 43, 93, 97].

Таблица 3.8 – Соотнесение полос поглощения ИК-спектров исходного порошка ХТЗ и его хиральных солей с *L*- и *D*-АК, $[-NH_2]/[AK] = 1.0$ осново-моль/моль

Группа	Образец					
	ХТЗ-40			ХТЗ-200		
	–	<i>L</i> -АК	<i>D</i> -АК	–	<i>L</i> -АК	<i>D</i> -АК
Частота полосы поглощения, см ⁻¹						
ν OH	3530 3464	3486	3468	3550 3436	3483	3475
ν NH (NH ₃ ⁺)	3418	3416	3425	–	3418	3424
ν NH	3225					
ν_s CH	2956–2854					
ν C=O ν C=C	1740	1768 1718	1739	1740	1785 1718	1780
δ C=O Амид I	1638	1619	1636	1638	1633	1637
δ_s NH (NH ₃ ⁺) Амид II	1537	1525	1532	–	1535	1530
δ COH δ_{as} CH ₃ δ_{sc} CH ₂	1465 1416	1402	1462 1408	1474 1422	1451 1402	1417 1400
δ OH δ_{as} CH ₃	1384					
ν CN Амид III	1315	1309	1309	1324	1306	1314
ν CO, δ CO	1261–1249					
ν COH	1155–1024					
ν COC	899	894	850	895	894	894 825
δ NH ν CC	759	752 559	593	751	600	600

Наибольшее количество Н-связей наблюдается для *D*-солевых комплексов ХТЗ-40(-200), что согласуется с отличительными особенностями индивидуальных диастереомеров АК, в частности, с отсутствием в ИК-спектре *D*-АК полосы поглощения ОН-групп при ν 3220 см^{-1} , поскольку они участвуют в образовании внутримолекулярных Н-связей $\text{C3}\cdots\text{C5}$ (рисунок 3.22 в, спектр 5) [75, 172]. Соотнесение полос поглощения ИК-спектров исходных *L*- и *D*-АК приведено в таблица А2 Приложения А.

Таким образом, спектральные характеристики хиральных солей ХТЗ с *L*- и *D*-АК указывают на развитую систему меж- и внутримолекулярных контактов в надмолекулярной структуре образцов, что не типично для солевой формы хитозана. При этом, наиболее развитой системой Н-связей характеризуются гомохиральные *D*-аскорбаты ХТЗ. Полученные результаты, как и данные ИК-спектроскопии, подтверждают, что взаимодействие ХТЗ с *L*-(*D*-)АК идет с переносом протона кислоты на аминогруппу полимера с образованием протонированных аминогрупп и, соответственно, солевой формы ХТЗ, которая обнаруживается и в порошках после диализа против воды (рисунок А1 и таблица А3 Приложения А).

ЯМР-спектроскопия дейтерированных свежеприготовленных растворов и хранившихся в течение 7 сут на примере ХТЗ-40 и ХТЗ-40 + *D*-АК представлена на рисунок 3.23. В ^1H -спектре свежеприготовленного раствора ХТЗ-40 наблюдается синглет при $\delta \sim 4.9$ м.д., характерный для аномерных атомов Н1 (рисунок 3.23 а, спектр 1). В середине спектра присутствуют резонансы кольцевых протонов при C3-C6 , образуя группу широких перекрывающихся сигналов $\delta \sim 3.7-4.0$ м.д. На наличие протонированных аминогрупп косвенно указывает широкая полоса кольцевого протона Н2 при $\delta \sim 3.2$ м.д., которая отсутствует в случае хитина или аналога его мономерного звена [114], а её положение находится в зависимости от степени ионизации аминогруппы [132] (см. рисунок 1.14 б).

В ^1H -спектре *D*-АК наблюдаются резонансные полосы: дуплет при $\delta \sim 5.0$ м.д. Н4 и два мультиплета при $\delta \sim 4.2$ м.д. и $\delta \sim 3.7$ м.д., соответствующие расщеплению сигналов Н5 и Н6 в результате спин-спинового взаимодействия (рисунок 3.23 а, спектр 3). Спектр ХТЗ-40 + *D*-АК (спектр 4) в целом представляет собой сумму спектров исходных растворов ХТЗ-40 и *D*-АК. Однако для смеси, по сравнению с исходными веществами, наблюдается сильнополюсный сдвиг. Помимо этого, сильнополюсный сдвиг усиливается при хранении растворов (спектры 2, 5).

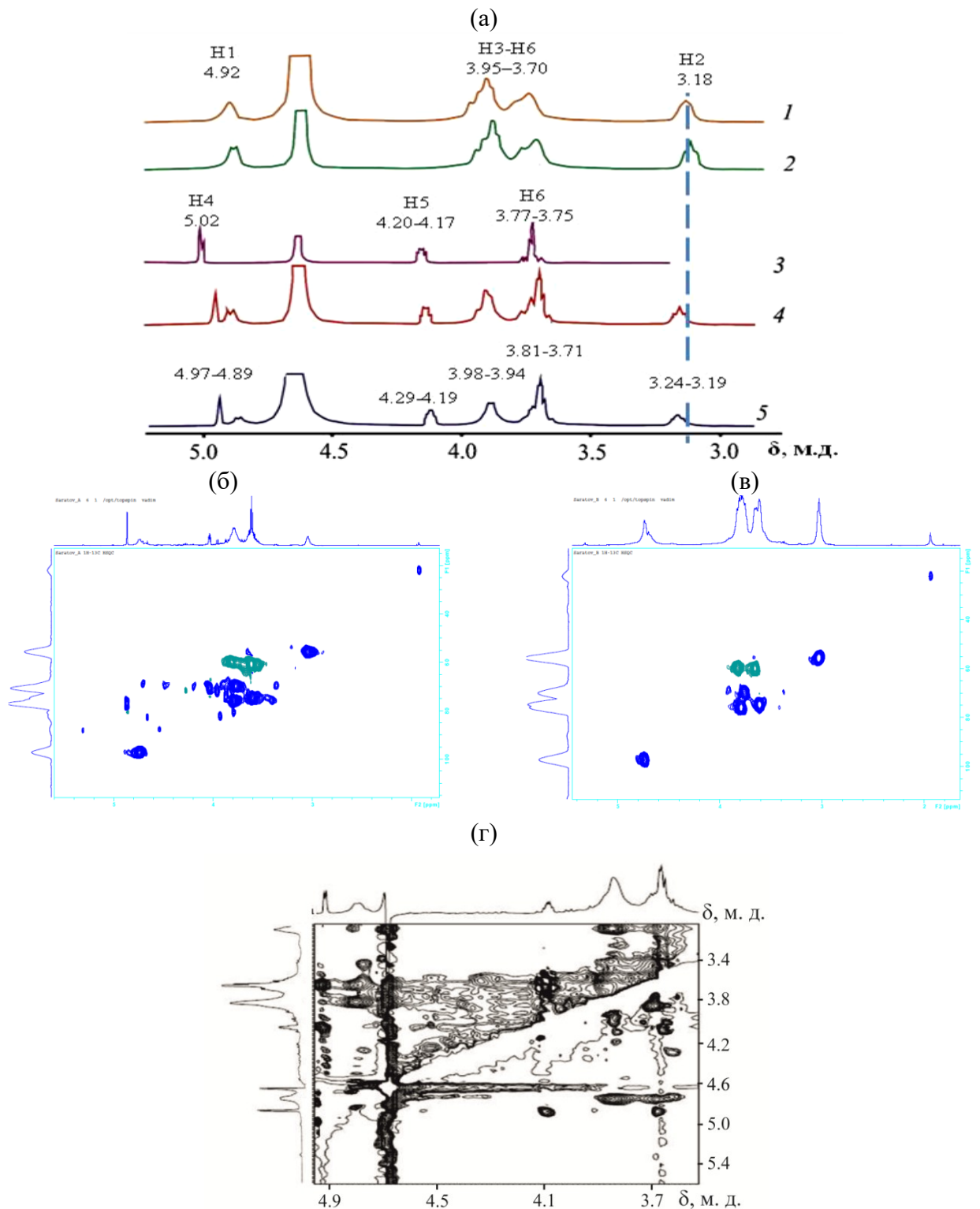


Рисунок 3.23. ЯМР ^1H -спектры (а) растворов XTЗ-40 (1, 2), D-АК (3), XTЗ-40 + D-АК (4, 5): свежеприготовленных (1, 4) и хранившихся 7 сут (2, 5); 2D [^1H , ^{13}C] HSQC-спектры (б, в) растворов XTЗ-40 (б) и XTЗ-40 + D-АК (в); 2D [^1H , ^1H] ROESY-спектр (г) раствора XTЗ-40 + D-АК; $[-\text{NH}_2]/[\text{АК}] = 0.6$ осново-моль/моль, D_2O .

В ^{13}C ЯМР-спектрах XTЗ-40 и XTЗ-40 + D-АК (рисунок 3.23 б, в) наблюдаются характерные пики для хитозана: C1 (δ 97.5), C2 (δ 55.9), C3 (δ 77.6), C4 (δ 70.1), C5 (δ 76.6), C6 (δ 60.2), C=O (δ 173.4) и CH_3 (δ 23.04) [114]. Пики C3 и

C5 создают единый широкий резонанс, который считается характеристическим в структуре хитозана и встречается в любом типе природного хитозана независимо от его источника [114]. В ^{13}C ЯМР-спектре ХТЗ-40 + D-АК (рисунок 3.23 в) также обнаруживаются резонансные сигналы, близкие к таковым для АК в индивидуальном состоянии: C1=O (δ 173.4), C2 (δ 157.2), C3 (δ 117.7), C4 (δ 77.7), C5 (δ 70.9) и C6 (δ 61.3) [172]. Аналогично ^1H -спектрам в ^{13}C -спектрах для свежеприготовленной системы ХТЗ-40 + D-АК наблюдается сильнополюсный сдвиг по сравнению с исходным раствором ХТЗ-40.

Из двумерного гетероядерного 2D [^1H , ^{13}C] HSQC-спектра определены корреляции между атомными ядрами разных типов, которые разделены одной связью. Кросс-пик 58.6/3.18 м.д. соответствует паре C2–H глюкопиранозного цикла макромолекулы. Двойной кросс-пик 61.9/3.8 и 61.9/3.6 м.д. соответствует атомам углерода C6 и двум протонам в группе CH_2OH молекул АК и макромолекул ХТЗ. Кросс-пики 70.9/3.7, 76/3.5 и 77/3.6 м.д. относятся к протонам, связанными с C4, C5 и C3 атомами пиранозного кольца. Для аномерного атома углерода C1 и связанного с ним протона в макромолекуле ХТЗ кросс-пик наблюдается при 97.5/4.9 м.д. Для пары C4–H в фуранозном кольце АК наблюдается кросс-пик 78.0/4.9 м.д., для пары C5–H при 72/4.1 м.д.

На импульсной последовательности 2D [^1H , ^1H] ROESY наблюдается диполь-дипольная кросс-релаксация при 3.67/4.89 и 3.83/4.89 м.д. для сближенных протонов в пространстве друг к другу на расстоянии не более 5.0 Å (рисунок 3.23 г). Так, кросс-пик при 3.67/4.89 м.д. можно отнести к внутримолекулярным взаимодействиям в молекуле индивидуальной АК, соответствующие протонам H6 и H4, соответственно. Второй кросс-пик при 3.83/4.89 м.д. характеризует пространственную сближенность протона H4 молекулы АК и кольцевых протонов при C3–C6 глюкопиранозного кольца ХТЗ.

3.1.3 Структурные и морфологические характеристики L-(D-) аскорбатов хитозана

На рентгеновских дифрактограммах исходных порошков ХТЗ-40 и ХТЗ-200 (рисунок 3.24, спектры I и I') на фоне аморфного гало проявляются основные кристаллические рефлексы при $2\theta \sim 11.3\text{--}12.5$ (гидратированные кристаллы), $15.2\text{--}16.5$ (безводные кристаллы), а также $19.3\text{--}20.3$ град и при $2\theta \sim 27.1$ для гидрохлорида ХТЗ-40 [219, 223]. Дифрактограммы являются типичными для аморфно-кристаллических полимеров с невысокой степенью кристалличности, в

частности, хитозана [26, 37, 93]. Значения межплоскостных расстояний в кристаллических решётках исследованных образцов согласуются с описанными в литературе (таблица 3.9) [108].

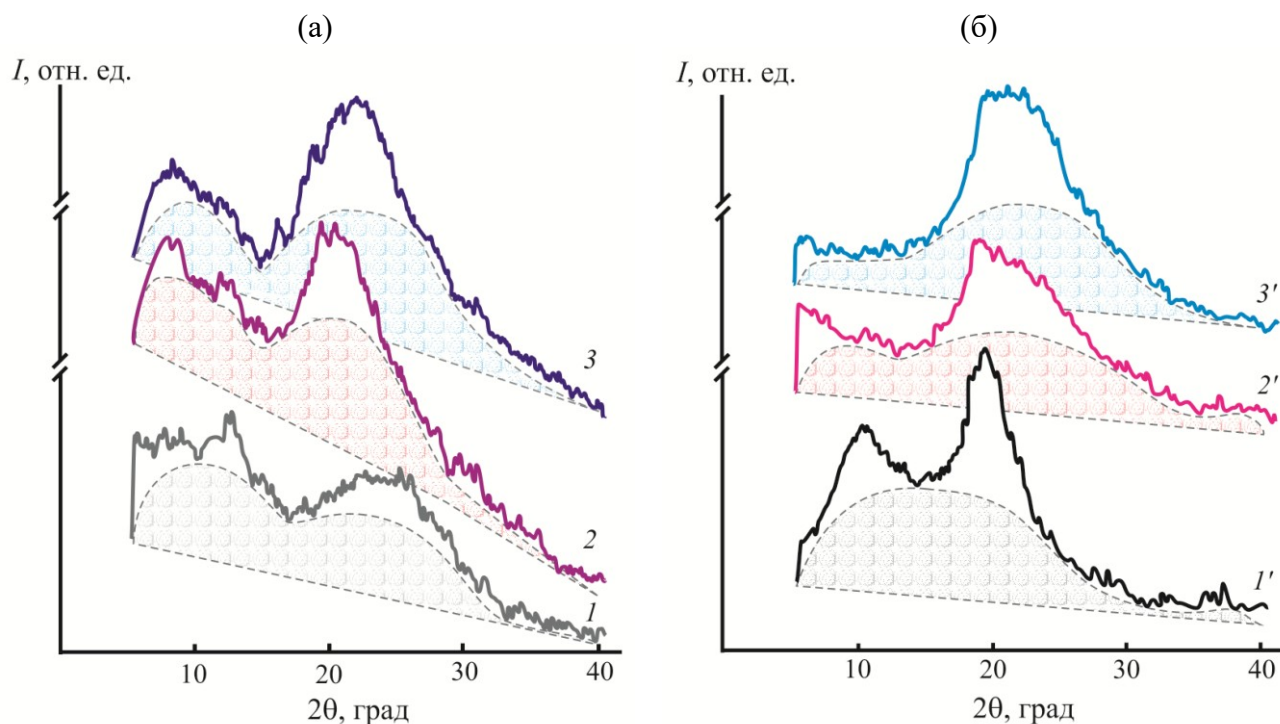


Рисунок 3.24. Рентгеновские дифрактограммы исходного порошка ХТЗ (I , I') и его солей с L - (2 , $2'$) и D -АК (3 , $3'$) для образцов ХТЗ-40 (а) и ХТЗ-200 (б). Оконтуренная пунктиром заштрихованная область соответствует диффузному рассеянию.

На экваториальных рентгеновских профилях диастереомерных солей ХТЗ-40· L -(D -)АК, по сравнению с исходным порошком ХТЗ-40, наблюдается значимое повышение интенсивности основных рефлексов в диапазоне $2\theta \sim 19.3$ – 20.3 град для ХТЗ-40· L -АК и $2\theta \sim 20.8$ – 22.6 град для ХТЗ-40· D -АК, а рефлекс при $2\theta \sim 28.2$ (ХТЗ-40· L -АК) и 27.1 град (ХТЗ-40· D -АК) практически исчезает (рисунок 3.24 а, спектры 2 и 3). Фиксируется также слабый пик при $2\theta \sim 14.2$ – 16.2 и 16.0 град (ХТЗ-40· L -АК и ХТЗ-40· D -АК, соответственно), характерный для дегидратированных солевых форм ХТЗ [33, 34, 120].

На дифракционных картинах диастереомерных солей ХТЗ-200· L -(D -)АК, по сравнению с исходным образцом ХТЗ-200, первый основной рефлекс при $2\theta \sim 11.8$ град малоинтенсивен, второй – смещается в область больших значений углов дифракции: до ~ 21.7 – 24.8 град для ХТЗ-200· L -АК и ~ 21.8 – 24.4 град ХТЗ-200· D -АК (рисунок 3.24 б, спектры $2'$ и $3'$). Кроме того, рентгеновские дифрактограммы ХТЗ-200· L -(D -)АК характеризуются уширением и уменьшением интенсивности пика второго основного рефлекса, что свидетельствует о наличии

в них меньших по размеру структурных элементов. В совокупности изменений экваториальных профилей рентгеновской дифракции можно заключить, что в структуре *L*-(*D*-)аскорбатов ХТЗ-40 и ХТЗ-200 присутствуют полиморфы гидратированной и безводной формы полимера.

Таблица 3.9. Характеристика кристаллитов и степень кристалличности исходных образцов ХТЗ и его хиральных солей с *L*- и *D*-АК

Образец		2θ, град	<i>d</i> , Å	χ, %	Образец		2θ, град	<i>d</i> , Å	χ, %
Полимер	Кислота				Полимер	Кислота			
ХТЗ-40	–	8.2	10.78	32.0 ±1.5	ХТЗ-200	–	6.8	13.31	35.4 ±1.9
		11.3	7.83				11.6	7.73	
		12.5	7.08				16.5	5.42	
		15.2	5.89				19.3	4.64	
		19.7	4.50				19.7	4.54	
		20.1	4.44				20.3	4.41	
		27.1	3.29				30.0	2.99	
		30.05	2.97				35.9	2.51	
		37.6	2.39				37.0	2.44	
	<i>L</i> -АК	8.9	9.93	25.6 ±3.3		<i>L</i> -АК	9.2	9.72	36.8 ±2.5
		11.9	7.43				11.8	7.60	
		12.6	7.02				20.5	4.37	
		14.2	6.2				21.7	4.12	
		16.2	5.47				24.8	3.61	
		19.3	4.60				30.0	2.99	
		20.3	4.37				31.3	2.87	
		28.2	3.16				35.9	2.51	
		29.7	3.00						
	35.5	2.52							
	<i>D</i> -АК	8.1	10.91	34.3 ±3.1		<i>D</i> -АК	8	11.28	40.9 ±3.6
		11.5	7.67				9.4	9.57	
		16.0	5.93				11.8	7.60	
		20.8	4.27				20.4	4.39	
		22.6	3.93				21.8	4.11	
27.1		3.29	23.0		3.89				
30.5		2.93	24.4		3.67				
			28.2		3.18				
		31.5	2.85						
		32.5	2.77						

Несмотря на некоторое снижение интенсивности отдельных рефлексов по сравнению с исходным полимером, степень кристалличности хиральных солей ХТЗ-40·*L*-(*D*-)АК и ХТЗ-200·*L*-(*D*-)АК достаточно высокая в сравнении с солевыми формами ХТЗ с традиционными монокарбонными кислотами-растворителями, значение χ которых, как правило, не превышает 25% [26, 37, 93]. Значения межплоскостных расстояний в кристаллической решётке, определенные при

$2\theta \sim 14.2\text{--}16.2$ град (ХТЗ-40·L-(D-)АК) увеличиваются, а при $2\theta \sim 19.3\text{--}22.6$ град (ХТЗ-40·L-(D-)АК, ХТЗ-200·L-(D-)АК) – уменьшаются (таблица 3.9). Обнаруженные структурные изменения наиболее выражены для D-изомерных солевых комплексов ХТЗ. Наиболее высокие значения степени кристалличности также наблюдаются для D-аскорбатов ХТЗ. Рассчитанные значения степени кристалличности, в совокупности с данными ЭА и ИК (см. подглавы 3.1.1 и 3.1.2), еще раз подтверждают отнесение ХТЗ·L-(D-)АК к безводным солям I типа [81].

Различный характер взаимодействия хитозана с L- и D-АК дополнительно подкрепляется результатами поляризационной и сканирующей электронной микроскопии морфологии осадков, выделенных из исследуемых растворов лиофильной сушкой или спиртовым раствором L-ментола, либо его смесью с ацетоном (рисунок 3.25) [220–222]. Так, СЭМ-микроскопия показала, что стереоизомерия кислотного остатка значительно отражается на надмолекулярном упорядочении порошков хиральных солевых комплексов ХТЗ-40(-200)·L-(D-)АК. Так, пористая структура твердой фазы L-солей ХТЗ-40(-200) представлена регулярной последовательностью разнонаправленных борозд, в то время как структура D-солей – ячейками близкой к сферической формы (рисунок 3.25 а–г). При осаждении полимера из водного раствора ХТЗ-40 + L-АК с использованием этанольного раствора L-ментола (специфический оптически активный осадитель) и ацетона (традиционный осадитель) формируется структура с преимущественно анизометрическими надмолекулярными образованиями (рисунок 3.25 д, ж), а при осаждении из раствора ХТЗ-40 + D-АК – с плотноупакованными конфокальными доменами сферической формы (рисунок 3.25 е, з).

Проведённое исследование показало, что при формировании L- и D-аскорбатов ХТЗ наиболее сильное энергетическое взаимодействие реализуется для гомохиральных солевых комплексов D-глюкан – D-диастереомер АК. Положение и ширина валентных колебаний N–H и O–H, их сдвиг в область низких частот, аналогичный сдвиг полос поглощения валентных и деформационных колебаний C=O свидетельствуют о существовании меж- и внутримолекулярных контактов в надмолекулярной структуре образцов, с наиболее развитой системой таких контактов для D-аскорбата ХТЗ. D-диастереомерные солевые комплексы ХТЗ характеризуются более высокой степенью кристалличности и наибольшим изменением межплоскостных расстояний в кристаллитах как по сравнению с ХТЗ·L-АК, так и по сравнению с солевыми комплексами ХТЗ с другими карбоновыми кислотами [93, 108, 116].

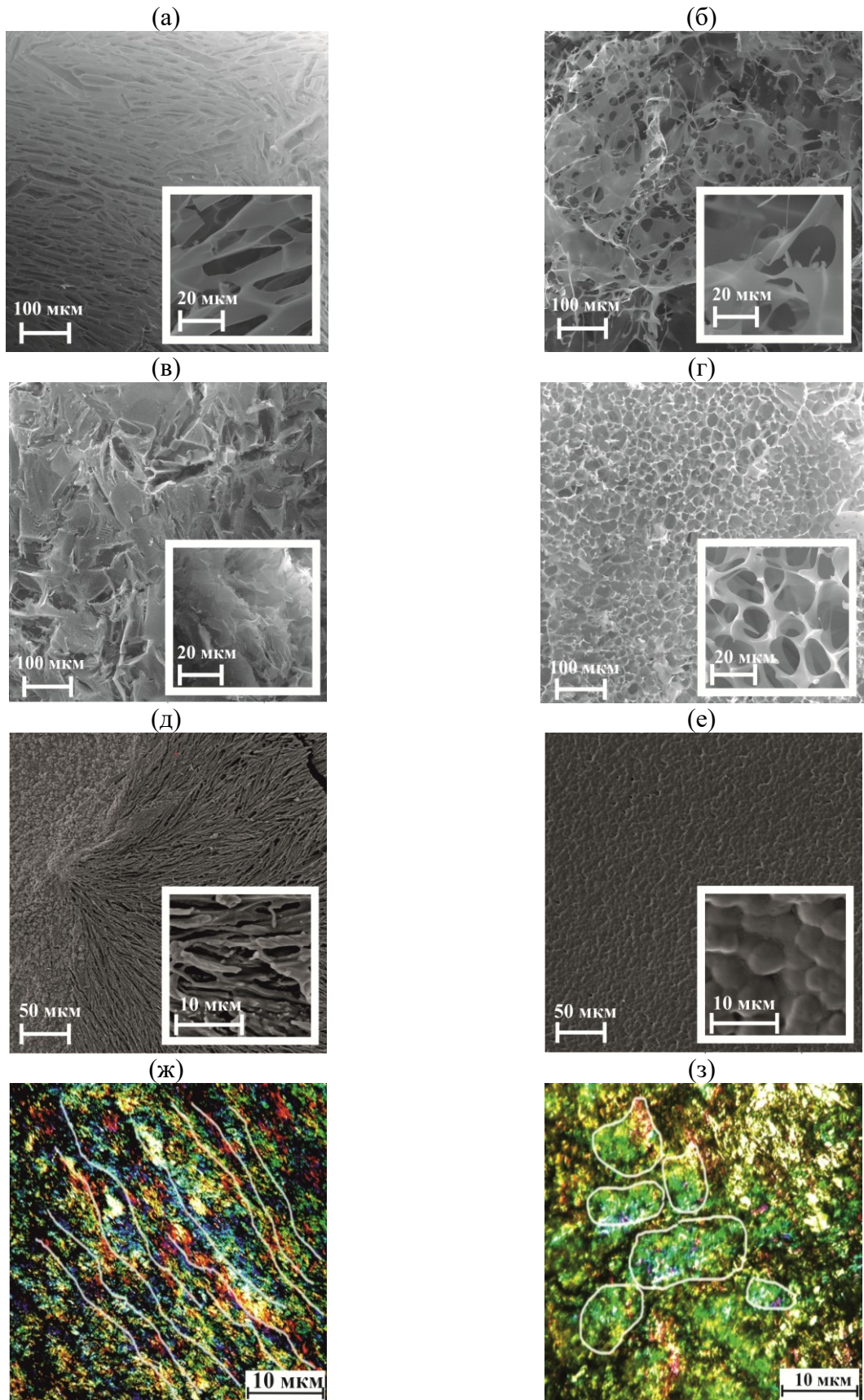


Рисунок 3.25. СЭМ- (а–е) и ПОМ-микроскопия (ж, з) твердой фазы, выделенной из водных растворов ХТЗ-40 (а, б, д, е, ж, з) и ХТЗ-200 (в, г) в *L*- (а, в, д, ж) и *D*-АК (б, г, е, з) лиофильной сушкой (а–г), водно-спиртовым раствором *L*-ментола (д, е) и его смесью с ацетоном (ж, з). Белыми линиями оконтурена форма надмолекулярных структур.

В солевых формах ХТЗ с *D*-изомером АК присутствует меньшее количество приходящейся на макромолекулярное звено кристаллизационной воды, что косвенно указывает на сильное взаимодействие компонентов соли, вследствие чего на взаимодействие с водой остаётся меньше центров и групп. Надмолекулярная структура и пространственное упорядочение солей ХТЗ с *L*- и *D*-АК также в значительной мере определяются пространственной конфигурацией хирального лиганда.

Как известно, протонизация глюкозаминных звеньев ХТЗ исключает возможность участия аминогрупп в формировании водородных связей и, вследствие внутримолекулярного электростатического отталкивания, частично ослабляет исходную жёсткую кристаллическую структуру полимера. Однако гетеро- (*D-L*) и гомохиральные (*D-D*) солевые комплексы ХТЗ–АК показывают уплотнённую надмолекулярную ориентацию макроцепей, стабилизированную многочисленными меж- и внутримолекулярными контактами. Совокупность полученных результатов позволяет констатировать, что хиральные солевые комплексы ХТЗ с *L*- и *D*-АК представляют собой стереоспецифические полимерные сетки, сшитые как посредством классических водородных и ион-дипольных связей, так и специфических кулоновских и др. взаимодействий, в которых немаловажную роль выполняет диастеремерная форма АК.

Установлено также, что тепловой эффект при взаимодействии хитозана с *L*-аскорбиновой кислотой в водной среде и степень протонирования (*D-L*)-солей меньше по сравнению с *D*-изомером кислоты. Гомохиральные (*D-D*)-соли, в отличие от гетерохиральных (*D-L*)-солей, отличаются меньшим количеством кристаллизационной воды, более развитой системой меж- и внутримолекулярных контактов, высокой степенью кристалличности и упорядоченной надмолекулярной организацией макроцепей.

Таким образом, энергетические, спектральные и структурно-морфологические свойства *L*- и *D*-аскорбатов ХТЗ в растворе и твердофазном состоянии свидетельствуют о решающей роли изомерной формы АК в пространственном упорядочении макроцепей *L*-(*D*-)аскорбата ХТЗ и построенных из них надмолекулярных хиральных структур.

3.2 Сорбционные свойства *L*- и *D*-аскорбатов хитозана

3.2.1 Кинетика сорбции паров воды

Кинетические зависимости степени сорбции порошками *L*- и *D*-диастереомерных солевых комплексов ХТЗ паров воды при всех исследуемых значениях p/p_s аналогичны и имеют начальный практически линейный участок $W_t = f(t)$ с выходом на плато (W_{eq}) в квазиравновесных условиях (рисунок 3.26).

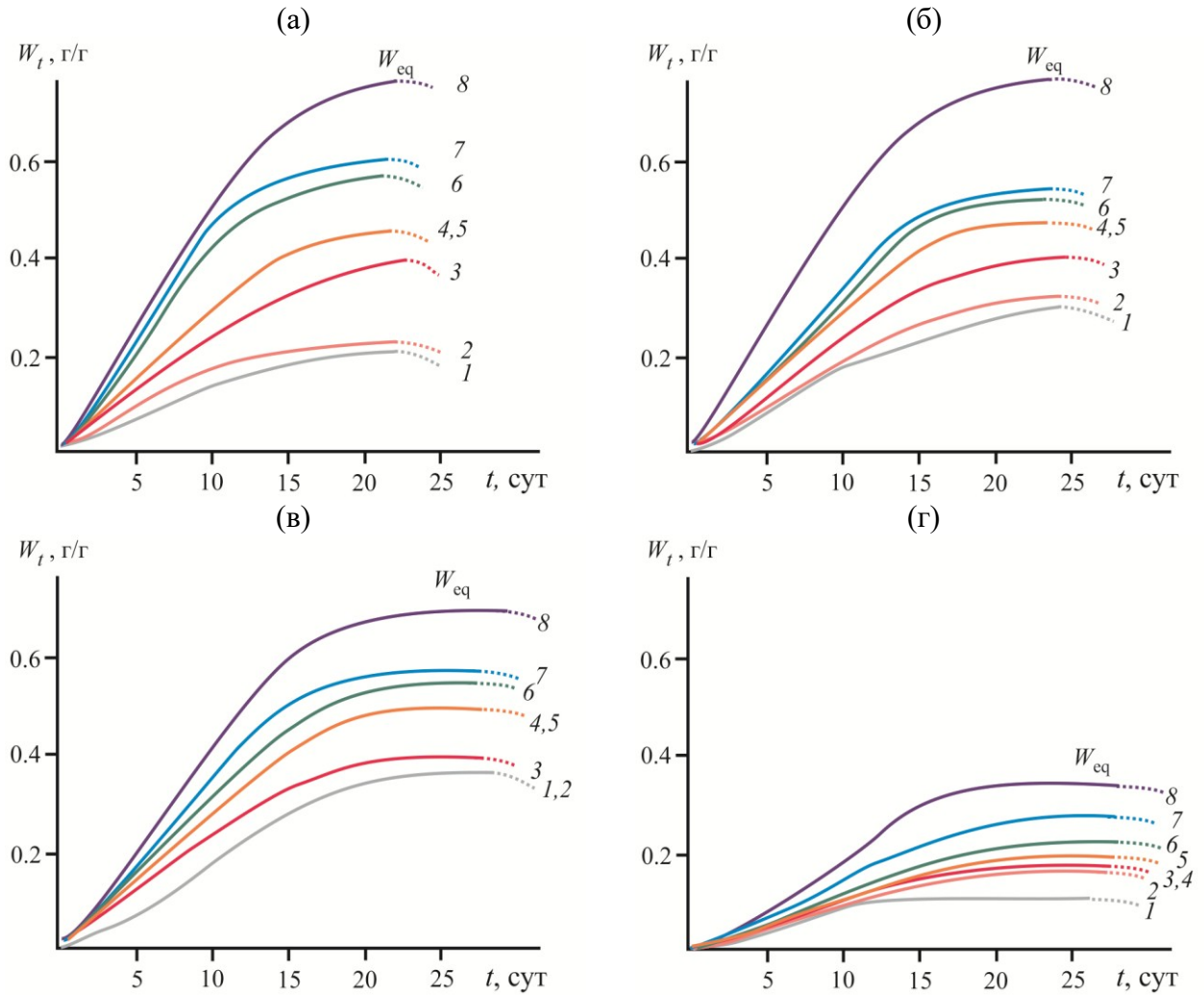


Рисунок 3.26. Кинетические кривые сорбции паров воды солями ХТЗ-40 (а, б) и ХТЗ-200 (в, г) с *L*- (а, в) и *D*-АК (б, г) при p/p_s 0.34 (1), 0.45 (2), 0.55 (3), 0.64 (4), 0.73 (5), 0.81 (6), 0.88 (7) и 0.92 (8); 20°C. Пунктиром обозначено начало растворения.

С повышением давления водяного пара (p/p_s) максимально достижимая степень сорбции увеличивается. Полученные зависимости являются типичными как для ХТЗ солевой и основной форм, так и для других природных полисахаридов и их производных [41, 42, 207]. Время достижения W_{eq} в случае солей ХТЗ-40·*L*-(*D*-)АК составило ~ 20 сут, ХТЗ-200·*L*-(*D*-)АК – ~ 15 сут. Дальнейшее выдерживание в паровой среде сопровождается неограниченным набуханием и растворением порошков.

Определённые из кривых $W_t = f(t)$ по эмпирическим уравнениям (2.15 и 2.16) значения скорости сорбции (V_S) и параметра, характеризующего тип диффузионного механизма переноса вещества (n), возрастают с повышением относительного давления паров воды p/p_s , а специфическая константа скорости сорбции ($K, \text{ч}^{-n}$) снижается (таблица 3.10).

Таблица 3.10 – Физико-химические параметры сорбции паров воды порошками ХТЗ·L-(D-)АК

p/p_s	ХТЗ-40·L-АК			ХТЗ-40·D-АК			ХТЗ-200·L-АК			ХТЗ-200·D-АК		
	$V_S \cdot 10^5, \text{г/с}$	n^a	$K \cdot 10^{5a}$	$V_S \cdot 10^5, \text{г/с}$	n^a	$K \cdot 10^{5a}$	$V_S \cdot 10^5, \text{г/с}$	n^a	$K \cdot 10^{5a}$	$V_S \cdot 10^5, \text{г/с}$	n^a	$K \cdot 10^{5a}$
0.34	1.58	0.62	4.54	1.03	0.47	30.66	1.76	0.63	4.73	0.81	0.57	10.21
0.45	1.77	0.65	3.64	1.19	0.48	29.75	1.94	0.67	3.14	0.97	0.64	5.17
0.55	2.22	0.72	1.62	1.98	0.66	3.50	2.10	0.73	2.04	0.86	0.66	3.47
0.64	2.39	0.87	0.31	2.28	0.77	0.94	2.53	0.76	1.26	0.91	0.73	1.44
0.73	2.50	0.85	0.30	2.38	0.84	0.35	2.29	0.78	0.98	0.98	0.80	0.53
0.81	2.94	0.88	0.22	2.67	0.86	0.22	2.74	0.79	0.74	1.14	0.83	0.40
0.88	3.24	0.89	0.22	2.86	0.89	0.19	2.91	0.80	0.70	1.40	0.85	0.35
0.92	3.96	0.93	0.21	3.72	0.96	0.09	3.51	0.84	0.46	1.72	0.95	0.12

^a – Коэффициент корреляции регрессии $\ln \left(\frac{W_t}{W_{\text{eq}}} \right) = \ln K + n \ln t$ составил 0.90–0.98.

Сравнение рассчитанных значений V_S показывает, что начальная скорость сорбции паров воды для порошков ХТЗ-40·L-АК и ХТЗ-200·L-АК выше по сравнению с порошками ХТЗ-40·D-АК и ХТЗ-200·D-АК, что свидетельствует о более плотной структуре последних (таблица 3.10). Для диастереомерных солей ХТЗ-40 при высоких значениях давления водяного пара наблюдается некоторое сближение скоростей сорбции, однако тенденция реализации более высоких значений V_S для L-солей сохраняется. В диапазоне низких значений давления пара параметр массопереноса для L-солей больше 0.6, а для D-солей – $n \sim 0.5$. При средних p/p_s параметр n принимает соизмеримые значения для обеих хиральных солевых форм, а при высоких p/p_s – становится выше для D-солей. Изменение специфической константы скорости сорбции K с повышением p/p_s антибатно изменению параметра массопереноса, что указывает на значимые различия в скорости диффузии молекул воды в исследуемых образцах L- и D-солей ХТЗ.

В совокупности, вариации физико-химических параметров сорбции паров воды порошками хиральных солей ХТЗ с L- и D-АК свидетельствуют об аномальной диффузии сорбата в полимерной матрице, сопровождающейся релаксационными явлениями в набухающем полимере, а также показывают общую тенденцию роста трансляционной подвижности и пластификации аморфной фазы солей с повышением p/p_s . При этом наиболее высокая скорость диффузии водяного пара наблюдается для полимерной матрицы ХТЗ-40(-200)·L-АК в силу меньшей её плотности.

3.2.2 Изотермы сорбции

L- и *D*-аскорбаты ХТЗ характеризуются *S*-образными изотермами сорбции с точкой перегиба при $p/p_s \sim 0.5$, начиная с которой аморфные домены набухшей полимерной матрицы находятся, преимущественно, в высокоэластическом состоянии (рисунок 3.27 а, б, маркеры). Такие изотермы являются типичными для частично кристаллических гидрофильных биополимерных сорбентов в стеклообразном состоянии [41, 208, 209]. Математическая обработка с использованием термического уравнения сорбции TES (2.17) [42] показала хорошее согласие теоретических изотерм с экспериментальными данными (кривые 1, 1', 2, 2').

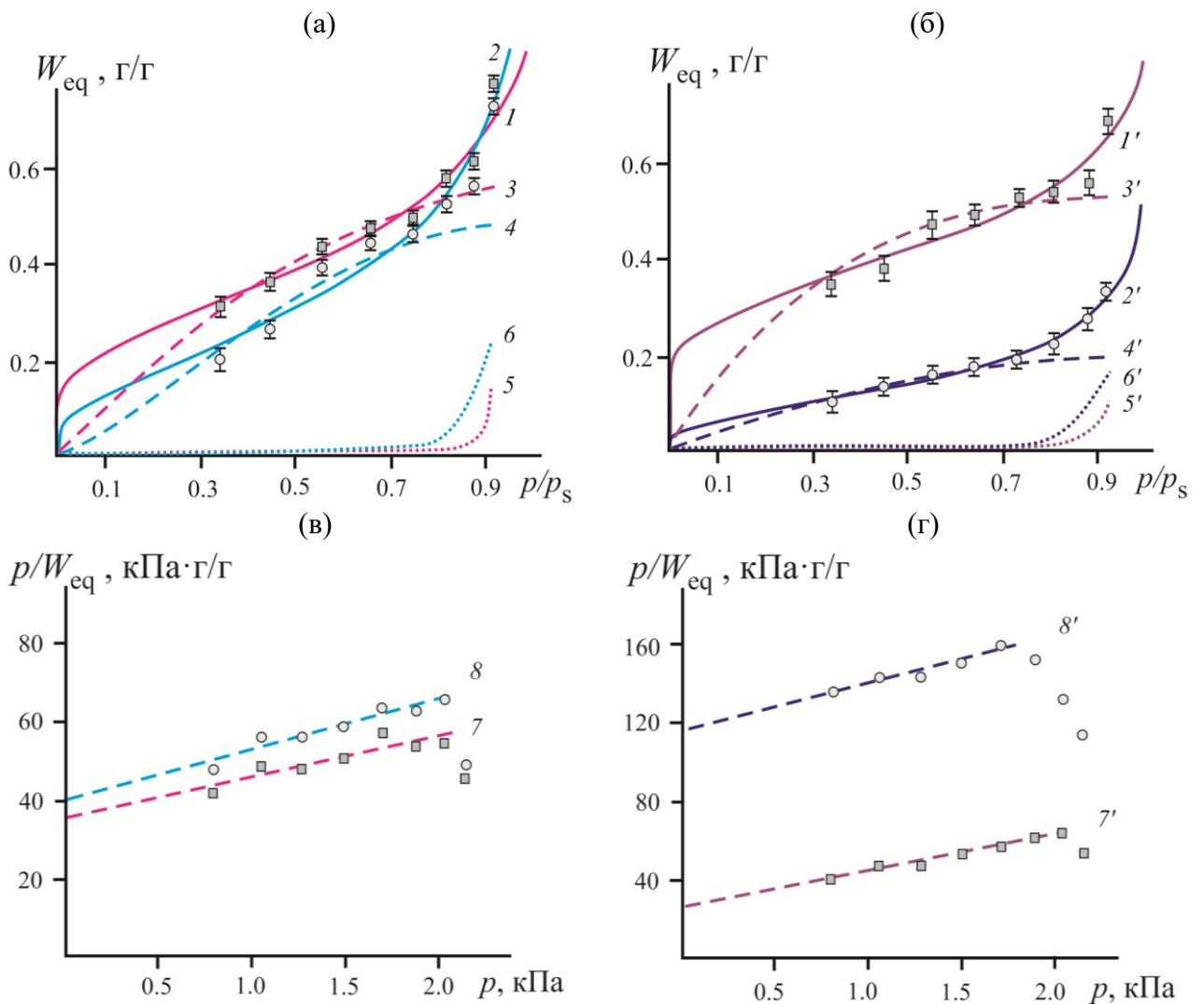


Рисунок 3.27. Изотермы сорбции паров воды порошками солей ХТЗ-40 (а, в) и ХТЗ-200 (б, г) с *L*- (1, 1', 3, 3', 5, 5', 7, 7') и *D*-АК (2, 2', 4, 4', 6, 6', 8, 8'): квадратные и круглые маркеры – эксперимент, кривые 1, 1', 2, 2' – расчёт по термическому уравнению сорбции TES (2.17), кривые 3, 3', 4, 4' – расчёт по уравнению Ленгмюра (2.18), кривые 5, 5', 6, 6' – расчёт по уравнению Флори–Хаггинса (2.19), прямые 7, 7', 8, 8' – в координатах уравнения Ленгмюра; $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

Анализ в рамках модели двойной сорбции (2.18 и 2.19) [41, 208] выявил, что экспериментальные изотермы *L*-(*D*-)аскорбатов ХТЗ представляют собой суперпозицию изотерм Ленгмюра и Флори–Хаггинса, отражающих изменение механизма массопереноса паров H₂O активными центрами полимерной матрицы в зависимости от p/p_s . При низкой активности пара $p/p_s < 0.4–0.5$ сорбция паров воды протекает в аморфной фазе полимера на первичных центрах сорбции по механизму мономолекулярной адсорбции Ленгмюра (рисунок 3.27 а, б, кривые 3, 3', 4, 4'). Основную долю поглощённого сорбата составляют молекулы воды локализованной (связанной) моды. При этом наличие в хиральных солях –ОН, –NH₃⁺ и остаточных –NH₂ групп, функциональных фрагментов N-ацетилглюкозаминных звеньев, гликозидных связей –О–, а также анионов кислоты подразумевает не только формирование водородных связей в процессе заполнения молекулами воды доступных активных центров сорбции [208], но и меж- и внутримолекулярных контактов макроцепей посредством ион-дипольных и специфических кулоновских взаимодействий, о возможности образования которых указывали авторы [43, 97].

В диапазоне $p/p_s = 0.5 – 0.8$ сорбционный процесс дополняется аномальной диффузией по механизму многослойной сорбции слабо взаимодействующих молекул воды. При высоких парциальных давлениях, $p/p_s > 0.8$, молекулы H₂O преимущественно кластеризуются в аморфных доменах полимерной матрицы, процесс сорбции протекает за счёт повышения нелокализованной (свободной) моды и описывается изотермой Флори–Хаггинса (кривые 5, 5', 6, 6').

Обращает на себя внимание, что во всём исследуемом диапазоне p/p_s для *L*-солей реализуются более высокие значения W_{eq} , чем для *D*-солей (рисунок 3.27 а, б). Причём данная разница более существенна для образца ХТЗ-200, в котором влияние аскорбат-анионов не «смазано» действием конкурирующего хлорид-аниона. Такое поведение согласуется и с соотношением долей кристаллической фазы в надмолекулярной структуре порошков ХТЗ-40·*L*-АК и ХТЗ-200·*L*-АК (таблица 3.11), которая, как известно, не участвует в абсорбционном процессе [207].

Таблица 3.11 – Физико-химические параметры порошков хиральных солей ХТЗ·*L*-(*D*-)АК

Параметр	ХТЗ-40· <i>L</i> -АК	ХТЗ-40· <i>D</i> -АК	ХТЗ-200· <i>L</i> -АК	ХТЗ-200· <i>D</i> -АК
χ , %	25.6±3.3	34.3±3.1	36.8±2.5	40.9±3.6
a_0 , г/г ^а	1.38±0.16	1.78±0.15	1.03±0.14	0.72±0.13
E , кДж/моль ^а	0.82±0.24	0.31±0.17	2.36±0.44	0.38±0.19
W_m , г/г ^б	0.56±0.04	0.46±0.04	0.57±0.04	0.25±0.04
K_S , кПа ^{-1б}	1.7±0.3	1.0±0.2	2.0±0.4	1.1±0.3

^а – Параметр термического уравнения сорбции ТЕС (2.17), остаточная сумма квадратов 0.002–0.015.

^б – Параметр изотерм сорбции Ленгмюра (2.18), коэффициент корреляции линейной регрессии 0.81–0.96.

Существенные различия наблюдаются также в предельной величине сорбции (a_0 , г/г) и характеристической энергии сорбции (E , кДж/моль) хиральных солей, рассчитанные по уравнению TES (2.17), а также в сорбционной ёмкости монослоя (W_m , г/г) и адсорбционной константе сорбционного равновесия (K_S , кПа⁻¹), определённых по линейной регрессии изотерм Ленгмюра (2.18) в координатах $p/W_{\text{eq}} = f(p)$ (рисунок 3.27 в, г, таблица 3.11). Несмотря на сравнимые с литературными данными значения (например, для плёнок ацетата хитозана $W_m = 0.43$ г/г [207]), полученные параметры свидетельствуют о значительных отличиях в количестве первичных сайтов сорбции L - и D -аскорбатов ХТЗ. Так, сорбционная ёмкость монослоя, пропорциональная содержанию доступных активных центров, для ХТЗ· L -АК выше, чем для ХТЗ· D -АК, что ещё раз подтверждает рыхлость надмолекулярного упорядочения L -солей и уплотнённость такового для D -солей. В случае L -солей, W_m и a_0 слабо зависят от молекулярной массы ХТЗ, что связывают с малым вкладом концевых групп в сорбционный процесс [207], а для D -солей наблюдается практически двукратная разница в данных физико-химических параметрах. Значения константы адсорбционного равновесия K_S , численно равной отношению констант сорбции и десорбции, а, следовательно, характеризующей энергию взаимодействия полимер–сорбат, для L -аскорбатов ХТЗ выше, чем для D -аскорбатов. Аналогичный характер выявляется и для E порошков L - и D -аскорбатов ХТЗ.

3.2.3 Свободная энергия Гиббса смешения

Поскольку после достижения W_{eq} неограниченное набухание L - и D -аскорбатов ХТЗ переходит в растворение, были рассчитаны термодинамические параметры данного процесса. В результате интегрирования изотерм Флори–Хаггинса по уравнению Гиббса–Дюгема согласно работе [42] получены два варианта концентрационных зависимостей энергии Гиббса смешения $\Delta\bar{G}_{\text{см}}$ сорбционной системы L -(D -)аскорбат ХТЗ + вода (рисунок 3.28).

В обоих случаях кривые $\Delta\bar{G}_{\text{см}} = f(\omega_2)$ ожидаемо находятся в отрицательной области и имеют асимметричный характер, минимум сдвинут в сторону больших концентраций полимера. Первый факт указывает на термодинамическую устойчивость хиральных солей ХТЗ в водных растворах и неизбежный переход сорбции в растворение, второй – на значительную разницу в размерах взаимодействующих молекул. Абсолютные значения свободной энергии смешения и, соответственно, обусловленное взаимодействием полярных групп

термодинамическое сродство компонентов и устойчивость системы хиральная соль + вода увеличиваются в ряду $\text{ХТЗ-200}\cdot\text{D-АК} \rightarrow \text{ХТЗ-40}\cdot\text{D-АК} \rightarrow \text{ХТЗ-40}\cdot\text{L-АК} \rightarrow \text{ХТЗ-200}\cdot\text{L-АК}$ в обоих случаях. Это можно объяснить тем, что сильные взаимодействия между хиральным ХТЗ-40(-200) и $\text{D-диастереомером АК}$, обеспечивающие надлежащее стерическое соответствие компонентов солевого комплекса, сохраняются и в набухшей системе. Это мешает молекулам воды всесторонне гидратировать и полимер и D-лиганд («поверхностная» гидратация).

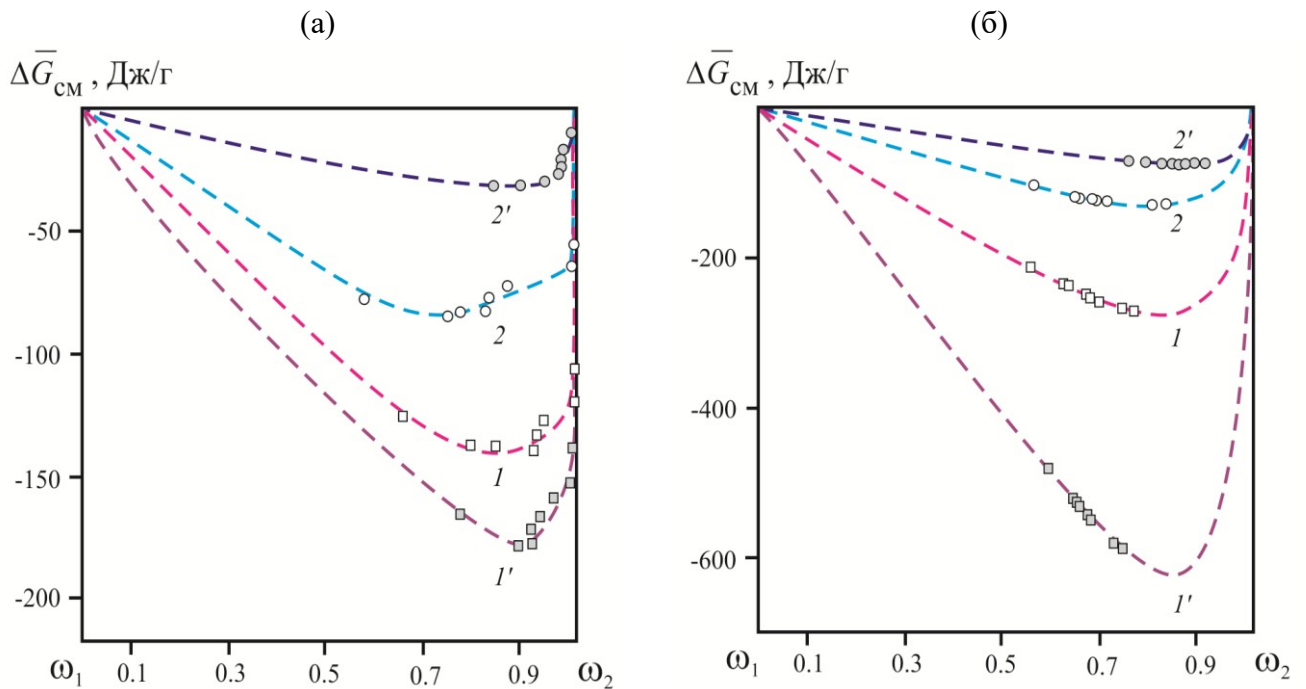


Рисунок 3.28. Концентрационная зависимость средней свободной энергии Гиббса смешения сорбционной системы $\text{L-(D)-аскорбат ХТЗ} + \text{вода}$ для порошков хиральных солей ХТЗ-40 ($1, 2$) и ХТЗ-200 ($1', 2'$) с L- ($1, 1'$) и D-АК ($2, 2'$), рассчитанная из изотермы Флори-Хаггинса (а) и TES (б).

В солевом комплексе ХТЗ с $\text{L-диастереомером АК}$ бóльшая рыхлость воздушно-сухого порошка обуславливает лёгкость проникновения молекул воды между макромолекулами и лигандом и, соответственно, исчерпывающую гидратацию полимера, что находит отражение в более сильном понижении энергии Гиббса смешения. Тот факт, что кривые 2 рисунка 3.28 расположены ниже кривых $2'$, можно объяснить в предположении, что хлорид-ионы вытеснены из плотной структуры порошка $\text{ХТЗ-40}\cdot\text{D-АК}$, хорошо гидратированы, за счёт чего энергия Гиббса понижена. Что же касается кривых 1 и $1'$, то, поскольку все компоненты системы гидратированы всесторонне, на первый план выходит соотношение масс анионов и их энергий гидратации. По-видимому, тяжёлый

хлорид-ион является своего рода «балластом», увеличивая массу системы сильнее, чем понижая свободную энергию смешения.

Обращает на себя внимание, что для двух использованных методов расчёта значения энергии Гиббса смешения различны: в случае использования уравнения TES (без вычета ленгмюровской составляющей) модуль $\Delta\bar{G}_{см}$ существенно выше. Это объясняется тем, что кривые TES имеют бесконечно большой наклон в начальной точке (рисунок 3.28 а и б, кривые 1, 1', 2, 2'), не подчиняясь закону Генри. Соответственно, вклад в интеграл этой области давлений p/p_s будет значительным, в отличие от более плавного интегрирования по Флори–Хаггинсу. Однако оба метода дают один и тот же качественный результат, с удовлетворительной точностью описывающий термодинамику растворения хиральных солей ХТЗ.

Таким образом, проведённая оценка сорбционного поведения *L*- и *D*-аскорбатов ХТЗ показала существенный вклад природы диастереомера АК на значение равновесной сорбции, общую скорость сорбции паров воды и механизм переноса вещества. Анализ изотерм сорбции позволяет сделать вывод о бóльшей гидрофильности и рыхлости структуры систем на основе ХТЗ·*L*-АК.

3.3 Оптические свойства *L*- и *D*-аскорбатов хитозана

Исходя из обнаруженных различий в надмолекулярном упорядочении структуры полимерного вещества проведено комплексное исследование оптических свойств диастереомернообогащенных солей хитозана с *L*-, *D*-аскорбат-анионами в УФ и видимой области спектра [179, 221, 222, 224, 225]. Использовали УФ-спектроскопию, КД и ДОВ.

3.3.1 УФ-спектроскопия

Электронные спектры растворов индивидуальных диастереоизомеров АК имеют сильное поглощение в ближнем ультрафиолете, обусловленное $\pi \rightarrow \pi^*$ электронным переходом в сопряженной двойной углерод-углеродной связи пятичленного лактонного кольца (рисунок 3.29, кривые 1 и 2). В УФ-спектре *L*-АК присутствует интенсивный максимум поглощения при 265 нм, *D*-АК – при 258 нм. Согласно работе [226] разложение широкой полосы поглощения водного раствора АК с использованием функции Гаусса выявляет вклады нейтральной формы ($\lambda_{\max} = 242$ нм) и моноаниона аскорбата ($\lambda_{\max} = 265$ нм).

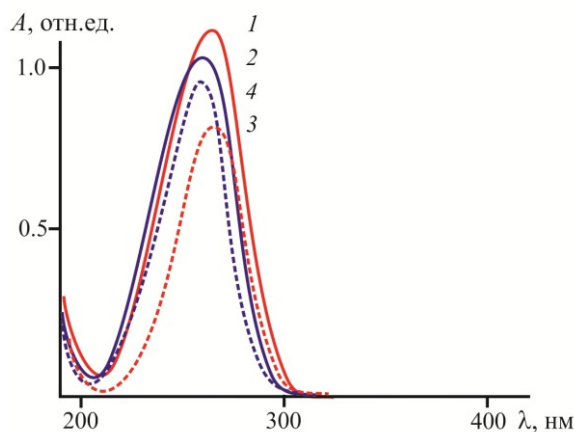


Рисунок 3.29. УФ-спектры поглощения водных растворов *L*- (1) и *D*-АК (2) и растворов ХТЗ-40 в *L*- (3) и *D*-АК (4), $C_{\text{ХТЗ}} = 5 \cdot 10^{-3}$ г/дл, $C_{\text{АК}} = 10 \cdot 10^{-3}$ г/дл, $[-\text{NH}_2]/[\text{АК}] = 0.5$ основомоль/моль, длина оптического пути 10 мм, $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

Оптическая плотность раствора *L*-АК несколько выше раствора *D*-АК (таблица 3.12), однако коэффициенты экстинкции ε (молярного поглощения) для *L*- и *D*-АК имеют близкие значения ($\varepsilon_L = 1.0 \cdot 10^4$ и $\varepsilon_D = 0.9 \cdot 10^4$ л/моль·см) и находятся в согласии с литературными данными ($1.0 \cdot 10^4$ л/моль·см для нейтральной АК и $1.5 \cdot 10^4$ л/моль·см для моноаниона аскорбата) [227]. Следовательно, в водном растворе *L*-АК содержится большее количество анионов, чем в *D*-АК, что подтверждается расчетом $[\text{HA}^-]/[\text{H}_2\text{A}]$ на основании потенциометрии растворов индивидуальных изомеров (таблица 3.12).

Таблица 3.12 – Спектральные характеристики водных растворов *L*-(*D*-)АК и солевых комплексов ХТЗ-40 + *L*-(*D*-)АК, ХТЗ-200 + *L*-(*D*-)АК и ХТЗ-200 + *L*-(*D*-)АК + HCl

Параметр	АК + H ₂ O		ХТЗ- \bar{M}_n + АК + H ₂ O						
			[-NH ₂]/[АК], осново-моль/ моль	ХТЗ-40·АК + H ₂ O		ХТЗ-200·АК + H ₂ O		ХТЗ-200·АК + HCl + H ₂ O ^б	
	<i>L</i> -АК	<i>D</i> -АК		<i>L</i> -АК	<i>D</i> -АК	<i>L</i> -АК	<i>D</i> -АК	<i>L</i> -АК	<i>D</i> -АК
pK _{a1}	4.26	4.18	–	6.3 – 6.5 [1–6]					
pH	3.0	2.9	1.0	3.0	2.9	4.4	4.3	3.0	2.9
[HA ⁻]/[H ₂ A] · 10 ^{2а}	5.5	5.2	–	–					
УФ-спектроскопия									
λ _{max} , нм	265	258	0.5	264	264	–	–	–	–
A, отн. ед.	1.1	1.0		0.96	0.81	–	–	–	–
ε · 10 ⁻⁴ , л/моль·см	1.0	0.9		0.31	0.28	–	–	–	–
КД-спектроскопия									
λ _{0^б} , нм	250	240	0.3–1.0	250	240	250	240	250	240
[θ] _{λ₀} · 10 ⁻⁵ , град·мл/дм·г	33.2	50.0	0.3	62.8	123.0	97.0	149.3	–	–
			0.5	51.5	83.0	81.7	69.2	–	–
			1.0	20.7	34.4	49.0	50.0	33.0	35.2
ДОВ-спектроскопия									
[α] _{589 нм^г} ^{25°C} град·мл/дм·г	+23	-17	0.3	+66.3	-56.9	+164.2	+58.1	–	–
			0.5	+44.3	-36.6	+141.3	+92.5	–	–
			1.0	+18.9	-16.8	+94.2	+94.4	+3.22	-30.83
			1.7	+8.2	-13.4	–	–	–	–
$\bar{K} \cdot 10^{-7}$ г, град·мл·нм ² /дм·г	0.51	-0.43	0.3	0.91	-1.51	2.43	1.11	–	–
			0.5	0.62	-0.96	2.18	1.54	–	–
			1.0	0.25	-0.47	1.62	1.61	-0.13	-0.70
			1.7	0.11	-0.30	–	–	–	–

^а – [HA⁻]/[H₂A] = K_{a1}/[H⁺].

^б – [-NH₂] : [АК] : [HCl] = 1 : 1 : 1 осново-моль/моль/моль.

^в – Дисперсионная константа, соответствующая длине волны максимума поглощения КД-спектра.

^г – Вращательная константа, рассчитанная по одночленному уравнению Друде (2.25) при 405 нм.

Для водно-кислотных растворов хитозана по сравнению с растворами индивидуальных изомеров АК наблюдаются bathochromic сдвиг и hypochromic эффект максимума поглощения (рисунок 3.29 спектры 3 и 4). Смещение спектральной полосы в длинноволновую область (λ_{max} = 264 нм) обусловлено дополнительной ионизацией АК с образованием аскорбат-анионов за счет депротонирования С3-ОН группы (положительный сольватохромизм) [226]. Уменьшение интенсивности полосы поглощения обычно сопровождается диполь-дипольными взаимодействиями между хромофорами в агрегате и отображает изменения в конформации биополимеров. Так, наблюдаемый hypochromic эффект (ΔA, отн. ед.) раствора хитозана в *L*- и *D*-АК равен 0.14 и 0.19 отн. ед., соответственно, что может свидетельствовать о более упорядоченном расположении переходных моментов в комплексе ХТЗ + *D*-АК по сравнению с ХТЗ + *L*-АК.

3.3.2 Спектроскопия кругового дихроизма

На рисунке 3.30 а представлены спектры КД водных растворов бинарных солей хитозана: ХТЗ-40 + *L*-АК и ХТЗ-40 + *D*-АК [221, 222, 224]. Для сравнения приведены спектры КД водного раствора ХТЗ-40 (кривая 1) и водных растворов изомеров *L*- и *D*-АК (кривые 8 и 8', соответственно). Как и следовало ожидать спектры КД аскорбатов хитозана характеризуются эффектом Коттона – результат возбуждения С=C–связи, $\pi \rightarrow \pi^*$ переход (кривые 2–5, 2'–5'). Причем, для обеих диастереомернообогащенных форм данный эффект положительный. Однако наблюдаются различия как в длине волны максимума (λ_0) положительной полосы КД, так и в ее интенсивности (таблица 3.12). В коротковолновой области спектра при $\lambda < 225\text{--}230$ нм и при $\lambda > 275\text{--}280$ нм наблюдаются отрицательные значения удельной эллиптичности. Уместно отметить, что эффект Коттона с $\lambda_0 = 253$ нм был зарегистрирован в работе [108], только в области отрицательных значений $[\theta]$, поскольку исследовались растворы N-замещенного аскорбата хитозана (изомер АК в работе не указан) в ДМСО.

Спектры КД водных растворов *D*-АК, так и *L*-АК, имеют положительную полосу эллиптичности при $\lambda_0 = 240$ и 250 нм, но показывают более высокую интенсивность эффекта Коттона: $[\theta]_{240} (D\text{-АК}) = 50.0 \cdot 10^5$ град·мл/дм·г и $[\theta]_{250} (L\text{-АК}) = 33.2 \cdot 10^5$ град·мл/дм·г (рисунок 3.30 а, кривые 8', 8). В работе [228] для раствора *L*-АК в CH_3CN также зафиксирован положительный эффект Коттона при $\lambda_0 = 247.4$ нм. Смещение максимума эллиптичности для *D*-АК в область более коротких длин волн, по сравнению с *L*-АК, согласуется со спектрами поглощения водных растворов изомеров АК в ближней УФ-области (см. рисунок 3.29). Гипсохромный сдвиг максимума поглощения также может быть связан с увеличением кислотности раствора вследствие изменения равновесия между нейтральными и анионными формами АК [226], что согласуется со значением рН исследуемых растворов (см. таблицу 3.12). Спектр КД водного раствора гидрохлорида ХТЗ-40 показывает отрицательное дихроичное поглощение с очень слабой по интенсивности полосой при 210 нм, ответственной за оптическую активность ацетамидного хромофора, и также слабую по интенсивности «размытую» полосу в диапазоне 250–260 нм (рисунок 3.30 а, кривая 1). Согласно авторам [122], изучавших спектры КД практически полностью деацетилированного хитозана, малая интенсивность эффекта Коттона при 210 нм подтверждает высокую степень деацетилирования используемого в работе образца ХТЗ.

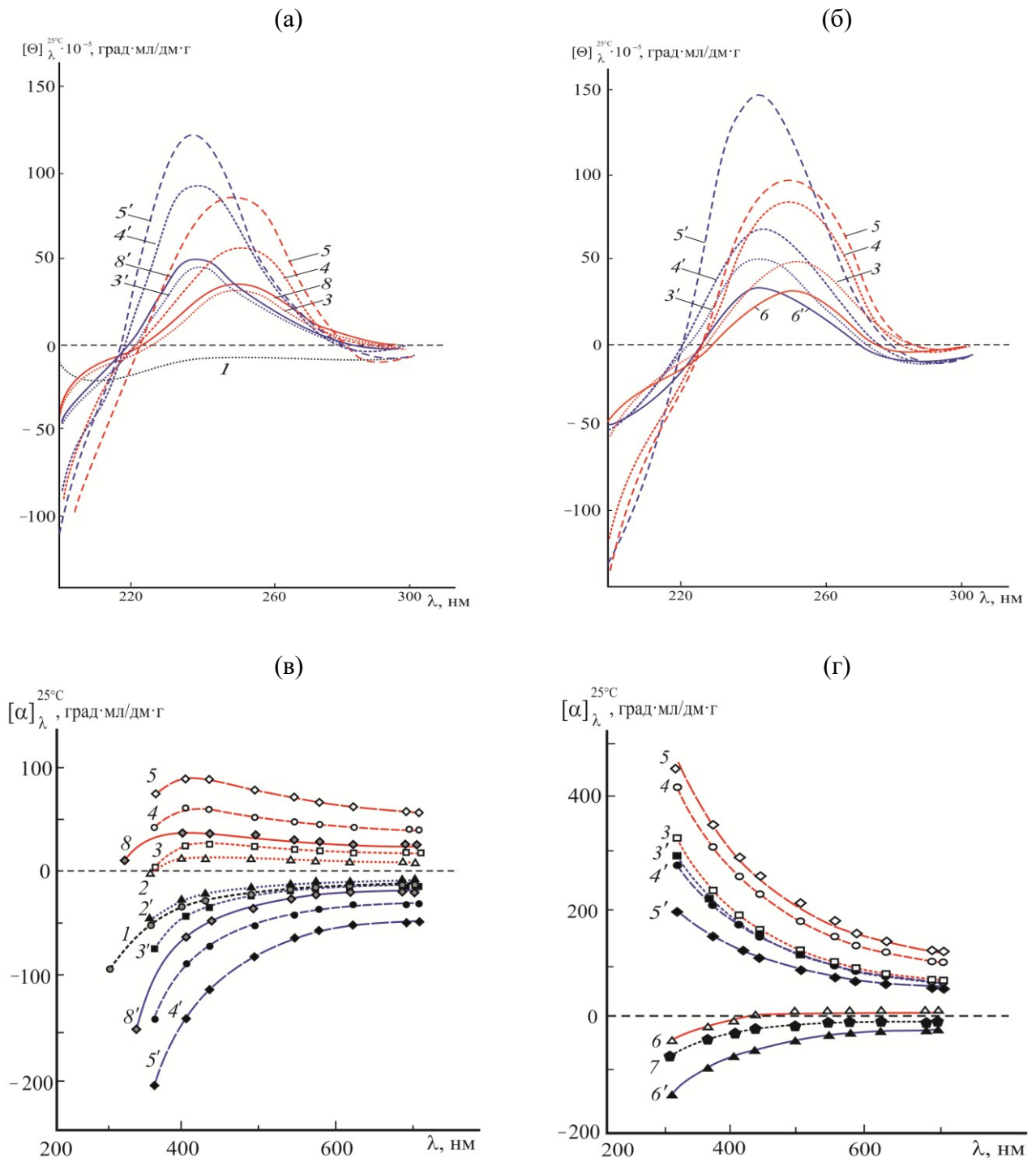


Рисунок 3.30. Спектры КД (а, б) и кривые ДОВ (в, г) растворов ХТЗ-40 (а, в), ХТЗ-200 (б, г) в H_2O (1), *L*- (2–5), *D*-АК (2'–5'), *L*-(*D*-)АК+HCl (6, 6'), HCl (7), а также водных растворов *L*-, *D*-АК (8, 8'); $[-\text{NH}_2] : [\text{АК}] = 1.0 : 0.6$ (2, 2'), 1 : 1 (3, 3'), 1 : 2 (4, 4'), 1 : 3 осново-моль/моль (5, 5'), $[-\text{NH}_2] : [\text{АК}] : [\text{HCl}] = 1 : 1 : 1$ осново-моль/моль/моль (6, 6'), $[-\text{NH}_2] : [\text{HCl}] = 1 : 1$ осново-моль/моль (7); 25°C.

Появление в спектрах КД растворов ХТЗ-40 + *L*-АК и ХТЗ-40 + *D*-АК (рисунок 3.30 а, кривые 3–5, 3'–5') по сравнению с ХТЗ-40 (кривая 1) интенсивной положительной дихроичной полосы с максимумом $\lambda_0 = 250$ и 240 нм обусловлено, вероятно, формированием аминокорбатного хромофора вследствие

взаимодействия протонированных ауксохромных групп ($-\text{NH}_3^+$) полисахаридной цепи с аскорбат-анионами. При этом, уменьшение интенсивности положительной полосы КД эквимольного раствора ХТЗ-40 + *L*-АК ($[\theta]_{250} = 20.7 \cdot 10^5$ град·мл/дм·г) и ХТЗ-40 + *D*-АК ($[\theta]_{240} = 34.4 \cdot 10^5$ град·мл/дм·г) по сравнению с раствором индивидуального изомера *L*-(*D*-)АК, как и проведенный ИК и ЯМР спектроскопический анализ взаимодействия ХТЗ с АК в водной среде (см. подглаву 3.1), может свидетельствовать о формировании пространственно сближенного комплекса между ХТЗ и резонансно-стабилизированным аскорбат-анионом. В качестве дополнительного доказательства участия в рассматриваемом взаимодействии аминогруппы можно привести также работу [122]. Автором показано, что при формировании комплекса Cu^{II} с аминогруппой у С2 и гидроксильной группой у С3 хитозановой цепи в исходно монотонном спектре КД появляется интенсивный эффект Коттона с максимумом при $\lambda_0 = 260\text{--}270$ нм.

Для растворов ХТЗ-40(-200) + *L*-(*D*-)АК (рисунок 3.30 а, б, кривые 3–5, 3'–5') с уменьшением мольного соотношения $[-\text{NH}_2] : [\text{АК}] = 1 : 1 \div 1 : 3$ интенсивность дихроичного поглощения повышается. После нормировки на концентрацию кислоты кривые КД растворов с $[-\text{NH}_2] : [\text{АК}] \geq 1 : 2$ осново-моль/моль практически совпадают со спектрами эквимольных систем. Следовательно эллиптичность ХТЗ-40(-200) + *L*-(*D*-)АК не зависит от концентрации несвязанной АК. Спектральные характеристики растворов ХТЗ-200 + *L*-(*D*-)АК + HCl отличаются от таковых для ХТЗ-200 + *L*-(*D*-)АК лишь значениями $[\theta]$ (рисунок 3.30 б, кривые 6, 6').

3.3.3 Спектроскопия оптического вращения

Исследование оптической активности индивидуальных изомеров АК в видимой области спектра показало, что водные растворы *L*-АК и *D*-АК характеризуются противоположными по знаку значениями удельного оптического вращения $[\alpha]$ и разным типом кривых ДОВ (рисунок 3.30 в, кривые 8 и 8'). Раствор *L*-АК показывает правое вращение (в отличие от левого вращения при $\lambda > 280$ нм в спектре КД, рисунок 3.30 а, кривая 8) и аномальную дисперсию, поскольку на зависимости $[\alpha] = f(\lambda)$ имеется перегиб. Значения $+\alpha$ в исследуемом диапазоне длины волны изменяются не монотонно: в диапазоне $\lambda = 280\text{--}365$ нм возрастают с увеличением длины волны, а при $\lambda = 405\text{--}710$ нм – уменьшаются. Раствор *D*-АК показывает левое вращение и нормальную дисперсию: значения $-\alpha$ монотонно убывают по модулю с увеличением λ (рисунок 3.30 в, кривая 8'). Обращает внимание, что при $\lambda \sim 405\text{--}710$ нм растворы *L*-АК и *D*-АК имеют близкие по модулю

значения $[\alpha]$, а при $\lambda = 280\text{--}365$ нм модуль $[\alpha]$ раствора *D*-АК существенно выше модуля этой величины для раствора *L*-АК.

Водные растворы ХТЗ-40 + *L*-АК и ХТЗ-40 + *D*-АК, как и растворы *L*-АК и *D*-АК, характеризуются противоположным направлением вращения плоскости поляризации – правым и левым, соответственно, и различным характером кривых дисперсии (рисунок 3.30 в, кривые 2–5, 2'–5'). Однако, оптическая активность солей ХТЗ-40 с *L*- и *D*-АК (при мольном соотношении $[-\text{NH}_2] : [\text{АК}] = 1 : 0.6$ и $1 : 1$) несколько отличается от оптических свойств индивидуальных *L*- и *D*-изоформ АК (рисунок 3.30 в, кривые 2, 3, 2', 3', таблица 3.12). Так, дисперсионная кривая раствора ХТЗ-40 + *L*-АК ($1 : 0.6$, $1 : 1$), как и раствора *L*-АК, хоть и относится к аномальному типу, однако показывает не только перегиб на зависимости $[\alpha] = f(\lambda)$, но и практически нулевое значение $[\alpha]$ при $\lambda \sim 360$ нм. Кривая ДОВ раствора ХТЗ-40 + *D*-АК ($1 : 0.6$, $1 : 1$), как и раствора *D*-АК, плавная, но реализуемые значения $[\alpha]$ несколько больше по абсолютной величине. Как и в случае водных растворов изомеров АК, растворы ХТЗ-40 + *L*-АК и ХТЗ-40 + *D*-АК показывают в определенном диапазоне длины волны ($\lambda \sim 495\text{--}710$ нм) близкие по модулю значения удельного оптического вращения. Что касается спектров удельного оптического вращения водных растворов гидрохлоридов ХТЗ-40 и ХТЗ-200, то они характеризуются только левым вращением и нормальной дисперсией: значения $-[\alpha]$ монотонно убывают по модулю с увеличением λ (рисунок 3.30 в, г, кривые 1 и 7) и занимают промежуточное положение между кривыми ДОВ растворов бинарной соли *L*-(*D*-)аскорбат-гидрохлорида ХТЗ-40 (рисунок 3.30 в, кривые 3, 3') и ХТЗ-200 (рисунок 3.30 г, кривые 6, 6', таблица 3.12).

Спектры ДОВ водных растворов ХТЗ-200 + *L*-АК (рисунок 3.30 г, кривые 3–5) аналогичны таковым ХТЗ-200 + *D*-АК (кривые 3'–5'). Кривые ДОВ для всех исследуемых мольных соотношений $[-\text{NH}_2] : [\text{АК}] = 1 : 1$, $1 : 2$ и $1 : 3$ плавные, нормального типа, характеризуются правым вращением и различаются лишь значениями $+\alpha$ (рисунок 3.30 г, кривые 3–5, 3'–5'). Причем спектральные характеристики эквимольных растворов *L*- и *D*-аскорбата ХТЗ-200 в диапазоне $\lambda > 450$ нм практически идентичны (кривые 3 и 3', таблица 3.12).

Для сравнительного анализа вращательной силы оптически активных хромофоров в составе исследуемых диастереомерных комплексов использовали обработку кривых ДОВ растворов *L*-(*D*-)аскорбатов ХТЗ разной \bar{M}_n по одночленному уравнению Друде (2.25, таблица 3.12). Вращательную константу

(K , град·мл·нм²/дм·г) рассчитывали как $K = [\alpha]_{\lambda} \cdot (\lambda^2 - \lambda_0^2)$, где λ_0 – дисперсионная константа, определенная из максимума дихроичной полосы спектра эллиптичности (см. рисунок 3.30 а, б, таблица 3.12), $\lambda = 405$ нм – выбрана по принципу наибольшей близости к длине волны оптически активного электронного перехода в совокупности со статистически значимыми различиями значений $[\alpha]_{\lambda}$ (рисунок А2 Приложения А).

Водный раствор индивидуальной L -АК характеризуется бóльшим по модулю значением $|K|$ в сравнении с D -АК. Подобная закономерность ($|K|_{\text{ХТЗ-200} + L\text{-АК}} > |K|_{\text{ХТЗ-200} + D\text{-АК}}$) характерна и для водных растворов L -(D -)аскорбатов ХТЗ-200 при $[-\text{NH}_2] : [\text{АК}] > 1$. Эквимольные системы ХТЗ-200 + L -(D -)АК имеют близкие значения K , однако введение Cl^- (ХТЗ-200 + L -(D -)АК + HCl) не только значительно снижает вращательную силу, но и «обращает» соотношение констант $|K|_{\text{ХТЗ-200} + L\text{-АК} + \text{HCl}} < |K|_{\text{ХТЗ-200} + D\text{-АК} + \text{HCl}}$. Аналогичная закономерность проявляется и для систем на основе гидрохлорида ХТЗ-40 + L -(D -)АК, что согласуется с более выраженным «разрыхляющим» эффектом анионов Cl^- на надмолекулярное упорядочение макроцепей в случае L -аскорбатов ХТЗ (см. подглаву 3.2). Стоит отметить, что рассчитанные значения вращательной константы согласуются со степенью связывания аминокрупп ХТЗ с анионами L -(D -)АК в диастереомерных комплексах, определенной потенциометрическим титрованием (см. рисунок 3.21), а также со значениями эллиптичности $[\theta]$ эффекта Коттона при λ_0 (таблица 3.12). Таким образом, в ряду эквимольных водных растворов ХТЗ-40 + L -АК \rightarrow ХТЗ-40 + D -АК \rightarrow ХТЗ-200 + D -АК \rightarrow ХТЗ-200 + L -АК увеличивается количество оптически активных аминокорбатных хромофоров и, соответственно, их суммарная вращательная сила.

Согласно имеющимся литературным данным, для растворов хитозана в органических (CH_3COOH) и неорганических кислотах (HCl), ацетатном буфере (0.33 М CH_3COOH + 0.20 М CH_3COONa) реализуются плавные кривые ДОВ, лежащие в области отрицательных значений $[\alpha]$ [56, 57, 124, 125]. Положительные же значения $[\alpha]$ характерны для растворов хитоолигомеров с числом элементарных звеньев ≤ 4 и для мономеров D -глюкозамина хлоргидрата и N -ацетил- D -глюкозамина [56]. Дисперсионные кривые с положительным знаком $[\alpha]$ (как плавные, так и немонотонные), а также другие различия в хирооптических характеристиках L -(D -)аскорбатов ХТЗ еще раз подтверждают, что взаимодействие хитозана с L -АК в водном растворе пространственно отличается как от взаимодействия с D -АК, так и с другими органическими и неорганическими кислотами.

3.4 Реологические свойства растворов *L*-(*D*-)аскорбатов хитозана

3.4.1 Вискозиметрические свойства разбавленных растворов

Согласно современным представлениям, размер макромолекулярного клубка полимерной соли и гидродинамическое поведение макромолекул определяется в первую очередь ионной силой растворяющей среды, определяемой природой используемой кислоты-растворителя ХТЗ [7, 24, 26, 35–40, 43, 86–88, 93, 96–98, 108–110, 143, 155, 156]. В этой связи, на следующем этапе для оценки конформационных особенностей хиральных *L*-(*D*-)аскорбатов хитозана исследовали вискозиметрические параметры макромолекул ХТЗ-40 и ХТЗ-200 в водных растворах *L*- и *D*-АК в сравнении с традиционными системами, используемыми для растворения хитозана (рисунок 3.31) [229, 230].

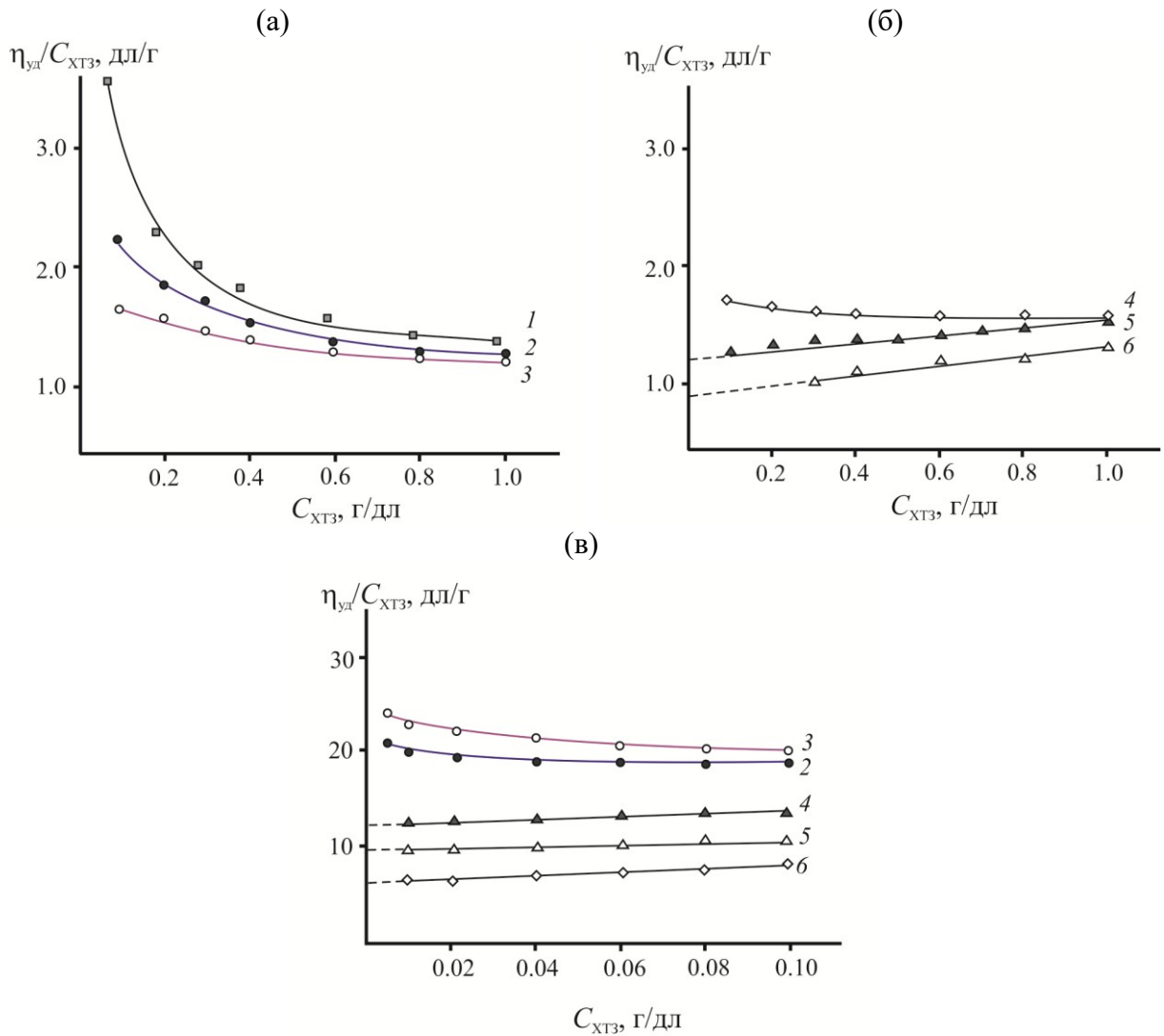


Рисунок 3.31. Концентрационная зависимость числа вязкости растворов ХТЗ-40 (а, б) и ХТЗ-200 (в) в воде (1), 0.03 М *D*- (2) и *L*-АК (3), 0.33 М CH_3COOH (4), 0.04 Н HCl (5) и 0.33 М CH_3COOH + 0.20 М CH_3COONa (6), 25°C.

Установлено, что в воде, *L*-(*D*-)АК и CH_3COOH макромолекулы ХТЗ-40 проявляют полиэлектролитные свойства: число вязкости растворов $\eta_{\text{уд}}/C_{\text{ХТЗ}}$ увеличивается при разбавлении (рисунок 3.31 а и б, кривые 1–4). Однако, для макромолекул ХТЗ-200 аналогичное поведение наблюдается только в *L*- и *D*-АК (рисунок 3.31 в). Данный эффект объясняется полиэлектролитным набуханием макрокатиона: при разбавлении уменьшается экранирование фиксированных зарядов и возрастает их взаимное отталкивание, что и приводит к увеличению $\eta_{\text{уд}}/C_{\text{ХТЗ}}$. В *Na*-ацетатном буфере и *HCl* полиэлектролитный эффект подавлен: зависимость $\eta_{\text{уд}}/C_{\text{ХТЗ}} = f(C_{\text{ХТЗ}})$ прямолинейна и аналогична зависимости для незаряженных полимеров (прямые 5 и 6). Значения k_{X} , определенные для растворов ХТЗ-40 и ХТЗ-200 в *Na*-ацетатном буфере и *HCl* (таблица 3.13), согласуются с известными в литературе для растворов других образцов ХТЗ с близкой к используемым в настоящей работе образцам \bar{M}_n в тех же растворителях [40, 87, 88, 92, 144, 145].

Таблица 3.13 – Влияние ионной силы растворяющей среды на значения предельного числа вязкости и константы Хаггинса водных растворов ХТЗ

Растворяющая среда	<i>I</i> , мМ	ХТЗ-40		ХТЗ-200	
		$[\eta]$, дл/г	k_{X}	$[\eta]$, дл/г	k_{X}
H_2O	–	4.68 ^б	–	–	–
0.03 М <i>L</i> -АК	1.6	2.04 ^б	–	25.5 ^б	–
0.03 М <i>D</i> -АК	1.6	2.80 ^б	–	21.6 ^б	–
0.33 М CH_3COOH	2.4	1.82 ^б	–	12.8 ^а	0.09
0.04 Н <i>HCl</i>	35.2	1.22 ^а	0.22	10.0 ^а	0.05
0.33 М CH_3COOH + 0.20 М CH_3COONa	200.0	0.92 ^а	0.47	6.3 ^а	0.12

^а – $[\eta]$ и k_{X} определены по уравнению (2.27), коэффициент корреляции линейной регрессии 0.85–0.99

^б – $[\eta]$ определено по уравнению (2.28), коэффициент корреляции линейной регрессии 0.82–0.98

Полученные результаты указывают на различное конформационное поведение макромолекул ХТЗ в используемых растворяющих средах, что также подтверждается найденными значениями предельного числа вязкости $[\eta]$ исследуемых растворов (таблица 3.13). Как и следовало ожидать, реализуемые значения предельного числа вязкости зависят от ионной силы растворяющей среды. При малом значении *I*, вследствие электростатического отталкивания одноименно заряженных звеньев, реализуется разбухшие макромолекулярные клубки сравнительно большого размера. При повышении *I* происходит компактизация макроклубков, обусловленная экранированием протонированных аминогрупп полимера

низкомолекулярными анионами. Такое поведение согласуется с классическими представлениями об электростатической природе разбухания макромолекул ионогенного полимера [40].

Обращает внимание тот факт, что, несмотря на близкое значение ионной силы I изоформ АК, характеризующихся и близкими значениями pK_a ($pK_{aL-АК} = 4.26$, $pK_{aD-АК} = 4.18$, см. таблицу 1.3), значения $[\eta]$ растворов ХТЗ-40 в D -АК существенно больше, чем в L -АК, а в случае растворов ХТЗ-200 – наоборот (таблица 3.13). Это позволяет предположить, что на размеры и, соответственно, гидродинамическое поведение макромолекул хитозана в водном растворе L - и D -АК существенное влияние оказывает и геометрия противоиона. Для выяснения данного предположения на следующем этапе оценивали влияние ионной силы данной растворяющей смеси, задаваемой варьированием концентрации L - и D -АК, на гидродинамические параметры макромолекул ХТЗ (рисунок 3.32).

3.4.2 Влияние ионной силы на гидродинамические параметры макро клубков

Зависимости $\eta_{уд}/C_{ХТЗ} = f(C_{ХТЗ})$ растворов ХТЗ-40 в L - и D -АК при концентрации АК 0.03–0.51 М имеют как общие закономерности, так и отличительные особенности (рисунок 3.32 а и б). Так, в растворах ХТЗ-40 в АК при концентрации L - и D -АК ≤ 0.11 М проявляется полиэлектролитный эффект (кривые 1, 3). При концентрации L - и D -АК = 0.34 М наблюдается поведение, характерное для макроионов с частичной компенсацией заряда (кривая 4), когда создаваемое низкомолекулярными противоионами значение ионной силы растворяющей смеси недостаточно для полной нейтрализации совокупного заряда макромолекулы [26, 40]. Такое поведение сохраняется и для раствора ХТЗ-40 в 0.51 М L -АК (а, кривая 5), а в растворе ХТЗ-40 в D -АК той же концентрации заряд макрокатиона скомпенсирован (б, прямая 4). Таким образом, в водно-кислотных растворах гидрохлорида ХТЗ-40 + D -АК реализуются более высокие значения $\eta_{уд}/C_{ХТЗ}$, чем в L -АК. Причем данное различие выражено в бóльшей степени при $C_{ХТЗ} < 0.4$ –0.5 г/дл.

Как известно, в растворах хитозана в слабых органических кислотах (к классу которых относится и АК) в зависимости от концентрации кислоты и, соответственно, ионной силы среды могут присутствовать поликатионы ($\sim NH_3^+$) и свободные анионы кислотных остатков (An^-), либо ионные пары $[\sim NH_3^+ \cdot An^-]$ или смеси ($\sim NH_3^+ + An^-$) и $[\sim NH_3^+ \cdot An^-]$ [40, 90]. Нелинейность

зависимости $\eta_{уд}/C_{ХТЗ} = f(C_{ХТЗ})$ растворов ХТЗ-40 в L -(D -)АК обусловлена нескомпенсированностью поликатиона анионным противоионным остатком, приводящей к разбуханию макромолекулярного клубка за счет отталкивания положительно заряженных звеньев макроцепи (рисунок 3.32 а и б, кривые). В растворе ХТЗ-40 в 0.51 М D -АК наблюдается, по-видимому, нейтрализация заряда поликатиона вследствие формирования ионных пар $[\sim\text{NH}_3^+ \cdot \text{An}^-]$ и зависимость $\eta_{уд}/C_{ХТЗ} = f(C_{ХТЗ})$ линейна (рисунок 3.32 б, прямая 4).

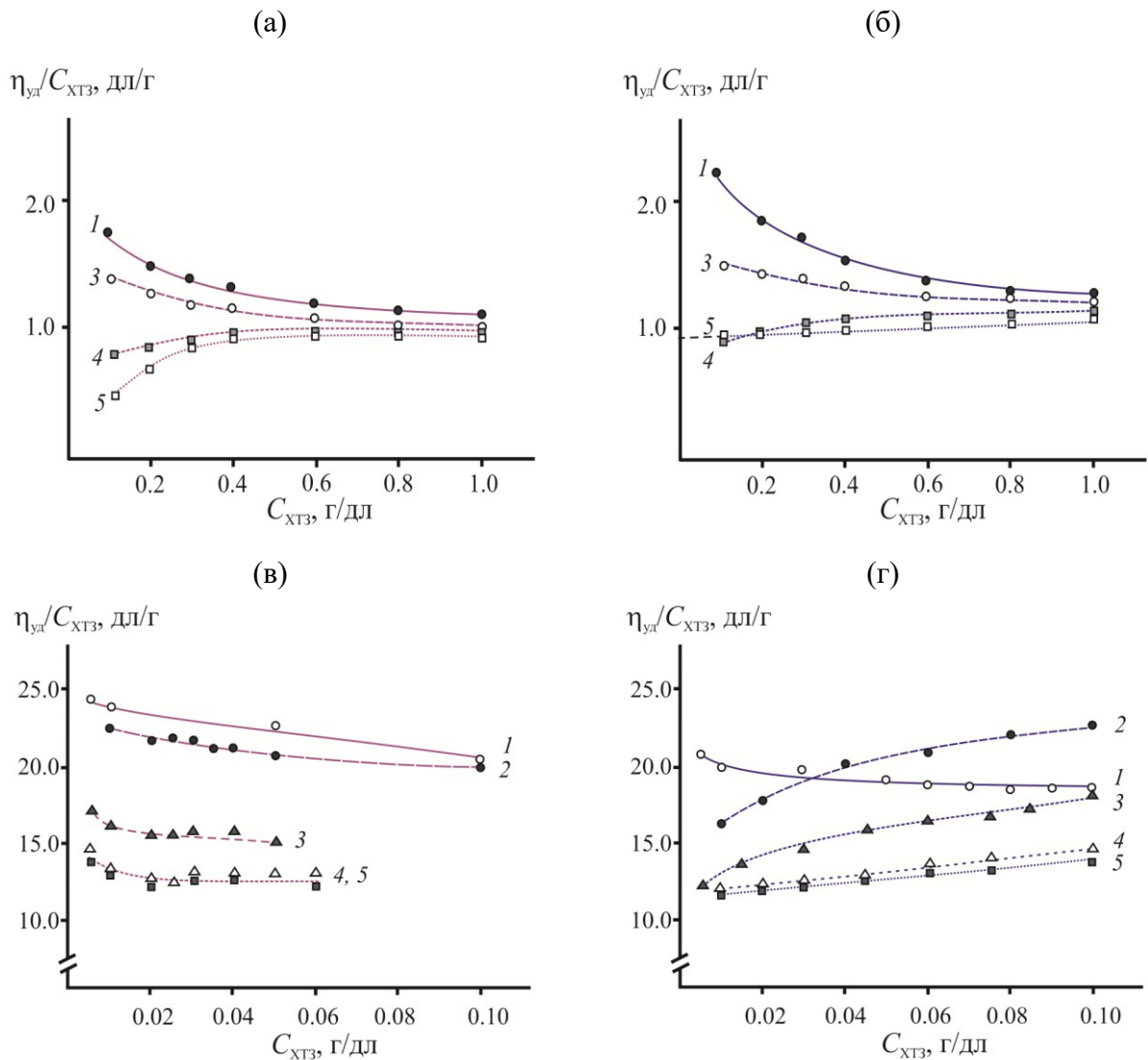


Рисунок 3.32. Концентрационная зависимость числа вязкости водно-кислотных растворов ХТЗ-40 (а, б) и ХТЗ-200 (в, г) в L - (а, в) и D -АК (б, г) при $C_{АК} = 0.03$ (1), 0.06 (2), 0.11 (3), 0.34 (4) и 0.51 М (5); 25°C.

Гидродинамическое поведение растворов ХТЗ-200 в L - и D -АК концентрации $C_{АК} = 0.03$ –0.51 М еще более различаются, чем ХТЗ-40 (рисунок 3.32 в и г). Так, во всем исследуемом диапазоне концентраций L -АК проявляется ярко выраженный эффект полиэлектролитного набухания макромолекул (рисунок 3.32 в). В случае растворов ХТЗ-200 в D -АК данный

эффект проявляется только при концентрации кислоты 0.03 М (г, кривая 1). При $C_{D-АК} = 0.06\text{--}0.11$ М наблюдается поведение, характерное для макроионов с частичной компенсацией заряда (кривые 2, 3), а при $C_{D-АК} = 0.34\text{--}0.51$ М – полной (прямые 4, 5). Обращает внимание, что при прочих равных условиях значения $\eta_{уд}/C_{ХТЗ}$ водно-кислотных растворов ХТЗ-200 в *L*-АК практически во всех случаях выше, чем в *D*-АК. В наибольшей степени эти различия проявляются в растворах ХТЗ-200 малой концентрации, $C_{ХТЗ} < 0.04\text{--}0.05$ г/дл.

Предельное число вязкости водных растворов хитозана в *L*- и *D*-АК, которое удалось определить (с использованием уравнения Хаггинса или Фуосса), закономерно уменьшается с увеличением концентрации кислоты и, соответственно, ионной силы среды (таблица 3.14). Значения $[\eta]$, как и значения $\eta_{уд}/C_{ХТЗ}$, растворов ХТЗ-40 в *D*-АК выше, чем в *L*-АК. При использовании 0.51 М *D*-АК найденное значение $[\eta]$ близко к значению $[\eta]$ в Na-ацетатном буфере (включающем соль CH_3COONa), т.е. полученного из зависимости $\eta_{уд}/C_{ХТЗ} = f(C_{ХТЗ})$ при изоионном разбавлении (таблица 3.13).

Таблица 3.14 – Влияние концентрации и ионной силы водных растворов АК на значения предельного числа вязкости и константы Хаггинса растворов ХТЗ в *L*- и *D*-АК

Концентрация АК, М	<i>I</i> , мм	ХТЗ-40		ХТЗ-200	
		<i>L</i> -АК	<i>D</i> -АК	<i>L</i> -АК	<i>D</i> -АК
0.03	1.6	2.04 ^б	2.80 ^б	25.5 ^б	21.6 ^б
0.06	2.1	–	–	24.0 ^б	16.5 ^а , $k_X=0.25$
0.11	3.0	1.61 ^б	1.92 ^б	18.5 ^б	13.0 ^а , $k_X=0.37$
0.34	5.2	–	–	14.4 ^б	11.6 ^а , $k_X=0.22$
0.51	6.4	–	0.95 ^а , $k_X=0.2$	13.3 ^б	11.5 ^а , $k_X=0.63$

^а – $[\eta]$ и k_X определены по уравнению (2.27), коэффициент корреляции линейной регрессии 0.87–0.96

^б – $[\eta]$ определено по уравнению (2.28), коэффициент корреляции линейной регрессии 0.81–0.94

Таким образом, обнаруженные отличия в гидродинамическом поведении макромолекул ХТЗ в присутствии *L*- и *D*-АК разной концентрации указывают на различия не только в размере макро клубков, но и в их совокупном объемном заряде, поскольку для нейтрализации макрокатиона необходима разная концентрация *L*- и *D*-АК.

Одним из способов изменения заряда макро клубка ионогенного полимера является введение в раствор сильного электролита. Для оценки влияния индифферентного электролита на вискозиметрические параметры

макромолекул ХТЗ-40 в водном растворе АК использовали NaCl в широком диапазоне концентраций $C_{\text{NaCl}} = 0.02\text{--}1.0$ М. Выбор для проведения данного исследования концентрации полимера $C_{\text{ХТЗ}} = 1.0$ г/дл обусловлен минимальными различиями в значениях $\eta_{\text{уд}}/C_{\text{ХТЗ}}$ растворов ХТЗ-40 в *L*- и *D*-АК, а концентрации кислоты 0.03 М – максимальным гидродинамическим объемом макрокатиона, реализуемым в принятых условиях эксперимента. Для сравнения использовали водно-солевые растворы полимера. В случае растворов ХТЗ-200 выбор для проведения данного исследования $C_{\text{ХТЗ}} = 0.01$ г/дл и $C_{\text{АК}} = 0.03$ М обусловлен максимально реализуемыми в принятых условиях эксперимента различиями в значениях $\eta_{\text{уд}}/C_{\text{ХТЗ}}$ растворов ХТЗ-200 в *L*-(*D*-)АК и гидродинамического объема макромолекулы при наименьшем значении *I* (таблица 3.14).

Зависимости числа вязкости растворов ХТЗ-40 в воде, *L*- и *D*-АК от концентрации соли имеют аналогичный характер, однако значение $\eta_{\text{уд}}/C_{\text{ХТЗ}}$ водных растворов ХТЗ-40 значимо больше, чем водно-кислотных в *L*- и *D*-АК (рисунок 3.33 а). При увеличении концентрации NaCl наблюдается резкое снижение числа вязкости с последующим выходом на постоянное значение, что указывает на уменьшение объема макроклубка в результате электростатического экранирования заряда макрокатиона.

Наиболее интенсивное подавление специфических полиэлектролитных эффектов в водном растворе ХТЗ-40 наблюдается до концентрации NaCl ~ 0.2 М (рисунок 3.33 а, кривая 1), а в водно-кислотных растворах – до $C_{\text{NaCl}} \sim 0.3\text{--}0.4$ М (кривые 2, 3). Экстраполяция $\eta_{\text{уд}}/C_{\text{ХТЗ}}$ растворов ХТЗ-40 в воде, *L*- и *D*-АК на бесконечно большую ионную силу дает значения ~ 1.0 , ~ 0.7 и ~ 0.5 дл/г, соответственно (рисунок 3.33 в). Таким образом, в условиях максимально возможной нейтрализации макрокатионов размеры клубков хитозана уменьшаются в ряду: $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{D-АК} \rightarrow \text{L-АК}$. Стало быть, индивидуальный клубок ХТЗ-40 имеет более компактную конформацию в среде *L*-(*D*-)АК. Примечательно, что данный эффект реализуется как в кислотно-солевой среде, так и без NaCl (см. таблицу 3.13). Исходя из полученных результатов для проведения последующего этапа исследования для компенсации заряда поликатиона введением сильного полиэлектролита в качестве оптимальной выбрана $C_{\text{NaCl}} = 0.5$ М (подглава 3.4.3).

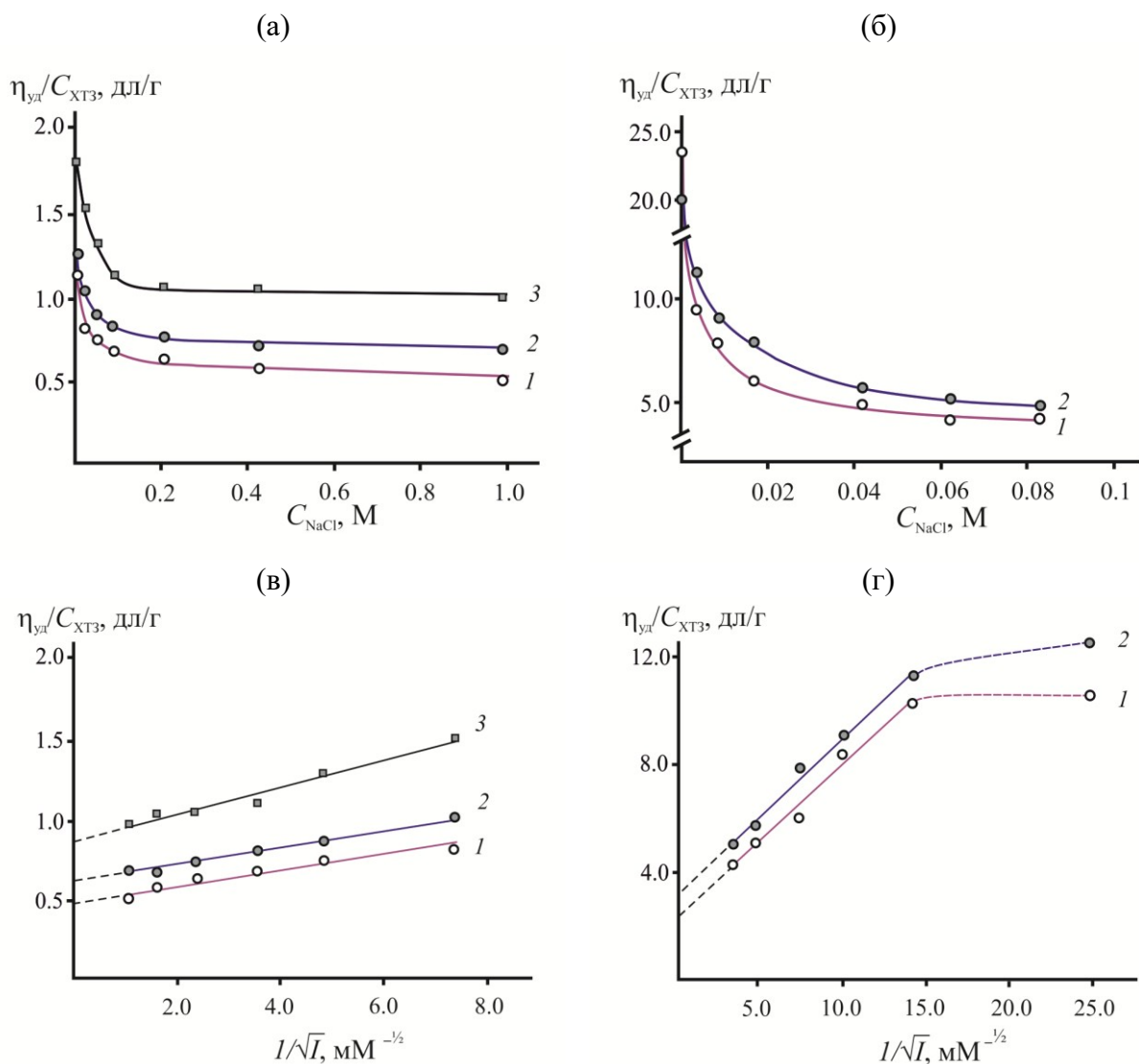


Рисунок 3.33. Зависимость числа вязкости раствора ХТЗ-40 (а, в) и ХТЗ-200 (б, г) в L - (1), D -АК (2) и в воде (3) от концентрации NaCl (а, б) и $1/\sqrt{I}$ (в, г); $C_{\text{ХТЗ-40}} = 1.0$ г/дл, $C_{\text{АК}} = 0.03$ М; $C_{\text{ХТЗ-200}} = 0.01$ г/дл, $C_{\text{АК}} = 0.03$ М; 25°C .

Характер концентрационной зависимости числа вязкости для ХТЗ-200 при варьировании C_{NaCl} подобен зависимости для ХТЗ-40 (рисунок 3.33 б). В обоих случаях повышение ионной силы среды приводит к поджатию макромолекулярных клубков. Как и следовало ожидать, в отличие от повышения ионной силы варьированием $C_{\text{АК}}$ (см. таблица 3.14), увеличение I введением NaCl понижает $\eta_{\text{уд}}/C_{\text{ХТЗ}}$ в большей степени. В диапазоне $C_{\text{NaCl}} \approx 0.04 - 0.08$ М значения числа вязкости растворов ХТЗ-200 в L -(D -)АК сопоставимы с таковыми в Na -ацетатном буфере (рисунок 3.31 в, прямая 5), а также с таковыми для полужесткоцепных неионногенных полисахаридов, например, эфиров целлюлозы [231]. Стало быть, при высокой концентрации соли происходит экранирование заряда поликатиона и гидродинамическое поведение макромолекул ХТЗ аналогично незаряженным полимерным цепям.

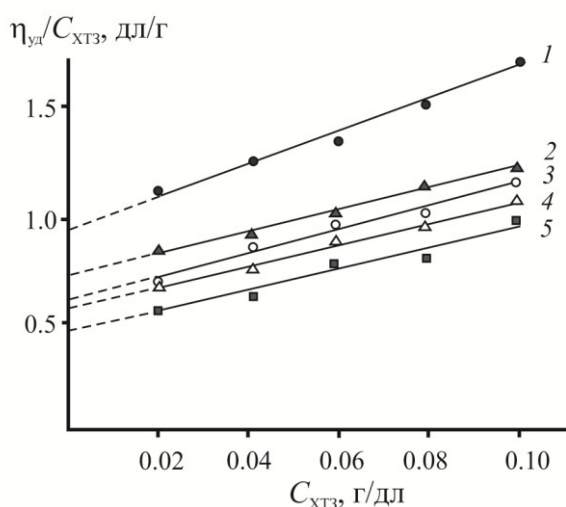
При $C_{\text{NaCl}} > \sim 0.09$ М происходит высаливание и фазовое разделение полимерной системы. Кроме того, как и в случае $[\eta] = f(C_{\text{AK}})$ зависимость $\eta_{\text{уд}}/C_{\text{ХТЗ}} = f(C_{\text{NaCl}})$ показывает влияние изомерной формы *L*- и *D*-АК на показатели вязкости. Однако, в отличие от водно-кислотных растворов (рисунок 3.32 в, г), в случае водно-кислотно-солевых – значения $\eta_{\text{уд}}/C_{\text{П}}$ выше для ХТЗ-200 в *D*-АК (рисунок 3.33 б). Экстраполяция $\eta_{\text{уд}}/C_{\text{ХТЗ}}$ растворов ХТЗ-200 в *L*- и *D*-АК при $I \rightarrow \infty$ дает значения ~ 3.0 и ~ 2.3 дл/г, соответственно (рисунок 3.33 г). Данный факт свидетельствует о меньшей «сжимаемости» клубков ХТЗ + *D*-АК данной \bar{M}_{η} и, соответственно, меньшей гидрофильности в сравнении с ХТЗ + *L*-АК и подтверждает данные сорбционного анализа (см. подглаву 3.2).

Таким образом, исследование водных растворов хитозана в *L*-(*D*-)АК разной концентрации без и с добавкой NaCl (соли-электролита нейтрального типа) показало существенные различия в гидродинамическом поведении макромолекул. В зависимости от ионной силы растворяющей смеси растворы ХТЗ проявляют полиэлектролитные свойства с реализацией максимально разбухшего поликатиона, либо с частично компенсированным зарядом, а также показывают характерную для макромолекул ионогенного полимера с практически полностью экранированным зарядом прямолинейную концентрационную зависимость числа вязкости. Установлено влияние изоформы противоиона на значения предельного числа вязкости водно-кислотных растворов хитозана. Значения предельного числа вязкости растворов гидрохлорида ХТЗ-40 в *D*-АК существенно больше, чем в *L*-АК, для растворов же ХТЗ-200 – выше в *L*-АК, что указывает на различия в совокупном объемном заряде молекул полимера. В водно-кислотно-солевых растворах происходит компактизация макромолекулярных клубков и в условиях нейтрализации заряда полииона число вязкости растворов обоих образцов ХТЗ-40(-200) выше в среде *D*-АК. Обнаруженные конформационные особенности макромолекул хитозана в присутствии диастереомеров аскорбиновой кислоты вполне логично объясняются пространственной конфигурацией противоионов и согласуются с результатами ИК-спектроскопии и СЭМ порошкообразных солей аскорбата хитозана (см. подглаву 3.1), а также данными КД и ДОВ (см. подглаву 3.3). Одним из подходов более детального выяснения конформационных изменений макроклубков является оценка гидродинамических и термодинамических параметров полимерной системы в широком диапазоне температуры.

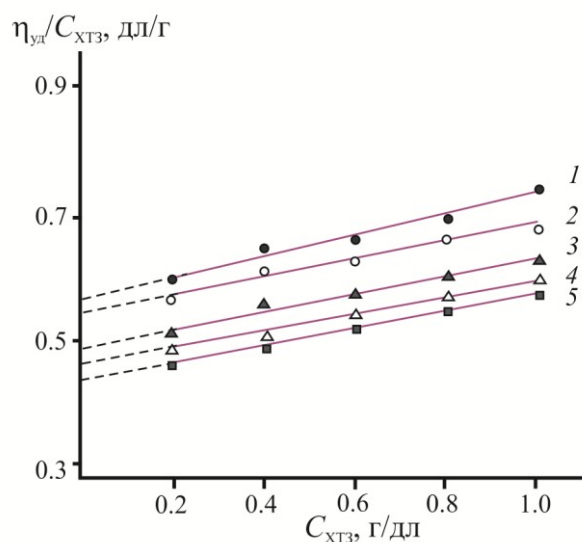
3.4.3 Температурная зависимость предельного числа вязкости

Оценку температурной зависимости предельного числа вязкости растворов ХТЗ-40 в водно-солевой и водно-кисотно-солевой среде L -(D -)АК концентрации 0.03 М проводили при изоионном разбавлении и постоянной ионной силе, задаваемой введением 0.50 М NaCl. Все зависимости $\eta_{уд}/C_{ХТЗ} = f(C_{ХТЗ})$ в исследованном диапазоне температур имеют прямолинейный характер (рисунок 3.34), что характеризует постоянство гидродинамического объема макромолекул в процессе разбавления.

(a)



(б)



(в)

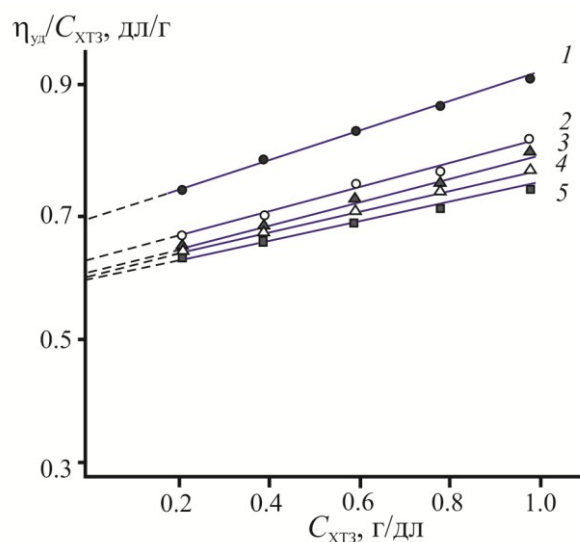


Рисунок 3.34. Концентрационная зависимость числа вязкости растворов ХТЗ-40 в водно-солевой (а) и водно-кисотно-солевой среде 0.03 М L - (б) и 0.03 М D -АК (в) при 25 (1), 30 (2), 35 (3), 40 (4) и 45°C (5), $C_{NaCl} = 0.50$ М.

С увеличением температуры предельное число вязкости растворов закономерно уменьшается (рисунок 3.34, таблица 3.15), что типично для

хитозана и других полужесткоцепных природных полисахаридов и их производных [138, 145]. Причем, для водных растворов ХТЗ-40 с добавкой 0.5 М NaCl снижение предельного числа вязкости выражено в большей степени, чем для растворов ХТЗ-40 в *L*- и *D*-АК с той же концентрацией соли. Кроме того, для водных растворов ХТЗ-40 реализуются более высокие значения $[\eta]$ по сравнению с водно-кислотными растворами ХТЗ-40, по крайней мере в диапазоне 25–40°C (таблица 3.15). Такое поведение, вероятно, объясняется существованием специфического гидродинамического взаимодействия макромолекул полимера с компонентами водно-кислотной растворяющей смеси, обусловленного сольватацией и бóльшим экранированием макроионов низкомолекулярными противоионами в растворах кислоты.

Таблица 3.15 – Влияние температуры на гидродинамические параметры* растворов ХТЗ-40 в водно-солевой и водно-кисотно-солевой растворяющих смесях

<i>T</i> , °C	H ₂ O + 0.50 М NaCl			H ₂ O + 0.03 М АК + 0.50 М NaCl					
				<i>L</i> -АК			<i>D</i> -АК		
	$[\eta]$, дл/г	k_X	$\delta_T \cdot 10^2$, К ⁻¹	$[\eta]$, дл/г	k_X	$\delta_T \cdot 10^2$, К ⁻¹	$[\eta]$, дл/г	k_X	$\delta_T \cdot 10^2$, К ⁻¹
25	0.94	0.86		0.56	0.52		0.69	0.48	
30	0.74	1.03		0.53	0.55		0.64	0.50	
35	0.63	1.31	-3.4±0.2	0.48	0.64	-1.5±0.1	0.61	0.52	-0.8±0.1
40	0.57	1.34		0.45	0.69		0.59	0.55	
45	0.44	2.80		0.43	0.74		0.58	0.57	

* – $[\eta]$ и k_X определены по уравнению (2.27), коэффициент корреляции линейной регрессии 0.95–0.99

Для всех исследуемых растворов с увеличением температуры наряду с понижением значений $[\eta]$ зафиксировано и повышение константы Хаггинса, являющейся мерой взаимодействия полимера с компонентами растворяющей смеси (таблица 3.15). Определенные значения температурного коэффициента предельного числа вязкости $\delta_T = d \ln[\eta] / dT$ для всех систем отрицательны и большие по модулю (таблица 3.15), что обусловлено уменьшением размеров макромолекулярных клубков при повышении температуры и, в целом подтверждает имеющиеся литературные данные о повышенной жёсткости макроцепи аминополисахарида хитозана [138, 145]. Таким образом, зависимости $\ln[\eta] = f(T)$ и $k_X = f(T)$ свидетельствует об ухудшении термодинамического качества растворяющей смеси при повышении температуры. В наибольшей степени это выражено для водно-солевых растворов гидрохлорида ХТЗ-40. Итак, характер изменения гидродинамических параметров растворов ХТЗ-40 в водно-солевой и водно-кисотно-солевой среде

L- и *D*-АК с повышением температуры позволяет констатировать, что, независимо от природы растворяющей смеси, макромолекулярные размеры полимера в исследуемом диапазоне температур определяются в наибольшей степени скелетной жёсткостью макроцепи (близкодействие).

Установленные закономерности проявляются в наименьшей степени для солевого комплекса ХТЗ-40 + *D*-АК. Стало быть, гомохиральные соли характеризуются бóльшим количеством меж- и внутримолекулярных контактов, стабилизирующих макромолекулярную конформацию данного полимерного вещества, как в растворе, так и в твердофазном состоянии. Уместно напомнить, что выделенная твердая фаза *D*-аскорбатов ХТЗ имеет более высокую степень кристалличности (рентгеновская дифрактометрия) и меньшую гидрофильность (паросорбционный анализ) в сравнении с *L*-аскорбатами (см. подглавы 3.1 и 3.2).

Необходимо также обсудить обнаруженные отличия в температурной зависимости предельного числа вязкости растворов ХТЗ-40 в *L*- и *D*-АК (рисунок 3.34 б, в; таблица 3.15). Обращает на себя внимание тот факт, что для растворов ХТЗ-40 + *D*-АК реализуются более высокие значения $[\eta]$ и меньшие значения k_x , δ_T по сравнению с растворами ХТЗ-40 + *L*-АК. Такое гидродинамическое поведение уже не может быть обусловлено только различиями в жесткости макроцепей ХТЗ-40 в водном растворе *L*- и *D*-АК. Сравнение температурных зависимостей $[\eta]$ и k_x , а также рассчитанных значения δ_T свидетельствует и о решающей роли объемных эффектов (дальнодействия) в формировании конформационных свойств макроцепей ХТЗ-40 в *L*- и *D*-АК. При этом, взаимодействие полимера с *D*-АК в водной среде энергетически более выгодно, чем с *L*-АК (см. подглаву 3.1, таблица 3.6).

Температурная зависимость предельного числа вязкости подтвердила повышенную скелетную жёсткость макромолекул хитозана. Однако, температурные зависимости $\eta_{уд}/C_{ХТЗ}$, $[\eta]$, константы Хаггинса и значения температурного коэффициента предельного числа вязкости растворов ХТЗ-40 в *L*-(*D*-)АК свидетельствуют о существенном влиянии на конформационное состояние макроцепей и изомерной формы противоиона. Обнаруженные различия в вискозиметрических параметрах и, соответственно, в конформационных особенностях, наряду с результатами оценки хиральности (см. подглаву 3.3), могут явиться основой понимания высокой биологической активности соли гидрохлорида хитозана и *D*-АК (см. подглаву 3.6).

3.4.4 Ротационная вискозиметрия умеренно-концентрированных растворов

Следует отметить, что в практическом плане при получении хитозансодержащих материалов наиболее перспективно использование растворов полимеров с более высокой концентрацией. В этой связи исследовали умеренно-концентрированные системы на примере образцов ХТЗ-40 + *L*-(*D*-)АК [141]. Растворы хранили при 20 ± 2 и $4.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ в течение 24–330 сут. Отдельное внимание уделено влиянию на вязкостные свойства изоформы АК.

Реограммы вязкости $\lg \eta = f(\lg \tau)$ свежеприготовленных растворов *L*- и *D*-аскорбатов ХТЗ ($C_{\text{ХТЗ}} = 15.0$ г/дл, $C_{\text{АК}} = 0.51 \text{ М} = 9.0$ г/дл) представляют собой типичные для полимеров неполные кривые течения с областями наименьшей ньютоновской и структурной вязкости (рисунок 3.35, кривые 1).

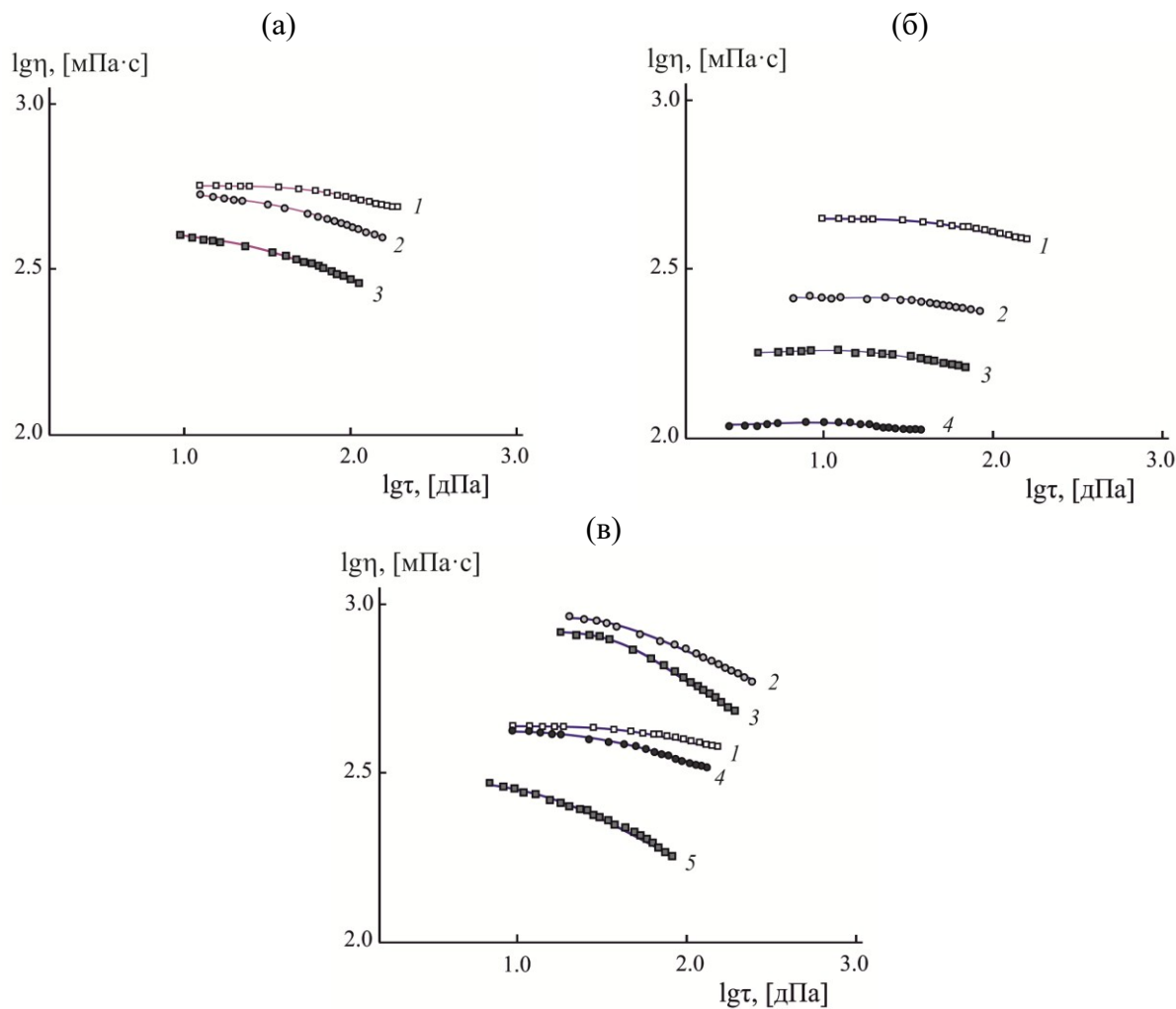


Рисунок 3.35. Кривые течения 15.0 г/дл растворов ХТЗ-40 в 9.0 г/дл *L*- (а) и *D*-АК (б, в), хранившихся в течение 0 (1), 10 ± 2 (2), 25 ± 2 (3), 40 ± 3 (4) и 320 ± 10 сут (5) при 20 ± 2 (а, б) и $4.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (в), $[-\text{NH}_2]/[\text{АК}] = 1.7$ осново-моль/моль.

При хранении растворов при 20°C наблюдается некоторое изменение кривых течения и понижение вязкости (рисунок 3.35 а, б, кривые 2–4). В наибольшей степени трансформация вязкого течения характерна для ХТЗ-40 + L-АК, а эффект снижения вязкости – для ХТЗ-40 + D-АК. Исходная система ХТЗ-40 + L-АК характеризуется более высокими значениями вязкости, чем система ХТЗ-40 + D-АК (рисунок 3.35 а, б). Однако снижение температуры хранения до 4°C способствует сначала (~25 сут) значительному структурированию раствора ХТЗ-40 + D-АК и повышению его вязкости (рисунок 3.35 в, кривые 2, 3), а затем (~40–330 сут) – существенному понижению значений η (кривые 4, 5).

Эффект падения вязкости исследуемых систем во времени представлен на рисунке 3.36 а. Для выяснения причин понижения вязкости методом ВЭЖХ проведено количественное определение АК в свежеприготовленных и хранившихся водных растворах индивидуальной кислоты и аскорбата хитозана на примере образца ХТЗ-40. Содержание кислоты оценивали с применением внешнего стандарта – свежеприготовленного 9.0 г/дл водного раствора АК, стабилизированного добавлением 5.0 г/дл ЭДТА. Оказалось, что хроматографический пик водного раствора индивидуальной D-АК крайне нестабилен. Уже через 20 мин после приготовления в растворе D-АК ($C_{\text{АК}} = 9.0$ г/дл) хроматографически определяется всего лишь ~6.0 г/дл, а через 6 месяцев хранения в отсутствие естественного света – ~4.0 г/дл и менее (рисунок 3.36 б, кривая 1), что объяснимо протеканием окислительных и гидролитических процессов в водных растворах АК.

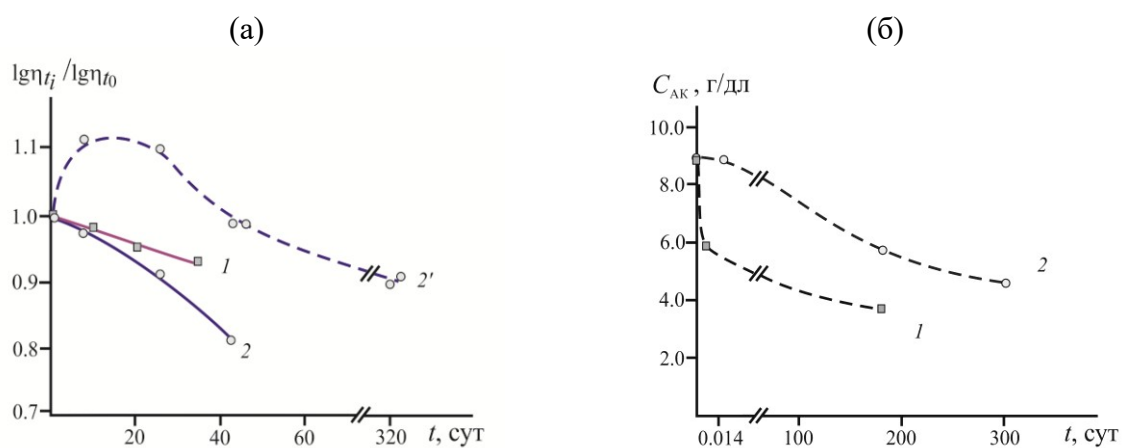


Рисунок 3.36. Изменение во времени: (а) – вязкости 15.0 г/дл раствора ХТЗ-40 в 9.0 г/дл L- (1) и D-АК (2, 2'), хранившегося при 20±2 (1, 2) и 4.0±0.5°C (2'), $\lg \tau = 1.25\text{--}1.45$ [дПа]; (б) – изменение концентрации D-АК в 9.0 г/дл водном растворе (1) и 15.0 г/дл растворе ХТЗ-40 в 9.0 г/дл D-АК (2), хранившихся при 4.0±0.5°C в отсутствие естественного освещения, определено методом ВЭЖХ, $[-\text{NH}_2]/[\text{АК}] = 1.7$ осново-моль/моль.

В отличие от раствора индивидуальной кислоты, в водном растворе *D*-аскорбата ХТЗ-40 ($C_{\text{ХТЗ}} = 15.0$ г/дл, $C_{\text{АК}} = 9.0$ г/дл) протекание окислительных процессов *D*-АК крайне затруднительно. Так, через 2 ч после приготовления раствора вся *D*-АК ($C_{\text{АК}} = 9.0$ г/дл), взятая для его приготовления, определяется полностью (рисунок 3.36 б, кривая 2). Снижение количества определяемой *D*-АК до ~ 5.0 г/дл наблюдается лишь через 10 месяцев хранения. В случае *L*-аскорбата ХТЗ-40 характер изменения концентрации компонентов при хранении растворов, реализуемый для *D*-аскорбата ХТЗ-40, принципиально не отличается.

Качественное определение методом ГС-МХ веществ, образующихся при хранении системы ХТЗ-40 + *D*-АК, показало присутствие органических веществ фуранового ряда, аналогичных таковым в растворе *D*-АК, и идентифицированные как продукты распада ее молекул [232]. По всей видимости, стабилизирующее влияние ХТЗ на АК в растворах обусловлено, как физическими, так и химическими факторами. Физические факторы связаны со способностью ХТЗ к образованию вязких растворов, затрудняющих диффузию компонентов, в частности, катализирующее разложение АК кислородом [233]. Химические факторы стабилизирующего эффекта ХТЗ обусловлены правым сдвигом рН в оптимальную область вследствие образования устойчивой формы однозарядного аниона АК и его комплекса с аминополисахаридом посредством донорно-акцепторного взаимодействия.

Таким образом, изомерная форма противоиона солевой формы ХТЗ оказывает существенное влияние на реологические характеристики как разбавленных, так и умеренно-концентрированных растворов. В этой связи интересно провести сравнительный анализ влияния ионной силы на вязкостные параметры растворов аскорбата хитозана в широком диапазоне концентрации высокомолекулярного компонента.

3.4.5 Влияние ионной силы на реологические параметры умеренно-концентрированных растворов

Оценку влияния концентрационного режима на вязкость исследуемых систем проводили на примере 0.5–15.0 г/дл растворов ХТЗ-40 в 9.0 г/дл *D*-АК. Ионную силу среды (0.2–0.7 М) создавали введением сильного электролита NaCl. Для построения зависимости $\lg \eta_{\text{max}} = f(\lg C_{\text{ХТЗ}})$ использовали значения

наибольшей ньютоновской вязкости η_{\max} растворов аскорбата хитозана, полученные экстраполяцией соответствующих реограмм вязкости $\lg \eta = f(\lg \tau)$ на нулевое значение $\lg \tau$ (см. рисунок 3.35 б) в соответствии с модифицированной моделью Виноградова–Покровского [149].

Полученная концентрационная зависимость $\lg \eta_{\max} = f(\lg C_{\text{ХТЗ}})$ исходных растворов *D*-аскорбата ХТЗ-40 является типичной для полиэлектролитов, аппроксимируется двумя прямолинейными участками, соответствующими разным концентрационным режимам и механизмам массопереноса (области I и III), а также имеет переходную область (область II) (рисунок 3.37, кривая 1).

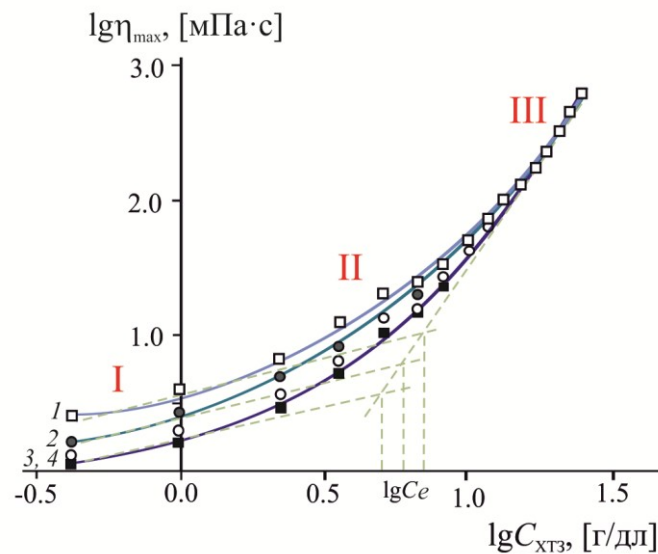


Рисунок 3.37. Концентрационная зависимость наибольшей ньютоновской вязкости систем ХТЗ-40 + *D*-АК при ионной силе среды 0.1 (1), 0.3 (2), 0.5 (3) и 0.7 М (4), создаваемой введением NaCl, $C_{\text{ХТЗ}} = 0.5\text{--}15.0$ г/дл, $C_{\text{АК}} = 9.0$ г/дл, $[-\text{NH}_2]/[\text{АК}] = 0.06\text{--}1.7$ осново-моль/моль, $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

В области малых концентраций ХТЗ (область I) изменение вязкости практически пропорционально увеличению концентрации полимера в системе $\lg \eta_{\max} \sim C_{\text{ХТЗ}}$ и массоперенос реализуется посредством поступательного движения независимых друг от друга макро клубков, а структурообразование характеризуется ориентационным порядком на уровне сегментов макромолекулы. В области относительно высоких концентраций полимера (область III) вследствие увеличения плотности межмолекулярных контактов возможность самостоятельного движения макромолекул исчезает, а течение раствора полимера осуществляется по рептационному механизму и изменение вязкости описывается степенной функцией $\lg \eta_{\max} \sim C_{\text{ХТЗ}}^n$ [151].

Переход от одного механизма течения к другому происходит при критической концентрации образования флуктуационной сетки зацеплений (C_e , г/дл), определяемой в области II по точке пересечения двух прямых $\lg \eta_{\max} \sim C_{\text{ХТЗ}}$ и $\lg \eta_{\max} \sim C_{\text{ХТЗ}}^n$, которая оказалась равной $C_e = 7.1 \pm 0.1$ г/дл.

Повышение ионной силы среды не изменяет характер концентрационной зависимости $\lg \eta_{\max} = f(\lg C_{\text{ХТЗ}})$, однако снижает значения вязкости в областях I и II (рисунок 7, кривые 2–4). В наибольшей степени этот эффект наблюдается в диапазоне низких концентраций ХТЗ (область I), когда расстояние между клубками существенно превышает их гидродинамический объем. При высоких концентрациях ХТЗ (область III) вязкость не зависит от ионной силы среды, вероятно, в силу плотной укладки макроцепей. С повышением I понижается и концентрация формирования физической сетки зацеплений флуктуационного характера: $C_e = 7.1 \pm 0.1$ г/дл ($I = 0.1$ М), $C_e = 6.0 \pm 0.1$ г/дл ($I = 0.3$ М), $C_e = 4.9 \pm 0.1$ г/дл ($I = 0.5–0.7$ М), что, возможно, связано с возрастанием эффективности узлов сетки зацепления в присутствии низкомолекулярного электролита [150].

Отметим, что наличие на концентрационной зависимости наибольшей ньютоновской вязкости достаточно протяженной области II при смене механизма массопереноса является типичным свойством растворов полиэлектролитов [87, 149–154]. Подобный характер $\lg \eta_{\max} = f(\lg C_{\text{ХТЗ}})$ наблюдался для уксусно-кислых растворов ХТЗ [20] при варьировании концентрации уксусной кислоты [149], водных растворов Na-сукцинил ХТЗ и Na-карбоксиметилцеллюлозы [20]. В нашем случае введение NaCl сужает переходную область, поскольку экранирует электростатическое взаимодействие сегментов поликатиона, что и сопровождается понижением вязкости. При этом, чем меньше концентрация ХТЗ и выше ионная сила среды, тем более предпочтительно взаимодействие NH_3^+ -групп с противоионами.

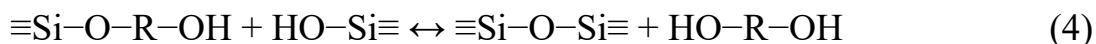
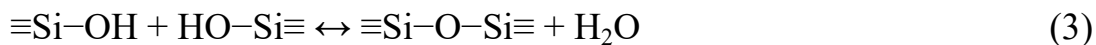
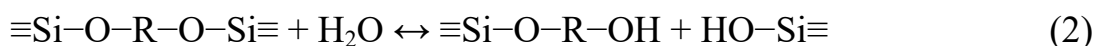
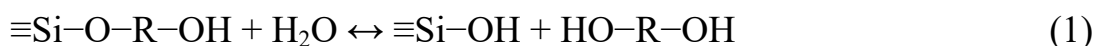
Концентрация образования сетки зацеплений является диагностическим показателем перехода от режима разбавленных растворов в режим концентрированных и используется для прогнозирования оптимальных условий формирования полимерного материала. Таким образом, при получении хитозансодержащих материалов (гелей, пленок, мембран, волокон и др.) экономически оправданная концентрация ХТЗ данной \bar{M}_n должна превышать 6.0 г/дл. Следует отметить, что растворы ХТЗ в L - и D -АК высокой концентрации (~6–15 г/дл) представляют собой

высоковязкую гелеобразную систему. Однако, несмотря на высокие значения вязкости и формирование флуктуационной сетки зацеплений, формоустойчивость таких «гелей» невысока, что требует разработки специальных приемов для формирования стабильной во времени пространственной структуры. Одним из перспективных способов решения данной задачи является стабилизация материала трехмерной золь-гель сеткой $\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$ связей. Поскольку материалы на основе ХТЗ находят преимущественно биомедицинское применение, в настоящей работе в качестве золь-гель прекурсора впервые использовали фармакологически активный тетраглицеролат кремния $\text{Si}(\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_3)_4 \cdot 3 \text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ [214, 215]. В отличие от классических золь-гель прекурсоров [212, 213] в нашем случае образуются глицерогидрогели, поскольку их формирование протекает в водно-глицериновой среде и сопровождается не полным гидролизом предшественника [222, 234–242].

3.5 Получение и физико-химические свойства глицерогидрогелей *L*- и *D*-аскорбата хитозана

Золь-гель синтезом в мягких условиях с использованием фармакологически активного прекурсора $\text{Si}(\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_3)_4 \cdot 3 \text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ получены глицерогидрогели *L*- и *D*-аскорбата хитозана при варьировании массового соотношения полимер : прекурсор ($C_{\text{ХТЗ}}/C_{\text{Si}}$) и условий проведения процесса гелеобразования, выявлены оптимальные составы и температуры с минимальным временем гелирования [222, 234–242].

Отметим, что используемый золь-гель прекурсор обладает коллагенстимулирующим и ангиогенным действием, ранозаживляющей и транскутанной активностью и полностью совместим с природными полисахаридами [214, 215]. Процесс гелеобразования обусловлен формированием трехмерной сетки $\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$ связей при гидролизе тетраглицеролата Si (1–2) с последующей конденсацией образующихся продуктов (3–4) [215].



Во всех случаях золь-гель реакция заканчивалась формированием прозрачных формоустойчивых монолитных систем (рисунок 3.38).

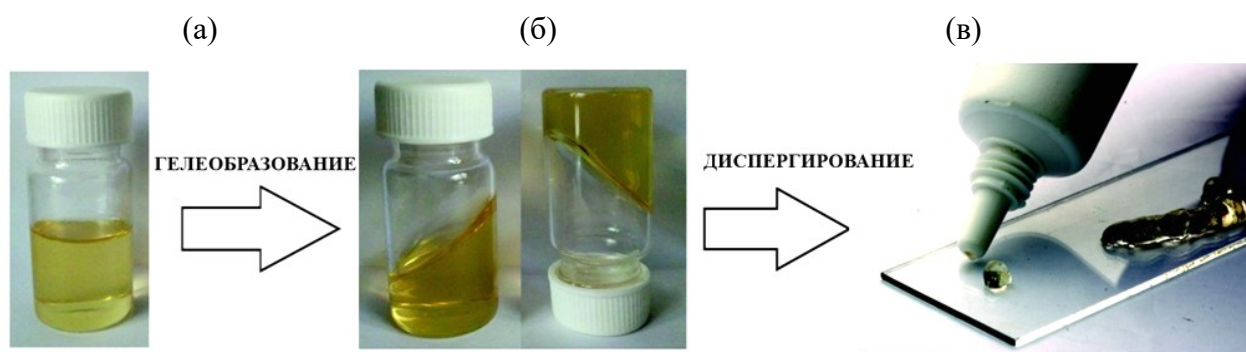


Рисунок 3.38. Фотографии кремнийхитозансодержащей композиции (а), сформированного из неё глицерогидрогеля–монолита (б), легко переходящего при диспергировании в мазеподобное состояние (в) [222].

3.5.1 Влияние компонентного состава на время гелеобразования

Исследовали кинетику гелеобразования смесевых композиций на основе 4.0 г/дл растворов ХТЗ-40(-200) в 4.0 г/дл *L*-(*D*-)АК и

$\text{Si}(\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_3)_4 \cdot 3 \text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ в широком диапазоне массового соотношения компонентов, 1 : 1 – 13 : 1 (рисунок 3.39, кривые 1, 3, 5).

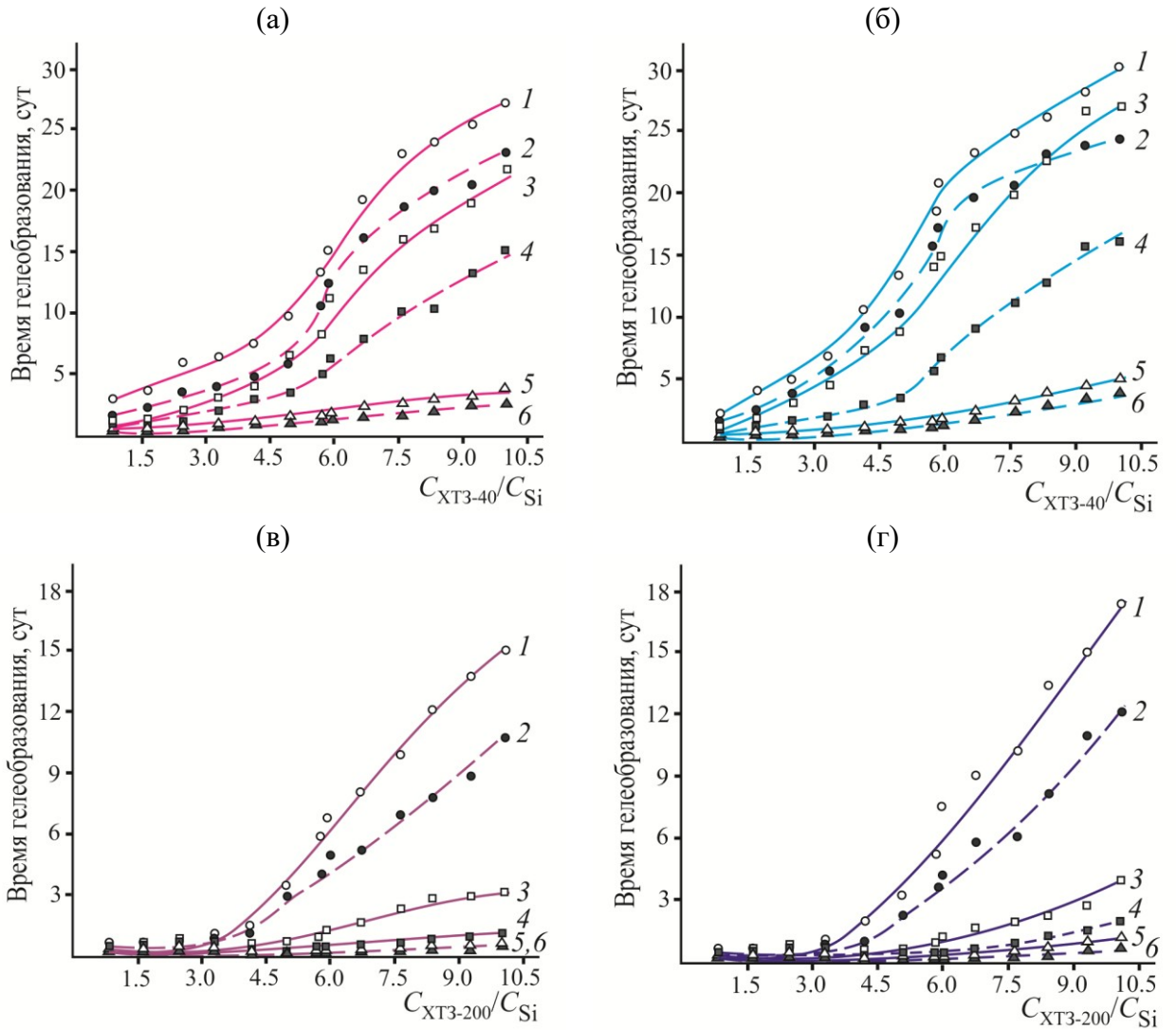


Рисунок 3.39. Зависимость времени гелеобразования от $C_{\text{XT3}}/C_{\text{Si}}$ для систем на основе XT3-40 (а, б) и XT3-200 (в, г) в *L*- (а, в) и *D*-АК (б, г) при 4 (1, 2), 20 (3, 4), 37°C (5, 6) без (1, 3, 5) и с добавлением 0.3 М NaCl (2, 4, 6) и массовом соотношении $\text{XT3} : \text{Si}(\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_3)_4 \cdot 3 \text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3 = 1:1 - 13:1$, $[-\text{NH}_2]/[\text{AK}] = 1.0$ осново-моль/моль.

Для всех композиций во всем исследуемом диапазоне составов наблюдается общая тенденция замедления гелеобразования с увеличением отношения хитозан/прекурсор, особенно выраженная при $C_{\text{XT3}}/C_{\text{Si}} \geq 5.0$. При $C_{\text{XT3}}/C_{\text{Si}} < 2.0$ для всех исследуемых систем, вне зависимости от молекулярной массы полимера, время гелеобразования определяется только концентрацией $\text{Si}(\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_3)_4 \cdot 3 \text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ и составляет ~1–2 сут. Поскольку гидроксильные группы хитозана выполняют роль шаблона для нуклеации силанола [212, 213, 222], повышение содержания полимера в системе приводит к увеличению количества «центров нуклеации» и снижению

«плотности» распределения реакционно-способных силанольных групп, что, соответственно, и замедляет гелеобразование. При $C_{\text{ХТЗ}}/C_{\text{Si}} \geq 5.0$ наблюдается изменение характера зависимости, что может объясняться реализацией «эквивольного» отношения полимер/прекурсор при $C_{\text{ХТЗ}}/C_{\text{Si}} \sim 5.5$ в исследуемых гелеобразующих системах.

Для композиций, характеризующихся одинаковым содержанием хитозана, время гелеобразования тем больше, чем меньше молекулярная масса полимера. Это обусловлено, вероятно, бóльшей вязкостью исходных растворов высокомолекулярного хитозана, чем растворов низкомолекулярного и, соответственно, меньшей концентрацией образования флуктуационной сетки зацеплений C_e .

В качестве гелеускоряющей добавки выбран NaCl, как наиболее активный активатор поликонденсации кремниевой кислоты из ряда натриевых солей: цитрат < тартрат < сукцинат < формиат < ацетат < хлорид [243]. Ускоряющее действие натриевых солей на гелеобразование в концентрированном золе кремнезема [243] и глицеролатов Si [214, 215] объясняется сжатием двойного электрического слоя частиц золя по мере роста концентрации соли, что облегчает процесс гелирования, т.к. образование коагуляционных связей между частицами золя обязательно предшествует образованию кристаллизационных мостиков за счет реакции поликонденсации кремниевой кислоты.

Выбор концентрации 0.3 М NaCl обусловлен результатами ротационной вискозиметрии (см. подглаву 3.4). Такая концентрация соли-электролита является оптимальной, поскольку не приводит к значительному снижению вязкости растворов аскорбатов хитозана и не вызывает осаждение полимера. Показано, что для всех исследуемых систем введение 0.3 М NaCl способствует уменьшению времени гелеобразования в $\sim 1.5 - 2.0$ раза (см. рисунок 3.39, кривые 2, 4, 6) по сравнению с исходной системой без ускорителя (кривые 1, 3, 5).

3.5.2 Влияние условий золь-гель процесса на время гелеобразования

Процесс гелеобразования проводили в изотермических условиях при 4, 20 и 37°C и при варьировании рН = 2.0–5.7. Установлено, что повышение температуры до 37°C приводит к нивелированию разницы во времени гелеобразования для систем без и с добавкой NaCl (рисунок 3.40 а).

Подобная зависимость времени гелеобразования зафиксирована и при варьировании рН смесевых систем (рисунок 3.40 б). Например, снижение рН до ~ 2.0 (введением гидроксикислоты, ГК) замедляет гелеобразование, а повышение рН до $\sim 4.3\text{--}5.0$ (введением 0.1 N NaOH в не вызывающем осаждение полимера количестве) – ускоряет золь-гель переход до нескольких часов. При значениях $\text{pH} = 5.6 \pm 0.1$, т.е. близких к нейтральному, гелеобразование протекает в течение часа.

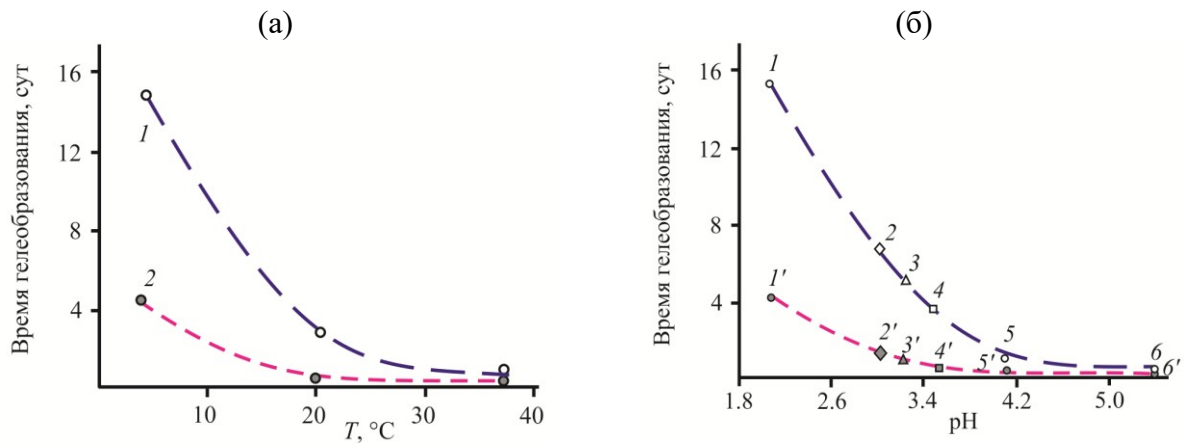


Рисунок 3.40. (а) – Зависимость времени гелеобразования от температуры для системы на основе $\text{Si}(\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_3)_4 \cdot 3 \text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ и ХТЗ-40 + D-АК без (1) и с добавкой 0.3 M NaCl (2); $\text{pH} = 3.8 \pm 0.1$ (1) и 4.3 ± 0.1 (2), $C_{\text{ХТЗ}}/C_{\text{Si}} = 5.0$. (б) – Зависимость времени гелеобразования от рН для систем на основе $\text{Si}(\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_3)_4$ и ХТЗ-40; рН варьировали использованием ГК (1, 1'), D- (2, 2'), L-АК (3, 3'), H_2O (4, 4') и NaOH (5, 5', 6, 6'), $C_{\text{ХТЗ}}/C_{\text{Si}} = 5.0$ (1–6) и 0.8 (1'–6'), 20°C .

Согласно работам [214, 215] механизм нуклеофильного замещения реакции конденсации продуктов гидролиза $\text{Si}(\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_3)_4$ до и после изоэлектрической точки ($\text{pH} = 4.1 \pm 0.1$) возможен с участием протонированных или депротонированных силанольных групп:



Замедление гелеобразования в области низких значений $\text{pH} < 4.0$ обусловлено образованием устойчивого катионного комплекса $\text{Si}-\text{OH}_2^+$, в котором атом Si находится в координационно-насыщенном состоянии (5) [215]. Кроме того, степень протонирования $-\text{NH}_2$ групп ХТЗ максимальна и активными сайтами нуклеации продуктов гидролиза и конденсации $\text{Si}(\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_3)_4$ выступают только гидроксильные группы и кислород ацетамидной группы глюкопиранозного кольца ХТЗ [212–215].

Повышение рН среды до близких к нейтральным значениям ($\text{pH} \sim 5\text{--}6$), например, варьированием концентрации водно-кислотного раствора хитозана

или введением NaOH, сопровождается уменьшением количества сольватированных аминогрупп и появлением дополнительных сайтов нуклеации, что, соответственно, оказывает выраженное катализирующее действие на процесс формирования кремнийхитозансодержащих глицерогидрогелей. Таким образом, pH среды и, соответственно, степень сольватации макроцепей (степень протонирования NH₂-групп) определяют кинетику процесса гелеобразования в целом.

3.5.3 Влияние изоформы аскорбиновой кислоты на время гелеобразования

Показано существенное влияние на время гелеобразования используемой для получения растворов хитозана изоформы аскорбиновой кислоты. Так, для составов, характеризующихся одинаковым содержанием ХТЗ-40 + *L*-(*D*-)АК (см. рисунок 3.39, а, б) и ХТЗ-200 + *L*-(*D*-)АК (в, г), при любом соотношении $C_{ХТЗ}/C_{Si}$ гелеобразование в системе на основе *D*-аскорбата хитозана (гомохирального солевого комплекса) протекает в течение более длительного промежутка времени, чем на основе *L*-аскорбата хитозана. Замедляющее действие *D*-аскорбата хитозана на кинетику гелеобразования по сравнению с *L*-аскорбатом хитозана отчасти может объясняться незначительным отличием в значениях константы диссоциации (pK_1) изомеров АК ($pK_{L-АК} = 4.26$ и $pK_{D-АК} = 4.18$), определяющей кислотность среды. Однако pH исходных растворов *L*-(*D*-) аскорбата хитозана, используемых для получения глицерогидрогелей, имеет одинаковые значения: $pH_{ХТЗ-40 \cdot L-АК} = pH_{ХТЗ-40 \cdot D-АК} = 3.1 \pm 0.2$ и $pH_{ХТЗ-200 \cdot L-АК} = pH_{ХТЗ-200 \cdot D-АК} = 4.2 \pm 0.2$. Исключая влияние pH гелеобразующей системы на кинетику гелеобразования предположили, что в данном случае определяющее влияние на время формирования пространственной сетки глицерогидрогеля может оказывать пространственная организация диастереомернообогащенных полисолей хитозана с *L*-, *D*-аскорбат анионами.

3.5.4 Реокинетика гелеобразования кремнийхитозансодержащих систем

На следующем этапе проведено сравнение кинетики гелеобразования кремнийсодержащих глицерогидрогелей на основе *L*-(*D*-) аскорбата хитозана методом ротационной вискозиметрии (рисунок 3.41). Реограммы вязкости исходных растворов ХТЗ-200 в *L*-(*D*-)АК имеют типичный для полимерных систем характер: на зависимости $\lg \eta = f(\lg \tau)$ наблюдаются области наибольшей ньютоновской и структурной вязкости (рисунок 3.41, кривые 1).

При этом для раствора ХТЗ-200 + *L*-АК характерны существенно более высокие значения вязкости, чем для раствора ХТЗ-200 + *D*-АК. После введения в исходные растворы аскорбата хитозана гелеобразователя $\text{Si}(\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_3)_4$ вязкость систем незначительно снижается (кривые 2), а через ~40 мин возрастает (кривые 3) с сохранением характера течения. Через ~80 мин на кривых $\lg \eta = f(\lg \tau)$ фиксируется только область структурной вязкости (кривые 4). Через > 120 мин реограммы вязкости имеют вид, характерный для структурированных систем (полная потеря текучести) с пределом прочности (τ_K , Па), который определяли экстраполяцией касательной к начальному прямолинейному участку структурной ветви кривой течения на ось абсцисс к условию $\lg \eta \rightarrow 0$.

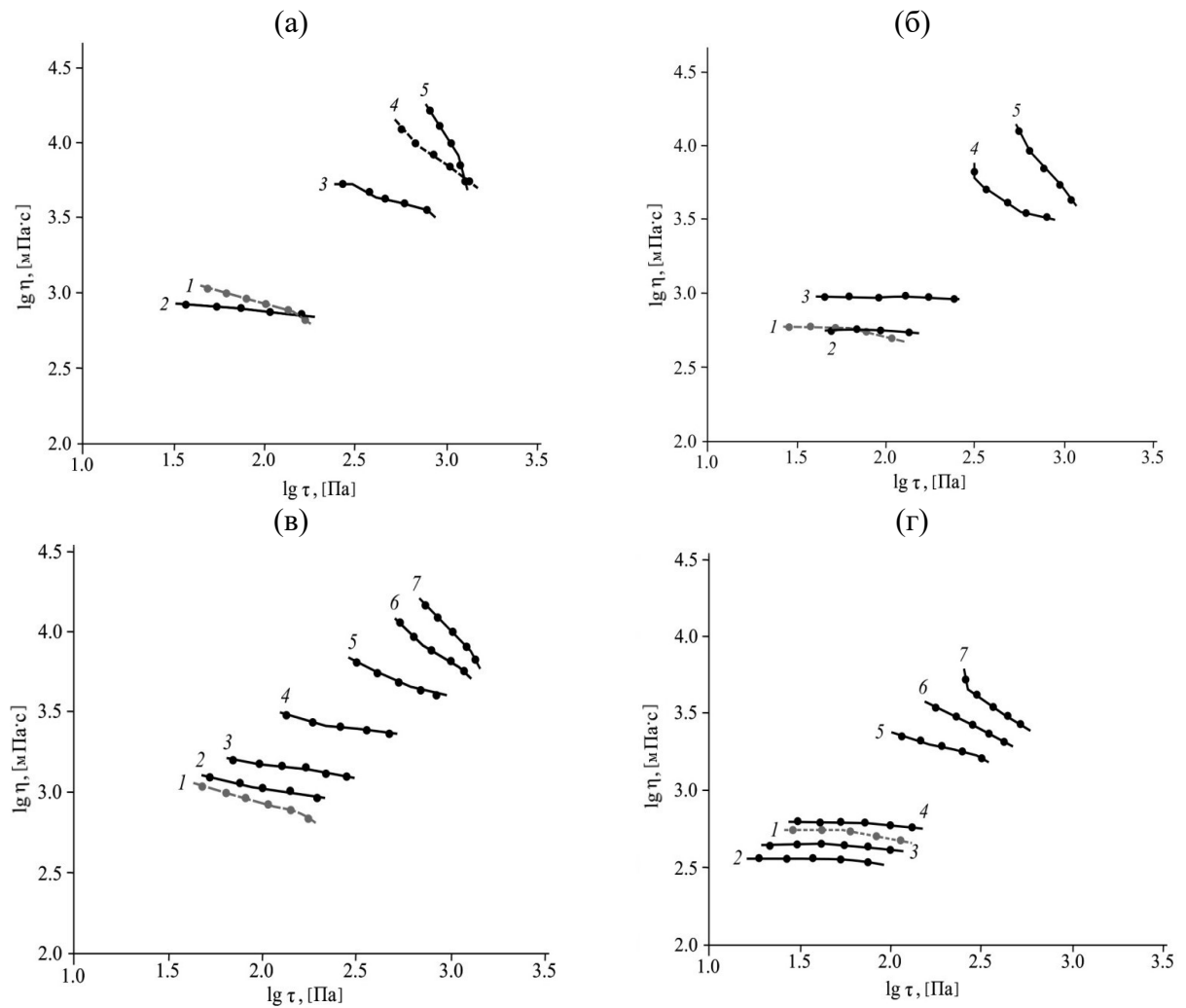


Рисунок 3.41. Кривые течения исходных 4.0 г/дл растворов ХТЗ-200 в 4.0 г/дл *L*- (а, в) и 4.0 г/дл *D*-АК (б, г) (1), гелеобразующих композиций с $\text{Si}(\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_3)_4$ при $C_{\text{ХТЗ}}/C_{\text{Si}} = 0.8$ (а, б) и 1.6 (в, г) через 0 (2), 40 (3), 85 (4), 120 (5), 150 (6) и 180 мин (7) после начала гелеобразования, $[-\text{NH}_2]/[\text{АК}] = 1.0$ осново-моль/моль, 25°C.

Установлено также, что структурно-механические свойства образующихся глицерогидрогелей зависят от изоформы используемой АК. Так, глицерогидрогели на основе ХТЗ-200 + *D*-АК имеют более высокий предел прочности, чем для ХТЗ-200 + *L*-АК (таблица 3.16). С увеличением $C_{\text{ХТЗ}}/C_{\text{Si}}$ предел прочности возрастает. Причем, чем более концентрированное система по хитозану, тем более очевидно влияние природы изомера АК. С увеличением содержания ХТЗ в системе предел прочности увеличивается на ~15–20%. Повышение прочности образующегося глицерогидрогеля может быть связано с увеличением числа водородных связей между макромолекулами ХТЗ и $\equiv\text{Si}-\text{OH}$ группами, образующимися в результате гидролиза $\text{Si}(\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_3)_4$, определяющих прочность надмолекулярной структуры полимерной системы.

Таблица 3.16 – Предел прочности кремнийхитозансодержащих глицерогидрогелей $[-\text{NH}_2]/[\text{АК}] = 1.0$ осново-моль/моль

Соотношение $C_{\text{ХТЗ}}/C_{\text{Si}}$	Предел прочности τ_K , Па	
	ХТЗ-200 + <i>L</i> -АК	ХТЗ-200 + <i>D</i> -АК
0.8	3.55 ± 0.07	3.80 ± 0.06
1.6	4.00 ± 0.05	4.45 ± 0.04

Для более детальной оценки пространственной структуры органо-неорганического глицерогидрогеля и ее трансформации при повышении температуры проведены осциллирующие тесты в высококонцентрированной по хитозану смесевой системе (ХТЗ + АК) + $\text{Si}(\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_3)_4 \cdot 3 \text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$. В качестве примера на рисунке 3.42 приведена температурная зависимость модуля упругости G' и потерь G'' для гелеобразующей системы на основе 15.0 г/дл раствора ХТЗ-40 в 9.0 г/дл *D*-АК.

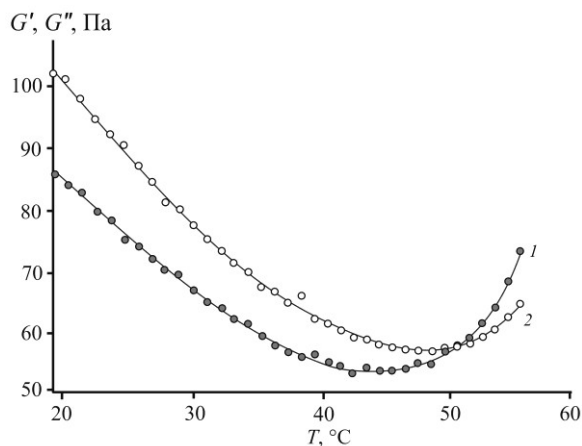


Рисунок 3.42. Температурная зависимость модуля упругости G' (1) и потерь G'' (2) гелеобразующей системы на основе 15.0 г/дл раствора ХТЗ-40 в 9.0 г/дл *D*-АК и $\text{Si}(\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_3)_4$, $C_{\text{ХТЗ}}/C_{\text{Si}} = 15.0$, $[-\text{NH}_2]/[\text{АК}] = 1.0$ осново-моль/моль, скорость нагрева $4^\circ\text{C}/\text{мин}$.

Из температурной зависимости модулей упругости (G' , Па) и потерь (G'' , Па) определено, что характерное для вязкоупругой жидкости соотношение $G' < G''$ реализуется до $\sim 48\text{--}49^\circ\text{C}$. Равенство модулей $G' = G''$ наблюдается при достижении 50°C . В температурном диапазоне $> 51^\circ\text{C}$ значения $G' > G''$, что свидетельствует о проявлении исследуемой композиции свойств вязкоупругого тела.

3.5.5 Потенциал поверхности и морфоструктура глицерогидрогелей

На следующем этапе проведена оценка потенциала поверхности глицерогидрогелей на основе ХТЗ-40(-200) + L -(D -)АК при разном соотношении $C_{\text{ХТЗ}}/C_{\text{Si}}$ динамическим зондовым методом [238]. Все исследованные образцы имеют положительный поверхностный заряд (таблица 3.17).

Таблица 3.17 – Потенциал поверхности глицерогидрогелей на основе ХТЗ + L -(D -)АК, $[-\text{NH}_2]/[\text{АК}] = 1.0$ осново-моль/моль

Соотношение $C_{\text{ХТЗ}}/C_{\text{Si}}$	Потенциал поверхности ζ , мВ*			
	ХТЗ-40		ХТЗ-200	
	L -АК	D -АК	L -АК	D -АК
1.0	+0.82	+0.97	+0.80	+0.62
2.0	+0.89	+1.00	+0.81	+0.79
3.0	+0.90	+1.06	+0.89	+0.86
4.0	+1.00	+1.20	+0.93	+0.89

* – Точность измерения потенциала поверхности составила ± 0.03 м В

Увеличение концентрации хитозана и, соответственно, соотношения $C_{\text{ХТЗ}}/C_{\text{Si}}$ приводит к небольшому росту значений потенциала поверхности для всех исследуемых систем (таблица 3.17). При этом, образцы на основе ХТЗ-40 характеризуются бóльшими значениями ζ , чем образцы на основе ХТЗ-200.

Как и при взаимодействии с одиночными малыми молекулами (в частности с парами воды, см. подглаву 3.2), при взаимодействии с молекулами, формирующих пространственные сетки (золь-гель прекурсор $\text{Si}(\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_3)_4$, настоящая подглава), отмечается влияние хиральности аниона L -(D -)АК в составе аскорбата хитозана. Так величина потенциала поверхности сформированных глицерогидрогелей L - и D -аскорбата хитозана понижается в ряду: $\text{ХТЗ-40} + D\text{-АК} \rightarrow \text{ХТЗ-40} + L\text{-АК} \rightarrow \text{ХТЗ-200} + L\text{-АК} \rightarrow \text{ХТЗ-200} + D\text{-АК}$. Примечательно, что такая последовательность соответствует результатам потенциометрического титрования исходных растворов аскорбатов ХТЗ: степень связывания ХТЗ с АК в данном ряду снижается (см. подглаву 3.1, таблица 3.6). Кроме того, стереоизомерия кислотного остатка отражается и на

надмолекулярном упорядочении глицерогидрогелей на основе *L*- и *D*-солевых комплексов ХТЗ. Так *L*-аскорбаты хитозана обнаруживают более разветвленные надмолекулярные структуры с меньшей шириной ветвей, чем *D*-аскорбаты (рисунок 3.43). При этом результаты ТЭМ-микроскопии коррелируют с гидродинамическими характеристиками: размеры макроклабков ХТЗ-40 в *D*-АК больше чем в *L*-АК как в водно-кислотных и в водно-кислотно-солевых растворах, так и при повышении температуры (см. подглаву 3.4, таблица 3.6).

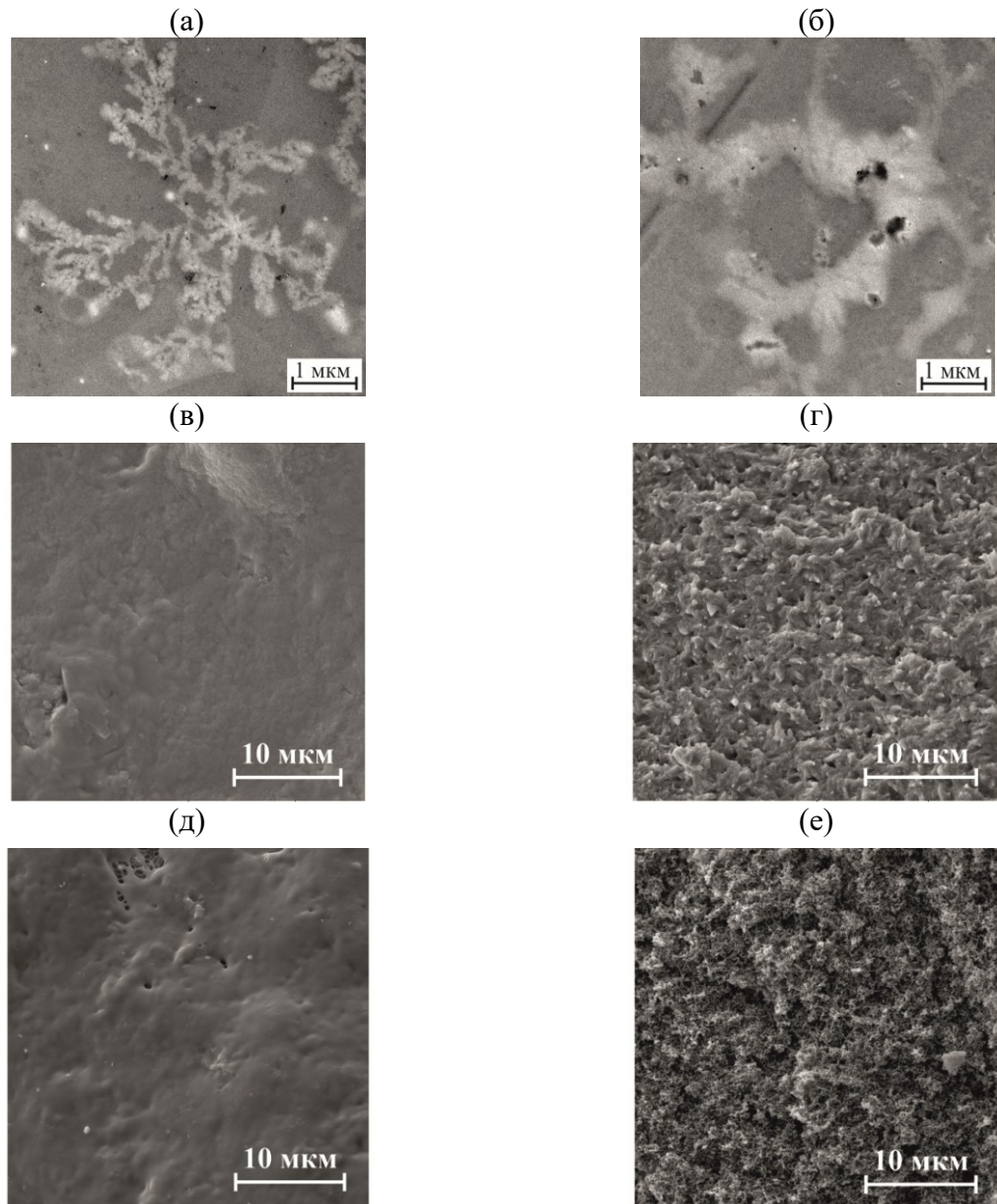


Рисунок 3.43. ТЭМ-микроскопия ультратонкого среза глицерогидрогелей (а, б) и СЭМ-микроскопия морфологии поверхности ксерогелей (в–е) на основе ХТЗ-40 (а, б, в, г), ХТЗ-200 (д, е) в *L*- (а, в, д) и *D*-АК (б, г, е), $C_{\text{ХТЗ}}/C_{\text{Si}} = 4.0$, $[-\text{NH}_2]/[\text{АК}] = 1.0$ осново-моль/моль, фиксация в EPON-812©.

Кроме того, хиральность ХТЗ · *L*-(*D*-)АК определяет морфоструктуру ксерогелей – выделенной твердой фазы глицерогидрогелей исчерпывающей холодной экстракцией C_2H_5OH в сочетании с криообработкой (рисунок 3.43). Так, ксерогели ХТЗ-40(-200)·*D*-АК имеют рыхлую развитую морфоструктуру поверхности в отличие от ХТЗ-40(-200)·*L*-АК, характеризующиеся сравнительно однородной поверхностью.

3.5.6 Модель пространственной сетки глицерогидрогелей

Полученные результаты позволяют предположить гипотетическую схему формирования исследованных гибридных хитозансодержащих гидрогелевых систем [236]. При смешении водных растворов ХТЗ + *L*-(*D*-)АК и глицериновых растворов $Si(OGly)_4$ начинается быстрый обратимый гидролиз тетраглицеролата кремния с образованием силанольных групп $\equiv Si-OH$ (1, 2) и их дальнейшая более медленная конденсация с образованием дисилоксановых группировок (3, 4) [215]. Реакция конденсации приводит к формированию полисилоксановой пространственной сетки, но избыток глицерина в системе препятствует полному гидролизу прекурсора [214]. Образование многочисленных межмолекулярных связей, включая водородные связи между $-OH$, не протонированными $-NH_2$ группами макромолекул ХТЗ и $\equiv Si-OH$ группами, образующимися в результате гидролиза $Si(OGly)_4$, а также ион-ионно-водородных контактов поликатионов [156] способствует формированию органо-неорганического глицерогидрогеля. При этом образование ковалентных связей полимер-гелеобразователь, согласно [212, 213], маловероятно. Известно также, что добавка глицерина в концентрированный водно-кислотный раствор хитозана способствует формированию сетки межмолекулярных Н-связей вплоть до образования водонерастворимых гелеобразных материалов [20]. В совокупности, протекающие процессы определяют надмолекулярную структуру образующегося глицерогидрогеля, представленной взаимопроницающими полимерными сетками органической (ХТЗ + *L*-(*D*-)АК) и неорганической природы ($\equiv Si-O-Si \equiv$) в водно-глицериновой среде (рисунок 3.44).

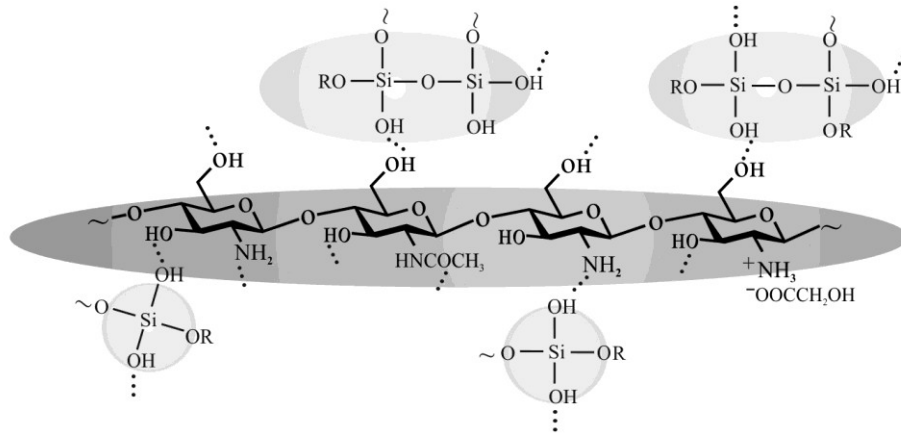


Рисунок 3.44. Предположительная схема внутри- и межмолекулярных взаимодействий в кремнийхитозансодержащем глицерогидрогеле, $R = C_3H_7O_3$.

На основании проведенных экспериментов можно констатировать, что ускоряющее действие на протекание золь-гель синтеза в кремнийхитозансодержащей системе оказывает повышение рН среды и температуры инкубирования, повышение концентрации прекурсора неорганической фазы (уменьшение соотношения $C_{ХТЗ}/C_{Si}$), а также добавка соли-электролита. По данным реокинетики гелеобразования, структурирование кремнийхитозансодержащих систем на основе *D*-аскорбата ХТЗ хоть и протекает медленнее, но сопровождается формированием более прочной глицерогидрогелевой структуры, чем на основе *L*-аскорбата ХТЗ. Наиболее высоким значением поверхностного потенциала обладают глицерогидрогели *D*-аскорбата низкомолекулярного ХТЗ. Гибридная глицерогидрогелевая структура представлена взаимопроникающими сетками аскорбата ХТЗ и полиолата кремния, которые стабилизированы внутри- и межмолекулярными водородными связями между функциональными группами макромолекул аминополисахарида и гидроксигруппами продуктов гидролитической конденсации прекурсора.

3.6 Биотестирование *L*- и *D*-аскорбатов ХТЗ

При разработке хитозансодержащих материалов медико-биологического назначения кроме физико-химических свойств, определяющих прикладные аспекты их применения, необходимо исследовать биологические свойства нового препарата, в частности, его цитотоксичность, антибактериальную активность и ранозаживляющую способность. Применительно к *L*- и *D*-аскорбатам ХТЗ, показавшим значимые различия в структуре, надмолекулярном упорядочении, сорбционно-диффузионных и термодинамических характеристиках, данные эксперименты целесообразно проводить в сравнительном анализе влияния изомерной формы кислотного остатка на биологическую активность диастереомерных солей.

Для тестирования *in vitro* и *in vivo* хиральных солей хитозана использовали биообъекты животного (культуры клеток, животные модели) и растительного происхождения (низшие и высшие растения). В качестве объектов животного происхождения использованы культуры грампозитивного и грамотрицательного штаммов микроорганизмов *S. aureus* и *E. coli*, а также культуры клеток нормальных человеческих дермальных фибробластов (НЧДФ). В качестве животных моделей выбраны крысы с ожоговой и резаной ранами. В качестве объектов растительного происхождения использованы культуры микроводорослей *S. quadricauda* и тест-семена *Linum usitatissimum*. Тестировали растворы, порошки и глицерогидрогели *L*-(*D*-) аскорбатов ХТЗ [244–249].

3.6.1 Тестирование на биообъектах животного происхождения

Микробиологическое исследование *in vitro* выявило различия в антимикробной активности (A_i) диастереомерных солей хитозана. Так, ХТЗ-40 + *D*-АК в 3.2 раза более активен по сравнению с ХТЗ-40 + *L*-АК в отношении штамма грампозитивного *S. aureus* и в 7.5 раза – в отношении грамотрицательного *E. coli* (рисунок 3.45). При этом значение A_i для ХТЗ-40·*D*-АК статистически значимо выше, чем для *D*-АК: в отношении *S. aureus* – в 1.7 раза, в отношении *E. coli* – в 2.2 раза (таблица 3.18). В случае индивидуальных диастереомеров АК биоцидная активность *L*-АК выше по сравнению с *D*-АК в отношении обеих тестируемых культур [222, 245].

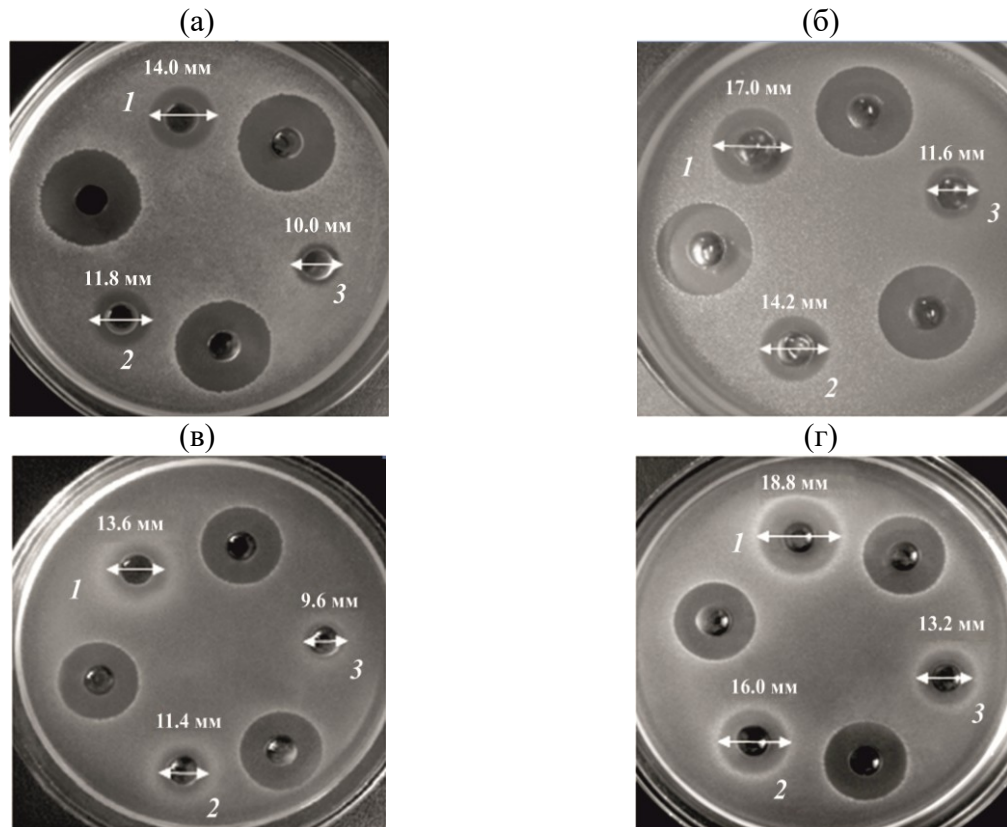


Рисунок 3.45. Зоны угнетения роста колоний тестовой культуры *S. aureus* (а, б) и *E. coli* (в, г) водными растворами XTZ-40 + L-AK (а, в) и XTZ-40 + D-AK (б, г) с $C_{XTZ} = 15.0$ г/дл и $C_{AK} = 9.0$ г/дл в разведении 1 : 2 (1), 1 : 4 (2), 1 : 8 (3) и 0.05 г/дл раствором хлоргексидинбиглюконата (стандарт), $[-NH_2] : [AK] = 1.7$ осново-моль/моль.

Таблица 3.18 – Диаметры зон ингибирования и антибактериальная активность L-(D-)AK и XTZ-40 + L-(D-)AK

Раствор	Концентрация, г/дл		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	XTZ-40	AK	d_i , мм	A_i , %	d_i , мм	A_i , %
L-AK	–	4.50	17.6	36.8	18.2	45.7
	–	2.25	14.8			
	–	1.12	12.2			
D-AK	–	4.50	15.4	17.0	16.4	24.6
	–	2.25	13.0			
	–	1.12	10.8			
XTZ-40 + L-AK	7.50	4.50	14.0	9.2	13.6	7.3
	3.75	2.25	11.8			
	1.19	1.12	10.0			
XTZ-40 + D-AK	7.50	4.50	17.0	29.2	18.8	54.7
	3.75	2.25	14.2			
	1.19	1.12	11.6			

Обнаружены также существенные изменения в морфологии клеток бактерий, выращенных в бульонной культуре с добавкой XTZ-40 + L-AK и XTZ-40 + D-AK: от формирования удлиненных клеток с видимыми признаками

нарушения клеточного деления до скопления агглютинированных мелких клеток и деструкции клеточной стенки (рисунок 3.46).

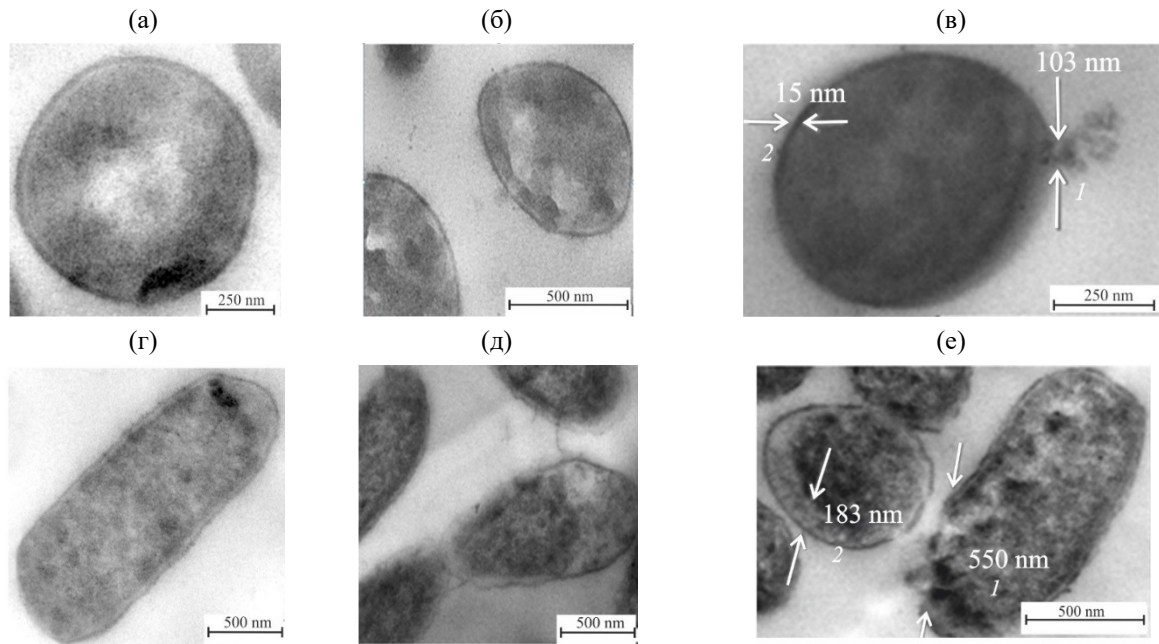


Рисунок 3.46. ТЭМ-морфология клеток *S. aureus* (а–в) и *E. coli* (г–е): контроль (а, г), после воздействия ХТЗ-40 + *L*-АК (б, д) и ХТЗ-40 + *D*-АК (в, у) с $C_{\text{ХТЗ}} = 0.15$ г/дл и $C_{\text{АК}} = 0.9$ г/дл: 1 – поврежденный участок клеточной стенки с выходом цитоплазматического содержимого, 2 – интактная клеточная стенка; метод негативного контрастирования, $[-\text{NH}_2] : [\text{АК}] = 1.7$ осново-моль/моль.

Воздействие ХТЗ-40 + *D*-АК на клетки бактерий *S. aureus* и *E. coli* вызывает более глубокие деструктивные изменения клеточных структур, чем воздействие ХТЗ-40 + *L*-АК. В частности, размер участков с нарушением целостности клеточной стенки в присутствии ХТЗ-40 + *D*-АК колеблется в диапазоне 90–250 нм (*S. aureus*) и 200–600 нм (*E. coli*), в присутствии ХТЗ-40 + *L*-АК – 25–170 нм (*S. aureus*) и 150–350 нм (*E. coli*) [245].

Культивирование *in vitro* клеток НЧДФ в присутствии терапевтических доз (10^{-2} – 10^{-3} г/дл) растворов *L*-(*D*-)АК, ХТЗ-40(-200) + *L*-(*D*-)АК и глицерогидрогелей на основе ХТЗ-40(-200) + *L*-(*D*-)АК показало отсутствие цитотоксичности (рисунок 3.47). При этом все системы на основе ХТЗ-40 + *D*-АК и ХТЗ-200 + *D*-АК статистически значимо повышали жизнеспособность клеток НЧДФ по сравнению с ХТЗ-40 + *L*-АК и ХТЗ-200 + *L*-АК. В случае индивидуальных диастереомеров АК наибольший темп роста популяции клеток и наиболее высокая выживаемость животной клеточной культуры наблюдался в присутствии *L*-АК.

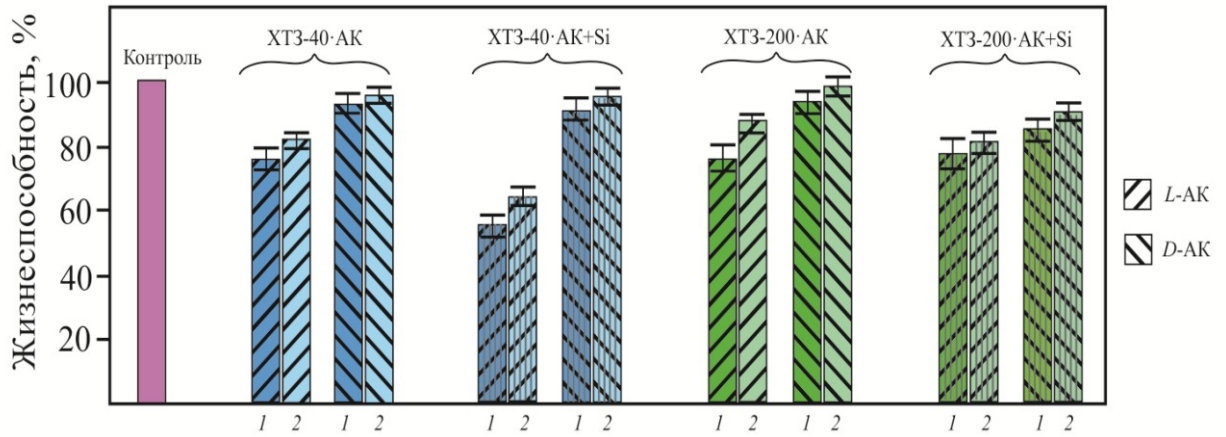


Рисунок 3.47. Диаграмма жизнеспособности клеток НЧДФ в присутствии растворов L -(D -)АК и ХТЗ-40(-200) + L -(D -)АК с $C_{\text{ХТЗ}} = C_{\text{АК}} = 0.1$ г/дл, глицерогидрогелей на основе ХТЗ-40(-200) + L -(D -)АК и $\text{Si}(\text{OGly})_4 \cdot 3 \text{GlyOH}$ с $C_{\text{ХТЗ}} = C_{\text{АК}} = 0.1$ г/дл, $C_{\text{ХТЗ}}/C_{\text{Si}} = 4.8$ в разведении 1 : 10 (1) и 1 : 14 (2), $[-\text{NH}_2]/[\text{АК}] = 1.0$ осново-моль/моль.

3.6.1.1 Ранозаживляющая активность

При исследовании ранозаживляющей активности *in vivo* зафиксирован более высокий темп заживления ожоговой раны ШБ степени тяжести у крыс при обработке гидрогелем на основе ХТЗ-40 + D -АК в сравнении с ХТЗ-40 + L -АК и препаратом «Левомеколь» (рисунок 3.48, таблица 3.19).

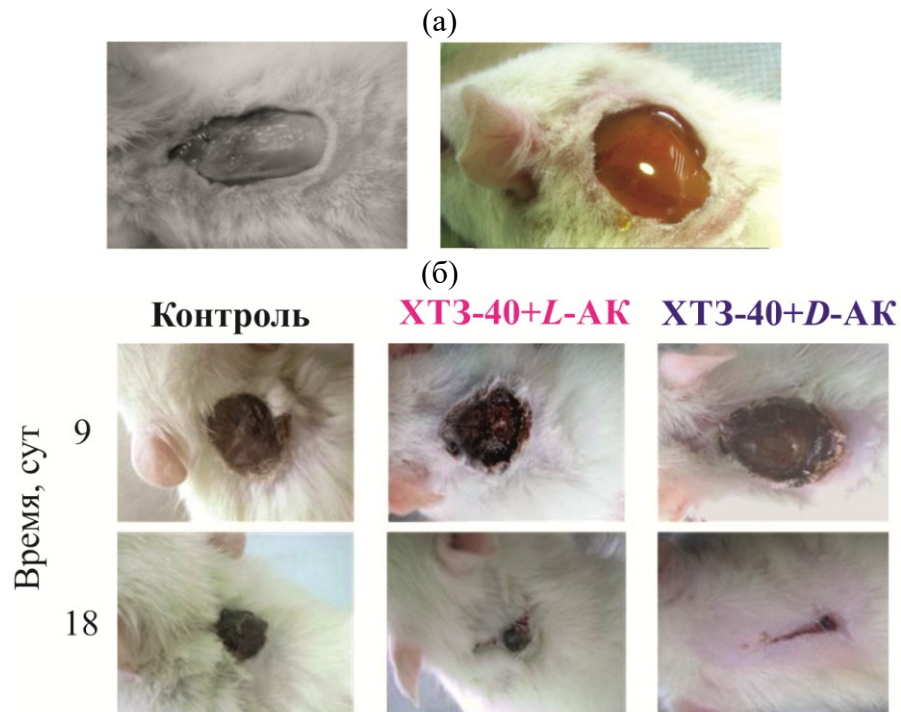


Рисунок 3.48. (а) – Моделирование ожога ШБ у альбиносов крыс-самок и розовая обработка гидрогелем на основе ХТЗ-40 + L -(D -)АК; (б) – Динамика заживления ожоговой раны на фоне ежедневного применения мази «Левомеколь» (контроль), гидрогеля ХТЗ-40 + L -(D -)АК; $C_{\text{ХТЗ}} = 15.0$ г/дл, $C_{\text{АК}} = 9.0$ г/дл, $[-\text{NH}_2] : [\text{АК}] = 1.7$ осново-моль/моль.

Согласно представлениям клинической практики, динамика заживления открытой раны определяется скоростью репаративно-регенераторных процессов, направленных на постепенное сокращение раны до ее полного закрытия. В связи с этим эффективность ранозаживляющего препарата принято оценивать по темпу убыли площади поверхности раны (ΔS , %). Известно также, что в процессе восстановления целостности кожного покрова после повреждения периметр раны уменьшается линейно, а площадь – квадратично, вследствие чего отношение периметра раны к ее площади различно для ран разных форм и размеров [217]. В этой связи в настоящем исследовании оценивали не только изменение площади поверхности раны, но и линейную скорость ранозаживления (V , мм/сут). Установлено, что наиболее высокие темпы репаративно-регенеративных процессов в группах при обработке ХТЗ-40 + L -(D -)АК отмечались в ранние сроки (1–3 сут), а сроки заживления ран под гидрогелем ХТЗ-40 + D -АК были на 10 сут короче, чем в контроле, и на 7 сут короче, чем под гидрогелем ХТЗ-40 + L -АК (таблица 3.19).

Таблица 3.19 – Динамика заживления ожоговой раны IIIБ степени у альбиносов крыс-самок

Обработка	1–3 сут		3–21 сут		21–28 сут	
	ΔS , %	V , мм/сут	ΔS , %	V , мм/сут	ΔS , %	V , мм/сут
Левомеколь/контроль	9.7	0.5	4.7	0.3	8.7	0.1
ХТЗ-40 + L -АК*	12.9	0.7	5.0	0.3	8.3	0.1
ХТЗ-40 + D -АК*	15.5	0.8	5.2	0.3	14.3	0.2

* – $C_{ХТЗ} = 15.0$ г/дл, $C_{АК} = 9.0$ г/дл, $[-NH_2]/[АК] = 1.7$ осново-моль/моль.

При исследовании ранозаживляющей активности *in vivo* на примере резаной раны у альбиносов крыс-самцов также показано, что более высокие темпы заживления наблюдаются при обработке составами на основе D -аскорбата ХТЗ-40(-60) в сравнении с L -аскорбатами ХТЗ-40(-60) и препаратом «Левомеколь» (рисунок 3.49) [249]. У крыс из опытных групп под глицерогидрогелями на 1-е сут лечения происходило значительное стягивание (контракция) раны, на 3-и сут нанесенные гидрогелевые покрытия переставали визуализироваться и формировался струп на всей поверхности раны.

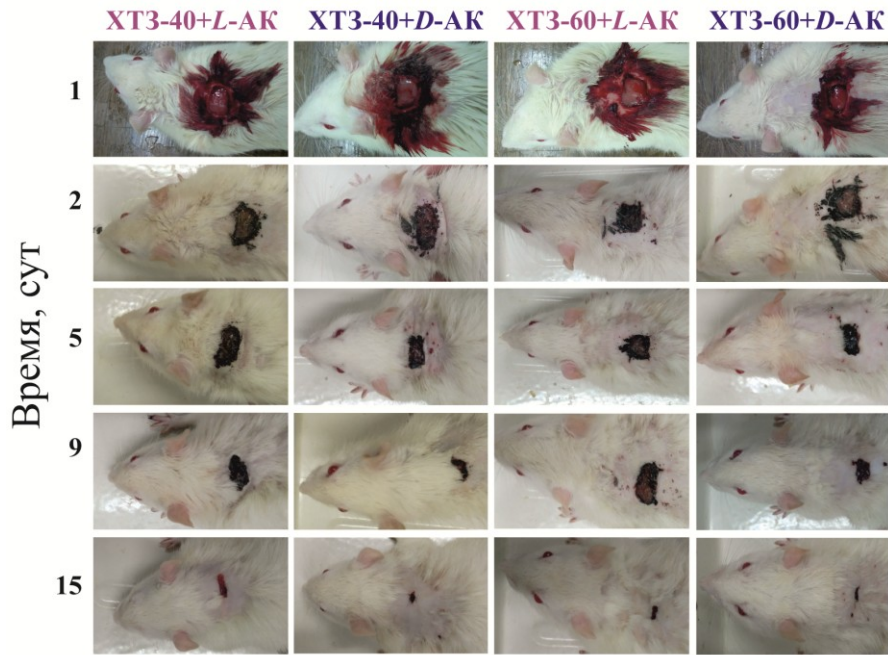


Рисунок 3.49. Динамика состояния резаной раны у альбиносов крыс-самцов после разовой обработки глицерогидрогелевыми композициями на основе XT3-40 + *L*-(*D*-)АК и XT3-60 + *L*-(*D*-)АК с добавкой *Алоэ вера*, $C_{\text{XT3}} = C_{\text{АК}} = 5.3$ г/дл, $C_{\text{XT3}}/C_{\text{Si}} = 8.0$, $[-\text{NH}_2]/[\text{АК}] = 1.0$ осново-моль/моль.

Зависимости, отражающие результаты планиметрии резаных ран у крыс в динамике, представлены на рисунок 3.50.

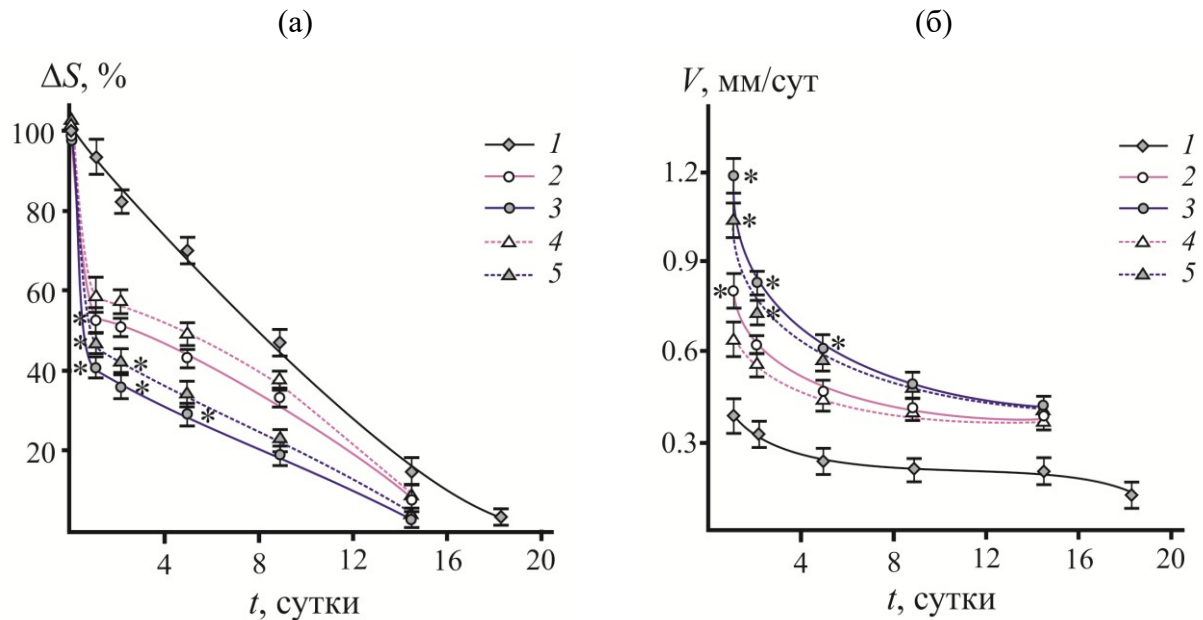


Рисунок 3.50. Динамика уменьшения площади поверхности (а) и скорости заживления (б) резаной раны у альбиносов крыс-самцов без (1) и с применением глицерогидрогелевых композиций на основе XT3-40 + *L*-АК (2), XT3-40 + *D*-АК (3), XT3-60 + *L*-АК (4) и XT3-60 + *D*-АК (5) с добавкой сока *Алоэ вера*, $C_{\text{XT3}} = C_{\text{АК}} = 5.3$ г/дл, $C_{\text{XT3}}/C_{\text{Si}} = 8.0$, $[-\text{NH}_2]/[\text{АК}] = 1.0$ осново-моль/моль. * – Статистически значимое различие с аналогичным показателем в контрольной группе (*U*-критерий Манна-Уитни, $p \leq 0.05$).

Ранозаживляющая активность глицерогидрогелей увеличивается в ряду ХТЗ-60 + L-АК → ХТЗ-40 + L-АК → ХТЗ-60 + D-АК → ХТЗ-40 + D-АК. Таким образом, как и в случае ожоговой раны наилучшее ранозаживляющее действие резаной раны проявляют составы, полученные с использованием D-солевого комплекса ХТЗ–АК, а при сравнении между ними – образцы полимера меньшей молекулярной массы. По завершении эксперимента проведена оценка изменения живой массы лабораторных животных (таблица 3.20). Оказалось, что крысы экспериментальных групп статистически значимо и более активно набирали вес, чем животные контрольной группы. Наибольший прирост массы, как и наиболее высокая ранозаживляющая активность, наблюдался для крыс экспериментальных групп ХТЗ-60 + D-АК и ХТЗ-40 + D-АК.

Таблица 3.20 – Изменение веса альбиносов крыс-самцов в контрольной и экспериментальных группах в процессе заживления резаной раны

Обработка раны	Средний вес животных, г		Прирост массы при $t = 18$ сут, %	Среднесуточный привес, %/сут
	$t = 0$ сут	$t = 18$ сут		
– /контроль	175 ± 5	246 ± 17	40.6 ± 6.9	2.3 ± 0.3
ХТЗ-40 + L-АК*	171 ± 6	282 ± 18	64.9 ± 7.0**	3.6 ± 0.9**
ХТЗ-40 + D-АК*	165 ± 5	288 ± 20	74.5 ± 9.1**	4.1 ± 0.4**
ХТЗ-60 + L-АК*	174 ± 6	275 ± 15	58.1 ± 5.2	3.2 ± 0.8
ХТЗ-60 + D-АК*	173 ± 7	283 ± 18	63.6 ± 6.4**	3.5 ± 0.9**

* – $C_{ХТЗ} = C_{АК} = 5.3$ г/дл, $[-NH_2]/[АК] = 1.0$ осново-моль/моль, $C_{ХТЗ}/C_{Si} = 8.0$.

** – Статистически значимое различие с аналогичным показателем в контрольной группе (U -критерий Манна-Уитни, $p \leq 0.05$).

Таким образом, заживление ожоговых и резаных ран у лабораторных животных протекает более высокими темпами на фоне применения глицерогидрогелей по сравнению с группой контроля (стандартная обработка). При этом, интенсивность регенерации под влиянием D-аскорбата ХТЗ выше, чем L-аскорбата ХТЗ. По видимости, это связано со способностью макромолекул D-аскорбата хитозана вызывать более быстрое купирование воспалительных процессов в поврежденных тканях за счет альтернативной активации тканевых макрофагов и подавления продукции медиаторов воспаления (ФНО α , ИЛ-8 и др.), нежели макромолекул L-аскорбата хитозана [167]. Кроме того, наличие в составе дополнительных биологически активных компонентов полиолата Si, а также сока *Алоэ вера*, обладающих коллагенстимулирующими, антимикробными, антиоксидантными и ангиогенными свойствами, так же способствует повышению скорости эпителизации ран [242].

Проведенные исследования *in vivo* показали, что крысы хорошо переносят местное применение глицерогидрогелей на основе *L-(D-)*аскорбатов ХТЗ. Присутствие препаратов на ране не оказывало раздражающего, аллергического или токсического действия, а также не влияло на их двигательную активность и аппетит. За весь период наблюдения не было зарегистрировано ни одного случая развития инфекционного процесса. Протестированные глицерогидрогелевые структуры на основе *D*-аскорбата ХТЗ могут быть использованы для создания биорезорбируемых (саморассасывающихся) покрытий для раневых поверхностей с высоким терапевтическим эффектом [244–249].

3.6.2 Тестирование на биообъектах растительного происхождения

Изучены ростовые характеристики тест-культуры зелёных микроводорослей *S. quadricauda* при выращивании *in vitro* в водной среде с добавкой 10^{-3} – 10^{-5} г/дл ХТЗ-40 и ХТЗ-40 + *L-(D-)*АК в стрессовых условиях (отсутствии минеральных элементов в инкубационной среде) (рисунок 3.51) [223]. Как и в случае животных объектов, особое внимание уделено влиянию изомерной формы образца солевого комплекса ХТЗ на фотосинтетическую активность клеток водоросли. Выбор в качестве тест-объекта *S. quadricauda* обусловлен тем, что данная водоросль легко культивируется в искусственных условиях и чрезвычайно чувствительна к любым, даже незначительным, изменениям культуральной среды [59, 250].

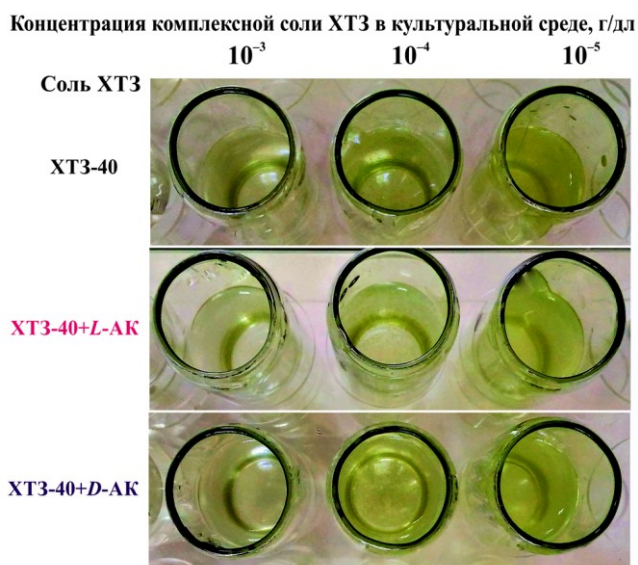


Рисунок 3.51. Фотографии сосудов после 72 ч культивирования зелёных микроводорослей *S. quadricauda* в присутствии ХТЗ-40, ХТЗ-40 + *L-(D-)*АК с концентрацией 10^{-3} – 10^{-5} г/дл, $[-\text{NH}_2]/[\text{АК}] = 1.0$ осново-моль/моль.

Во всех опытах выявлено эвтрофирующее действие солей ХТЗ на культуральную среду, заключающееся в значимом приросте тест-культуры в безминеральной питательной среде (дистиллированной воде). Значения флуоресценции (I , отн. ед.) *S. quadricauda* в процессе альготестирования свидетельствуют о целостности фотосинтетической системы микроводорослей и увеличении числа клеток тест-объекта в процессе культивирования (таблица 3.21). Данный показатель согласуется с изменением значений рН культуральной среды, также подтверждающим рост тестируемых ценобиальных организмов, поскольку чем больше Δ рН, тем выше физиологическая активность и метаболизм водорослей [250].

Таблица 3.21 – Флуоресценция хлорофилла и изменение рН культуральной среды зелёных микроводорослей *S. quadricauda* в присутствии ХТЗ-40, ХТЗ-40 + *L*-(*D*-)АК*

Соль ХТЗ	Концентрация солевого комплекса ХТЗ в культуральной водной среде, г/дл								
	10^{-3}			10^{-4}			10^{-5}		
	Физико-химические параметры								
	I , отн.ед.	ΔI , %	Δ рН	I , отн.ед.	ΔI , %	Δ рН	I , отн.ед.	ΔI , %	Δ рН
ХТЗ-40 (контроль)	0.020±	–	0.17±	0.031±	–	0.49±	0.042±	–	0.59±
	0.001		0.01	0.002		0.02	0.003		0.03
ХТЗ-40 + <i>L</i> -АК	0.017±	–15.0	0.20±	0.032±	+3.2	0.79±	0.045±	+7.1	0.71±
	0.001		0.01	0.002		0.05	0.003		0.04
ХТЗ-40 + <i>D</i> -АК	0.021±	+5.0	0.50±	0.038±	+22.6	0.86±	0.049±	+16.7	0.81±
	0.001		0.02	0.002		0.06	0.003		0.05

* – $[-\text{NH}_2]/[\text{АК}] = 1.0$ осново-моль/моль

Обнаружена также достоверная стимуляция роста водорослей в присутствии хиральных солей ХТЗ-40 + (*L*-)*D*-АК по сравнению с исходным солевым комплексом ХТЗ-40 (таблица 3.21). При этом, наибольшее биостимулирующее действие (ΔI , %) на фотосинтетическую активность и рост ценобий *S. quadricauda* в процессе альготестирования проявил *D*-аскорбат ХТЗ. Уместно отметить, что разные ростовые характеристики тест-культуры зеленой водоросли *S. pyrenoidosa* в присутствии диастереомерных аддуктов ХТЗ·(*S*-)дихлорпроп и ХТЗ·(*R*-)дихлорпроп зафиксировали авторы [59].

На следующем этапе проведена оценка росторегулирующего действия солевых комплексов ХТЗ-40·*L*-(*D*-)АК и ХТЗ-200·*L*-(*D*-)АК при проращивании тест-семян *Linum usitatissimum* в модифицированном почвогрунте в условиях этиолирования (рост всходов тест-растений в темноте) [223]. Модификацию почвогрунта (100 см³) осуществляли внесением 10 г сухого порошка соответствующей комплексной соли. Результаты опытов с высшими растениями показывают, что прямое внесение в почвогрунт хиральных солей ХТЗ благоприятно влияет на всхожесть тест-семян в стрессовых условиях, индуцированных отсутствием освещения (рисунок 3.52).



Рисунок 3.52. Фотографии контейнеров со всходами и значения всхожести тест-семян на 7-е сутки проращивания в исходном и модифицированном ХТЗ-40·L-(D-)АК и ХТЗ-200·L-(D-)АК почвогрунте в условиях этиолирования, $[-\text{NH}_2]/[\text{АК}] = 1.0$ осново-моль/моль.

Количество всходов тест-семян в модифицированном почвогрунте больше, чем в исходном. Наибольшая биостимулирующая активность по сравнению с контролем проявилась в почвогрунте, модифицированном ХТЗ-40·D-АК (95±5%). При сравнении влияния диастереомерной формы хирального лиганда на всхожесть тест-семян в модифицированном почвогрунте можно констатировать, что D-аскорбаты ХТЗ проявляют более выраженное биостимулирующее действие, чем L-аскорбаты ХТЗ.

Таким образом, в результате микробиологического исследования *in vitro* установлено, что гомохиральные D-аскорбаты ХТЗ по сравнению с гетерохиральными L-аскорбатами ХТЗ обладают более высокой антибактериальной активностью, оказывая деструктивное воздействие на клеточные стенки патогенных и условно-патогенных бактерий, входящих в спектр возбудителей раневых инфекционных осложнений. Оценка жизнеспособности *in vitro* клеток НДЧФ показала отсутствие цитотоксичности исследуемых хиральных солей и глицерогидрогелей на их основе. Однократная обработка *in vivo* ожоговой и резаной ран у лабораторных животных кремнийхитозансодержащими глицерогидрогелями оказывает статистически значимое снижение сроков восстановления по сравнению с традиционным лекарственным препаратом. При этом, наиболее эффективными оказалась солевая форма ХТЗ с D-изомерным лигандом.

Биотестирование *in vitro* L- и D-аскорбатов ХТЗ на примере низших (*S. quadricauda*) и высших растений (*Linum usitatissimum*) также выявило наилучшее ростостимулирующее действие для гомохиральных солевых комплексов D-аминоглюкан–D-АК на основе низкомолекулярного ХТЗ-40. Проведенные эксперименты на широком круге биообъектов указывают на высокую регуляторную роль гомохиральности солевой формы хитозана в биологической функциональности получаемых материалов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено комплексное исследование взаимодействия хитозана с *L*-аскорбиновой кислотой и ее *D*-диастереомером, используемых в качестве донора протона при формировании изомерных солевых комплексов полимер–кислота. Оценены конформационные особенности макроцепей и построенных из них надмолекулярных структур, хирооптические и сорбционно-диффузионные свойства, стереоспецифические характеристики и биологическая функциональность *L*- и *D*-аскорбата хитозана.

1. Установлено, что взаимодействие *D*-глюкана с *L*-(*D*-)аскорбиновой кислотой в водной среде протекает с переносом протона кислоты на аминогруппу полимера и образованием диастереомерных солевых комплексов между макромолекулами протонированного хитозана и аскорбат-анионами. При этом взаимодействие *D*-глюкана с *D*-изомером кислоты с формированием гомохиральных (*D*–*D*)-солей энергетически и стерически более выгодно.

2. Структура и пространственное упорядочение изомерных солей *L*-(*D*-)аскорбата хитозана определяются стереоконфигурацией хирального лиганда. Гомохиральные (*D*–*D*)-соли в отличие от гетерохиральных (*D*–*L*)-солей характеризуются меньшим количеством кристаллизационной воды, высокой степенью кристалличности и более уплотненной надмолекулярной структурой с развитой системой меж- и внутримолекулярных контактов.

3. Кинетические параметры сорбции паров воды (как и результаты п. 2) свидетельствуют о более плотной структуре солевых комплексов *D*-аскорбата хитозана. Изотермы сорбции порошков хиральных солей *S*-образны и удовлетворительно аппроксимируются термическим уравнением сорбции и суперпозицией изотерм Ленгмюра и Флори–Хаггинса. Абсолютные значения энергии Гиббса смешения, термодинамическое сродство компонентов и устойчивость системы хиральная соль + вода увеличиваются в ряду (*D*–*D*) → (*D*–*L*)-солей.

4. Стереои́зомерия кислотного остатка отражается на хирооптических эффектах *L*-(*D*-)аскорбата хитозана. Растворы диастереобогащенных солей различаются значениями молярной эллиптичности эффекта Коттона ($\pi \rightarrow \pi^*$ переход), длиной волны максимума дихроичной полосы в УФ-области спектра и параметрами дисперсии оптического вращения в видимой. При стереоспецифической кристаллизации *L*-аскорбата хитозана в среде *L*-ментола

образуются оптически анизотропные фибриллярные структуры, *D*-аскорбата хитозана – плотно упакованные конфокальные домены близкой к сферической формы.

5. Обнаружено влияние изомерной формы кислоты на вискозиметрические параметры (*D-L*) и (*D-D*)-солей, гидродинамический объем макромолекул и проявление ими полиэлектролитных свойств. В водных растворах хитозана в *L*- и *D*-аскорбиновой кислоты при одинаковом значении рН и ионной силы наиболее разбухшие клубки реализуются для (*D-D*)-солевых комплексов, что соответствует предположению формирования гомохирального комплекса с более высокой степенью переноса заряда.

6. Концентрированные растворы *D*-аскорбата хитозана, в сравнении с *L*-диастереомерным комплексом, демонстрируют меньшие значения вязкости и оказывают замедляющее действие на процесс поликонденсации силанола при формировании органо-неорганических глицерогидрогелевых систем. При этом превышение эквимольного соотношения соль хитозана/гелеобразователь повышает прочность взаимопроникающих гибридных сеток, плотность ассоциатов конденсированной фазы и положительный поверхностный заряд формируемых структур.

7. Сравнительный анализ биологической активности изомерных солей хитозана на широком круге биообъектов (культуры клеток, бактериальные микроорганизмы, животные модели, тест-растения) показал, что во всех случаях наиболее эффективное биологическое действие проявляют (*D-D*)-солевые комплексы полимер-кислота. Полученные результаты позволяют выдвинуть гипотезу, что принципам функциональной организации биообъектов наиболее отвечают гомохиральные соли *D*-глюкан–*D*-кислота.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Сокращения

- ХТЗ-40(-60, -200) – хитозан со средневязкостной молекулярной массой 40, 60 или 200 кДа
- L -(D -)АК – L - или D -аскорбиновая кислота
- ХТЗ + L -(D -)АК – раствор L - или D -аскорбата хитозана
- ХТЗ· L -(D -)АК – соль L - или D -аскорбата хитозана
- (D - D) – гомохиральный солевой комплекс D -глюкан · D -АК
- (D - L) – гетерохиральный солевой комплекс D -глюкан · L -АК
- $\text{Si}(\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_3)_4 \cdot 3 \text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ – тетраглицеролаты кремния в 3-х мольном избытке глицерина
- $\text{Si}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_4$ – тетраэтоксилан (ТЭОС)
- ГК – гликолевая кислота
- L -(D -)АМК – L - или D -аминокислота
- L -(D -)Cys – L - или D -цистеин
- GNSs и GQDs – графеновые нанолиты и квантовые точки
- МЦК – микрокристаллическая целлюлоза
- ВЕТ – модель полимолекулярной сорбции Брунауэра–Эммета–Теллера
- GAB – модель полимолекулярной локализованной сорбции Гуггенхайма–Андерсона–де'Бера
- TES – термическое уравнение сорбции
- КД и ДОВ – круговой дихроизм и дисперсия оптического вращения
- УФ и ИК – ультрафиолетовая и инфракрасная спектроскопия
- НПВО – метод нарушенного полного внутреннего отражения
- ЯМР – ядерная магнитная резонансная спектроскопия
- 2D [^1H ^{13}C] HSQC – гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия
- 2D [^1H ^1H] ROESY – гомоядерная спектроскопия эффекта Оверхаузера с вращающейся рамкой
- ЭА и РСА – элементный и рентгеноструктурный анализ
- ТГА – термогравиметрический анализ
- СЭМ – сканирующая электронная микроскопия
- ТЭМ – трансмиссионная (просвечивающая) электронная микроскопия
- ПОМ – поляризационная оптическая микроскопия

НЧДФ – нормальные человеческие дермальные фибробласты

ИЛ-1 β , ФНО- α – провоспалительные цитокины: интерлейкин и фактор некроза опухоли

Условные обозначения

\bar{M}_η – средневязкостная молекулярная масса, кДа

СД – степень деацетилирования, мольн. %

$\text{p}K_a$ – отрицательный десятичный логарифм константы диссоциации

pH – показатель кислотности среды

n_D^{25} – показатель преломления среды

I – ионная сила растворяющей среды, мМ

$C_{\text{АК}}$ – концентрация аскорбиновой кислоты, М

$C_{\text{ХТЗ}}$ – концентрация хитозана, мас. % (г/дл)

C_{Si} – концентрация кремния, мас. %

$C_{\text{ХТЗ}}/C_{\text{Si}}$ – массовое соотношение темплат/прекурсор

ΔH – теплота растворения, кДж/моль

$c_{\text{H}_2\text{O}}$ – теплоемкость воды, 4.2 Дж/(г·К)

K_H – постоянная калориметра, Дж/К

α' – степень протонирования, мольн. %

A – пропускание, отн. ед.

ν – волновое число, см^{-1}

δ – химический сдвиг, м.д.

χ – степень кристалличности, %

2θ – угол дифракции, град

d – межплоскостное расстояние в кристаллической решётке, Å

p/p_s – относительное давление водяного пара

p_s – давление насыщенного пара воды, 2.31 кПа

W_t и W_{eq} – текущая и максимально достижимая степени сорбции, г/г

W_m – максимальное количество вещества в монослое, г/г

a_0 – предельная величина сорбции, г/г

ϕ – объемная доля сорбированной воды

ω_1 и ω_2 – массовая доля растворителя и полимера в системе

n – параметр массопереноса уравнения Шотта

V_s – скорость сорбции, г/с

K_s – константа сорбционного равновесия, Па^{-1}

K_n – специфическая константа сорбции, ч^{-n}

χ_{12} – параметр парного взаимодействия Хаггинса

E – характеристическая энергия сорбции, Дж/моль

$\Delta\mu_1$ и $\Delta\mu_2$ – разность химических потенциалов растворителя и полимера, Дж/моль

$\Delta\bar{G}_{\text{СМ}}$ – средняя свободная энергия смешения Гиббса, Дж/г

λ – длина волны, нм (\AA)

l – длина оптического пути, дм

ε – коэффициент экстинкции (молярного поглощения), л/моль·см

$[\alpha]_{\lambda, \text{нм}}^{25^\circ\text{C}}$ – оптическая активность, град·мл/дм·г

$[\theta]_{\lambda, \text{нм}}^{25^\circ\text{C}}$ – удельная эллиптичность, град·мл/дм·г

K и λ_0 – вращательная и дисперсионная константы уравнения Друде

$\eta_{\text{уд}}/C_{\text{ХТЗ}}$ – число вязкости, дл/г

$[\eta]$ – предельное число вязкости, дл/г

θ – растворитель

$\langle R_G \rangle$ и l_p – радиус инерции и персистентная длина, нм

k_X и B – константы Хаггинса и Фуосса

δ_T – температурный коэффициент предельного числа вязкости, K^{-1}

η – вязкость, Па·с

τ и τ_K – напряжение сдвига и предел прочности, дПа

C^* и C_e – концентрации кроссовера и образования флуктуационной сетки зацеплений, мас.%

G' и G'' – модули упругости и потерь, Па

$t_{\text{гел}}$ – время гелеобразования, сут

ζ – потенциал поверхности, мВ

d_i и d_0 – диаметры зон подавления роста тест-культуры раствором и стандартным препаратом, соответственно, мм

A_i – относительная антибактериальная активность, %

S_0 и S_t , P_0 и P_t – площадь и периметр раневой поверхности при предшествующем измерении и через промежуток времени t , мм^2 , мм

ΔS – убыль площади раневой поверхности, %

V – средняя линейная скорость заживления, мм/сут

ΔI – относительная флуоресценция, %

r_i^2 – коэффициент корреляции

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Petroni S., Tagliaro I., Antonini C., D'Arienzo M., Orsini S.F. Chitosan-based biomaterials: insights into chemistry, properties, devices, and their biomedical applications // *Marine drugs*. – 2023. – Vol. 21. – No 3. – P. 147.
2. Boamah P.O., Onumah J., Aduguba W.O., Santo K.G. Application of depolymerized chitosan in crop production: A review // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2023. – Vol. 235. – P. 123858.
3. Mohebbi S., Nezhad M.N., Zarrintaj P., Jafari S.H., Gholizadeh S.S., Saeb M.R., Mozafari M. Chitosan in biomedical engineering: a critical review // *Curr. Stem. Cell. Res. Ther.* – 2019. – Vol. 14. – No 2. – P. 93-116.
4. Edo G.I., Yousif E., Al-Mashhadani M.H. Chitosan: An overview of biological activities, derivatives, properties, and current advancements in biomedical applications // *Carbohydr. Res.* – 2024. – P. 109199.
5. Kluczka J. Chitosan: structural and chemical modification, properties, and application // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – Vol. 25. – No 1. – P. 554.
6. Kou S.G., Peters L., Mucalo M. Chitosan: A review of molecular structure, bioactivities and interactions with the human body and micro-organisms // *Carbohydr. Polym.* – 2022. – Vol. 282. – P. 119132.
7. Aranaz I., Navarro-García F., Morri M., Acosta N., Casettari L., Heras A. Evaluation of chitosan salt properties in the production of AgNPs materials with antibacterial activity // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2023. – T. 235. – P. 123849.
8. Kildeeva N.R., Belokon M.A., Sazhnev N.A., Chalykh A.E., Petrova T.F., Matveev V.V., Svidchenko E.A., Surin N.M. Influence of genipin crosslinking on the properties of chitosan-based films // *Polymers*. – 2020. – Vol. 12. – No 5. – P. 1086.
9. Gabriele F., Donnadio A., Casciola M., Germani R. Ionic and covalent crosslinking in chitosan-succinic acid membranes: Effect on physicochemical properties // *Carbohydr. Polym.* – 2021. – Vol. 251. – P. 117106.
10. Carrera C., Bengoechea C., Carrillo F. Effect of deacetylation degree and molecular weight on surface properties of chitosan obtained from biowastes // *Food Hydrocoll.* – 2023. – Vol. 137. – P. 108383.
11. Namli S., Guven O., Simsek F.N., Gradišek A., Sumnu G., Yener M.E. Effects of deacetylation degree of chitosan on the structure of aerogels // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2023. – Vol. 250. – P. 126123.
12. Romany A., Payne G.F., Shen J. Effect of acetylation on the nanofibril formation of chitosan from all-atom *de novo* self-assembly simulations // *Molecules*. – 2024. – Vol. 29. – No 3. – P. 561.

13. Weißpflog J., Vehlow D., Müller M., Kohn B., Scheler U., Boye S., Schwarz S. Characterization of chitosan with different degree of deacetylation and equal viscosity in dissolved and solid state—insights by various complimentary methods // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2021. – Vol. 171. – P. 242-261.
14. Hamedi H., Moradi S., Hudson S.M., Tonelli A. Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review // *Carbohydr. Polym.* – 2018. – Vol. 199. – P. 445-460.
15. Pellá M.G., Lima-Tenorio M.K., Tenorio-Neto E.T., Guilherme M.R., Chitosan-based hydrogels: From preparation to biomedical applications // *Carbohydr. Polym.* – 2018. – Vol. 196. – P. 233-245.
16. Sacco P., Pedroso-Santana S., Kumar Y., Joly N., Martin P., Bocchetta P. Ionotropic gelation of chitosan flat structures and potential applications // *Molecules.* – 2021. – Vol. 26. – No 3. – P. 660.
17. Tang W., Wang J., Hou H., Li Y., Wang J., Fu J., Tan H. Application of chitosan and its derivatives in medical materials // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2023. – Vol. 240. – C. 124398.
18. Rufato K.B., Galdino J.P., Ody K.S., Pereira A.G., Corradini E. Hydrogels based on chitosan and chitosan derivatives for biomedical applications // *Hydrogels-Smart Mater. Biomed. Appl.* – Intechopen. – 2018.
19. Духанина Е.Г., Дрябина С.С., Быков Д.С., Богданова Т.П., Шулевич Ю.В., Новаков И.А. Изучение гидродинамических свойств хитозана в бинарных растворах уксусная кислота-вода // *Изв. Волгоград. ГУ.* – 2023. – № 12(283). – С. 106-112.
20. Кулиш Е.И., Лаздин Р.Ю., Шуршина А.С., Колесов С.В., Захарова Е.М., Захаров В.П. Структурообразование как способ формирования физико-механических характеристик пленок, полученных из водных растворов некоторых полисахаридов // *Высокомолек. соед. Сер. А.* – 2021. – Т. 63. – № 1. – С. 57-65.
21. Giraldo J.D., Rivas B.L. Direct ionization and solubility of chitosan in aqueous solutions with acetic acid // *Polym. Bul.* – 2021. – Vol. 78. – P. 1465-1488.
22. Shurshina S.A., Mukhamedyarov N.T., Kuzina G.L., Lazdina Y.M., Kulish I.E. The possibility of using dibasic acids as regulators of chitosan transport properties // *Macromol. Res.* – 2023. – Vol. 31. – No 9. – P. 863-871.
23. de Souza Soares L., Perim R.B., de Alvarenga E.S., de Moura Guimarães L., de Carvalho Teixeira A.V.N., dos Reis Coimbra J.S. Insights on physicochemical aspects of chitosan dispersion in aqueous solutions of acetic, glycolic, propionic or lactic acid // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2019. – Vol. 128. – P. 140-148.

24. Бабичева Т.С., Шиповская А.Б. Вязкостные свойства растворов хитозана в гликолевой кислоте // Изв. Сарат. ун. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2020. – Т. 20. – № 2. – С. 170-177.
25. Бабунова М.В., Чернова В.В., Лаздин Р.Ю., Захаров В.П., Кулиш Е.И. Изучение вязкостных характеристик растворов хитозана в присутствии органических соразтворителей // Химическая физика. – 2018. – Т. 37. – № 12. – С. 51-57.
26. Lugovitskaya T.N., Shipovskaya A.B., Shmakov S.L., Shipenok X.M. Formation, structure, properties of chitosan aspartate and metastable state of its solutions for obtaining nanoparticles // Carbohydr. Polym. – 2022. – Vol. 277. – С. 118773.
27. Шипенко К.М., Шиповская А.Б. Структура и надмолекулярное упорядочение *L*- и *D*-аспарагината хитозана // Изв. Сарат. ун. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2023. – Т. 23. – № 4. – С. 411-425.
28. Shipovskaya A.B., Shipenok X.M., Lugovitskaya T.N., Babicheva T.S. Self-assembling nano-and microparticles of chitosan *L*-and *D*-aspartate: preparation, structure, and biological activity // Mater. Proc. – 2023. – Vol. 14. – No 1. – P. 31-38.
29. Kumaraswamy R.V., Kumari S., Choudhary R.C., Sharma S.S. Salicylic acid functionalized chitosan nanoparticle: a sustainable biostimulant for plant // Int. J. Biol. Macromol. – 2019. – Vol. 123. – P. 59-69.
30. Luo S., Man H., Jia X., Li Y., Pan A., Zhang X. Preparation and characterization of acetylsalicylic acid/chitosan nanoparticles and its antithrombotic effects // Designed monomers and polymers. – 2018. – Vol. 21. – No 1. – P. 172-181.
31. Hu F., Sun T., Xie J., Xue B., Li X., Gan, J., Shao Z. Functional properties of chitosan films with conjugated or incorporated salicylic acid // J. Mol. Struct. – 2021. – Vol. 1223. – P. 129237.
32. Pereira A.E.S., Sandoval-Herrera I., Zavala-Betancourt S.A., Oliveira H.C., Ledezma-Pérez A, Romero-García J. γ -Polyglutamic acid/chitosan nanoparticles for the plant growth regulator gibberellic acid: Characterization and evaluation of biological activity // Carbohydr. Polym. – 2017. – Vol. 157. – P. 1862-1873.
33. Баклагина Ю.Г., Клечковская В.В., Кононова С.В., Петрова В.А., Пошина Д.Н., Орехов А.С., Скорик Ю.А. Полиморфные модификации хитозана // Кристаллография. – 2018. – Т. 63. – № 3. – С. 341-352.
34. Naito P.K. Ogawa Y., Kimura S., Iwata T., Wada M. Crystal transition from hydrated chitosan and chitosan/monocarboxylic acid complex to anhydrous chitosan investigated by X-ray diffraction // J. Polym. Sci. B: Polym. Phys. – 2015. – Vol. 53. – No 15. – P. 1065-1069.

35. Zhang W., Jiang Q., Shen J., Gao P., Yu D. The role of organic acid structures in changes of physicochemical and antioxidant properties of crosslinked chitosan films // *Food Packag. Shelf Life.* – 2022. – Vol. 31. – P. 100792.
36. Бочек А.М., Забивалова Н.М., Попова Е.Н., Лебедева М.Ф., Лаврентьев В.К., Юдин В.Е. Влияние природы кислоты на свойства растворов смесей метилцеллюлозы с хитозаном и композиционных пленок на их основе // *Высокомолек. соед. Сер. А.* – 2021. – Т. 63. – № 1. – С. 66-80.
37. Qiao C., Ma X., Wang X., Liu L. Structure and properties of chitosan films: Effect of the type of solvent acid // *LWT.* – 2021. – Vol. 135. – P. 109984.
38. Pavoni J.M.F., Luchese C.L., Tessaro I.C. Impact of acid type for chitosan dissolution on the characteristics and biodegradability of cornstarch/chitosan based films // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2019. – Vol. 138. – P. 693-703.
39. Davydova V.N., Yermak I.M. The conformation of chitosan molecules in aqueous solutions // *Biophysics.* – 2018. – Vol. 63. – P. 501-511.
40. Rinaudo M. Physicochemical behaviour of semi-rigid biopolymers in aqueous medium // *Food Hydrocoll.* – 2017. – Vol. 68. – P. 122-127.
41. Chalykh A.E., Bardyshev I.I., Petrova T.F. Free volume and water sorption by cellulose esters // *Polymers.* – 2021. – Vol. 13. – No 16. – P. 2644.
42. Dresvyanina E.N., Grebennikov S.F., Elokhovskii V.Yu., Dobrovol'skaya I.P., Ivan'kova E.M., Yudin V.E., Heppe K., Morganti P. Thermodynamics of interaction between water and the composite films based on chitosan and chitin nanofibrils // *Carbohydr. Polym.* – 2020. – Vol. 245. – P. 116552.
43. Endres M.B., Weichold O. Sorption-active transparent films based on chitosan // *Carbohydr. Polym.* – 2019. – Vol. 208. – P. 108-114.
44. Ma B., Bianco A. Regulation of biological processes by intrinsically chiral engineered materials // *Nature Rev. Mater.* – 2023. – Vol. 8. – No 6. – P. 403-413.
45. Tverdislov V.A., Malyshko E.V. Chiral dualism as an instrument of hierarchical structure formation in molecular biology // *Symmetry.* – 2020. – Vol. 12. – No 4. – P. 587.
46. Mabrouk M., Hammad A.A., Abdella F.R. Enantioselective chitosan-based racemic ketoprofen imprinted polymer: chiral recognition and resolution study // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2022. – Vol. 200. – P. 327-334.
47. Shipovskaya A.B., Shmakov S.L., Gegel N.O. Optical activity anisotropy of chitosan-based films // *Carbohydr. Polym.* – 2019. – Vol. 206. – P. 476-486.
48. Шиповская А.Б., Руденко Д.А., Шмаков С.Л., Гегель Н.О. Анизотропия оптической активности тонких пленок *L*- и *D*-аскорбата хитозана // *Науч.-техн. вед. СПбГПУ. Физ.-мат. науки.* 2023. – Т. 16. – № 32. – С. 301-306.

49. Xie S.M., Yuan L.M. Recent development trends for chiral stationary phases based on chitosan derivatives, cyclofructan derivatives and chiral porous materials in high performance liquid chromatography // *J. Sep. Sci.* – 2019. – Vol. 42. – No 1. – P. 6-20.
50. Tsioupi D.A., Stefan-vanStaden R.I., Kapnissi-Christodoulou C.P. Chiral selectors in CE: Recent developments and applications // *Electrophoresis.* – 2013. – Vol. 34. – No 1. – P. 178-204.
51. Rezgui S., Amrane A., Fourcade F., Assadi A., Monser L., Adhoum N. Electro-Fenton catalyzed with magnetic chitosan beads for the removal of Chlordimeform insecticide // *Appl. Catal. B: Environ.* – 2018. – Vol. 226. – P. 346-359.
52. El Kadib A. Chitosan as a sustainable organocatalyst: a concise overview // *ChemSusChem.* – 2015. – Vol. 8. – No 2. – P. 217-244.
53. Liu C., Dong C., Liu S., Yang Y., Zhang Z. Multiple chiroptical switches and logic circuit based on salicyl-imine-chitosan hydrogel // *Carbohydr. Polym.* – 2021. – Vol. 257. – P. 117534.
54. Singh S., Kumar S., Koh J. Physicochemical and optical activity of chitosan based ternary nanocomposites for food packaging applications // *J. Mol. Struct.* – 2024. – Vol. 1311. – P. 138210.
55. Lermontov S.A., Sipyagina N.A., Malkova A.N., Baranchikov A.E., Ivanov V.K. Chiral lactate-modified silica aerogels // *Microporous Mesoporous Mater.* – 2017. – Vol. 237. – P. 127-131.
56. Шиповская А.Б., Фомина В.И., Казмичева О.Ф., Тимофеева Г.Н., Комаров Б.А. Влияние молекулярной массы на оптическую активность хитозана // *Высокомолек. соед. Сер. Б.* – 2007. – Т. 49. – № 12. – С. 2195-2199.
57. Шиповская А.Б., Малинкина О.Н., Фомина В.И., Руденко Д.А., Щеголев С.Ю. Оптическая активность растворов и пленок ацетата хитозана // *Изв. АН. Сер. хим.* – 2015. – № 5. – С. 1172-1172.
58. Шиповская А.Б., Фомина В.И., Казмичева О.Ф., Руденко Д.А., Малинкина О.Н. Оптическая активность пленок хитозана разной молекулярной массы и модификации // *Высокомолек. соед. Сер. А.* – 2017. – Т. 59. – № 3. – С. 250-261.
59. Wen Y., Yuan Yu., Chen H., Xu D., Lin K., Liu W. Effect of chitosan on the enantioselective bioavailability of the herbicide dichlorprop to *Chlorella pyrenoidosa* // *Env. Sci. Technol.* – 2010. – Vol. 44. – No 13. – P. 4981-4987.
60. Schneider H.J. Chemomechanical gels-actuators and sensors., in: Schneider H.J. (Ed.), *Chemoresponsive Materials*. RSC Publishing, Cambridge. – 2015. – P. 44-66.
61. Mustafa F.H.A., El Rab Kh.M.G., Kamel R.M., Elshaarawy R.F.M. Cost-effective removal of toxic methylene blue dye from textile effluents by new integrated

crosslinked chitosan/aspartic acid hydrogels // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2023. – Vol. 248. – P. 125986.

62. Ашуров Н.Ш., Югай С.М., Шахобутдинов С.Ш., Кулумбетов А.С., Атаханов А.А. Физикохимические исследования структуры наночастиц хитозана и аскорбат хитозана // *Изв. АН. Сер. хим.* – 2022. – Т. 2. – С. 227-231.

63. Sekar V., Rajendran K., Vallinayagam S., Deepak V., Mahadevan S. Synthesis and characterization of chitosan ascorbate nanoparticles for therapeutic inhibition for cervical cancer and their *in silico* modeling // *J. Ind. Eng. Chem.* – 2018. – Vol. 62. – P. 239-249.

64. Rossi S., Vigani B., Puccio A., Sandri G., Ferrari F. Chitosan ascorbate nanoparticles for the vaginal delivery of antibiotic drugs in atrophic vaginitis // *Marine Drugs.* – 2017. – Vol. 15. – No 10. – P. 319.

65. Elshoky H.A., Salaheldin T.A., Ali M.A., Gaber M.H. Ascorbic acid prevents cellular uptake and improves biocompatibility of chitosan nanoparticles // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – Vol. 115. – P. 358-366.

66. Brignone S.G., Tampucci S., Maletto B.A., Allemandi D.A., Chetoni P., Palma S.D. Self-assembled structures of ascorbic acid derivatives: encapsulation properties and controlled drug delivery applications // *Expert Opinion on Drug Delivery.* – 2025. – P. 1-18.

67. Augustine R., Dan P., Schlachet I., Rouxel D., Menu P., Sosnik A. Chitosan ascorbate hydrogel improves water uptake capacity and cell adhesion of electrospun poly (epsilon-caprolactone) membranes // *Int. J. Pharm.* – 2019. – Vol. 559. – P. 420-426.

68. Tsujikawa T., Kanauchi O., Andoh A., Saotome T., Sasaki M., Fujiyama Y., Bamba T. Supplement of a chitosan and ascorbic acid mixture for Crohn's disease: a pilot study // *Nutrition.* – 2003. – Vol. 19. – № 2. – P. 137-139.

69. Liu J., Pu H., Zhang X., Xiao L., Kan J., Jin C. Effects of ascorbate and hydroxyl radical degradations on the structural, physicochemical, antioxidant and film forming properties of chitosan // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – Vol. 114. – P. 1086-1093.

70. Liu X., Ren J., Zhu Y., Han W., Xuan H., Ge L. The preservation effect of ascorbic acid and calcium chloride modified chitosan coating on fresh-cut apples at room temperature // *Colloids Surf. A.* – 2016. – Vol. 502. – P. 102-106.

71. Özdemir K. S., Gökmen V. Extending the shelf-life of pomegranate arils with chitosan-ascorbic acid coating // *LWT.* – 2017. – Vol. 76. – P. 172-180.

72. Tan W., Zhang J., Zhao X., Li Q., Dong F. Preparation and physicochemical properties of antioxidant chitosan ascorbate/methylcellulose composite films // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2020. – Vol. 146. – P. 53-61.

73. Tan W., Dong F., Zhang J., Zhao X., Li Q., Guo Z. Physical and antioxidant properties of edible chitosan ascorbate films // *J. Agricult. Food Chem.* – 2019. – Vol. 67. – No 9. – P. 2530-2539.

74. Fidler M.C., Davidsson L., Zeder C., Hurrell R.F. Erythorbic acid is a potent enhancer of nonheme-iron absorption // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2004. – Vol. 79. – No 1. – P. 99-102.
75. Ambrosi M., Nostro P.L., Fratini E., Giustini L., Ninham B.W. Effect of headgroup chirality in nanoassemblies. Part 1. Self-assembly of *D*-isoascorbic acid derivatives in water // *J. Phys. Chem. B.* – 2009. – Vol. 113. – No 5. – P. 1404-1412.
76. Philippova O.E., Volkov E.V., Sitnikova N.L., Khokhlov A.R., Desbrieres J., Rinaudo M. Two types of hydrophobic aggregates in aqueous solutions of chitosan and its hydrophobic derivative // *Biomacromol.* – 2001. – Vol. 2. – No 2. – P. 483-490.
77. Berth G., Dautzenberg H. The degree of acetylation of chitosans and its effect on the chain conformation in aqueous solution // *Carbohydr. Polym.* – 2002. – Vol. 47. – No 1. – P. 39-51.
78. Franca E.F., Lins R.D., Freitas L.C., Straatsma T.P. Characterization of chitin and chitosan molecular structure in aqueous solution // *J. Chem. Theory Comp.* – 2008. – Vol. 4. – No 12. – P. 2141-2149.
79. Franca E.F., Freitas L.C.G., Lins R.D. Chitosan molecular structure as a function of N-acetylation // *Biopolymers.* – 2011. – Vol. 95. – № 7. – P. 448-460.
80. Okuyama K., Noguchi K, Kanenari M, Osawa K, Ogawa K. Structural diversity of chitosan and its complexes // *Carbohydr. Polym.* – 2000. – Vol. 41. – No 3. – P. 237-247.
81. Ogawa K., Yui T., Okuyama K. Three D structures of chitosan // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2004. – Vol. 34. – No 1-2. – P. 1-8.
82. Liu N., Chen X.G., Park H.J., Liu C.-G., Liu C., Meng X., Yu L. Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli* // *Carbohydr. Polym.* – 2006. – Vol. 64. – № 1. – C. 60-65.
83. Qun G., Ajun W. Effects of molecular weight, degree of acetylation and ionic strength on surface tension of chitosan in dilute solution // *Carbohydr. Polym.* – 2006. – Vol. 64. – No 1. – P. 29-36.
84. Kasaai M.R., Arul J., Charlet G. Intrinsic viscosity–molecular weight relationship for chitosan // *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Physics.* – 2000. – Vol. 38. – No 19. – P. 2591-2598.
85. Dos Santos Z.M., Caroni A.L.P.F., Pereira M.R., da Silva D.R., Fonseca J.L.C. Determination of deacetylation degree of chitosan: a comparison between conductometric titration and CHN elemental analysis // *Carbohydr. Res.* – 2009. – Vol. 344. – No 18. – P. 2591-2595.
86. Chen R.H., Lin W.C., Lin J.H. Effects of pH, ionic strength, and type of anion on the rheological properties of chitosan solutions // *Acta polymerica.* – 1994. – Vol. 45. – No 1. – P. 41-46.

87. Desbrieres J. Viscosity of semiflexible chitosan solutions: Influence of concentration, temperature, and role of intermolecular interactions // *Biomacromol.* – 2002. – Vol. 3. – No 2. – P. 342-349.
88. Cho J., Heuzey M.C., Bégin A., Carreau P.J. Viscoelastic properties of chitosan solutions: Effect of concentration and ionic strength // *J. Food Eng.* – 2006. – Vol. 74. – No 4. – P. 500-515.
89. Fan M., Hu Q., Shen K. Preparation and structure of chitosan soluble in wide pH range // *Carbohydr. Polym.* – 2009. – Vol. 78. – No 1. – P. 66-71.
90. Cataldo S., Crea F., Gianguzza A., Pettignano A., Piazzese D. Solubility and acid-base properties and activity coefficients of chitosan in different ionic media and at different ionic strengths, at T= 25 C // *J. Mol. Liq.* – 2009. – Vol. 148. – No 2-3. – P. 120-126.
91. Eich A., Wolf B.A. Intrinsic viscosities of polyelectrolytes: determination and modeling of the effects of extra salt // *ChemPhysChem.* – 2011. – Vol. 12. – No 15. – P. 2786-2790.
92. Costa C.N., Teixeira V.G., Delpech M.C., Souza J.V.S., Costa M.A. Viscometric study of chitosan solutions in acetic acid/sodium acetate and acetic acid/sodium chloride // *Carbohydr. Polym.* – 2015. – Vol. 133. – P. 245-250.
93. Demarger-Andre S., Domard A. Chitosan carboxylic acid salts in solution and in the solid state // *Carbohydr. Polym.* – 1994. – Vol. 23. – No 3. – P. 211-219.
94. Kawada J., Yui T., Okuyama K., Ogawa, K. Crystalline behavior of chitosan organic acid salts // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2001. – Vol. 65. – No 11. – P. 2542-2547.
95. Kawahara M., Yui T., Oka K., Zugenmaier P., Suzuki S., Kitamura S., Ogawa K. Fourth 3D structure of the chitosan molecule: Conformation of chitosan in its salts with medical organic acids having a phenyl group // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2003. – Vol. 67. – No 7. – P. 1545-1550.
96. Hamdine M., Heuzey M.C., Bégin A. Effect of organic and inorganic acids on concentrated chitosan solutions and gels // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2005. – Vol. 37. – No 3. – P. 134-142.
97. Pigaleva M.A., Portnov I.V., Rudov A.A., Blagodatskikh I.V., Grigoriev T.E., Gallyamov M.O., Potemkin I.I. Stabilization of chitosan aggregates at the nanoscale in solutions in carbonic acid // *Macromol.* – 2014. – Vol. 47. – No 16. – P. 5749-5758.
98. Shamov M.V., Bratskaya S.Y., Avramenko V.A. Interaction of carboxylic acids with chitosan: effect of pK and hydrocarbon chain length // *J. Colloid Interface Sci.* – 2002. – Vol. 249. – No 2. – P. 316-321.

99. Liu D., Wei Y., Yao P., Jiang L. Determination of the degree of acetylation of chitosan by UV spectrophotometry using dual standards // *Carbohydr. Res.* – 2006. – Vol. 341. – No 6. – С. 782-785.
100. Kumirska J., Czerwicka M., Kaczyński Z., Bychowska A., Brzozowski K., Thöming J., Stepnowski P. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan // *Marine drugs.* – 2010. – Vol. 8. – No 5. – P. 1567-1636.
101. Brugnerotto J., Lizardi J., Goyoolea F.M., Argülles-Monal W., Desbrières J., Rinaudo M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization // *Polymer.* – 2001. – Vol. 42. – P. 3569-3580.
102. Kasaai M.R. Various methods for determination of the degree of N-acetylation of chitin and chitosan: a review // *J. Agricult. Food Chem.* – 2009. – Vol. 57. – No 5. – P. 1667-1676.
103. Большаков И.Н., Сизых А.Г., Сурков Е.В., Дуреева Н.С., Шунтиков А.В. Электронные и колебательные спектры хитозана. – Изд-во ВНИРО. 2006. – С. 86-89.
104. Кучина Ю.А., Долгопятова Н.В., Новиков В.Ю., Сагайдачный В.А., Морозов Н.Н. Инструментальные методы определения степени деацетилирования хитина // *Вест. МурмГТУ.* – 2012. – Vol. 15. – No 1. – P. 107-113.
105. Rehman H.U., Cord-Landwehr S., Shapaval V., Dzurendova S., Kohler A., Moerschbacher B.M., Zimmermann B. High-throughput vibrational spectroscopy methods for determination of degree of acetylation for chitin and chitosan // *Carbohydr. Polym.* – 2023. – Vol. 302. – P. 120428.
106. Ritthidej G.C., Phaechamud T., Koizumi T. Moist heat treatment on physicochemical change of chitosan salt films // *Int. J. Pharm.* – 2002. – Vol. 232. – No 1-2. – P. 11-22.
107. Cadogan E.I., Lee C.H., Popuri S.R., Lin H.Y. Effect of solvent on physicochemical properties and antibacterial activity of chitosan membranes // *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* – 2014. – Vol. 63. – No 14. – P. 708-715.
108. Singh J., Dutta P.K. Preparation, circular dichroism induced helical conformation and optical property of chitosan acid salt complexes for biomedical applications // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2009. – Vol. 45. – No 4. – P. 384-392.
109. Singh J., Dutta P.K., Dutta J., Hunt A.J., Macquarrie D.J. Preparation and properties of highly soluble chitosan–L-glutamic acid aerogel derivative // *Carbohydr. Polym.* – 2009. – Vol. 76. – No 2. – P. 188-195.
110. Singh J., Dutta P. K. Spectroscopic and conformational study of chitosan acid salts // *J. Polym. Res.* – 2009. – Vol. 16. – P. 231-238.

111. Taghizadeh M.T., Bahadori A. Preparation, characterization and adhesive properties of di- and tri-hydroxy benzoyl chitosan nanoparticles // *Chin. J. Polym. Sci.* – 2013. – Vol. 31. – No 4. – P. 649-659.

112. Михайлов Г.П., Тучков С.В., Лазарев В.В., Кулиш Е.И. Комплексообразование хитозана с уксусной кислотой по данным Фурье-спектроскопии комбинационного рассеяния света // *ЖФХ.* – 2014. – Т. 88. – № 6. – С. 973-978.

113. Saito H., Tabeta R., Ogawa K. High-resolution solid-state C13 NMR study of chitosan and its salts with acids: conformational characterization of polymorphs and helical structures as viewed from the conformation-dependent C13 chemical shifts // *Macromol.* – 1987. – Vol. 20. – No 10. – P. 2424-2430.

114. Vårum K.M., Antohonsen M.W., Grasdalen H., Smidsrød 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 // *Carbohydr. Res.* – 1991. – Vol. 211. – No 1. – P. 17-23.

115. Kawada J., Yui T., Abe Y., Ogawa K. Crystalline features of chitosan-*L*- and *D*-lactic acid salts // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 1998. – Vol. 62. – No 4. – P. 700-704.

116. Ogawa K., Nakata K., Yamamoto A., Nitta Y., Yui T. X-ray study of chitosan *L*- and *D*-ascorbates // *Chem. Mater.* – 1996. – Vol. 8. – No 9. – P. 2349-2351.

117. Ogawa K. Crystalline behavior of chitosan // *Adv. Chitin Sci.* – 2000. – Vol. 4. – P. 324-329.

118. Yui T., Ogawa K. X-ray diffraction study of polysaccharides // *Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility.* – 2005. – P. 99-122.

119. Могилевская Е.Л., Акопова Т.А., Зеленецкий А.Н., Озерин А.Н. О кристаллической структуре хитина и хитозана // *Высокомолек. соед. Сер А.* – 2006. – Т. 48. – № 2. – С. 216-226.

120. Kobaisi M.A., Murugaraj P., Mainwaring D.E. Origin and influence of water-induced chain relaxation phenomena in chitosan biopolymers // *J. Polym. Sci. B: Polym. Phys.* – 2012. – Vol. 50. – No 6. – P. 403-414.

121. Buffington L.A., Stevens E.S. Far-ultraviolet circular dichroism of solutions, gels, and films of chitins // *J. Am. Chem. Soc.* – 1979. – Vol. 101. – No 18. – P. 5159-5162.

122. Domard A. pH and CD measurements on a fully deacetylated chitosan: application to CuII-polymer interactions // *Int. J. Biol. Macromol.* – 1987. – Vol. 9. – № 2. – P. 98-104.

123. Шиповская А.Б., Казмичева О.Ф., Тимофеева Г.Н. Дисперсия оптического вращения растворов хитозана // Сб. ст. «Структура и динамика молекулярных систем»: Уфа: Изд-во ИФМК УНЦ РАН. – 2002. – Вып. IX. – Т. 2. – С. 293-296.

124. Koralewski M., Bodek K.H., Marczewska K. Optical properties of chitosan in aqueous solution // Polish Chitin Soc. – 2006. – Vol. 4. – P. 29-39.
125. Koralewski M., Bodek K.H., Wachowski T. Temperature and metal ions influence on optical properties of chitosan in aqueous solution // Polish Chitin Soc. – 2007. – С. 79-86.
126. Shipovskaya A.B., Fomina V.I., Rudenko D.A., Shchyogolev S.Yu. Influence of physical and chemical modification on the optical rotatory dispersion and biological activity of chitosan films // Int. J. Polym. Sci. – 2013. – Vol. 2013. – No 1. – P. 825296.
127. Пениче-Ковас К., Нието Х.М., Гарсиа-Алонсо И., Фернандес-Белтран Х.Р. Влияние некоторых параметров приготовления хитозана на его характеристики // Биоорг. Хим. – 1984. – Т. 10. – № 9. – С. 1248-1252.
128. Евдокимов Ю.М., Саляев В.И. Жидкокристаллические дисперсии комплексов, образованных хитозаном с двухцепочечными нуклеиновыми кислотами // Жидкие кристаллы. – 2003. – Т. 30. – № 9. – С. 1057-1074.
129. Gegel N.O., Shipovskaya A.B. Optical activity of chitosan films with induced anisotropy // SPIE Proceed. SFM 2015: PALS. – 2016. – Vol. 9917. – P. 684-689.
130. Колчина О.С., Малинкина О.Н., Шиповская А.Б. Изучение растворения хитозана в водном растворе салициловой кислоты // Сб. тр. «Совр. пробл. теор. и exper. хим.». – 2016. – С. 79-81.
131. Li K., Green A.R., Dinges M.M., Larive C.K. ¹H NMR characterization of chitin tetrasaccharide in binary H₂O: DMSO solution: Evidence for anomeric end-effect propagation // Int. J. Biol. Macromol. – 2019. – Vol. 129. – P. 744-749.
132. Beecher C.N., Larive C.K. ¹H and ¹⁵N NMR characterization of the amine groups of heparan sulfate related glucosamine monosaccharides in aqueous solution // Anal. Chem. – 2015. – Vol. 87. – No 13. – P. 6842-6848.
133. Bosshard H.R., Marti D.N., Jelesarov I. Protein stabilization by salt bridges: concepts, experimental approaches and clarification of some misunderstandings // J. Mol. Recognit. – 2004. – Vol. 17. – No 1. – P. 1-16.
134. Cierpicki T., Otlewski J. Amide proton temperature coefficients as hydrogen bond indicators in proteins // J. Biomol. NMR. – 2001. – Vol. 21. – No 3. – P. 249-261.
135. Schatz C., Viton C., Delair T., Pichot C., Domard A. Typical physicochemical behaviors of chitosan in aqueous solution // Biomacromol. – 2003. – Vol. 4. – No 3. – P. 641-648.
136. Gamzazade A.I., Šlimak V.M., Skljar A.M., Štykova E.V., Pavlova S.S., Rogožin S.V. Investigation of the hydrodynamic properties of chitosan solutions // Acta Polymer. – 1985. – Vol. 36. – No 8. – P. 420-424.

137. Wang W., Xu D. Viscosity and flow properties of concentrated solutions of chitosan with different degrees of deacetylation // *Int. J. Biol. Macromol.* – 1994. – Vol. 16. – No 3. – P. 149-152.

138. Kasaai M.R. Calculation of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent–temperature system using experimental reported viscometric constants data // *Carbohydr. Polym.* – 2007. – Vol. 68. – No 3. – P. 477-488.

139. Кулиш Е.И., Туктарова И.Ф., Чернова В.В., Абзальдинов Х.С., Заиков Г.Е. Метод вискозиметрии как способ оценки конформационного состояния хитозана в растворе // *Вестник КазанГУ.* – 2013. – Т. 16. – № 14. – С. 140-143.

140. Lewandowska K., Sionkowska A., Grabska S., Kaczmarek B. The miscibility of collagen/hyaluronic acid/chitosan blends investigated in dilute solutions and solids // *J. Mol. Liq.* – 2016. – Vol. 220. – P. 726-730.

141. Фомина В.И., Малинкина О.Н., Гегель Н.О., Абрамов А.Ю., Шиповская А.Б. Влияние природы модифицирующей добавки на реологические свойства концентрированной системы хитозан - органическая кислота - вода // *Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер.: Химия. Биология. Экология.* – 2015. – Т. 15. – № 1. – С. 28-36.

142. Фомина В.И., Солонина Н.А., Шиповская А.Б. Ионная агрегация макромолекул как причина кинетической (не)стабильности физико-химических свойств растворов хитозана // *Изв. Сарат. ун. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология.* – 2019. – Т. 19. – № 1. – С. 22-38.

143. Луговицкая Т.Н., Шиповская А.Б. Физико-химические свойства водных растворов *L*-аспарагиновой кислоты с добавкой хитозана // *ЖОХ.* – 2017. – Т. 87. – № 4. – С. 650-656.

144. Козырева Е.В., Абрамов А.Ю., Шиповская А.Б. Особенности физико-химических свойств растворов хитозана // *Изв. Сарат. ун. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология.* – 2011. – Т. 11. – № 2. – С. 25-31.

145. Колсанова Е.В., Орозалиев Э.Э., Шиповская А.Б. Вискозиметрические свойства растворов хитозана в уксусной кислоте и натрий-ацетатном буфере // *Изв. Сарат. ун. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология.* – 2014. – Т. 14. – № 2. – С. 5-9.

146. Кузина Л.Г., Мурзагильдина А.С., Чернова В.В., Кулиш Е.И. Влияние степени протонирования хитозана на некоторые его свойства // *Вест. БашГУ.* – 2012. – Т. 17. – № 2. – С. 902-905.

147. Кулиш Е.И., Чернова В.В., Володина В.П., Колесов С.В. О возможных причинах "непостоянства" значений характеристической вязкости хитозана // *Высокомолек. соед. Сер А.* – 2015. – Т. 57. – № 5. – С. 390-390.

148. Sorlier P., Viton C., Domard A. Relation between solution properties and degree of acetylation of chitosan: role of aging // *Biomacromol.* – 2002. – Vol. 3. – No 6. – P. 1336-1342.
149. Шиповская А.Б., Абрамов А.Ю., Пышнограй Г.В., Aziz A. Реологические свойства воднокислотных растворов хитозана: эксперимент и расчеты вискозиметрических функций на основе мезоскопической модели // *ИФЖ* – 2016. – Т. 89. – № 3. – С. 632-642.
150. Орленева А.П., Королев Б.А., Литманович А.А., Захарова Ю.А., Касаикин В.А., Куличихин В.Г. Особенности реологического поведения водных растворов поли-N-диметилдиаллиламмоний хлорида // *Высокомолек. соед. Сер. А.* – 1998. – Т. 40. – № 7. – С. 1179-1185.
151. Литманович Е.А., Сядук Г.В., Лысенко Е.А., Зезин А.Б., Кабанов А.В., Кабанов В.А. Влияние концентрационного режима на реологические свойства полиметакрилата натрия и его комплексов с блок-сополимером полистирол-поли-N-этил-4-винилпиридиний бромидом в водно-солевом растворе // *Высокомолек. соед. Сер. А.* – 2006. – Т. 48. – № 9. – С. 1682-1690.
152. Древаль В.Е., Васильев Г.Б., Литманович Е.А., Куличихин В.Г. Реологические свойства концентрированных водных растворов смесей анионных и катионных полиэлектролитов // *Высокомолек. Соед. Сер. А.* – 2008. – Т. 50. – № 7. – С. 1172-1179.
153. Buhler E., Rinaudo M. Structural and dynamical properties of semirigid polyelectrolyte solutions: a light-scattering study // *Macromol.* – 2000. – Vol. 33. – No 6. – P. 2098-2106.
154. Dobrynin A.V., Colby R.H., Rubinstein M. Scaling theory of polyelectrolyte solutions // *Macromol.* – 1995. – Vol. 28. – No 6. – P. 1859-1871.
155. Chen R.H., Tsaih M.L. Effect of temperature on the intrinsic viscosity and conformation of chitosans in dilute HCl solution // *Int. J. Biol. Macromol.* – 1998. – Vol. 23. – No 2. – P. 135-141.
156. Li Q., Song B.Z., Yang Z.Q., Fan H.L. Electrolytic conductivity behaviors and solution conformations of chitosan in different acid solutions // *Carbohydr. Polym.* – 2006. – Vol. 63. – № 2. – С. 272-282.
157. Kanauchi O., Deuchi K., Imasato Y. Increasing effect of a chitosan and ascorbic acid mixture on fecal dietary fat excretion // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 1994. – Vol. 58. – No 9. – P. 1617-1620.
158. Osman M., Fayed S.A., Ghada I.M., Romeilah R.M. Protective effects of chitosan, ascorbic acid and gymnema sylvestre against hypercholesterolemia in male rats // *Austr. J. Basic Appl. Sci.* – 2010. – Vol. 4. – No 1. – P. 89-98.

159. Muzzarelli R.A.A. Removal of uranium from solutions and brines by a derivative of chitosan and ascorbic acid // *Carbohydr. Polym.* – 1985. – Vol. 5. – No 2. – P. 85-89.
160. Muzzarelli R.A.A., Tanfani F., Emanuelli M. Chelating derivatives of chitosan obtained by reaction with ascorbic acid // *Carbohydr. Polym.* – 1984. – Vol. 4. – No 2. – P. 137-151.
161. Muzzarelli R., Biagini G., Pugnali A., Filippini O., Baldassarre V., Castaldini C., Rizzoli C. Reconstruction of parodontal tissue with chitosan // *Biomaterials.* – 1989. – Vol. 10. – No 9. – P. 598-603.
162. Yanagiguchi K. Wound healing following direct pulp capping with chitosan-ascorbic acid complex in rat incisors // *Korean Chitin Chitosan J.* – 2000. – Vol. 5. – No 3. – P. 182-182.
163. Zain N.M., Stapley A.G.F., Shama G. Green synthesis of silver and copper nanoparticles using ascorbic acid and chitosan for antimicrobial applications // *Carbohydr. Polym.* – 2014. – Vol. 112. – P. 195-202.
164. Rossi S., Marciello M., Sandri G., Bonferoni M.C., Ferrari F., Caramella C. Chitosan ascorbate: a chitosan salt with improved penetration enhancement properties // *Pharm. Develop. Technol.* – 2008. – Vol. 13. – No 6. – p. 513-521.
165. Marciello M., Rossi S., Caramella C., Remuñán-López C. Freeze-dried cylinders carrying chitosan nanoparticles for vaginal peptide delivery // *Carbohydr. polym.* – 2017. – Vol. 170. – P. 43-51.
166. Hafsa J., Charfeddine B., Smach M.A., Limem K., Majdoub H. Synthesis, characterization, antioxidant and antibacterial proprieties of chitosan ascorbate // *IJPCBS.* – 2014. – Vol. 4. – № 4.
167. Иванов П.В., Булкина Н.В., Зудина И.В., Ведяева А.П., Зюлькина Л.А. Клинико-иммунологическая оценка эффективности местного применения 8%-го аскорбата хитозана в комплексном лечении больных генерализованным пародонтитом // *Изв. ВУЗов. Поволжский регион. Медицинские науки.* – 2015. – Т. 2. – № 34. – С. 68–74.
168. Staudte H., Guntsch A., Völpel A., Sigusch B.W. Vitamin C attenuates the cytotoxic effects of *Porphyromonas gingivalis* on human gingival fibroblasts // *Arch. Oral Biol.* – 2010. – Vol. 55. – No 1. – P. 40-45.
169. Rizzo J.A., Rowan M.P., Driscoll I.R., Chung K.K., Friedman B. Vitamin C in burn resuscitation // *Critical care clinics.* – 2016. – Vol. 32. – No 4. – P. 539-546.
170. Koekkoek W.A.C., van Zanten A.R.H. Antioxidant vitamins and trace elements in critical illness // *Nutrition in clinical practice.* – 2016. – Vol. 31. – № 4. – P. 457-474.

171. Dolle C., Magrone P., Riva S., Ambrosi M., Fratini E., Peruzzi N., Nostro P.L. Symmetric and asymmetric bolaamphiphiles from ascorbic acid // *J. Phys. Chem. B.* – 2011. – Vol. 115. – No 40. – P. 11638-11649.

172. Azarnia N., Berman H.M., Rosenstein R.D. The crystal structure of *D*-isoascorbic acid // *Structural Science.* – 1972. – Vol. 28. – No 7. – C. 2157-2161.

173. Sreeja V., Jayaprabha K.N., Joy P.A. Water-dispersible ascorbic-acid-coated magnetite nanoparticles for contrast enhancement in MRI // *Appl. NanoSci.* – 2015. – Vol. 5. – P. 435-441.

174. Kröger-Ohlsen M., Skibsted L.H. Kinetics and mechanism of reduction of ferrylmyoglobin by ascorbate and *D*-isoascorbate // *J. Agricult. Food Chem.* – 1997. – Vol. 45. – No 3. – P. 668-676.

175. Munoz-Munoz J.L., García-Molina F., García-Ruiz P.A., Varón R., Tudela J., García-Cánovas F., Rodríguez-Lopez J.N. Stereospecific inactivation of tyrosinase by *L*- and *D*-ascorbic acid // *Biochim. Biophys. Acta. Proteins and Proteomics.* – 2009. – Vol. 1794. – No 2. – P. 244-253.

176. Wenner W. The reaction of *L*-ascorbic and *D*-isoascorbic acid with nicotinic acid and its amide // *J. Org. Chem.* – 1949. – Vol. 14. – No 1. – P. 22-26.

177. Green D.W., Lee J.M., Kim E.J., Lee D.J., Jung H.S. Chiral biomaterials: From molecular design to regenerative medicine // *Adv. Mat. Interfaces.* – 2016. – Vol. 3. – No 6. – P. 1500411.

178. Duan P., Cao H., Zhang L., Liu M. Gelation induced supramolecular chirality: chirality transfer, amplification and application // *Soft Matter.* – 2014. – Vol. 10. – No 30. – P. 5428-5448.

179. Shipovskaya A.B., Khonina T.G., Zhuravleva Yu.Yu., Malinkina O.N., Gegel N.O., Ivanenko M.V., Zudina I.V., Shadrina E.V., Larchenko E.Yu. Chiral silicon-chitosan-containing glycerohydrogels obtained by biomimetic mineralization // *Adv. Chem. Res. / Ed.: J.C. Taylor. Nova Sci. Publ.: New York.* – 2020. – Vol. 63. – Chapter 1. – P. 1-75.

180. Nagy K.J., Giano M.C., Jin A., Pochan D.J., Schneider J.P. Enhanced mechanical rigidity of hydrogels formed from enantiomeric peptide assemblies // *J. Am. Chem. Soc.* – 2011. – Vol. 133. – No 38. – P. 14975-14977.

181. Chen Q., Mithani M., Auras R., Kirkensgaard J.J.K., Uysal-Unalan I. Understanding nucleation efficiency of stereocomplex-crystallites on homochiral crystallization in poly (*L*-lactide)/poly (*D*-lactide) blends: homogenization near crystal growth front // *RSC Appl. Polym.* – 2026.

182. Taraban M.B., Hyland L.L., Yu Y.B. Split of Chiral degeneracy in mechanical and structural properties of oligopeptide–polysaccharide biomaterials // *Biomacromol.* – 2013. – Vol. 14. – No 9. – P. 3192-3201.

183. Guo L., Guo Y., Wang R., Feng J., Shao N., Zhou X., Zhou Y. Interface chirality: from biological effects to biomedical applications // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28. – No 15. – P. 5629.
184. González-Campo A., Amabilino D.B. Biomolecules at interfaces: chiral, naturally // *Biochirality: Origins, Evolution and Molecular Recognition*. – 2013. – C. 109-156.
185. Sun T., Han D., Rhemann K., Chi L., Fuchs H. Stereospecific interaction between immune cells and chiral surfaces // *J. Am. Chem. Soc.* – 2007. – Vol. 129. – No 6. – P. 1496-1497.
186. Suzuki N., Wang Y., Elvati P., Qu Z.B., Kim K., Jiang S., Kotov N.A. Chiral graphene quantum dots // *ACS Nano*. – 2016. – Vol. 10. – No 2. – P. 1744-1755.
187. Baranes K., Moshe H., Alon N., Schwartz S., Shefi O. Neuronal growth on *L*- and *D*-cysteine self-assembled monolayers reveals neuronal chiral sensitivity // *ACS Chem. NeuroSci.* – 2014. – Vol. 5. – No 5. – P. 370-376.
188. Yao X., Hu Y., Cao B., Peng R., Ding J. Effects of surface molecular chirality on adhesion and differentiation of stem cells // *Biomaterials*. – 2013. – Vol. 34. – No 36. – P. 9001-9009.
189. Motealleh A., Seda Kehr N. Janus nanocomposite hydrogels for chirality-dependent cell adhesion and migration // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. – 2017. – Vol. 9. – No 39. – P. 33674-33682.
190. Kehr N.S. Enantiomorphous periodic mesoporous organosilica-based nanocomposite hydrogel scaffolds for cell adhesion and cell enrichment // *Biomacromol.* – 2016. – Vol. 17. – No 3. – P. 1117-1122.
191. Kolukisaoglu Ü. *D*-amino acids in plants: sources, metabolism, and functions // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21. – № 15. – P. 5421.
192. Bastings J.J.A.J., van Eijk H.M., Olde Damink S.W., Rensen S.S. *D*-amino acids in health and disease: a focus on cancer // *Nutrients*. – 2019. – Vol. 11. – No 9. – P. 2205.
193. Shi Y., Hussain Z., Zhao Y. Promising application of *D*-amino acids toward clinical therapy // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23. – No 18. – P. 10794.
194. Kumar R., Singh N., Chauhan A., Kumar M., Bhatta R.S., Singh S.K. Mycobacterium tuberculosis survival and biofilm formation studies: effect of *D*-amino acids, *D*-cycloserine and its components // *J. Antibiotics*. – 2022. – Vol. 75. – No 8. – P. 472-479.
195. Jiang Z., Yu Y., Wu H. Preparation of CS/GPTMS hybrid molecularly imprinted membrane for efficient chiral resolution of phenylalanine isomers // *J. Membr. Sci.* – 2006. – Vol. 280. – No 1-2. – P. 876-882.

196. Zheng X.F., Lian Q., Yang H. Synthesis of chitosan–gelatin molecularly imprinted membranes for extraction of *L*-tyrosine // *RSC Advances*. – 2014. – Vol. 4. – No 80. – P. 42478-42485.

197. Li J., Ma J., Jiang T., Wang Y., Wen X., Li G. Constructing biopolymer–inorganic nanocomposite through a biomimetic mineralization process for enzyme immobilization // *Materials*. – 2015. – Vol. 8. – No 9. – P. 6004-6017.

198. Iftime M.M., Marin L. Chiral betulin-imino-chitosan hydrogels by dynamic covalent sonochemistry // *Ultrasonics SonoChem*. – 2018. – Vol. 45. – P. 238-247.

199. Евдокимов Ю.М., Саяннов В.И., Скуридин С.Г., Штыкова Э.В., Хлебцов Н.Г., Кац Е.И. Физико-химические и нанотехнологические подходы к созданию «твердых» пространственных структур ДНК // *Успехи химии*. – 2015. – Т. 84. – № 1. – С. 27-42.

200. Ou J., Tao Y., Xue J., Kong Y., Dai J., Deng L. Electrochemical enantio-recognition of tryptophan enantiomers based on graphene quantum dots–chitosan composite film // *ElectroChem. Com.* – 2015. – Vol. 57. – P. 5-9.

201. Gogoi A., Konwer S., Zhuo G.Y. Polarimetric measurements of surface chirality based on linear and nonlinear light scattering // *Front. Chem.* – 2021. – Vol. 8. – P. 611833.

202. Agrawal A.M., Manek R.V., Kolling W.M., Neau S.H. Water distribution studies within microcrystalline cellulose and chitosan using differential scanning calorimetry and dynamic vapor sorption analysis // *J. Pharm. Sci.* – 2004. – Vol. 93. – No 7. – P. 1766-1779.

203. Gámiz-González M.A., Piskin A.E., Pandis C., Chatzimanolis-Moustakas C., Kyritsis A., Marí B., Ribelles J.L.G., Vidaurre A. Determining the influence of N-acetylation on water sorption in chitosan films // *Carbohydr. Polym.* – 2015. – Vol. 133. – P. 110-116.

204. Кулиш Е.И., Шуршина А.С., Колесов С.В. Транспортные свойства пленок хитозан-амикацин // *Хим. Физ.* – 2014. – Т. 33. – № 8. – С. 76-76.

205. Угрозов В.В., Филиппов А.Н., Сидоренко Ю.И. Описание гигроскопичности гидрофильных биополимеров и биополимерных смесей // *Коллоид. Жур.* – 2007. – Т. 69. – № 2. – С. 256-260.

206. Угрозов В.В., Артамонова С.Д., Шарнина Ф.Ф., Ившин В.П., Грунин Л.Ю., Катаева Л.И. Сорбция водяных паров хитинсодержащими материалами // *Коллоид. Жур.* – 2008. – Т. 70. – № 6. – С. 833-836.

207. Чалых А.Е., Петрова Т.Ф., Хасбиуллин Р.Р., Озерин А.Н. Сорбция и диффузия воды в хитинах и хитозанах // *Высокомолек. Соед. Серия А*. – 2014. – Т. 56. – № 5. – С. 526-526.

208. Tual C., Espuche E., Escoubes M., Domard A. Transport properties of chitosan membranes: Influence of crosslinking // *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Physics*. – 2000. – Vol. 38. – No 11. – P. 1521-1529.

209. Gocho H., Shimizu H., Tanioka A., Chou T.-J., Nakajima T. Effect of polymer chain end on sorption isotherm of water by chitosan // Carbohydr. Polym. – 2000. – Vol. 41. – No 1. – P. 87-90.

210. Wiles J.L., Vergano P.J., Barron F.H., Bunn J.M., Testin R.F. Water vapor transmission rates and sorption behavior of chitosan films // J. Food Sci. – 2000. – Vol. 65. – No 7. – P. 1175-1179.

211. Тагер А.А., Шолохович Т.И., Шарова И.М., Адамова Л.В., Бессонов Ю.С. Термодинамика смешения полимеров // Высокомолек. Соед. – 1975. – № 12. – С. 2766-2773.

212. Shchipunov Y.A., Karpenko T.Y. Hybrid polysaccharide–silica nanocomposites prepared by the sol–gel technique // Langmuir. – 2004. – Vol. 20. – No 10. – P. 3882-3887.

213. Singh V., Srivastava P., Singh A., Singh D., Malviya T. Polysaccharide-silica hybrids: design and applications // Polym. Rev. – 2016. – Vol. 56. – No 1. – P. 113-136.

214. Хонина Т.Г. Шадрина Е.В., Бойко А.А., Чупахин О.Н., Ларионов Л.П., Волков А.А., Бурда В.Д. Синтез гидрогелей на основе полиолатов кремния // Изв. АН. Сер. хим. – 2010. – № 1. – С. 76-86.

215. Шадрина Е.В. Синтез и свойства полиолатов кремния и гидрогелей на их основе : дис. канд. хим. наук. – 2011. – 26 с.

216. Shmakov S. Mathematical processing of chitosan ascorbate-water sorption isotherms // Mendeleev Data. – 2023. – V1.

217. Осинцев Е.Ю., Слободской А.Б. Способ определения скорости заживления раневой поверхности : Пат. РФ 2102755. 1998.

218. Рогачева С.М., Жутов А.С., Шилова Н.А., Клочкова И.Н., Борисова С.В. Оценка рогачева регулирующей активности и экотоксичности диарилидензамещенных циклогексанонов /Изв. Саратов. ун. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2020. – Т. 20. – С. 137.

219. **Малинкина О.Н.**, Провозина А.А., Шиповская А.Б. Оценка химического взаимодействия гидрохлорида хитозана с аскорбиновой кислотой методами ИК- и ЯМР-спектроскопии // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер.: Химия. Биология. Экология. – 2014. – Т. 14. – № 3. – С. 20-24.

220. **Малинкина О.Н.**, Шиповская А.Б. Энергетика солеобразования и надмолекулярное упорядочение *L*- и *D*-аскорбатов хитозана // Высокомолек. соед. Сер. А, – 2023. – Т. 65. – № 5. – С. 351–361.

221. Шиповская А.Б., **Малинкина О.Н.**, Гегель Н.О., Зудина И.В., Луговицкая Т.Н. Структура и свойства солевых комплексов хитозана с диастереомерами аскорбиновой кислоты // Изв. АН. Сер. хим. – 2021. – № 9. – С. 1765-1774.

222. Gegel N.O., Zhuravleva Yu.Yu., Shipovskaya A.B., **Malinkina O.N.**, Zudina I.V. Influence of chitosan ascorbate chirality on the gelation kinetics and properties of silicon-chitosan-containing glycerohydrogels // *Polymers*. – 2018. – Vol. 10. – No 3. – P. 259.

223. **Malinkina O.N.**, Shmakov S.L., Shipovskaya A.B. Structure, the energy, sorption and biological properties of chiral salts of chitosan with *L*- and *D*-ascorbic acid // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2024. – Vol. 257. – Article ID 128731

224. **Malinkina O.N.**, Zhuravleva Yu.Yu., Zudina I.V., Shipovskaya A.B. Optical activity and SEM of chiral chitosan ascorbates // *J. Phys.: Conf. Ser. Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures*. – 2019. – P. 012056.

225. **Malinkina O.N.**, Shipovskaya A.B., Kazmicheva O.F. Optical properties of chitosan in aqueous solution of *L*- and *D*-ascorbic acids // *SFM PALS 2015*. – SPIE. 2016. – Vol. 9917. – P. 690-694.

226. Маркарян Ш.А., Саркисян А.Р. Электронные спектры поглощения аскорбиновой кислоты в водных и водно-диалкилсульфоксидных растворах // *Жур. прикл. спектроскопии*. – 2011. – Т. 78. – № 1. – С. 11-15.

227. Ogata Y., Kosugi Y. Ultraviolet spectra of *L*-ascorbic acid and cupric ascorbate complex // *Tetrahedron*. – 1970. – Vol. 26. – No 20. – P. 4711-4716.

228. Wittine K., Gazivoda T., Markus M., Mrvos-Sermek D., Hergold-Brundic A., Cetina M., Zihir D., Gabelica V., Mintas M., Raic-Malic S. Crystal structures, circular dichroism spectra and absolute configurations of some *L*-ascorbic acid derivatives // *J. Mol. Struct.* – 2004. – Vol. 687. – No 1-3. – P. 101-106.

229. **Малинкина О.Н.**, Гегель Н.О., Шиповская А.Б. Влияние изоформы аскорбиновой кислоты на гидродинамическое поведение макромолекул аскорбата хитозана в водных растворах // *Изв. Саратов. ун.. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология*. – 2019. – Т. 19. – № 2. – С. 152-164.

230. **Malinkina O.N.**, Gegel N.O., Shipovskaya A.B. Hydrodynamic behavior of chitosan hydrochloride macromolecules in aqueous solutions of *D*- and *L*-ascorbic acid // *J. Mol. Liq.* – 2019. – Vol. 284. – P. 75-81.

231. Шиповская А.Б., Щёголев С.Ю. Фазовый анализ и оптическая активность систем эфир целлюлозы-мезофазогенный растворитель. – 2014. Саратов: Изд-во Саратовск. ун-та. 266 с. ISBN 978-5-292-04261-7.

232. Pilarski B., Wyrzykowski D., Młodzianowski J. A new approach for studying the stability and degradation products of ascorbic acid in solutions // *J. Sol. Chem.* – 2023. – Vol. 52. – No 6. – P. 639-657.

233. Кайшева Н.Ш., Кайшев А.Ш., Губанова Л.Б., Саморядова А.Б. Применение очищенного яблочного пектина для стабилизации аскорбиновой кислоты в фреш-соках // Изв. ВУЗов. Пищевая технология. – 2019. – № 1. – С. 40-46.

234. Шадрина Е.В. **Малинкина О.Н.**, Хонина Т.Г., Шиповская А.Б., Фомина В.И., Ларченко Е.Ю., Попова В.А., Зырянова И.Г., Ларионов Л.П. Исследование процесса образования и фармакологической активности кремнийхитозансодержащих глицерогидрогелей, полученных методом биомиметической минерализации // Изв. АН. Сер. хим. – 2015. – № 7. – С. 1633-1633.

235. **Malinkina O.N.**, Sobolev A.M., Shipovskaya A.B. Hybrid nanogels based on chitosan hydrochloride-ascorbate derived by sol-gel biomimetic synthesis // BioNanoScience. – 2016. – Vol. 6. – No 2. – P. 157-161.

236. Shipovskaya A.B., **Malinkina O.N.**, Zhuravleva Yu.Yu., Rogacheva S.M. Synthesis of silicon-containing chitosan hydrogels in a glycolic acid medium // Adv. Mater. Sci. Eng. – 2016. – Vol. 2016. – No 1. – P. 3951703.

237. Шиповская А.Б., **Малинкина О.Н.**, Афанасов И.М., Хонина Т.Г., Зудина И.В., Брусов С.С., Макарова А.М. Композиция для получения гидрогеля. Пат. РФ № 2657826. 2018.

238. Журавлева Ю.Ю., **Малинкина О.Н.**, Гегель Н.О., Голядкина А.А., Шиповская А.Б. Физико-механические свойства кремнийхитозансодержащих глицерогидрогелевых пластин на основе *L*-и *D*-аскорбата хитозана // Изв. Саратов. ун. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2018. – Т. 18. – № 2. – С. 154-162.

239. Shipovskaya A.B., Zhuravleva Yu.Yu., Khonina T.G., **Malinkina O.N.**, Gegel N.O. Influence of the ascorbic acid isoform on the sol-gel synthesis kinetics and properties of silicon-chitosan-containing glycerohydrogel plates // J. Sol-Gel Sci. Technol. – 2019. – Vol. 92. – P. 349-358

240. Журавлева Ю.Ю., **Малинкина О.Н.**, Шиповская А.Б., Хонина Т.Г. Гидрогелевый материал на основе соли хитозансодержащего вещества и способ его получения. Патент № 2707973 РФ // Б.И. – 2019. – № 34. – 16 с.

241. Журавлева Ю.Ю., **Малинкина О.Н.**, Шиповская А.Б., Хонина Т.Г. Гидрогелевый материал на основе соли хитозансодержащего вещества и способ его получения. Патент № 2695223 РФ // Б.И. – 2019. – № 21. – 27 с.

242. Журавлева Ю.Ю., **Малинкина О.Н.**, Шиповская А.Б., Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б., Мурдак Д.А. Биодegradуемая лечебно-профилактическая гидрогелевая пластина и способ её получения. Патент № 2732241 РФ // Б.И. – 2020. – № 26. – 19 с.

243. Ноздря В.И., Ефимов Н.Н., Роднова В.Ю., Хлебников В.Н. Закономерности гелеобразования концентрированного золя кремниевой кислоты в присутствии натриевых солей // Баш. хим. жур. – 2016. – Т. 23. – № 4. – С. 31-41.

244. Шиповская А.Б., Зудина И.В., Фомина В.И., **Малинкина О.Н.** Новые антимикробные препараты на основе комплексной соли хитозана с хиральным органическим лигандом // Бутлеровские сообщения. – 2015. – Т. 41. – № 3. – С. 82-94.

245. Гегель Н.О., Зудина И.В., **Малинкина О.Н.**, Шиповская А.Б. Влияние изомерной формы аскорбиновой кислоты на антибактериальную активность ее солей с хитозаном // Микробиология. – 2018. – Т. 87. – № 5. – С. 618-623.

246. Shipovskaya A.B., Khonina T.G., **Malinkina O.N.** Ushakova O.S. Sol-gel synthesis, physicochemical properties and wound healing activity of silicon-containing glycerohydrogel plates based on *L*- and *D*-chitosan ascorbates with the addition of *Aloe Vera* // Adv. Chem. Res. / Ed.: J.C. Taylor. Nova Sci. Publ.: New York. – 2024. – Vol. 83. – Chapter 5. – P. 109-135.

247. Аль З., **Малинкина О.Н.**, Зудина И.В., Ковалева, Я.О., Ксенофонтова О.Ю., Островский Н.В. Оценка ранозаживляющей активности *L*-и *D*-изоформ аскорбиновой кислоты и их солей с хитозаном на модели ожоговой раны у крыс // Совр. пробл. науки и образования. – 2016. – № 6. – С. 236-246.

248. Аль З., **Малинкина О.Н.**, Чемодурова А.А., Ксенофонтова О.Ю., Зудина И.В. Оценка антибактериальной активности *L*-и *D*-изоформ аскорбиновой кислоты и их солей с хитозаном // Совр. пробл. науки и образования. – 2016. – № 5. – С. 298-306.

249. **Малинкина О.Н.**, Журавлёва Ю.Ю., Шиповская А.Б. Ранозаживляющая активность *in vivo* глицерогидрогелевых пластин на основе аскорбата хитозана, *Алоэ Вера* и полиолата кремния // Прикл. биохим. микробиол. – 2022. – Т. 58. – № 2. – С. 179-184.

250. Xiao R., Chen R., Zhang H.Y., Li H. Microalgae *Scenedesmus quadricauda* grown in digested wastewater for simultaneous CO₂ fixation and nutrient removal // JBMB. – 2011. – Vol. 5. – No 2. – P. 234-240.

Приложение А

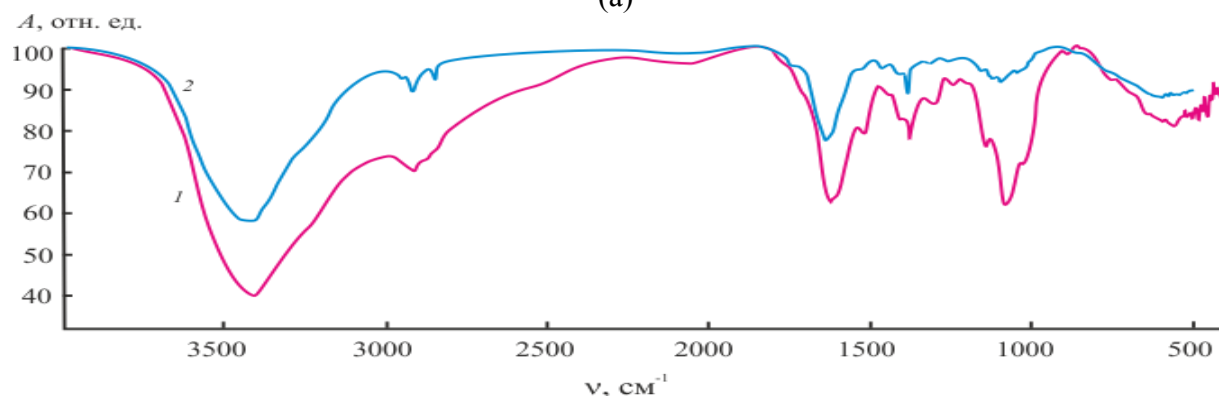
Таблица А1 – Степень связывания хитозана с *L*-(*D*-)АК в водно-кислотных растворах

Состав системы, 10 ⁻⁴ моль					Параметры титрования						
[-NH ₂] /[АК]	ХТЗ		АК		pH ₀	ΔV _{NaOH} , 10 ⁻⁴ моль / pH _{Eq}				α', мольн.%	
	40	200	<i>L</i> -	<i>D</i> -		Eq1	Eq2	Eq3	Eq4	Cl ⁻	АК ⁻
						HCl	АК	Cl ⁻	АК ⁻		
1.5	9.2	-	4.8	-	3.2	0.05/3.3	3.7/4.8	5.3/7.0	1.1/8.4	58.0	11.7
			-	4.8	3.1	0.05/3.2	3.5/4.8	5.2/7.0	1.3/8.0	56.8	14.1
1.0	-	-	10.0	-	3.0	0.05/3.0	8.7/4.8	5.3/6.9	1.3/8.0	58.5	14.1
			-	10.0	2.9	0.05/3.0	8.5/4.7	5.2/6.9	1.5/8.0	57.4	16.6
0.5	4.5	-	9.9	-	2.9	0.03/3.0	9.0/4.2	2.6/6.8	0.8/8.1	57.8	17.7
			-	9.9	2.9	0.03/3.0	9.0/3.9	2.6/6.8	0.9/8.0	57.8	20.2
0.33	-	-	-	14.7	2.7	0.03/3.0	13.0/3.9	2.2/6.7	1.9/7.9	43.6	32.0
1.0	-	10.2	9.8	-	4.4	-	2.9/6.6	-	6.9/7.7	-	67.6
			-	9.8	4.3	-	3.4/6.5	-	6.5/7.6	-	63.7
0.9	-	-	11.1	-	4.0	-	4.7/6.5	-	6.4/7.8	-	62.1
			-	11.1	3.8	-	5.3/6.5	-	5.9/7.7	-	57.6
0.5	-	5.1	9.9	-	3.6	-	7.0/6.4	-	2.9/7.9	-	57.3
			-	9.9	3.2	-	7.1/6.4	-	2.8/7.4	-	54.6
0.25	-	-	19.9	-	3.2	-	17.1/6.3	-	2.8/7.6	-	55.3
			-	19.9	3.1	-	17.2/6.3	-	2.7/7.7	-	53.3

Таблица А2 – Соотнесение полос поглощения ИК-спектров порошков *L*- и *D*-АК

Группа	Частота полосы поглощения, см ⁻¹	
	<i>L</i> -АК	<i>D</i> -АК
ν OH C3	3526	3482
ν OH C6	3411	3404 перегиб
ν OH C2	3316	3333
ν OH C5	3220	отсутствует
ν_{as} CH ₂ C6	3042	3014
ν CH C5	отсутствует	2952 сл.
ν CH C4 ν_s CH ₂ C6	2916 сл.	2900 сл.
	2869 сл.	2850 сл.
	2820 сл.	-
	2754 сл.	2741 сл.
	2656 пл.	2656 пл.
Обертоны CO и CO ₂	2146	отсутствуют
	2017	
	1882	
ν C=O	1755	1761
ν C=C	1659	1674
δ_w CH ₂ C6	1497	1478
δ C3-O-H	1459	1422
δ C5-O-H	1388	1400
δ C6-H	1363 пл.	1360 пл.
δ C5-H	отсутствует	1334 пл.
ν C2-O-H	1321	1317
δ C4-H	1275	1273
ν C2-O-H	1248	1248
δ C5-H	1222	1222 пл.
δ_{sc} CH ₂ C6	1198	1196
ν C3-O-H	-	1135
ν C5-O-H	1112	-
ν COC	1076	1084
	1044 пл.	1049
	1026	1040 пл.
ρ CH ₂ C6	988	938
ν C5-H	870	878
ν COC	821	812
δ C4-C5	756	760
γ C=O	721	733
α COC	683	711
β C=O	-	650
ϕ COC	628	582
ϕ COC	565	560

(a)



(б)

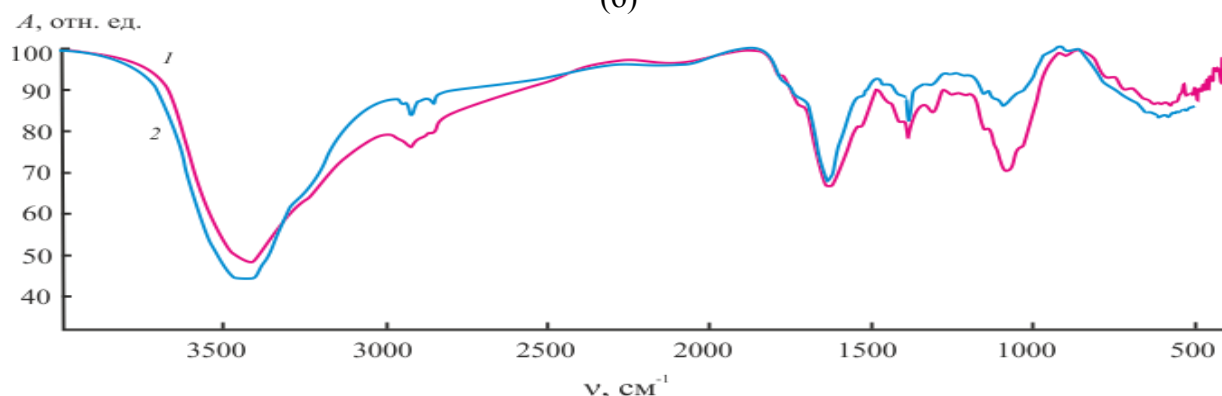


Рисунок А1. ИК-спектры порошков ХТЗ-40 (а) и ХТЗ-200 (б) в *L*-(1) и *D*-АК (2), лиофильно выделенных из соответствующих эквимольных растворов после диализа против воды.

Таблица А3 – Соотнесение полос поглощения ИК-спектров порошков хиральных солей ХТЗ с *L*- и *D*-АК после диализа, $[-\text{NH}_2]/[\text{АК}] = 1.0$ осново-моль/моль

Группа	ХТЗ-40		ХТЗ-200	
	<i>L</i> -	<i>D</i> -	<i>L</i> -	<i>D</i> -
$\nu \text{OH } \nu \text{NH}$	3416	3425	3418	3424
$\nu_s \text{CH}$	2926	2959	2924	2923
	2884 пл.	2924	2892 пл.	–
	2851 пл.	2853	2859 пл.	2854
$\nu \text{C=O},$ $\nu \text{C=C}$	1768 пл.	1739 сл.	1785 пл.	1780 пл.
	1718 пл.		1718 пл.	
δNH Амид I	1619	1636	1633	1637
$\delta_s \text{NH}_3^+, \delta_{as} \text{NH}_3^+$ Амид II	1525	1532	1535 пл.	1530 пл.
δCOH $\delta_{as} \text{CH}_3$ δCOH νCN Амид III δCO $\delta_{sc} \text{CH}_2$	–	1462 сл	1451 пл.	1417 пл.
	1402 пл.	1408 сл.	1402	1400
	1384	1384	1384	1384
	1309	1309	1306 сл.	1314
	1250	1256	1252 сл.	1261 сл.
νCOH	1150 оч. сл.	1146 сл.	1152	1148
	–	1117	1077 оч. сл.	1091
	1090	1094		
νCOC	1027	1040	894	894
	894	850	–	825
δNH_2 νCC	752	–	600	600
	559	593		

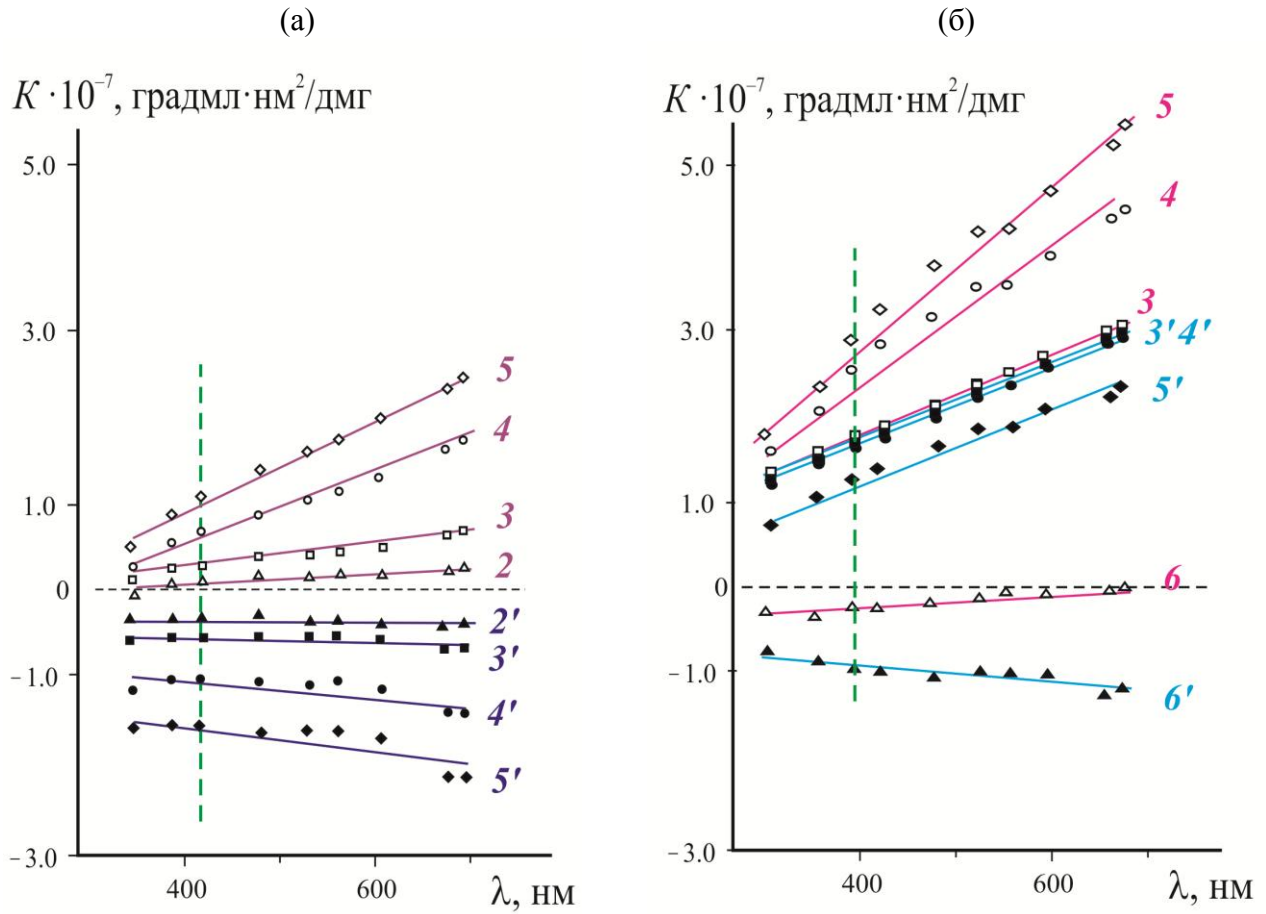


Рисунок А2. Зависимость вращательной константы K , рассчитанных по уравнению Друде из кривых ДОВ растворов ХТЗ-40 (а) и ХТЗ-200 (б) в L - (2–5), D -АК (2'–5'), L -(D -)АК+НСІ (6, 6'); $[-\text{NH}_2] : [\text{АК}] = 1.0 : 0.6$ (2, 2'), 1 : 1 (3, 3'), 1 : 2 (4, 4'), 1 : 3 осново-моль/моль (5, 5'), $[-\text{NH}_2] : [\text{АК}] : [\text{НСІ}] = 1 : 1 : 1$ осново-моль/моль/моль (6, 6') от длины волны; 25°C; вертикальным пунктиром показана длина волны (405 нм), выбрана по принципу наибольшей близости к длине волны оптически активного электронного перехода в совокупности со статистически значимыми различиями значений $[\alpha]_{\lambda}$.

Приложение Б



Патенты РФ

1. Журавлева Ю.Ю., Малинкина О.Н., Шиповская А.Б., Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б., Мурдак Д.А. Биодegradуемая лечебно-профилактическая гидрогелевая пластина и способ её получения Патент РФ № 2732241 //Б.И. 2020. № 26. 19 с.
2. Журавлева Ю.Ю., Малинкина О.Н., Шиповская А.Б., Хонина Т.Г. Гидрогелевый материал на основе соли хитозансодержащего вещества и способ его получения. Патент РФ № 2707973 //Б.И. 2019. № 34. 16 с.
3. Журавлева Ю.Ю., Малинкина О.Н., Шиповская А.Б., Хонина Т.Г. Гидрогелевый материал на основе соли хитозансодержащего вещества и способ его получения. Патент РФ № 2695223 //Б.И. 2019. № 21. 27 с.
4. Фомина В.И., Малинкина О.Н., Шиповская А.Б., Гегель Н.О., Зудина И.В., Токмакова Е.В. Гидрогель на основе комплексной соли хитозана и способ его получения. Патент РФ № 2617501 //Б.И. 2017. № 12. 19 с.

Приложение В

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Института химии
СГУ, к.х.н., доцент

А.В. Ушаков

**АКТ ВНЕДРЕНИЯ
РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ
В УЧЕБНЫЙ ПРОЦЕСС**

РЕЗУЛЬТАТЫ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ Малинкиной О.Н. «ЗАКОНОМЕРНОСТИ СТРУКТУРООБРАЗОВАНИЯ и ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *L*- и *D*-АСКОРБАТОВ ХИТОЗАНА» внедрены в учебный процесс Института химии ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского». Используются при преподавании дисциплины Б1.В.05 «Биодеградируемые полимеры» для студентов 4-го курса бакалавриата Института химии, обучающихся по направлению подготовки 04.03.01 «Химия», профиль «Химия низко- и высокомолекулярных веществ»:

- лекция «Влияние хиральности макромолекул на свойства биоразлагаемых полимерных материалов»;
- авторская учебно-исследовательская работа «Определение паропроницаемости и парасорбционных свойств гель-плёнок хитозана»;
- авторская учебно-исследовательская работа «Определение упруго-пластических и морфологических параметров гибридных гидрогелевых пластин на основе хитозана».

ОСНОВАНИЕ: решение заседания Ученого Совета Института химии СГУ (протокол № 2 от 5 марта 2026 г.).

Ученый Секретарь Ученого Совета
Института химии СГУ,
профессор, д.х.н.

Н.А. Бурмистрова