



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2025. Т. 25, вып. 3. С. 294–307

Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology, 2025, vol. 25, iss. 3, pp. 294–307

<https://ichbe.sgu.ru>

<https://doi.org/10.18500/1816-9775-2025-25-3-294-307>, EDN: WBTDAX

Научная статья

УДК 547.458:[544.77.052+53.096]



Удаление нестехиометрической аспарагиновой кислоты из водной дисперсии наночастиц аспарагината хитозана

Д. С. Чернова, О. С. Ушакова, К. М. Шипенок, А. Б. Шиповская 

Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

Чернова Дарья Сергеевна, студент Института химии, darianna1703@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0003-7575-574X>

Ушакова Ольга Сергеевна, аспирант Института химии, olgakol4ina777@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0005-6189-4567>

Шипенок Ксения Михайловна, аспирант Института химии, kshipenok@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9733-751X>

Шиповская Анна Борисовна, доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой полимеров на базе ООО «АКРИПОЛ» Института химии, начальник отдела высокомолекулярных соединений Образовательно-научного институтаnanoструктур и биосистем, shipovskayaab@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1916-4067>

Аннотация. В традиционном методе удаления избытка кислоты, используемой для получения солевой формы хитозана, имеет место не только реакция с нейтрализующими основаниями, но и частичное депротонирование макроцепей. Поскольку заряженные аминогруппы ответственны за биологическую активность полисахарида, актуальна разработка способов оптимизации кислотно-основного состава хитозанодержащей системы без элиминирования протона. В работе представлены результаты исследования удаления нестехиометрической аспарагиновой кислоты из водной дисперсии наночастиц аспарагината хитозана, полученных самосборкой *in situ* в процессе ассоциации контрионов на заряженных полимерных цепях и стабилизированных полисилоксановым оболочечным покрытием, с использованием подходов изогидрической и изотермической кристаллизации. Показано, что снижение температуры в диапазоне 50–4°C в сочетании с отгонкой воды на 50–85% приводит к пересыщению нанодисперсии и кристаллизации малорастворимого компонента дисперсионной среды с выпадением осадка. Оценено влияние мольного соотношения кислота/полимер (1.3–1.7 моль/осново-моль) в целевом веществе дисперской фазы, скорости охлаждения (10 и 30°C/ч) и степени концентрирования дисперсии (50–85%), а также температуры (22±2 и 4°C) и времени выдержки (1–200 сут) на морфоструктуру, химический состав, кристаллическое упорядочение и количественный выход твердой фазы. Методами ИК-спектроскопии, рентгеноструктурного анализа, динамики, потенциометрии и гравиметрии доказано соответствие воздушно-сухой формы выделенного осадка кристаллам цвиттер-ионной формы аспарагиновой кислоты. Установлено, что наиболее оптимальным вариантом для препаративного удаления нестехиометрических двойных биполярных ионов является концентрирование нанодисперсии на 85% с последующим переохлаждением с 50 до 4°C со скоростью 10°C/ч. Разработанный подход сочетания изогидрической и изотермической кристаллизации нестехиометрической аспарагиновой кислоты успешно протестирован на умеренно-концентрированных растворах комплексной соли гидрохлорида-аспарагината хитозана.

Ключевые слова: хитозан, L-аспарагиновая кислота, аспарагинат хитозана, наночастицы, кислотно-основной состав, изогидрическая и изотермическая кристаллизация

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 24-16-00172, <https://rscf.ru/project/24-16-00172>.

Для цитирования: Чернова Д. С., Ушакова О. С., Шипенок К. М., Шиповская А. Б. Удаление нестехиометрической аспарагиновой кислоты из водной дисперсии наночастиц аспарагината хитозана // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2025. Т. 25, вып. 3. С. 294–307. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2025-25-3-294-307>, EDN: WBTDAX

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

Removal of non-stoichiometric aspartic acid from an aqueous dispersion of chitosan aspartate nanoparticles

D. S. Chernova, O. S. Ushakova, X. M. Shipenok, A. B. Shipovskaya 

Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia

Daria S. Chernova, darianna1703@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0003-7575-574X>

Olga S. Ushakova, olgakol4ina777@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0005-6189-4567>

Xenia M. Shipenok, kshipenok@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9733-751X>

Anna B. Shipovskaya, shipovskayaab@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1916-4067>



Abstract. In the traditional method of removing excess acid used to obtain the salt form of chitosan, not only a reaction with neutralizing bases proceeds, but also partial deprotonation of macrochains. Since charged amino groups are responsible for the biological activity of the aminopolysaccharide, it seems important to develop methods for optimizing the acid–base composition of a chitosan-containing system without proton elimination. The paper presents the results of our study on the removal of non-stoichiometric aspartic acid from an aqueous dispersion of chitosan aspartate nanoparticles obtained by *in situ* self-assembly during counterion association on charged polymer chains and stabilized by a polysiloxane shell coating using isohydric and isothermal crystallization approaches. It is shown that a temperature decrease in the range of 50–4°C in combination with water distillation by 50–85% leads to supersaturation of the nanodispersion and crystallization of the poorly soluble component of the dispersion medium with precipitation. The influence of the acid/polymer molar ratio (1.3–1.7 mol/mol of NH₂) in the target substance of the dispersed phase, the cooling rate (10 and 30°C/h) and the dispersion concentration degree (50–85%), as well as the temperature (22±2 and 4°C) and holding time (1–200 days) on the morphostructure, chemical composition, crystalline ordering and quantitative yield of the solid phase has been estimated. The correspondence of the air-dry form of the isolated precipitate to crystals of the zwitterionic form of aspartic acid has been proven by IR spectroscopy, X-ray structural analysis, dialysis, potentiometry and gravimetry. It has been found that the most optimal option for preparative removal of non-stoichiometric double bipolar ions is the concentration of nanodispersion by 85% followed by supercooling from 50 down to 4°C at a rate of 10°C/h. The developed approach to combining isohydric and isothermal crystallization of non-stoichiometric aspartic acid has been successfully tested on moderately concentrated solutions of the complex salt of chitosan hydrochloride–aspartate.

Keywords: chitosan, *L*-aspartic acid, chitosan aspartate, nanoparticles, acid–base composition, isohydric and isothermal crystallization

Acknowledgments. The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation, project No. 24-16-00172, <https://rscf.ru/project/24-16-00172/>.

For citation: Chernova D. S., Ushakova O. S., Shipenok X. M., Shipovskaya A. B. Removal of non-stoichiometric aspartic acid from an aqueous dispersion of chitosan aspartate nanoparticles. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2025, vol. 25, iss. 3, pp. 294–307 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2025-25-3-294-307>, EDN: WBTDX

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

Введение

Аминополисахарид хитозан – сополимер *D*-глюкозамина и *N*-ацетил-*D*-глюкозамина со степенью дезацетилирования выше ~75 мольн.% – растворяется в водных растворах органических и одноосновных неорганических кислот с формированием водорасторимой солевой (протонированной ~–NH₃⁺) формы. Наиболее часто применяются и изучены водно-кислотные растворы хитозана в соляной, уксусной и муравьиной кислотах [1–5]. Для практического применения в биомедицине, фармакологии и агробиотехнологии наиболее перспективны биологически активные органические кислоты и аминокислоты (гликолевая, янтарная, молочная, аскорбиновая, аспарагиновая и др.), значительно повышающие биологическую активность солевого хитозана [6–10].

Вследствие сополимерного строения и наличия в элементарных звеньях двух типов функциональных групп (–NH₂, –OH), участвующих в формировании развитой системы меж- и внутримолекулярных водородных связей, растворение хитозана проводят в мольном избытке кислоты (в пересчете на –NH₂ группы), особенно при использовании многоосновных карбоновых кислот и аминокислот [6, 11–14]. При этом обеспечивается максимально возможная степень протонирования аминогрупп и, соответственно, концентрация полимера в растворе. В результате в получаемых из таких

растворов конечных продуктах сохраняется не прореагировавшая с аминогруппами полимера кислота, которая может негативно влиять на характеристики хитозанодержащего материала. Например, в пленке хитозана, сформованной из раствора в янтарной кислоте, присутствуют не только противоионы (находящиеся у –NH₃⁺ групп), но и микрокристаллогидраты свободной янтарной кислоты [15]. Последние разлагаются при нагревании, что сопровождается не термомодификацией (повышением водостойкости и прочности [16]), а разрушением структуры пленочного материала. Избыток кислоты усиливает антибактериальные, противовирусные и фунгицидные свойства аминополисахаридной соли [14, 17–20], однако затрудняет определение индивидуальных вкладов хитозанового поликатиона и свободной кислоты. Для удаления нестехиометрической кислоты из раствора хитозана используют, как правило, реакцию нейтрализации неорганическими (NaOH, NH₃·H₂O), реже органическими основаниями (триэтаноламин) [13, 21–24]. Несмотря на то что образующиеся при этом соли относятся к слабощелочным или нейтральным соединениям и, как правило, биоинертны, их присутствие в системе может влиять на объективность и точность проводимых экспериментов. Сказанное предопределяет разработку иных подходов для удаления не связанной с хитозаном кислоты.

В настоящей работе поставлена задача удаления избытка аспарагиновой кислоты из

водных дисперсий наночастиц аспарагината хитозана, полученных на начальном этапе фазового разделения системы хитозан + аспарагиновая кислота + вода и стабилизированных полисилоксановым оболочечным покрытием [6, 11, 25]. Поскольку наночастицы получены самосборкой *in situ* поликатиона хитозана с аспарагин-анионами ($\sim\text{NH}_3^+\cdot\text{HAsp}^-$) в процессе противоионной ассоциации [6, 26, 27] и представляют собой оболочечные гидратированные макролубки с высокой лабильностью, введение даже слабого основания сопровождается поджиманием макроцепей, уменьшением размера наноструктурированных ассоциатов и значительно влияет на физико-химические и биохимические свойства нанодисперсий. Применение неорганических оснований, даже малой концентрации, нарушает коллоидную стабильность наночастиц. Так как аспарагиновая кислота является слабой кислотой ($\text{pKa} = 1.88$ для $\alpha\text{-COOH}$, 3.65 для $\beta\text{-COOH}$ и 9.60 для $\alpha\text{-NH}_3^+$) и ограниченно растворима в воде (0.5 г на 100 мл при 25°C), для удаления ее нестехиометрического количества из нанодисперсии аспарагината хитозана можно использовать подходы изогидрической или изотермической кристаллизации, либо их сочетание. Предположили, что несмотря на значимое повышение растворимости аспарагиновой кислоты в присутствии хитозана [28], снижение температуры ниже критической или частичное удаление водной среды путем выпаривания будет понижать растворимость нестехиометрической кислоты в водной среде нанодисперсии, вызывая пересыщение и самоизвестный переход системы в равновесное состояние. В результате должна образоваться новая фаза, в частности, кристаллический осадок аспарагиновой кислоты. При этом необходимо учитывать, что на процесс фазообразования будут влиять не только условия полигидрической или изотермической кристаллизации, но и концентрация кислоты и, соответственно, мольное соотношение кислота/полимер в системе, а также концентрация полимера (в нашем случае наночастиц) в нанодисперсии. Высокая концентрация высокомолекулярного вещества повышает вязкость полимерной системы и существенно замедляет образование новой фазы.

Цель работы – оптимизация кислотно-основного состава водной дисперсии наночастиц аспарагината хитозана методами изогидрической и изотермической кристаллизации в условиях ограниченной растворимости аспарагиновой кислоты.

Материалы и методы

Использовали образец порошкообразного хитозана (CS) со средневязкостной молекулярной массой 200 кДа, степенью деацетилирования 82 мол. % и влажностью 8±1 мас. % (ООО «Биопрогресс», Россия); порошок полученной биокатализитическим синтезом х. ч. *L*-аспарагиновой кислоты (*L*-AspA, ЗАО «Биоамид», РФ); 58.7% глицериновый раствор тетраглицеролата кремния ($\text{Si}(\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_3)_4$), синтезированный в лаборатории Института органического синтеза им. И. Я. Постовского УрО РАН (Екатеринбург, РФ) [29]; 1.0 N HCl (ЗАО «УралХимИнв», РФ); бидистиллированную воду.

Для получения водной дисперсии наночастиц аспарагината хитозана (CS·*L*-AspA) навески порошков CS, *L*-AspA растворяли в бидистиллированной воде на колбонагревателе UED-100DS (UED Group, Китай) при перемешивании магнитной мешалкой в течение 3 ч при 50°C. Систему фильтровали через воронку Шотта-160, добавляли $\text{Si}(\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_3)_4$ из расчета ~0.08 г на 25 мл дисперсии CS·*L*-AspA, перемешивали при 50°C в течение 6 ч, как описано выше, и охлаждали до 22±2°C в термоустойчивом стакане с утеплением со скоростью охлаждения не более 10°C/ч (способ I), либо в условиях комнатной атмосферы посредством теплообмена с окружающим воздухом при скорости охлаждения ~30°C/ч (способ II). В результате формировалась дисперсия оболочечных наночастиц аспарагината хитозана (CS·*L*-AspA·Si). Концентрация CS при приготовлении исходной системы составила $C_{\text{CS}} = 0.3\text{--}0.6 \text{ г/дл}$, $L\text{-AspA} - C_{\text{AspA}} = 0.3\text{--}0.6 \text{ г/дл}$, мольное соотношение $[\text{AspA}]/[\text{CS}]$ в пересчете на $-\text{NH}_2$ группы полимера – 1.3–1.7 моль/осново-моль.

Использовали также комплексную соль гидрохлорид-аспарагинат хитозана (CS·HCl·*L*-AspA), которую готовили путем диспергирования навески CS в бидистиллированной H_2O с последующим добавлением навески *L*-AspA в эквимольном соотношении к полимеру, затем раствора HCl до pH 3.8 при перемешивании магнитной мешалкой в течение 4 ч при 50°C и последующим охлаждением до 22±2°C, как описано выше (способы I и II). Концентрация основных компонентов раствора составила $C_{\text{CS}\cdot\text{HCl}} = 4.0 \text{ г/дл}$, $C_{\text{AspA}} = 3.2 \text{ г/дл}$, мольное соотношение $[\text{AspA}]/[\text{CS}] = 1.0 \text{ моль/осново-моль}$, $[\text{HCl}]/[\text{CS}] = 0.2 \text{ моль/осново-моль}$.

Гравиметрические измерения проводили на аналитических весах «OhausDiscovery» (США), точность взвешивания ±0.01 мг. Влажность



измеряли на влагомере AND MX-50 (Япония). Водородный показатель измеряли на pH-метре Mettler Toledo Five Easy FE20 (Германия).

Изогидрическую кристаллизацию нестехиометрической *L*-AspA в случае оболочечных наночастиц CS·*L*-AspA·Si проводили понижением температуры водной дисперсии в диапазоне 50–4°C, изотермическую – концентрированием (K, %) путем удаления воды отгонкой на 50–85% от исходного объема. Концентрирование нанодисперсии проводили на роторном испарителе

Labtex ИР-1ЛТ (РФ) при температуре отгонки 50°C и остаточном давлении 0.2 атм (рис. 1, I). Сконцентрированные дисперсии выдерживали во времени (t, сут) при 22±2°C (стандартные условия) или 4°C (холодильная камера Liebherr LKPV 6520 MedLine) до выпадения осадка (см. рис. 1, II), который отделяли фильтрованием через предварительно доведенный до постоянной массы бумажный фильтр (см. рис. 1, III) и сушили до воздушно-сухого состояния при комнатной атмосфере.

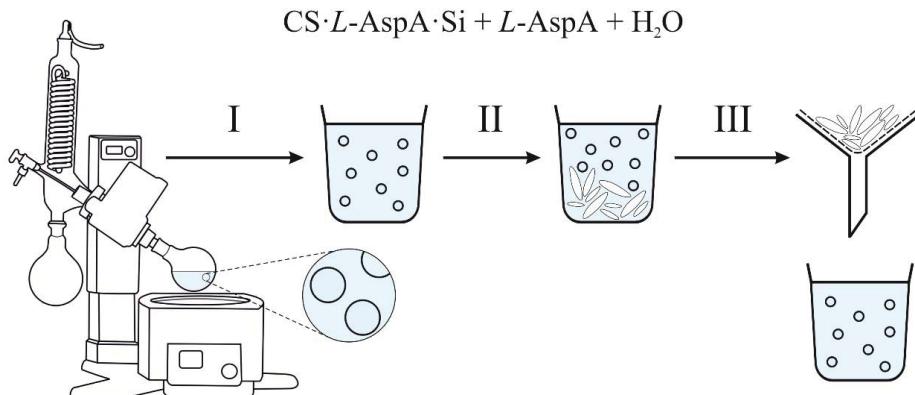


Рис. 1. Схема процесса удаления нестехиометрической аспарагиновой кислоты из водной дисперсии оболочечных наночастиц аспарагината хитозана: I – концентрирование нанодисперсии CS·*L*-AspA·Si на роторном испарителе при 50°C (изотермическая кристаллизация); II – охлаждение сконцентрированной нанодисперсии CS·*L*-AspA·Si до 22±2 или 4°C и выдерживание до образования твердой фазы осадка (изогидрическая кристаллизация); III – отделение осадка фильтрованием

Fig. 1. Scheme of the process of removing non-stoichiometric aspartic acid from an aqueous dispersion of shell nanoparticles of chitosan aspartate: I – concentrating the CS·*L*-AspA·Si nanodispersion on a rotary evaporator at 50°C (isothermal crystallization); II – cooling the concentrated CS·*L*-AspA·Si nanodispersion down to 22±2 or 4°C and holding until a solid phase is formed (isohydric crystallization); III – separation of the precipitate by filtration

Для комплексной соли CS·HCl·*L*-AspA стадию концентрирования не применяли, поскольку использовали раствор с высокой концентрацией полимера. Изогидрическую кристаллизацию несвязанной *L*-AspA осуществляли охлаждением раствора с 50 до 22±2°C и последующем выдерживании при комнатной температуре до выпадения осадка. Твердую фазу отделяли фильтрованием через мембранный фильтр Владивор МФАС-МА № 6 (ЗАО НЦТ, РФ) с размером пор 0.3 мкм, предварительно разбавив в 4 раза исходный раствор холодной дистиллированной водой.

Изображения выделенного из нанодисперсии осадка получали на поляризационном микроскопе (ПМ) ЛабоПол-2 (РФ) при увеличении в 4–40 раз. Источником света служила галогенная лампа (12 В, 30 Вт). Фотографии получены USB-камерой DMC 300 с разрешением 3 Мпх

(Ханчжоу, Китай). Изображения нерастворимой фазы в водной среде нанодисперсии получали на многофункциональном конфокальном лазерном сканирующем микроскопе (КЛСМ) Leica TCS SP8 (Leica Microsystems, UK) при длине волны возбуждения 488 нм и диапазоне детекции эмиссии 520–600 нм. Фотография осадка в растворе комплексной соли сделана фотокамерой смартфона Sony XQ-BT52 в режиме фотосъёмки.

ИК-спектры регистрировали на ИК-спектрометре Nicolet 6700 FT-IR (США) с разрешением 4 cm^{-1} , используя усреднение из 32 сканов в диапазоне 4000–500 cm^{-1} методом нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО). Отнесение колебательных полос поглощения к колебаниям связей проводили с использованием стандартных корреляционных таблиц ИК-спектров основных классов органических соединений.

Рентгенофазовый анализ проводили на рентгеновском дифрактометре ДРОН-8Т (АО «ИЦ «Буревестник», Санкт-Петербург, Россия) с CuK_α -излучением, кремниевой кюветой, параболическим зеркалом Гёбеля (AXO Dresden GmbH, Германия) и позиционно-чувствительным детектором Mythen 2R1D с 640 каналами (Dectris, Швейцария) и дискретностью $2\theta = 0.0144$ град. Геометрия фокусного луча: щели аксиальная 6–10 мм, экваториальная 0.25 мм. Регистрацию осуществляли при вращении кюветы 0.2 об/с в диапазоне углов $2\theta = 5$ –50 град по точкам с шагом 0.1 град для центрального канала детектора и временем экспозиции в точке 4 с. Обработку дифрактограмм проводили с использованием программы АО «ИЦ «Буревестник», качественный анализ – с применением базы данных PDF-2 версии 2.2102 (2021 г.). Пробоподготовка включала дополнительное перетирание порошка выделенного осадка в агатовой ступке.

Диализ проводили с использованием трубчатой мембранны Cellu-Sep (США) с пределом 12–14 кДа против воды в течение 3 сут с заменой воды каждые сутки. Проводимость определяли методом динамического рассеяния света на анализаторе «Zetasizer Nano ZS» (Великобритания) с гелий-неоновым лазером мощностью 4 мВт в кювете DTS1070.

Результаты и их обсуждение

При проведении исследований для разработки подхода к удалению из водной дисперсии оболочечных наночастиц аспарагината хитозана нестехиометрической кислоты и, соответственно, регулирования кислотно-основного состава полимерной системы варьировали концентрацию (C_{CS} и C_{AspA} , г/дл) и мольное соотношение ($[\text{AspA}]/[\text{CS}]$, моль/осново-моль) основных компонентов целевого вещества $\text{CS}\cdot L\text{-AspA}\cdot\text{Si}$ дисперской фазы, степень концентрирования полимерной системы (K , %), а также скорость охлаждения (10 и 30°C/ч), температуру (22±2 и 4°C) и время (1–200 сут) выдерживания нанодисперсии.

Поскольку на выход твердой фазы мало-растворимого вещества при изогидрической кристаллизации влияет скорость охлаждения системы, на первом этапе оценена кинетическая стабильность нанодисперсии $\text{CS}\cdot L\text{-AspA}\cdot\text{Si}$, охлажденной согласно способам I и II. В основе процесса выделения не связанной с полимером $L\text{-AspA}$ лежит ее нерастворимость в холодной

воде, поэтому температура выдерживания составила 4°C. На примере дисперсии наночастиц $\text{CS}\cdot L\text{-AspA}\cdot\text{Si}$ с $C_{\text{CS}} = 0.3$ г/дл, $C_{\text{AspA}} = 0.4$ г/дл, $[\text{AspA}]/[\text{CS}] = 1.7$ моль/осново-моль установлено, что независимо от скорости охлаждения система остается агрегационно и седиментационно стабильной при 4°C в течение длительного времени. Так, даже при медленном охлаждении (способ I), заведомо предопределяющим благоприятные условия зародышеобразования и кристаллизации, дисперсия не показывает признаков выделения осадка в течение ~200 сут хранения. При быстром охлаждении (способ II), когда времени для формирования центров кристаллизации недостаточно, нанодисперсия сохраняет стабильность ~950 сут. В связи с этим для перевода нестехиометрической кислоты в дисперсионной среде в состояние пересыщения увеличили концентрацию целевого вещества в системе.

После отгонки 50% водной среды выделение твердой фазы из нанодисперсии наблюдается на 17-е сут выдерживания при 4°C (табл. 1). Как и следовало ожидать, наиболее легко в состояние пересыщения переводится дисперсия, полученная при медленном охлаждении (способ I). Осадок легко отделяется фильтрованием полимерной системы через бумажный фильтр и после сушки представляет собой мелкодисперсные игольчатые макрочастицы, форма которых подобна морфологии кристаллов исходного порошка $L\text{-AspA}$ (табл. 2). Вместе с тем, через 192 сут выдерживания в тех же температурных условиях наблюдается повторное выпадение осадка, гравиметрическая форма которого представлена кристаллами той же морфологической формы, но частично агрегированными в более крупные частицы.

Исследование воздушно-сухих осадков методами ИК-спектроскопии и рентгенофазового анализа показало соответствие ИК-спектров и рентгенограмм исходному образцу порошкообразной $L\text{-AspA}$, молекулы которой в твердофазном состоянии находятся преимущественно в виде внутренней соли (цвиттер-ионов). Результаты согласуются также с имеющимися в литературе спектроскопическими и дифрактометрическими характеристиками данного соединения [30, 31]. Так, в ИК-спектрах присутствуют все характеристические для $L\text{-AspA}$ частоты колебаний (рис. 2, а, кривые 1–3). Полоса поглощения при ~ 3420 – 3320 cm^{-1} соответствует валентным колебаниям N–H ассоциированных

Таблица 1 / Table 1

Физико-химические характеристики и условия изогидрической/изотермической кристаллизации водной дисперсии оболочечных наночастиц CS·L·AspA·Si, комплексной соли CS·HCl·L·AspA и выделенного из данных систем осадка
Physicochemical characteristics and conditions of isohydric/isothermal crystallization of an aqueous dispersion of CS·L·AspA·Si shell nanoparticles, CS·HCl·L·AspA complex salt, and the precipitate isolated therefrom

Система / System	Концентрация, г/дл / Concentration, g/dl		Соотношение [AspA]/[CS], моль/осново- моль / Ratio [AspA]/[CS], mol/mol of NH ₂	pH	Концентри- рование K, % / Concentra- tion degree K, %	Температура выдерживания, °C / Storage temperature, °C	Время формирования осадка t, сут / Precipitation time t, days	Морфология осадка / Morphology of precipitate	Масса осадка, г / Precipitate weight, g	
	CS	AspA							Рассчитано / Calculated	Найдено / Found
CS·L·AspA·Si	0.3	0.4	I		1.7	3.7	50	17	Игольчатый / Needles	
	0.3	0.3	II		1.3	3.9	50	4	Агрегированный / Aggregated	0.160* 0.064**
	0.6	0.6				70		192		0.072±0.035
	0.6	0.6				85		17	Игольчатый / Needles	
	0.6	0.6						1	Игольчатый / Needles	
	0.6	0.6						15	Мелкодисперсный / Finely dispersed	0.060* 0.036**
	4.0	3.2	I		1.0	3.8	—	22±2	12	Студнеобразный / нитевидный / Gelatinous filiform
	4.0	3.2	I		1.0	3.8	—		5	Игольчатый / Needles
										0.040* 0.020**
										0.018

Примечание. * Теоретически рассчитанная масса нестехиометрической L-AspA (HAsp⁻, H₂Asp). ** Теоретически рассчитанная масса нестехиометрических цвиттер-ионов (~40, 52 и 60% H₂Asp при pH 3.7, 3.8 и 3.9 соответственно).

Note. *Theoretically calculated mass of non-stoichiometric L-AspA (HAsp⁻, H₂Asp). **Theoretically calculated mass of non-stoichiometric zwitterions (~40, 52, and 60% H₂Asp at pH 3.7, 3.8, and 3.9, respectively).



Таблица 2 / Table 2

ПМ-изображения исходного порошка *L*-AspA и выделенного из водной дисперсии наночастиц CS₂*L*-AspA·Si воздушно-сухого осадка; КЛСМ-изображения водонерастворимой фазы в водной среде нанодисперсии CS₂*L*-AspA·Si; фотография осадка в растворе комплексной соли CS·HCl·*L*-AspA
TM images of the initial *L*-AspA powder and the air-dry precipitate isolated from the aqueous dispersion of CS₂*L*-AspA·Si nanoparticles; CLSM images of the water-insoluble phase in a aqueous medium of the CS₂*L*-AspA·Si nanodispersion; photo of the precipitate in a CS·HCl·*L*-AspA complex salt solution

Система / System	Концентрация, г/дл / Concentration, g/dl		[AspA]/[CS], моль/ осново-моль / [AspA]/ [CS], mol/mol of NH ₂	K, %	t, сут / t, days	Изображения объектов / Images of the objects
	CS	AspA				
Исходный порошок <i>L</i> -AspA / Raw <i>L</i> -AspA powder						
Осадок, выделенный из нанодисперсии CS ₂ <i>L</i> -AspA·Si / Sediment isolated from CS ₂ <i>L</i> -AspA·Si nanodispersion	0.3	0.4	1.7	50	17	
Водонерастворимая фаза нанодисперсии CS ₂ <i>L</i> -AspA·Si / Water-insoluble phase of CS ₂ <i>L</i> -AspA·Si nanodispersion	0.3	0.3	1.3	85	1	
Осадок в растворе комплексной соли CS·HCl· <i>L</i> -AspA / Precipitate in a CS·HCl· <i>L</i> -AspA complex salt solution	4.0	3.2	1.0	50	9	
					–	

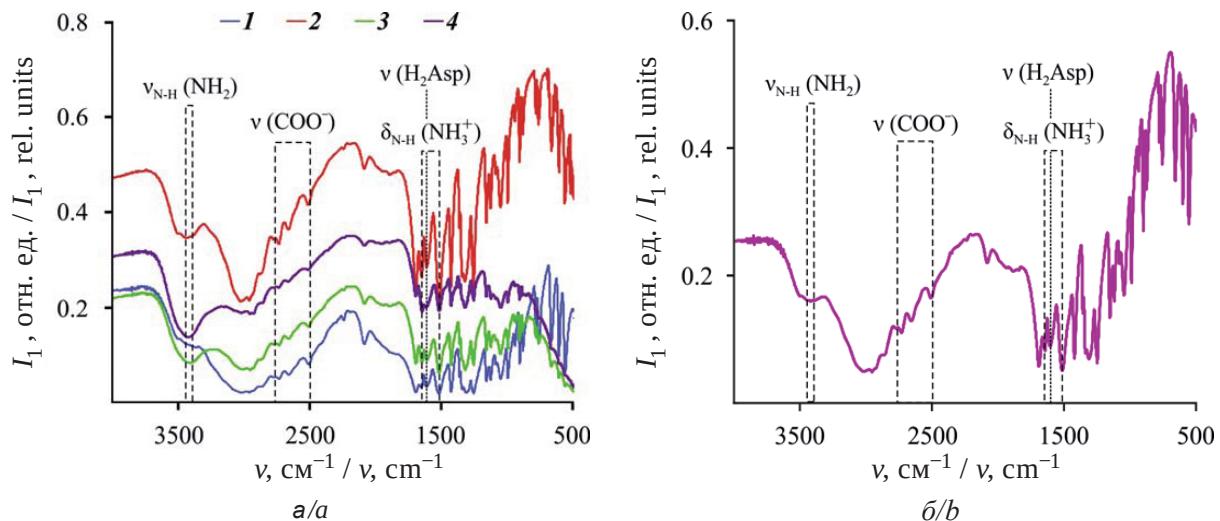


Рис. 2. ИК-спектры: а – исходного порошка *L*-AspA (1) и воздушно-сухого осадка, выделенного из дисперсии наночастиц CS-*L*-AspA-Si с $C_{\text{CS}} = 0.3 \text{ г/дл}$, $C_{\text{AspA}} = 0.4 \text{ г/дл}$ ($[\text{AspA}]/[\text{CS}] = 1.7 \text{ моль/осново-моль}$) при $K = 50\%$ и $t = 17$ (2) и 192 сут (3), $K = 85\%$ и $t = 1$ сут (4); б – воздушно-сухого осадка, выделенного из раствора комплексной соли CS-HCl-*L*-AspA с $C_{\text{CS-HCl}} = 4.0 \text{ г/дл}$, $C_{\text{AspA}} = 3.2 \text{ г/дл}$ ($[\text{AspA}]/[\text{CS}] = 1.0 \text{ моль/осново-моль}$) при $t = 5$ сут (цвет онлайн)

Fig. 2. IR spectra: a – of the initial *L*-AspA powder (1) and the air-dried precipitate isolated from the dispersion of CS-*L*-AspA-Si nanoparticles with $C_{\text{CS}} = 0.3 \text{ g/dL}$, $C_{\text{AspA}} = 0.4 \text{ g/dL}$ ($[\text{AspA}]/[\text{CS}] = 1.7 \text{ mol/mol of NH}_2$) at $K = 50\%$ and $t = 17$ (2) and 192 days (3), $K = 85\%$ and $t = 1$ day (4); b – of the air-dried precipitate isolated from the solution of the complex salt CS-HCl-*L*-AspA with $C_{\text{CS-HCl}} = 4.0 \text{ g/dL}$, $C_{\text{AspA}} = 3.2 \text{ g/dL}$ ($[\text{AspA}]/[\text{CS}] = 1.0 \text{ mol/mol of NH}_2$) at $t = 5$ days (color online)

NH_2 -групп, при $3130\text{--}3030 \text{ cm}^{-1}$ – валентным, а при $1660\text{--}1610$ и $1550\text{--}1485 \text{ cm}^{-1}$ – деформационным колебаниям N-H в $-\text{NH}_3^+$. За колебания COO^- группы ответственны полосы поглощения в диапазоне частот $2760\text{--}2530 \text{ cm}^{-1}$. Интенсивные характеристические полосы в области $1615\text{--}1610 \text{ cm}^{-1}$ свидетельствуют о бетаиновой структуре *L*-AspA. Отсутствие поглощения в области $1740\text{--}1750 \text{ cm}^{-1}$ указывает на локализацию протона не при карбоксилат-ионе, а при аминогруппе, что служит дополнительным доказательством цвиттер-ионной структуры анализируемого химического вещества [30].

Сравнительный анализ рентгенограмм осадка и исходного порошка *L*-AspK показывает идентичность формы и ширины дифракционных пиков, а также их положения при углах 2θ и, соответственно, значений межплоскостных расстояний в кристаллитах (рис. 3, а, кривые 1 и 2). Практически одинаковая высокая интенсивность максимума пиков указывает на высокую степень кристалличности всех анализируемых веществ. Сопоставление рентгенограмм в сочетании с данными ИК-спектроскопии демонстрирует, что при сочетании изогидрической и изотермической кристаллизации образуются химически чистые кристаллы *L*-AspK, а фазовое разделение полимерной системы отсутствует.

Экспериментально найденная суммарная масса высушенных осадков, выделенных на 17-е и 192-е сут хранения нанодисперсии при 4°C , составила $0.072\pm 0.035 \text{ г}$ и значимо ниже теоретически рассчитанной массы нестехиометрической кислоты (см. табл. 1). Однако при пересчете на долю свободных цвиттер-ионнов ($\sim 40\%$ от всех ионных форм *L*-AspA при данных условиях) экспериментальная и теоретическая массы имеют близкие значения. Результаты гравиметрии, наряду с данными микроскопии и прямых методов идентификации химического состава вещества, являются дополнительным подтверждением, что выделенная из водной дисперсии CS-*L*-AspA-Si нерастворимая фаза состоит из кристаллов цвиттер-ионной формы *L*-AspA.

Как и следовало ожидать, при диализной обработке фазово-разделившейся дисперсии наночастиц CS-*L*-AspA-Si наблюдается растворение осадка (рис. 4). При этом отмечается снижение pH диализата с 6.6 до 4.1 и проводимости нанодисперсии с 1.4 до 0.9 мСм/см. Это свидетельствует о достижении на конечном этапе диализа равенства химических потенциалов анионов и цвиттер-ионов *L*-AspA в водной среде диализата и диализуемой дисперсной системе и, соответственно, термодинамического равновесия.

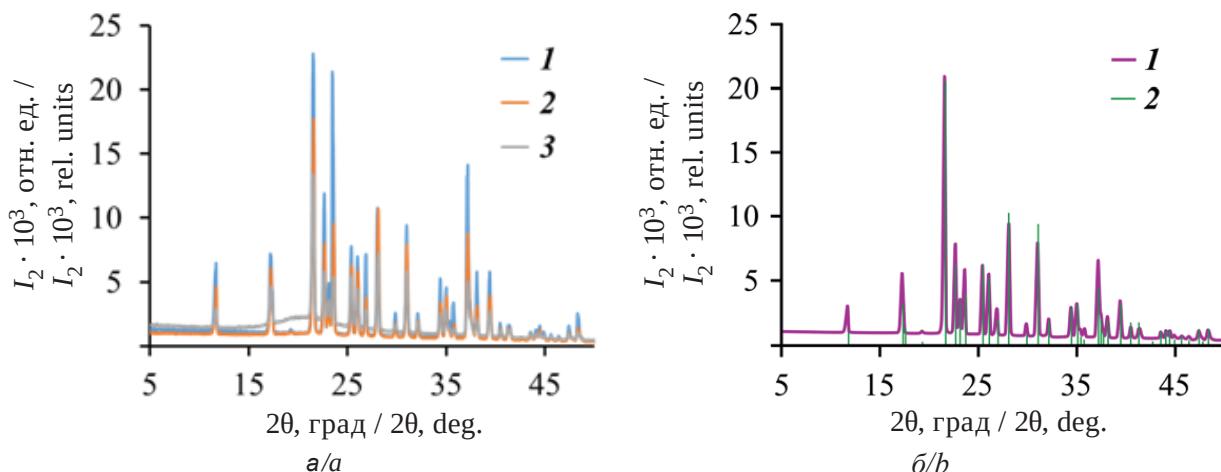


Рис. 3. Рентгенограммы: а – исходного порошка L-AspA (1) и воздушно-сухого осадка, выделенного из дисперсии наночастиц CS-L-AspA-Si с $C_{CS} = 0.3$ г/дл, $C_{AspA} = 0.4$ г/дл ($[AspA]/[CS] = 1.7$ моль/осново-моль) при $K = 50\%$ и $t = 17$ сут (2), $K = 85\%$ и $t = 1$ сут (3); б – воздушно-сухого осадка, выделенного из раствора комплексной соли CS·HCl·L-AspA с $C_{CS\cdot HCl} = 4.0$ г/дл, $C_{AspA} = 3.2$ г/дл ($[AspA]/[CS] = 1.7$ моль/осново-моль) при $t = 5$ сут (1); зеленым цветом показана штрих-дифрактограмма эталонного образца L-AspA из базы данных PDF-2 (цвет онлайн)

Fig. 3. X-ray diffraction patterns: a – of the initial L-AspA powder (1) and of the air-dried precipitate isolated from the dispersion of CS-L-AspA-Si nanoparticles with $C_{CS} = 0.3$ g/dL, $C_{AspA} = 0.4$ g/dL ($[AspA]/[CS] = 1.7$ mol/mol of NH_2) at $K = 50\%$ and $t = 17$ days (2), $K = 85\%$ and $t = 1$ day (3); b – of the air-dried precipitate isolated from the solution of the complex salt CS·HCl·L-AspA with $C_{CS\cdot HCl} = 4.0$ g/dL, $C_{AspA} = 3.2$ g/dL ($[AspA]/[CS] = 1.7$ mol/mol of NH_2) at $t = 5$ days (1); The green lines show the X-ray diffraction pattern of the L-AspA reference sample from the PDF-2 database (2) (color online)

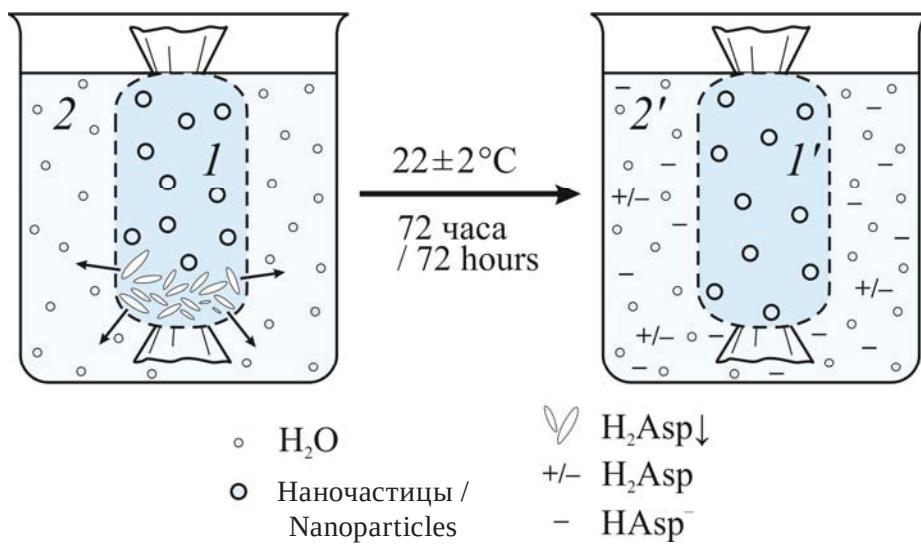


Рис. 4. Схематическое представление осмотических и диффузионных процессов, протекающих при диализе водной дисперсии оболочечных наночастиц аспарагината хитозана после изогидрической и изотермической кристаллизации: 1 – нанодисперсия CS·L-AspA·Si с кристаллами осадка H₂Asp[↓], 1' – нанодисперсия CS·L-AspA·Si после растворения осадка, 2 – H₂O, 2' – H₂O + HAsp⁻ + H₂Asp, где HAsp⁻ и H₂Asp – анион и цвиттер-ион аспарагиновой кислоты соответственно

Fig. 4. Schematic representation of the osmotic and diffusion processes occurring during dialysis of an aqueous dispersion of shell nanoparticles of chitosan aspartate after isohydric and isothermal crystallization: 1 – CS·L-AspA·Si nanodispersion with H₂Asp[↓] precipitate crystals, 1' – CS·L-AspA·Si nanodispersion after precipitate dissolution, 2 – H₂O, 2' – H₂O + HAsp⁻ + H₂Asp, where HAsp⁻ and H₂Asp are the anion and zwitterion of aspartic acid, respectively



Логично, что удаление из системы цвиттер-ионов не приводит к изменениям в водородном показателе: pH исходной дисперсии оболочечных наночастиц CS·L-AspA·Si и после удаления H₂Asp составляет 3.7. При этом в исходной системе постоянные показатели pH-метра устанавливаются в течение ~5–7 мин, а в системе с удаленным избытком кислоты – практически мгновенно. Стало быть, кислотно-основные свойства как исходной нанодисперсии, так и после удаления двойных биполярных ионов определяются солевой формой хитозана [$\sim\text{NH}_3^+$] · HAsp⁻ и нестехиометрической диссоциированной кислотой (HAsp⁻, H⁺). В этой связи предположили, что понижение концентрации L-AspA и, соответственно, мольного соотношения [AspA]/[CS] при приготовлении исходной нанодисперсии должно способствовать уменьшению времени выпадения кристаллов H₂Asp.

На основании проведенного анализа и интерпретации данных, на следующем этапе для выявления влияния количества свободной L-AspA на время её фазового выделения исследовали дисперсию наночастиц CS·L-AspA·Si, полученную при меньшем мольном соотношении полимера и кислоты. При той же, что и в вышеописанных экспериментах, концентрации полимера C_{CS} = 0.3 г/дл, но меньшей концентрации кислоты C_{AspA} = 0.3 г/дл, т.е. при снижении мольного соотношения [AspA]/[CS] до 1.3 моль/осново-моль, в сконцентрированной на 50% нанодисперсии даже при охлаждении до комнатной температуры по способу II практически сразу формируются твердофазные игольчатые частицы. Визуализация последних методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии показала, что их поперечный размер соответствует субмикронному диапазону (см. табл. 2). Малый размер частиц слабо влияет на интенсивность их броуновского движения, вследствие чего время выпадения осадка снижается незначительно и составляет 15 сут после получения дисперсии (см. табл. 1). Выделенный из системы высушенный осадок представляет собой мелкодисперсный порошок, а его весовая гравиметрическая форма существенно меньше теоретической массы цвиттер-ионов.

Повышение концентрации полимера и кислоты в исходной нанодисперсии в два раза (C_{CS} = 0.6 г/дл, C_{AspA} = 0.6 г/дл) при неизменности остальных характеристик системы и параметров эксперимента ([AspA]/[CS] =

= 1.3 моль/осново-моль, K = 50%, 22±2°C) снижает время формирования нерастворимого осадка в тех же условиях до 12 сут (см. табл. 1). Однако осадок имеет студнеобразную нитевидную текстуру и с трудом выделяется из полимерной системы. Это указывает на незавершенность фазового разделения вследствие, вероятно, повышенной вязкости нанодисперсии при такой концентрации CS, L-AspA и K = 50%. Как и для нанодисперсии меньшей концентрации и с тем же соотношением [AspA]/[CS], экспериментально найденная масса осадка не соответствует теоретически рассчитанной. При снижении температуры выдерживания дисперсий с [AspA]/[CS] = 1.3 моль/осново-моль и концентрацией хитозана 0.3 и 0.6 г/дл до 4°C время выпадения осадка, его морфология и гравиметрические показатели практически не изменяются.

Как выяснилось, снижение C_{AspA} и, соответственно, количества нестехиометрических ионов HAsp⁻ и H₂Asp слабо влияет на время достижения пересыщения в дисперсионной среде нанодисперсии относительно мало растворимого компонента и, соответственно, не приводит к заметному сокращению времени фазового выделения кислоты, а одновременное повышение C_{CS} и C_{AspA} при том же мольном соотношении [AspA]/[CS] изменяет морфоструктуру осадка и затрудняет его отделение из полимерной системы. Поэтому для ускорения фазового отделения цвиттер-ионов L-AspA было предложено увеличить степень вакуумной отгонки водной среды дисперсии CS·L-AspA·Si, полученной при [AspA]/[CS] = 1.7 моль/осново-моль способом I, и сохранить условия выдерживания при 4°C.

Оказалось, что концентрирование дисперсии наночастиц CS·L-AspA·Si с C_{CS} = 0.3 г/дл, C_{AspA} = 0.4 г/дл на 70% не влияет на время выпадения осадка. Как и при K = 50%, кристаллы образуются на 17-е сут после приготовления системы (см. табл. 1). Однако после удаления 85% водной среды скорость фазового разделения существенно повышается и образование твердой фазы происходит в течение 24 ч. Осадок, выделенный из нанодисперсии при K = 70 и 85%, представлен частицами игольчатой формы, степень упорядоченности которых значимо выше по сравнению с частицами твердой фазы при K = 50% (см. табл. 2). ИК-спектроскопия и рентгенофазовый анализ подтверждают соответствие осадка кристаллам L-AspA (см. рис. 2, а, кривая 4; рис. 3, а, кривая 3).

Как и в случае нанодисперсии с $K = 50\%$, экспериментально найденная масса осадка соответствует теоретически найденной массе биполярных ионов (см. табл. 1). Таким образом, для эффективного удаления нестехиометрических цвиттер-ионов кислоты лучше всего использовать сконцентрированную на 85% дисперсию наночастиц $\text{CS}\cdot\text{L-AspA}\cdot\text{Si}$, полученную при $[\text{AspA}]/[\text{CS}] = 1.7$ моль/осново-моль способом I и выдержанную в течение суток в условиях холодильной камеры.

Для проверки применимости предложенного подхода к удалению двойных биполярных ионов аналогичные эксперименты были проведены с растворами комплексной соли гидрохлорида аспарагината хитозана. Этап концентрирования был заменен получением исходной системы с максимально возможной концентрацией полимера при эквимолярном содержании кислоты. Раствор соли $\text{CS}\cdot\text{HCl}\cdot\text{L-AspA}$ с $C_{\text{CS}\cdot\text{HCl}} = 4.0$ г/дл, $C_{\text{AspA}} = 3.2$ г/дл, $[\text{AspA}]/[\text{CS}] = 1.0$ моль/осново-моль представлял собой высоковязкую, но визуально однородную жидкость. Выпадение кристаллов из медленно охлажденного по способу I раствора фиксируется уже через 1.5–2.0 сут с момента его приготовления и продолжается до 5 сут хранения полимерной системы при комнатной температуре (см. табл. 2). Как и в случае осадка, выделенного из сконцентрированных дисперсий наночастиц $\text{CS}\cdot\text{L-AspA}\cdot\text{Si}$, выделенная из комплексной соли $\text{CS}\cdot\text{HCl}\cdot\text{L-AspA}$ фаза соответствует кристаллам цвиттер-ионной формы L-AspA : положение и относительная интенсивность полос поглощения ИК-спектра (см. рис. 2, б) совпадают с таковыми для исходного образца кислоты (см. рис. 2, а, кривая 1), а рефлексы на рентгенограмме соответствуют дифрактометрическим пикам штрих-дифрактограммы эталонного образца L-AspA (см. рис. 3, б). Примечательно, что масса воздушно-сухого осадка близка к теоретическому значению массы присутствующих в системе при $\text{pH } 3.8$ биполярных ионов (см. табл. 1). При быстром охлаждении раствора по способу II кроме образования кристаллов кислоты фиксируется и фазовое выделение твердой фазы полимера, хотя и в малом количестве.

Заключение

Проведенное исследование показало, что комбинация изогидрической и изотермической

кристаллизации обеспечивает оптимальные условия для пересыщения хитозансодержащей системы малорастворимой в данных условиях аспарагиновой кислоты и ее последующей кристаллизации с выделением осадка. Это позволяет в сравнительно мягких условиях количественно удалять нестехиометрическую кислоту из водной дисперсии оболочечных наночастиц солевой формы хитозана без использования нейтрализующих оснований, приводящих к понижению степени протонирования макроцепей и биологической активности биогенного аминополисахарида. Предложенный подход демонстрирует высокую степень универсальности и может быть использован для оптимизации кислотно-основного состава как дисперсных, так и молекулярных растворов хитозана, используемых в научных исследованиях и практических приложениях для получения полимерных материалов. Не исключено, что описанный способ может быть применен в различных областях химии и биотехнологии для разработки методик определения аспарагинат-ионов в многокомпонентных смесях, включая смеси аминокислот, а также целевого вещества в фармацевтических препаратах и биологически активных добавках на основе L-AspA и ее солей.

Список литературы

1. Lewandowska K., Szulc M. Rheological and film-forming properties of chitosan composites // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23, № 15. Art. 8763. <https://doi.org/10.3390/ijms23158763>
2. Morin-Crini N., Lichthouse E., Torri G., Crini G. Fundamentals and applications of chitosan // Sustainable Agriculture Reviews. 2019. Vol. 35. P. 49–123. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16538-3_2
3. Михайлов Г. П., Тучков С. В., Лазарев В. В., Кулиш Е. И. Комплексообразование хитозана с уксусной кислотой по данным Фурье-спектроскопии комбинационного рассеяния света // Журнал физической химии. 2014. Т. 88, № 6. С. 973–978. <https://doi.org/10.7868/S0044453714060193>
4. Кузина Л. Г., Мурзагильдина А. С., Чернова В. В., Кулиш Е. И. Влияние степени протонирования хитозана на некоторые его свойства // Вестник Башкирского университета. 2012. Т. 17, № 2. С. 902–905.
5. Nicu R., Bobu E., Desbrieres J. Chitosan as cationic polyelectrolyte in wet-end papermaking systems // Cellul. Chem. Technol. 2011. Vol. 45, № 1. P. 105–111. URL: https://www.researchgate.net/publication/249999122_Chitosan_as_cationic_polyelectrolyte_in_wet-end_papermaking_systems (дата обращения: 02.03.2025).
6. 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 // Carbohydrate Polymers. 2022. Vol. 277. ID: 118773. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118773>
7. Ашурев Н. Ш., Югай С. М., Шахобутдинов С. Ш., Кулумбетов А. С., Атаканов А. А. Физико-химические исследования структуры наночастиц хитозана и аскорбат хитозана // Известия Академии наук. Серия химическая. 2022. №2. С. 227–231.
 8. Kumaraswamy R. V., Kumari S., Choudhary R. C., Sharma S. S., Pal A., Raliya R., Biswas P., Saharan V. Salicylic acid functionalized chitosan nanoparticle: A sustainable biostimulant for plant // Int. J. Biol. Macromol. 2018. Vol. 123. P. 1–35. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.202>
 9. 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, part 2. ID: 128731. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128731>
 10. Soares L. de S., Tonole B., Milião G. L., Teixeira A. V. N. de C., Coimbra J. S. dos R., Oliveira E. B. Aqueous solutions of glycolic, propionic, or lactic acid in substitution of acetic acid to prepare chitosan dispersions: A study based on rheological and physicochemical properties // J. Food Sci. Technol. 2021. Vol. 58, № 5. P. 1797–1807. <https://doi.org/10.1007/S13197-020-04691-0>
 11. Шипенок К. М., Луговицкая Т. Н., Шиповская А. Б. Процессы структурообразования при получении наночастиц L- и D-аспарагината хитозана // Журнал физической химии. 2024. Т. 98, № 8. С. 133–141. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?edn=PHYLHZ>
 12. Amorim M. L., Ferreira G. M. D., Soares L. de S., Soares W. A. dos S., Ramos A. M., Coimbra J. S. dos R., Silva L. H. M. da, Oliveira E. B. de. Physicochemical aspects of chitosan dispersibility in acidic aqueous media: Effects of the food acid counter-anion // Food Biophysics. 2016. Vol. 11, № 4. P. 388–399. <https://doi.org/10.1007/S11483-016-9453-4>
 13. Ing L. Y., Zin N. M., Sarwar A., Katas H. Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties // Int. J. Biomater. 2012. Vol. 2012. P. 1–9. ID: 632698. <https://doi.org/10.1155/2012/632698>
 14. Pillai C. K. S., Paul W., Sharma C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation // Progress in Polymer Science. 2009. Vol. 34. P. 641–678. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.04.001>
 15. 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 // Высокомолекулярные соединения (серия А). 2021. Т. 63, № 1. С. 66–80. <https://doi.org/10.31857/S2308112021010028>
 16. Зоткин М. А., Вихорева Г. А., Кечекьян А. С. Термомодификация хитозановых пленок в форме солей с различными кислотами // Высокомолекулярные соединения. Серия Б. 2004. Т. 46, № 2. С. 359–363.
 17. Cano-Vicent A., Tuñón-Molina A., Martí M., Serrano-Aroca Á. Biocompatible chitosan films containing acetic acid manifested potent antiviral activity against enveloped and non-enveloped viruses // Int. J. Mol. Sci. 2023. Vol. 24, № 15. Art. 12028. <https://doi.org/10.3390/ijms241512028>
 18. Poznanski P., Hameed A., Orczyk W. Chitosan and chitosan nanoparticles: parameters enhancing antifungal activity // Molecules. 2023. Vol. 28, № 7. Art. 2996. <https://doi.org/10.3390/molecules28072996>
 19. Omogbai B. A., Ikenebomeh M. J., Obazenu E. I., Imoni A. A. Changes in pH affects bioactivity of chitosans from *Callinectes sapidus* // J. Appl. Sci. Environ. Manage. 2019 Vol. 23, № 3. P. 411–415. <https://doi.org/10.4314/JASEM.V23I3.7>
 20. Jung J., Cavender G., Zhao Y. The contribution of acidulant to the antibacterial activity of acid soluble α - and β -chitosan solutions and their films // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014. Vol. 98, № 1. P. 425–435. <https://doi.org/10.1007/S00253-013-5334-7>
 21. Актуганов Г. Э., Сафина В. Р., Галимзянова Н. Ф., Кузьмина Л. Ю., Гильванова Е. А., Бойко Т. Ф., Мелентьев А. И. Устойчивость к хитозану бактерий и микромицетов, различающихся по способности к продукции внеклеточных хитиназ и хитозаназ // Микробиология. 2018. Т. 87, № 5. С. 599–609. <https://doi.org/10.1134/S0026365618050026>
 22. Lemma S. M., Bossard F., Rinaudo M. Preparation of pure and stable chitosan nanofibers by electrospinning in the presence of poly(ethylene oxide) // Int. J. Mol. Sci. 2016. Vol. 17, № 11. Art. 1790. <https://doi.org/10.3390/ijms17111790>
 23. Qin C., Li H., Xiao Q., Liu Y., Zhu J., Du Y. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity // Carbohydrate Polymers. 2006. Vol. 63, № 3. P. 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.09.023>
 24. Shmakov S. L., Babicheva T. S., Kurochkina V. A., Lugovitskaya T. N., Shipovskaya A. B. Structural and morphological features of anisotropic chitosan hydrogels obtained by ion-induced neutralization in a triethanolamine medium // Gels. 2023. Vol. 9, № 11. ID: 876. <https://doi.org/10.3390/gels9110876>
 25. Shipenok X. M., Mazhikenova A. M., Glukhovskoy E. G., Shipovskaya A. B. Phase separation of L-menthol an aqueous dispersion of biologically active nanoparticles of chitosan L- and D-aspartate // J. of Biomedical Photonics & Eng. 2024. Vol. 10, № 4. P. 040316–1–040316–7. <https://doi.org/10.18287/JBPE24.10.040316>
 26. Shipovskaya A. B., Ushakova O. S., Volchkov S. S., Shipenok X. M., Shmakov S. L., Gegel N. O., Burov A. M. Chiral nanostructured glycerohydrogel sol–gel plates of chitosan L- and D-aspartate: Supramolecular ordering and optical properties // Gels. 2024. Vol. 10, № 7. ID: 427. <https://doi.org/10.3390/gels10070427>
 27. Шиповская А. Б., Луговицкая Т. Н., Зудина И. В. Биоцидная активность наночастиц аспарагината хитозана // Микробиология. 2023. Т. 92, № 1. С. 68–76. <https://doi.org/10.31857/S0026365622600547>

28. Луговицкая Т. Н., Шиповская А. Б. Физико-химические свойства водных растворов L-аспарагиновой кислоты с добавкой хитозана // Журнал общей химии. 2017. Т. 87, № 4. С. 650–656.
29. Шадрина Е. В., Малинкина О. Н., Хонина Т. Г., Шиповская А. Б., Фомина В. И., Ларченко Е. Ю., Попова Н. А., Зырянова И. Г., Ларионов Л. П. Исследование процесса образования и фармакологической активности кремнийхитозансодержащих глицерогидрогелей, полученных методом биомиметической минерализации // Известия Академии наук. Серия химич. 2015. Т. 64, № 7. С. 1633–1639.
30. Логинова Е. С., Никольский В. М. Биоразлагаемые комплексоны. влияние оптической изомерии на физико-химические свойства // Химическая физика. 2017. Т. 36, № 8. С. 94–100.
31. Lee T., Lin Y. K. The origin of life and the crystallization of aspartic acid in water // Crystal Growth & Design. 2010. Vol. 10, iss. 4. P. 1652–1660.

References

1. Lewandowska K., Szulc M. Rheological and film-forming properties of chitosan composites. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, vol. 23, no. 15, art. 8763. <https://doi.org/10.3390/ijms23158763>
2. Morin-Crini N., Lichfouse E., Torri G., Crini G. Fundamentals and applications of chitosan. *Sustainable Agriculture Reviews*, 2019, vol. 35, pp. 49–123. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16538-3_2
3. Mikhailov G. P., Tuchkov S. V., Lazarev V. V., Kulish E. I. Complexation of chitosan with acetic acid according to Fourier-transform Raman spectroscopy data. *Journal of Physical Chemistry*, 2014, vol. 88, no. 6, pp. 973–978 (in Russian). <https://doi.org/10.7868/S0044453714060193>
4. Kuzina L. G., Murzagildina A. S., Chernova V. V., Kulish E. I. Influence of the degree of protonation of chitosan on some of its properties. *Bulletin of the Bashkir University*, 2012, vol. 17, no. 2, pp. 902–905 (in Russian).
5. Nicu R., Bobu E., Desbrieres J. Chitosan as cationic polyelectrolyte in wet-end papermaking systems. *Cellul. Chem. Technol.*, 2011, vol. 45, no. 1, pp. 105–111. Available at: https://www.researchgate.net/publication/249999122_Chitosan_as_cationic_polyelectrolyte_in_wet-end_papermaking_systems (accessed March 2, 2025).
6. 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. *Carbohydrate Polymers*, 2022, vol. 277. ID: 118773. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118773>
7. Ashurov N. Sh., Yugai S. M., Shakhobutdinov S. Sh., Kulumbetov A. S., Atakhanov A. A. Physico-chemical studies of the structure of chitosan nanoparticles and chitosan ascorbate. *Proceedings of the Academy of Sciences. Chemical series*, 2022, no. 2, pp. 227–231 (in Russian).
8. Kumaraswamy R. V., Kumari S., Choudhary R. C., Sharma S. S., Pal A., Raliya R., Biswas P., Saharan V. Salicylic acid functionalized chitosan nanoparticle: A sustainable biostimulant for plant. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018, vol. 123, pp. 1–35. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.202>
9. 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, part 2. ID: 128731 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128731>
10. Soares L. de S., Tonole B., Milião G. L., Teixeira A. V. N. de C., Coimbra J. S. dos R., Oliveira E. B. Aqueous solutions of glycolic, propionic, or lactic acid in substitution of acetic acid to prepare chitosan dispersions: A study based on rheological and physicochemical properties. *J. Food Sci. Technol.*, 2021, vol. 58, no. 5, pp. 1797–1807. <https://doi.org/10.1007/S13197-020-04691-0>
11. Shipenok K. M., Lugovitskaya T. N., Shipovskaya A. B. Processes of structure formation in the production of L- and D-aspartate chitosan nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry*, 2024, vol. 98, no. 8, pp. 133–141 (in Russian).
12. Amorim M. L., Ferreira G. M. D., Soares L. de S., Soares W. A. dos S., Ramos A. M., Coimbra J. S. dos R., Silva L. H. M. da, Oliveira E. B. de. Physicochemical aspects of chitosan dispersibility in acidic aqueous media: Effects of the food acid counter-anion. *Food Biophysics*, 2016, vol. 11, no. 4, pp. 388–399. <https://doi.org/10.1007/S11483-016-9453-4>
13. Ing L. Y., Zin N. M., Sarwar A., Katas H. Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. *Int. J. Biomater.*, 2012, vol. 2012, pp. 1–9. ID: 632698. <https://doi.org/10.1155/2012/632698>
14. Pillai C. K. S., Paul W., Sharma C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 2009, vol. 34, pp. 641–678. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.04.001>
15. Bochek A. M., Zabivalova N. M., Popova E. N., Lebedeva M. F., Lavrentiev V. K., Yudin V. E. Influence of the nature of the acid on the properties of solutions of mixtures of methylcellulose with chitosan and composite films based on them. *High-Molecular Compounds (Series A)*, 2021, vol. 63, no. 1, pp. 66–80 (in Russian). <https://doi.org/10.31857/S2308112021010028>
16. Zotkin M. A., Vikhoreva G. A., Kechekyan A. S. Thermal modification of chitosan films in the form of salts with various acids. *High-Molecular Compounds. Series B*, 2004, vol. 46, no. 2, pp. 359–363 (in Russian).
17. Cano-Vicent A., Tuñón-Molina A., Martí M., Serrano-Aroca Á. Biocompatible chitosan films containing acetic acid manifested potent antiviral activity against enveloped and non-enveloped viruses. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, vol. 24, no. 15, art. 12028. <https://doi.org/10.3390/ijms24151208>
18. Poznanski P., Hameed A., Orczyk W. Chitosan and chitosan nanoparticles: parameters enhancing antifungal activity. *Molecules*, 2023, vol. 28, no. 7, art. 2996. <https://doi.org/10.3390/molecules28072996>

19. Omogbai B. A., Ikenebomeh M. J., Obazenu E. I., Imoni A. A. Changes in pH affects bioactivity of chitosans from *Callinectes sapidus*. *J. Appl. Sci. Environ. Manage*, 2019, vol. 23, no. 3, pp. 411–415. <https://doi.org/10.4314/JASEM.V23I3.7>
20. Jung J., Cavender G., Zhao Y. The contribution of acidulant to the antibacterial activity of acid soluble α - and β -chitosan solutions and their films. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, vol. 98, no. 1, pp. 425–435. <https://doi.org/10.1007/S00253-013-5334-7>
21. Aktuganov G. E., Safina V. R., Galimzyanova N. F., Kuzmina L. Yu., Gilvanova E. A., Boyko T. F., Melentyev A. I. Resistance to chitosan of bacteria and micromycetes differing in their ability to produce extracellular chitinases and chitosanases. *Microbiology*, 2018, vol. 87, no. 5, pp. 599–609 (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S0026365618050026>
22. Lemma S. M., Bossard F., Rinaudo M. Preparation of pure and stable chitosan nanofibers by electrospinning in the presence of poly(ethylene oxide). *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, vol. 17, no. 11, art. 1290. <https://doi.org/10.3390/ijms17111790>
23. Qin C., Li H., Xiao Q., Liu Y., Zhu J., Du Y. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers*, 2006, vol. 63, no. 3, pp. 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.09.023>
24. Shmakov S. L., Babicheva T. S., Kurochkina V. A., Lugovitskaya T. N., Shipovskaya A. B. Structural and morphological features of anisotropic chitosan hydrogels obtained by ion-induced neutralization in a triethanolamine medium. *Gels*, 2023, vol. 9, no. 11. ID: 876. <https://doi.org/10.3390/gels9110876>
25. Shipenok X. M., Mazhikenova A. M., Glukhovskoy E. G., Shipovskaya A. B. Phase separation of *L*-menthol an aqueous dispersion of biologically active nanoparticles of chitosan *L*- and *D*-aspartate. *J. of Biomedical Photonics & Eng.*, 2024, vol. 10, no. 4, pp. 040316-1–040316-7. <https://doi.org/10.18287/JBPE24.10.040316>
26. Shipovskaya A. B., Ushakova O. S., Volchkov S. S., Shipenok X. M., Shmakov S. L., Gegel N. O., Burov A. M. Chiral nanostructured glycerohydrogel sol–gel plates of chitosan *L*- and *D*-aspartate: Supramolecular ordering and optical properties. *Gels*, 2024, vol. 10, no. 7. ID: 427. <https://doi.org/10.3390/gels10070427>
27. Shipovskaya A. B., Lugovitskaya T. N., Zudina I. V. Biocidal activity of chitosan aspartate nanoparticles. *Microbiology*, 2023, vol. 92, no. 1, pp. 68–76 (in Russian). <https://doi.org/10.31857/S0026365622600547>
28. Lugovitskaya T. N., Shipovskaya A. B. Physicochemical properties of aqueous solutions of *L*-aspartic acid containing chitosan. *Rus. J. Gen. Chem.*, 2017, vol. 87, no. 4, pp. 782–787.
29. Shadrina E. V., Malinkina O. N., Khonina T. G., Shipovskaya A. B., Fomina V. I., Larchenko E. Yu., Popova N. A., Zyryanova I. G., Larionov L. P. Formation and pharmacological activity of silicon–chitosan-containing glycerohydrogels obtained by biomimetic mineralization. *Russian Chemical Bulletin, International Edition*, 2015, vol. 64, no. 7, pp. 1633–1639 (in Russian).
30. Loginova E. S., Nikolsky V. M. Biodegradable complexes. The influence of optical isomerism on physicochemical properties. *Chemical Physics*, 2017, vol. 36, no. 8, pp. 94–100 (in Russian).
31. Lee T., Lin Y. K. The origin of life and the crystallization of aspartic acid in water. *Crystal Growth & Design*, 2010, vol. 10, iss. 4, pp. 1652–1660.

Поступила в редакцию 05.06.2025; одобрена после рецензирования 22.06.2025; принята к публикации 24.06.2025
The article was submitted 05.06.2025; approved after reviewing 22.06.2025; accepted for publication 24.06.2025