

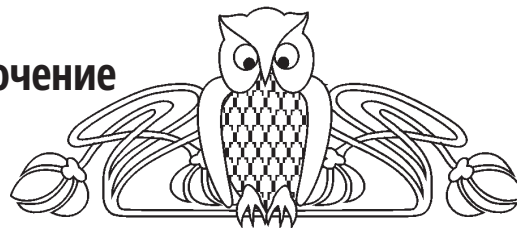


Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 4. С. 411–425
Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology, 2023, vol. 23, iss. 4, pp. 411–425
<https://ichbe.sgu.ru>

<https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-411-425>, EDN: IVZQCS

Научная статья
УДК 547.458.1:[543.42+544.022]

Структура и надмолекулярное упорядочение L- и D-аспарагината хитозана



К. М. Шипенко, А. Б. Шиповская ✉

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

Шипенко Ксения Михайловна, студент 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 института наноструктур и биосистем, shipovskayaab@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1916-4067>

Аннотация. В работе использовали хитозан (CS) со средневязкостной молекулярной массой 200 кДа и степенью деацетилирования 82 мольн.% производства ЗАО «Биопрогресс» (РФ). Получены водные растворы энантиомерных солевых комплексов CS с L- и D-аспарагиновой кислотой (AspA) при эквимольном соотношении CS:AspA, считая на аминогруппы. Порошки солей CS-L-(D-)AspA выделяли из соответствующих растворов упариванием воды и хранили в эксикаторе при нулевой влажности. Установлено, что в таких условиях образуется водорастворимая солевая форма полимера с пластинчатыми светло-бежевыми частицами размером 0.05–1.0 мм. Методами элементного анализа, ИК- и ЯМР-спектроскопии, рентгеновской дифрактометрии проведена оценка химического взаимодействия CS с L-(D-)AspA в водном растворе и конденсированном состоянии, исследованы химическая структура и надмолекулярное упорядочение энантиомерных солей. Установлено, что по классификации Ogawa К. с соавторами формульная единица CS-L-(D-)AspA соответствует негидратированным солям I типа, в которых молекулы воды заменены на анионы кислоты. ИК-спектроскопия подтвердила донорно-акцепторное взаимодействие полимер–кислота и выявила развитую систему меж- и внутримолекулярных контактов. Одно- и двумерная ЯМР-спектроскопия показала взаимодействие пар атомных ядер между H₃–H₆ полимера и 2H₈ или H_α кислоты, H₁ или H₂ и H_α, H₁ и H₃–H₆, обусловленное пространственной близостью протонов в повторяющихся мономерных единицах, удалённых по цепи «изгибных» сегментах цепей и соседних макромолекулах. Для CS-L-AspA выявлены дополнительные резонансы между H₂ и H₃–H₆ полимера, для CS-D-AspA – H₁ или H₂. Рентгеновская дифрактометрия обнаружила высокоупорядоченную ориентацию макроцепей и не типичную для солей CS высокую степень кристалличности. Солевой комплекс CS-D-AspA, в отличие от CS-L-AspA, характеризуется меньшим количеством кристаллизационной воды, более упорядоченной надмолекулярной структурой и более развитой системой меж- и внутримолекулярных контактов.

Ключевые слова: хитозан, L- и D-аспарагиновая кислота, солевые комплексы, взаимодействие, элементный анализ, ИК- и ЯМР-спектроскопия, рентгеновская дифрактометрия

Благодарности: Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект №22-23-00320, <https://rscf.ru/project/22-23-00320/>.

Для цитирования: Шипенко К. М., Шиповская А. Б. Структура и надмолекулярное упорядочение L- и D-аспарагината хитозана // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 4. С. 411–425. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-411-425>, EDN: IVZQCS

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

Article

Structure and supramolecular ordering of chitosan L- and D-aspartates

X. M. Shipenok, A. B. Shipovskaya ✉

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

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. Chitosan (CS) with a viscosity-average molecular weight of 200 kDa and a deacetylation degree of 82 mol%, produced by Bioprogress Ltd. (RF) has been used in this work. Aqueous solutions of enantiomeric salt complexes of CS with L- and D-aspartic acid (AspA) have been obtained at an equimolar CS:AspA ratio, in terms of amino groups. Powders of CS-L-(D-) AspA salts have been isolated from the corresponding solutions



by evaporation of water and stored in a desiccator at zero humidity. It has been established that under such conditions a water-soluble salt form of the polymer with lamellar light beige particles 0.05–1.0 mm in size is formed. Using the methods of elemental analysis, IR and NMR spectroscopy, and X-ray diffractometry, the chemical interaction of CS with *L*-(*D*-)AspA in aqueous solution and condensed state has been evaluated, and the chemical structure and supramolecular ordering of these enantiomeric salts have been studied. It has been established that, according to the classification of K. Ogawa et al., the formula unit CS-*L*-(*D*-)AspA corresponds to non-hydrated salts of type I, in which water molecules are replaced by acid anions. IR spectroscopy confirmed the donor–acceptor polymer–acid interaction and revealed a developed system of intermolecular and intramolecular contacts. One- and two-dimensional NMR spectroscopy showed the interaction of pairs of atomic nuclei between H₃–H₆ of the polymer and 2H_β or H_α of the acid, H₁ or H₂ and H_α, H₁ and H₃–H₆, due to the spatial proximity of protons in repeating monomer units, in the “bend” chain segments removed along the chain, and in neighboring macromolecules. For CS-*L*-AspA, additional resonances have been identified between H₂ and H₃–H₆ of the polymer, for CS-*D*-AspA these have been between H₁ or H₂. X-ray diffractometry has revealed a highly ordered orientation of macrochains and a high crystallinity degree, untypical for CS salts. The salt complex CS-*D*-AspA, in contrast to CS-*L*-AspA, is characterized by a smaller amount of crystallization water, a more ordered supramolecular structure, and a more developed system of intermolecular and intramolecular contacts.

Keywords: chitosan, *L*- and *D*-aspartic acid, salt complexes, interaction, elemental analysis, IR and NMR spectroscopy, X-ray diffractometry

Acknowledgements: This research was funded by a grant from the Russian Science Foundation No. 22-23-00320, <https://rscf.ru/project/22-23-00320/>.

For citation: Shipenok X. M., Shipovskaya A. B. Structure and supramolecular ordering of chitosan *L*- and *D*-aspartates. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 4, pp. 411–425 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-4-411-425>, EDN: IVZQCS

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

Введение

Солевые формы (CS) с органическими и неорганическими кислотами вследствие проявления антиоксидантной, биоцидной, противовирусной, иммуномодулирующей, ранозаживляющей и др. активности, весьма перспективны в разработке новых фармацевтических препаратов и вакцин, средств доставки лекарств, биотрансплантатов и медицинских шовных материалов, а также в ветеринарии, косметологии, лечебном питании, производстве БАДов [1, 2]. Многочисленные исследования показали, что биологическая активность солей CS определяется, в первую очередь, их катионной природой. Например, электростатическое взаимодействие протонированных аминокрупп макроцепи с анионными компонентами поверхностных структур клеточных мембран обуславливает дестабилизацию клеточной стенки и в конечном итоге приводит к гибели патогена [3, 4]. Катионная плотность заряда макромолекул CS и, соответственно, электростатический эффект во многом определяются природой кислоты, используемой для формирования солей [2].

Кроме того, природа кислоты оказывает значимое влияние на конформационные характеристики и структуру солевой формы CS. Так, японская научная группа классифицировала соли хитозана на несколько типов кристаллических структур, отличающихся конформацией макроцепей, количеством кристаллизационной воды, структурно-полиморфной модификацией и кинетической стабильностью [5]. Соли I типа представляют собой безводные кристаллы, в которых молекулы CS принимают форму уд-

линенной двойной спирали 2/1 (аналогичной конформации хитина или целлюлозы), стабилизированной внутримолекулярной водородной связью O₃ – O₅'. Соли II типа образуют гидратированный кристалл, вследствие чего основной вклад в кристаллическую структуру вносят скелетные цепи CS с присутствующими между ними молекулами воды. Молекула CS принимает при этом релаксированную двойную спираль 2/1, состоящую из асимметричных звеньев тетрасахарида. В более поздней работе была установлена конформация вытянутой восьмикратной спирали 8/5 или 8/3 [6]. При формировании солей II типа при низкой температуре молекула CS формирует форму спирали 4/1 с асимметричными звеньями дисахарида. В обоих случаях конформация цепей неустойчивая, поскольку не образуется сильной внутримолекулярной Н-связи, такой как в типе I, но возможна стабилизация спирали анионами. Особенностью солевой формы II типа является спонтанная дегидратация, включающая и удаление кислоты, с необратимым превращением в высококристаллическую полиморфную модификацию CS с системой Н-связей как в типе I [6]. В солях III типа конформация макроцепей CS представлена пятикратной спиралью (5/3) с асимметричным звеном глюкозамина [7].

В последние годы для получения солевой формы CS все чаще стали использовать биологически активные карбоновые кислоты и аминокислоты [8–10]. В данном случае природа кислоты-растворителя оказывает значимое влияние не только на физико-химические свойства материалов, но и расширяет спектр их медико-



биологических свойств [10–12]. Предполагается, что в таких солевых комплексах реализуются не только меж- и внутримолекулярные водородные связи и классические кулоновские взаимодействия, но и специфические кулоновские координации в виде ионных ассоциаций, а также гидрофобные и ион-дипольные контакты [13, 14]. При этом конкуренция кулоновского отталкивания одноименно заряженных мономерных звеньев и притяжения между «нейтрализованными» сегментами полимерных цепей влияет на пространственную упаковку макромолекул и их надмолекулярную ориентацию [14].

Аминокислоты и большинство биологически активных карбоновых кислот хиральны и имеют стереоантиподы, различающиеся пространственным строением и биологической функциональностью, что отражается и на свойствах их солей с CS. Так, L-молочная кислота обладает меньшим термодинамическим сродством к CS, чем её D-изомер, а L- и D-лактаты CS различаются температурой формирования солевых форм I (безводный кристалл) и II типа (гидратированный кристалл) [15]. L- и D-аскорбаты CS отличаются размером макроклубков и их надмолекулярным упорядочением, хирооптическими свойствами, антибактериальной, пролиферирующей, противовоспалительной и ранозаживляющей

щей активностью [16–19]. При этом наибольшую эффективность проявляют соли CS не с фармакологически активной L-аспарагиновой кислотой, а с её D-диастереомером.

Особый интерес представляют солевые формы CS с энантиомерами AspA. L-AspA является заменимой протеиногенной аминокислотой. Выполняет функцию нейромедиатора, участвует в переаминировании, биосинтезе мочевины, пиримидиновых оснований, в цикле лимонной кислоты (Кребса) и др., проявляет антимикробную активность [20, 21]. D-AspA обнаружена в составе белков хрусталика глаза при катаракте, в головном мозге при болезни Альцгеймера, в стенке аорты при атеросклерозе, в дентине зубов человека при физиологическом взрослении [22]. Предполагается, что D-AspA образуется при спонтанной рацемизации L-AspA в структуре полипептидов в процессе старения и выполняет в организме специфические функции эндокринной регуляции.

Молекулы AspA содержат две кислотные COOH-группы и основную NH₂-группу, имеющую противоположную пространственную конфигурацию в случае энантиомерных форм этого вещества (рис. 1, а, б). Вследствие стереоконфигурационных различий энантиомеры AspA характеризуются одинаковым по модулю, но

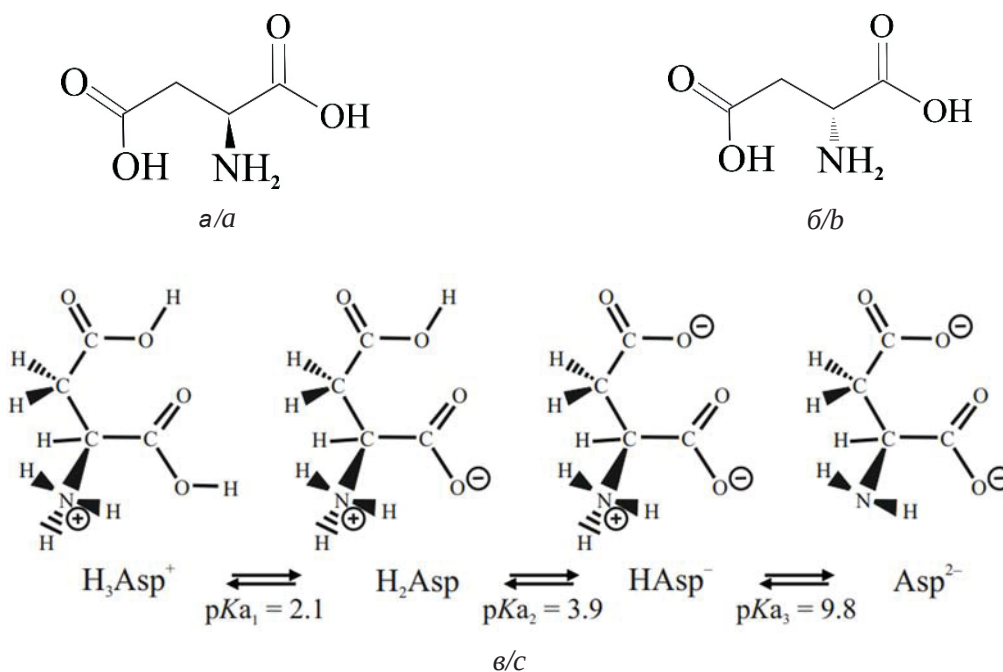


Рис. 1. Структурные формулы энантиомеров L-AspA (а), D-AspA (б) и структуры ионов AspA при разном значении pH (в)

Fig. 1. Structural formulae of enantiomers L-AspA (a), D-AspA (b) and the structure of AspA ions at several pH values (c)



противоположным по знаку удельным оптическим вращением: +25.5 град для *L*-AspA и –25.5 град для *D*-AspA (25°C, 589 нм, 5% в 5 М HCl). Обе кислоты имеют невысокую растворимость в воде [23]. В водной среде в зависимости от pH молекулы AspA существуют в различных пропорциях катионов, диполярных ионов, анионов и дианионов (см. рис. 1, в) [24, 25]. В твердой фазе AspA находится, преимущественно, в цвиттер-ионной форме [26]. ИК-спектры индивидуальных *L*- и *D*-энантиомеров AspA не различимы [21]. Различия в частотах полос поглощения структурных фрагментов наблюдаются лишь для рацемических смесей *L*-AspA + *D*-AspA.

Ранее нами было показано, что водные растворы AspA могут выступать в качестве биосовместимой среды для растворения CS [27]. Формирование аспарагиновокислого CS протекает при pH 3.5–3.8 и минимальном стехиометрическом отношении [AspA]/[–NH₂] ~ 0.43 [28]. В растворе макромолекулы полисоли проявляют свойства полиэлектролита с частично компенсированным зарядом [28, 29] и образуют левозакрученную спиральную вторичную структуру [30]. Порошок CS·AspA, выделенный из соответствующего раствора, имеет форму пластинчатых микрочастиц с фрактальным упорядочением [31]. Установлено, что соли CS·*L*-AspA и CS·*D*-AspA нетоксичны, гемо- и биосовместимы, проявляют высокую ростостимулирующую активность в отношении тест-растений с наилучшим эффектом для солевого комплекса с *D*-антиподом AspA [32]. Вероятно, что подобное проявление биологической активности обусловлено различиями в пространственном упорядочении CS·*L*-AspA и CS·*D*-AspA. Однако детализация структурных особенностей энантиомерных форм CS·*L*-(*D*-)AspA не была проведена.

Целью настоящего исследования является оценка химической структуры и надмолекулярного упорядочения *L*- и *D*-аспарагината CS методами ИК- и ЯМР-спектроскопии, элементного анализа и рентгеновской дифрактометрии.

Материалы и методы

Для исследования выбран CS со средневязкостной молекулярной массой 200 кДа, степенью деацетилирования 82 мольн.%, влажностью $W = 9 \pm 1$ мас.% (ЗАО «Биопрогресс», РФ). Использовали порошки х.ч. *L*-AspA, полученной биокаталитическим синтезом (ЗАО «Биоамид», РФ), и х.ч. *D*-AspA (ЗАО «Вектон», РФ), бидистиллированную воду, D₂O (Cambridge Isotope

Laboratories, Inc., США). Солевые комплексы CS·*L*-(*D*-)AspA получали при мольном соотношении [AspA]/[–NH₂] = 1.0 моль/осново-моль.

Растворы солей CS·*L*-(*D*-)AspA в дистиллированной воде концентрации $C_{CS} = 0.8$ г/дл (для получения порошков) и в D₂O с $C_{CS} = 0.3$ г/дл (для получения ЯМР-спектров) получали на колбонагревателе Labdevices HMS-100D (Китай) при 50.0±0.1°C и перемешивании на магнитной мешалке со скоростью 400 об/мин. В колбу на 100 мл наливали 50 мл дистиллированной воды, подогревали до указанной температуры, засыпали навеску CS и перемешивали 20 мин для набухания частиц полимера. Далее в колбу вносили навеску AspA, добавляли 50 мл воды, перемешивали в течение 2–3 ч до растворения CS, охлаждали до комнатной температуры и пропускали через фильтрующую воронку Шотта-160. Порошки солей CS·*L*-(*D*-)AspA получали упариванием соответствующих растворов в чашках Петри при комнатной температуре (22±2 °C) в воздушной атмосфере, сушили до постоянной массы и измельчали в фарфоровой ступке. Образцы хранили в эксикаторе при нулевой влажности.

Гравиметрические измерения проводили на аналитических весах «Ohaus Discovery» (США).

Элементный анализ выполнен на CHNS-анализаторе Elementar Vario Micro Cube (ElementarAnalysensystem GmbH, Германия): C, H – в токе O₂, N – в токе CO₂. Погрешность составила ±0.5 мас.%. Брутто-формулу (формульную единицу) вещества вычисляли из атомного соотношения C/N, разного для CS и AspA, по методике [33].

ИК-спектры регистрировали на вакуумном ИК-фурье-спектрометре Vertex 70 v (Bruker, США) с термовариацией PIKE GladiATR и разрешением 4 см⁻¹, используя в среднем 36 сканирований в диапазоне 4000–400 см⁻¹ методом нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО). Спектры обрабатывали в программе OPUS. Полосы колебательного поглощения расшифровывали по корреляционным таблицам [34] и экспериментальным работам для AspA, CS и его солевых форм [21, 28, 35].

Спектры ЯМР ¹H (400 МГц), ¹³C (100 МГц), ¹H–¹H COSY, ROESY и NOESY регистрировали на спектрофотометре Bruker Avance II 600 (США) в D₂O при 40°C, внутренний стандарт – тетраметоксисилан. Проводили 32 скана с временем релаксации 1 с в диапазоне частот 5.5–1.5 м.д. Для расшифровки ЯМР-спектров использовали литературные источники [7, 28, 35, 36].



Рентгеновские дифрактограммы получали на дифрактометре ДРОН-8Т (АО «ИЦ «Буревестник», РФ) с излучением $\text{Cu}_{K\alpha}$, параболическим зеркалом Гёбеля (AXO Dresden GmbH, Германия) и позиционно-чувствительным детектором Mythen 2R1D с 640 каналами (Dectris, Швейцария) с дискретностью $2\theta = 0.0144$ град, в кварцевой кювете 2 мм. Геометрия фокусного луча: щели аксиальная 12 мм, экваториальная 0.25 мм. Регистрацию осуществляли в диапазоне углов $2\theta = 5\text{--}40$ град по точкам с шагом 0.02 град для центрального канала детектора и временем экспозиции 10 с в точке. Степень кристалличности (χ , %) рассчитывали, как отношение интегральной интенсивности суммарного рассеяния кристаллитов к полному рассеянию от аморфных и кристаллических областей гра-

фическим интегрированием (программа QCAD 3.15) [37, 38]. Полученные результаты сравнивали с данным работ [28, 39, 40].

Результаты и их обсуждение

При высушивании свежеприготовленного водного раствора CS в L- и D-AspA образуется водорастворимый порошок CS·L-(D-)AspA светло-бежевого цвета, состоящий из пластинчатых частиц размером 0.05–1.0 мм. Формульная единица образцов, полученных при мольном соотношении $[\text{AspA}]/[\sim\text{-NH}_2] = 1.0 \text{ mol/mono-mol}$ и определенная по данным элементного анализа, приведена в табл. 1. Стехиометрический пересчет содержания элементов на усредненное элементарное звено показывает формирование солевых комплексов I типа (безводный кристалл

Таблица 1 / Table 1

Формульная единица и соотношение полос поглощения ИК-спектров порошков CS, CS·L-AspA и CS·D-AspA
Formula unit and correlation of absorption bands in the IR spectra of CS, CS·L-AspA and CS·D-AspA powders

Тип колебания структурного фрагмента / Vibration type of the structural fragment	CS	CS·L-AspA	CS·D-AspA
	Формульная единица / Formula unit		
	$\text{C}_{6.4}\text{H}_{11.4}\text{NO}_{4.2} + 1.5 \text{H}_2\text{O}$	$\text{C}_{6.4}\text{H}_{11.4}\text{NO}_{4.2} + \text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4 + 2.64 \text{H}_2\text{O}$	$\text{C}_{6.4}\text{H}_{11.4}\text{NO}_{4.2} + \text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4 + 1.99 \text{H}_2\text{O}$
Частота полосы поглощения, cm^{-1} / Absorption band frequency, cm^{-1}			
$\nu_{\text{O-H}}$	3435		
$\nu_{\text{N-H}}$	3255		
$\nu_{\text{N-H}} (\text{NH}_3^+)$	–	3125	3115
$\nu_{\text{as}}(\text{CH})$	2925		
$\nu_{\text{s}}(\text{CH})$	2855		
$\nu_{\text{связ}}(\text{OH})$	–	2500	
$\nu_{\text{as}}(\text{C-N})$	2360, 2340	2360	
$\nu_{\text{C-O}} (\text{COO}^-)$	–	2100, 1460	2105, 1465
$\nu_{\text{C=O}} (\text{COOH})$	–	1715	1720
$\delta_{\text{C=O}}$ (Амид I)	1635	1630	
$\delta_{\text{N-H}}$ (Амид II)	1580	1560	1550
$\delta_{\text{as}}(\text{CH})$	1420, 1370	1400, 1350	
$\nu_{\text{C-N}} + \delta_{\text{N-H}}$ (Амид III)	1305 – 1300		
$\nu(\text{C-C}), \nu(\text{C-O}), \nu(\text{C-N}), \delta(\text{C-H})$ Глюкопиранин-ное кольцо Glucopyranose ring	1150		
	1100 – 1080		
	1040 – 1020		
	895 – 890		
	850		
$\delta_{\text{O-H}} (\text{COOH})$	–	615	620



[5]), поскольку количество кристаллизационной воды в $CS \cdot L\text{-AspA}$ и $CS \cdot D\text{-AspA}$ сравнимо с исходным порошком полимера. При этом меньшее количество связанной H_2O содержится в D -аспарагинате CS , что косвенно указывает на сильное взаимодействие компонентов соли, вследствие чего на взаимодействие с водой остаётся меньше центров и групп, чем в L -солевом комплексе.

В ИК-спектрах солевых форм CS с L - и D - $AspA$ присутствуют все характеристические для данного полимера частоты колебаний, в частности, вовлеченных в систему внутри- и межмолекулярных водородных контактов NH - и OH -связей, $-NHCO$ - групп (Амид I и Амид II), симметричных и ассиметричных колебаний CH - и CN -связей, валентных и деформацион-

ных колебаний фрагментов глюкопиранозного кольца (рис. 2, см. табл. 1) [21, 28, 35]. Наблюдаются также плохо разрешенные полосы с центрами при 3125 см^{-1} для порошка $CS \cdot L\text{-AspA}$ и 3115 см^{-1} для порошка $CS \cdot D\text{-AspA}$, относящиеся к протонированным аминогруппам полимера. В спектрах L - и D -аспарагинатов CS имеются характерные для валентных колебаний ионизованных и неионизованных карбонильных групп кислотного остатка полосы поглощения: $2100, 1715, 1460, 615\text{ см}^{-1}$ для $CS \cdot L\text{-AspA}$ и $2105, 1720, 1465, 620\text{ см}^{-1}$ для $CS \cdot D\text{-AspA}$. ИК-спектроскопия подтверждает, что взаимодействие CS с $AspA$ идет с переносом протона кислоты на аминогруппу полимера с образованием NH_3^+ -групп и, соответственно, солевой формы полимера.

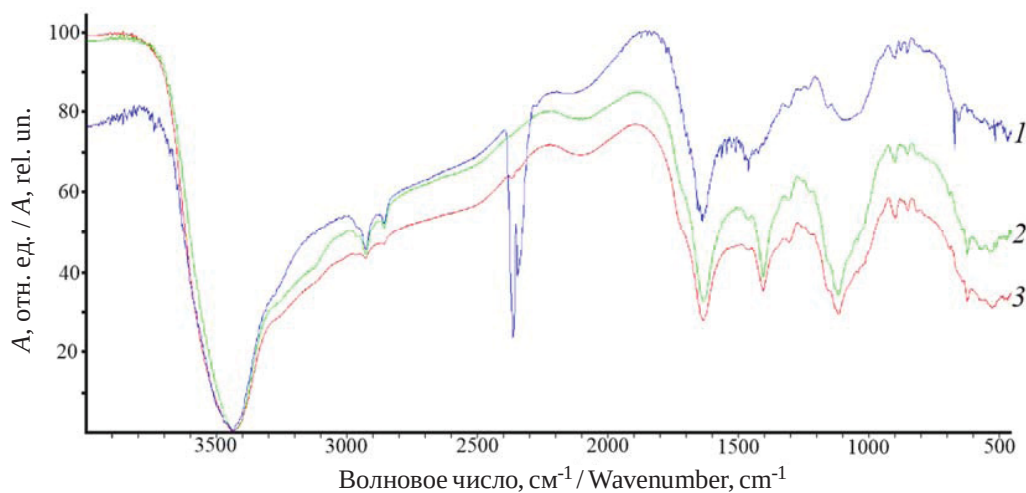


Рис. 2. ИК-спектры порошков: 1 – CS , 2 – $CS \cdot L\text{-AspA}$, 3 – $CS \cdot D\text{-AspA}$ (цвет онлайн)

Fig. 2. IR spectra of powders: 1 – CS , 2 – $CS \cdot L\text{-AspA}$, 3 – $CS \cdot D\text{-AspA}$ (color online)

При этом спектральные характеристики L - и D -аспарагината CS несколько отличаются от ИК-спектров водорастворимых солевых форм этого полимера с анионами карбоновых кислот и от солевого комплекса $CS\text{-}AspA$, синтезированного в среде H_2O + изопропиловый спирт при $4\text{--}10^\circ\text{C}$ в работе [30]. Например, в спектрах четко не выявляются полосы поглощения, характерные для симметричного изгибного растяжения соли амина. Вероятно, валентные колебания NH_3^+ перекрываются с полосой валентных колебаний NH и с полосой ассиметричных валентных колебаний в CH_2 фрагменте (2925 см^{-1} для обоих образцов), что проявляется в виде сравнительно небольшого изгиба спектральной линии с центром при 3125 и 3115 см^{-1} для образцов

$CS \cdot L\text{-AspA}$ и $CS \cdot D\text{-AspA}$ соответственно. Кроме того, полоса поглощения NH_3^+ -группы накладывается на полосу поглощения Амид II, вследствие чего на спектральной линии фиксируется перегиб при 1560 см^{-1} для $CS \cdot L\text{-AspA}$ и 1550 см^{-1} для $CS \cdot D\text{-AspA}$.

При сравнении ИК-спектров L - и D -стереомерных солей CS выявляется, что полосы поглощения валентных колебаний $N\text{-H}$ в протонированной аминогруппе и деформационных колебаний $N\text{-H}$ (полоса Амид II) для образца $CS \cdot D\text{-AspA}$ наблюдаются при меньших значениях волнового числа по сравнению с $CS \cdot L\text{-AspA}$. Валентные колебания $C\text{-O}$ ионизованных и $C\text{-O}$ неионизованных карбоксильных групп, а также деформационные колебания $O\text{-H}$ в -COOH для



порошка CS·D-AspA фиксируются при более высоких значениях ν , чем для порошка CS·L-AspA.

Полученные спектральные характеристики указывают на достаточно развитую систему меж- и внутримолекулярных контактов в надмолекулярной структуре образцов L- и D-аспарагината CS, что не типично для солевой формы этого полимера, протонированные группы которой вследствие внутримолекулярного электростатического отталкивания частично ослабляют исходную жёсткую кристаллическую структуру полимера. Это могут быть Н-связи между соседними цепями полимера или удаленными по цепи «изгибными» сегментами одной и той же

макромолекулы. Не исключены специфические кулоновские и ион-дипольные взаимодействия, о чем указывали авторы [13, 14]. Кроме того, возможны Н-связи между макромолекулами полимера и свободными функциональными группами молекул кислоты. Учитывая, что в твердой фазе AspA находится в цвиттер-ионной форме, разумно предположить возможность участия в формировании Н-связей и биполярного иона молекулы кислоты. При этом наиболее развитой системой Н-связей характеризуется CS·D-AspA.

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C растворов CS·L-(D-) AspA показывают все характерные для CS и AspA сигналы протонов и углеродов (рис. 3, табл. 2)

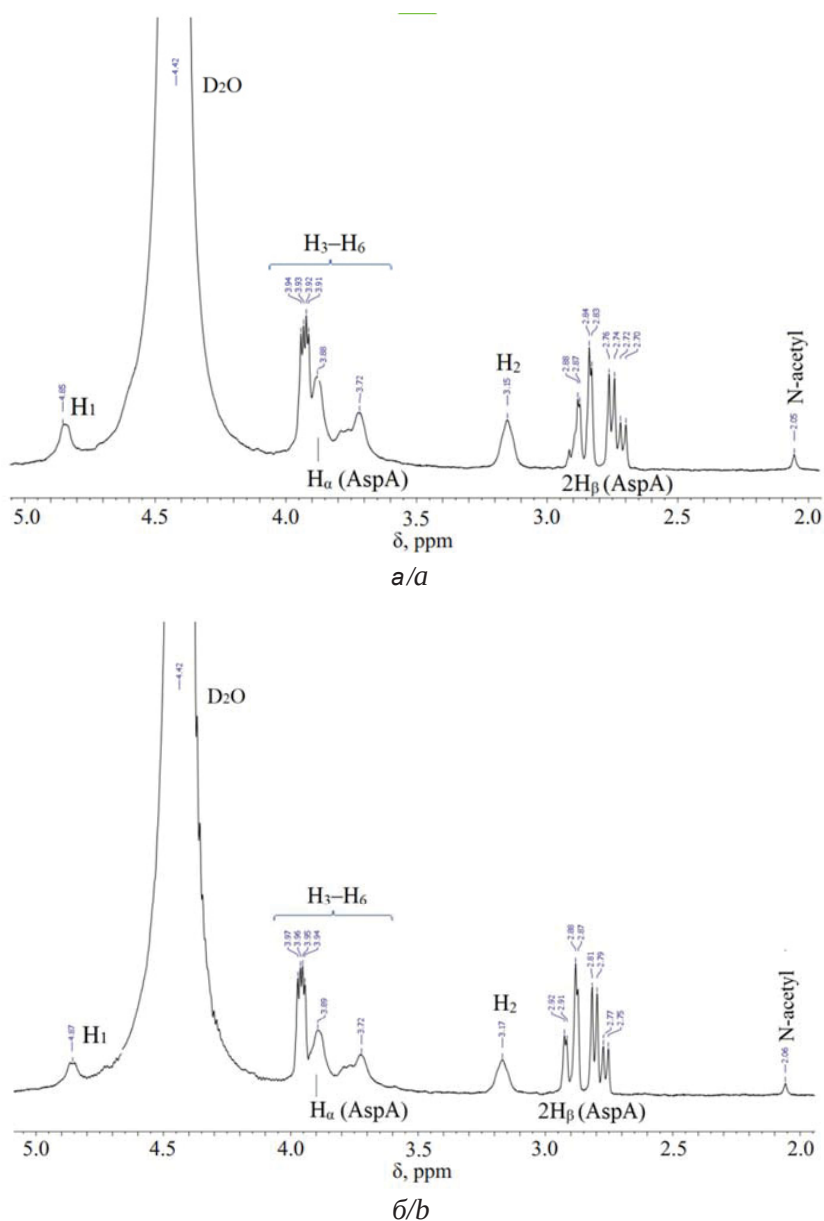


Рис. 3. ЯМР ^1H спектры растворов CS·L-AspA (а) и CS·D-AspA (б) в D_2O
 Fig. 3. ^1H NMR spectra of solutions of CS·L-AspA (a) and CS·D-AspA (b) in D_2O



Таблица 2 / Table 2

Соотнесение полос поглощения спектров ЯМР ^1H и ^{13}C растворов CS, CS·L-AspA и CS·D-AspA в D_2O
Correlation of absorption bands in the ^1H and ^{13}C NMR spectra of solutions of CS, CS·L-AspA and CS·D-AspA in D_2O

δ , ppm	CS·L-AspA		δ , ppm	CS·D-AspA	
	L-AspA	CS		D-AspA	CS
ЯМР ^1H / NMR ^1H					
4.85	–	H_1	4.87	–	H_1
4.42	–	D_2O	4.42	–	D_2O
3.91–3.94	–	$\text{H}_3\text{--H}_6$	3.94–3.97	–	$\text{H}_3\text{--H}_6$
3.72	–		3.72	–	
3.88	H_α	–	3.89	H_α	–
3.15	–	H_2 (деацетилированные звенья / deacetylated links)	3.17	–	H_2 (деацетилированные звенья / deacetylated links)
2.70–2.88	2H_β	–	2.77–2.92	2H_β	–
2.05	–	N-acetyl	2.06	–	N-acetyl
ЯМР ^{13}C / NMR ^{13}C					
179.24	-COOH	–	178.68	-COOH	–
176.27	-COOH	-C=O	176.04	-COOH	-C=O
100.69	–	C_1	100.60	–	C_1
79.63	–	C_4	79.63	–	C_4
77.43	–	C_5	77.44	–	C_5
73.10	–	C_3	73.02	–	C_3
62.87	–	C_6	62.85	–	C_6
58.59	–	C_2	58.58	–	C_2
54.64	-CH-	–	54.38	-CH-	–
38.72	-CH ₂ -	–	38.39	-CH ₂ -	–

[7, 35, 36]. Например, в спектрах ЯМР ^1H , кроме сигналов протонов глюкопиранозного кольца и ацетамидной группы CS присутствует уширенный сигнал протонов α -углеродного атома и квадруплет дублетов протонов β -метиленовой группы AspA. При этом сигнал H_2 в солевых комплексах смещен с сторону меньших δ по сравнению с исходным CS [36], что свидетельствует о формировании протонированных аминогрупп. Уширение сигнальных картин протонов H_α и 2H_β в L-(D-)аспарагинате CS в сравнении с AspA [28] также указывает на солеобразование полимера с кислотой. В сравнении с CS·L-AspA, для CS·D-AspA наблюдается уменьшение площади сигналов H_1 , H_2 , $\text{H}_3\text{--H}_6$, H_α (при $\delta \sim 3.9$ ppm) и небольшое смещение данных резонансов в сторону более сильных полей. Для мультиплета 2H_β обнаруживается увеличение

площади сигнальных картин и более существенный сдвиг в область бóльших значений δ .

Оценка $^1\text{H}\text{--}^1\text{H}$ -связей и, соответственно, корреляции протонов с вицинальными протонами (COSY), пространственной близости удаленных протонов (ROESY) и их пространственной корреляции (NOESY) показала, что для CS·L-AspA и CS·D-AspA отмечаются взаимодействия между $\text{H}_3\text{--H}_6$ полимера и 2H_β или H_α кислоты, H_1 или H_2 и H_α , H_1 и $\text{H}_3\text{--H}_6$. Для CS·L-AspA выявляются дополнительные резонансы между H_2 и $\text{H}_3\text{--H}_6$ полимера, а для CS·D-AspA – H_1 и H_2 . Следует отметить, что выявленные кросс-пики могут быть обусловлены не только пространственной близостью протонов CS и AspA внутри одних и тех же повторяющихся мономерных единиц, но и пространственной близостью протонов соседних цепей полимера или удаленных



по цепи «изгибных» сегментов одной и той же макромолекулы. Выявленные частотно-избирательные отклики протонов указывают на формирование пространственно-сближенного солевого комплекса полимер–кислота, а также,

как и данные ИКС, подтверждают формирование развитой системы меж- и внутримолекулярных контактов. Наибольшее число взаимодействий между парами атомных ядер наблюдается для образца CS-D-AspA (рис. 4, табл. 3).

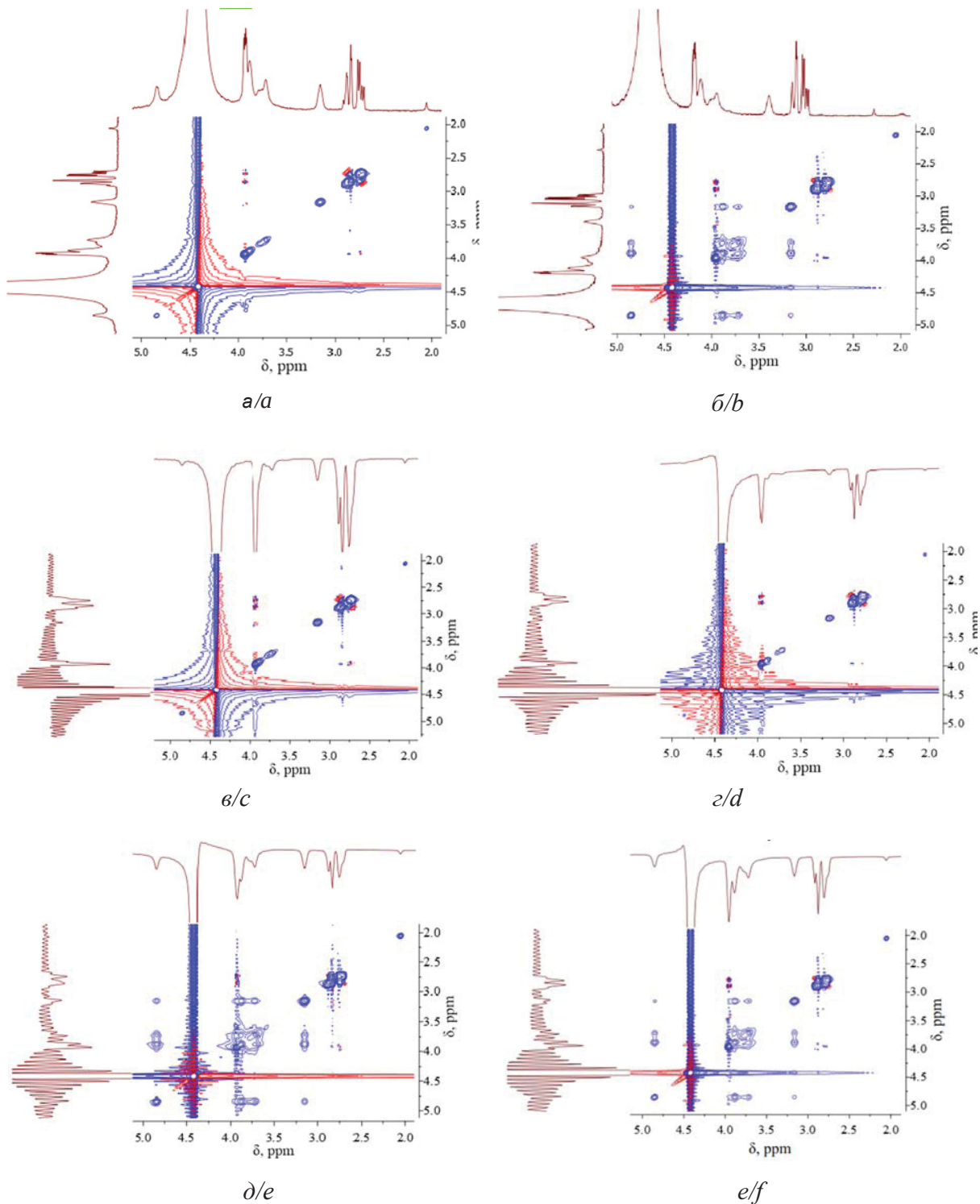


Рис. 4. Спектры COSY (а, б), ROESY (в, г) и NOESY (д, е) растворов CS-L-AspA (а, в, д) и CS-D-AspA (б, г, е) в D₂O
 Fig. 4. COSY (a, b), ROESY (c, d) and NOESY (e, f) spectra of solutions of CS-L-AspA (a, c, e) and CS-D-AspA (b, d, f) in D₂O



Таблица 3 / Table 3

Соотнесение кросс-пиков спектров COSY, ROESY и NOESY растворов CS, CS·L-AspA и CS·D-AspA в D₂O
Correlation of cross-peaks in the COSY, ROESY and NOESY spectra of solutions of CS, CS·L-AspA
and CS·D-AspA in D₂O

δ, ppm		CS·L-AspA	δ, ppm		CS·D-AspA		
¹ H	¹ H		¹ H	¹ H			
COSY							
3.91	2.73	H ₃ -H ₆	2H _β	2.80	3.95	2H _β	H ₃ -H ₆
3.91	2.86			2.87	3.96		
3.93	2.86			2.92	3.95		
3.93	2.73			3.14	4.85	H ₂	H ₁
3.95	2.73			3.16	4.85		
3.95	2.86			3.19	4.85		
				3.71	3.87	H ₃ -H ₆	H _α
				3.88	3.16	H _α	H ₂
ROESY							
3.90	2.74	H ₃ -H ₆	2H _β	3.93	2.90	H ₃ -H ₆	2H _β
3.90	2.86			3.95	2.78		
3.92	2.73			3.95	2.90		
3.92	2.86			3.96	2.78		
3.95	2.73			3.98	2.78		
3.95	2.86			3.98	2.90		
NOESY							
3.72	3.15	H ₃ -H ₆	H ₂	3.72	3.89	H ₃ -H ₆	H _α
3.72	3.88		H _α	3.72	4.85		H ₁
3.72	4.84		H ₁	3.88	3.16		H _α
3.88	3.15	H _α	H ₂	3.89	4.85	H ₁	
3.88	4.84		H ₁	3.92	2.78	H ₃ -H ₆	2H _β
3.92	2.72	H ₃ -H ₆	2H _β	3.93	2.89		
3.94	2.85			3.96	2.78		
				3.96	2.90		
				3.98	2.79		

Рентгеновская дифрактометрия показала существенные различия в надмолекулярном упорядочении *L*- и *D*-аспарагината CS как в сравнении с исходным образцом, так и в отношении энантиомерных солевых форм (рис. 5, табл. 4). На рентгеновской дифрактограмме исходного порошка CS на фоне аморфного гало проявляются основные кристаллические рефлексы при $2\theta \sim 11.1$ и 19.4 град, а также три малоинтенсивных рефлекса в диапазоне 25.5 – 29.0 град. Дифрактограмма является типичной для аморфно-кристаллических полимеров с невысокой степенью кристалличности.

Рентгеновские дифрактограммы энантиомерных солей CS характеризуются уширением основных рефлексов, что свидетельствует о наличии в них меньших по размеру структурных элементов. Интенсивность первого основного рефлекса в области $2\theta \sim 11.2$ – 11.6 град повышается для обоих образцов, а второго – понижается и смещается до 18.5 град для CS·*L*-AspA и 18.7 град для CS·*D*-AspA. Обнаруживаются дополнительные рефлексы в диапазоне $2\theta \sim 21$ – 23 град, проявляющиеся для CS·*L*-AspA уширенным пиком с центром при $2\theta \sim 22.2$ град, а для CS·*D*-AspA – двумя пиками при 21.5 и 22.2 град.

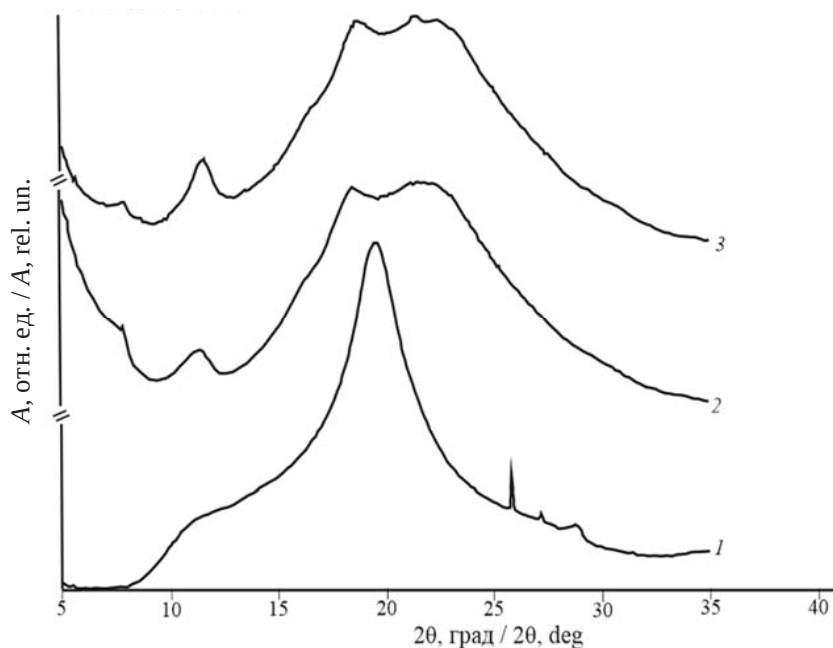


Рис. 5. Рентгеновские дифрактограммы порошков: 1 – CS, 2 – CS·L-AspA, 3 – CS·D-AspA

Fig. 5. X-ray diffraction patterns of powders: 1 – CS, 2 – CS·L-AspA, 3 – CS·D-AspA

Таблица 4 / Table 4

Характеристика кристаллитов и степень кристалличности порошков CS, CS·L-AspA и CS·D-AspA
Characteristics of crystallites and the degree of crystallinity of CS, CS·L-AspA and CS·D-AspA powders

Образец / Sample	Дифракционный угол 2θ, град / Diffraction angle 2θ, deg	Межплоскостное расстояние d, Å / Interplanar distance d, Å	Степень кристалличности χ, % / Degree of crystallinity χ, %
CS	11.12	7.96	34.3
	19.38	4.58	
	25.85	3.45	
	27.31	3.27	
	28.77	3.10	
CS·L-AspA	7.88	11.23	28.0
	11.23	7.88	
	18.46	4.81	
	22.15	4.01	
CS·D-AspA	7.77	11.38	30.2
	11.62	7.62	
	18.69	4.75	
	21.46	4.14	
	22.23	4.00	

Слабоинтенсивные рефлексы в диапазоне $2\theta \sim 25.5\text{--}29.0$ град, наблюдающиеся у исходного порошка CS, на дифрактограммах его диастереомерных солей не обнаруживаются.

Степень кристалличности порошков CS·L-AspA и CS·D-AspA достаточно высокая (см. табл. 4). Несколько меньше исходного образца, но не столь значительно как для солевых комплексов



CS с традиционными карбоновыми кислотами (CH_3COOH , HCOOH) [39, 40]. Значения межплоскостных расстояний в кристаллической решётке, определенные при основном рефлексе $2\theta \sim 11$ град уменьшаются, а при $2\theta \sim 19$ град – увеличиваются. Обнаруженные структурные изменения наиболее выражены для *D*-изомерных солевых комплексов CS. Наиболее высокие значения степени кристалличности также наблюдаются для *D*-аспарагината CS.

Заключение

Таким образом, солевые комплексы CS·*L*-(*D*-)AspA отличаются от известных в литературе солевых комплексов CS с органическими кислотами высокоупорядоченной ориентацией макроцепей. Совокупность результатов элементного анализа, ИК- и ЯМР-спектроскопии, рентгеновской дифрактометрии позволяет предположить, что и развитая система меж- и внутримолекулярных контактов в надмолекулярной структуре энантиомерных солей CS и *L*-(*D*-)AspA стабилизирована посредством сложных ион-ионно-водородных контактов, включающих классические ионные и водородные связи, а также специфические ион-дипольные и ассоциировано-кулоновские взаимодействия, в которых немаловажную роль выполняет стереоизомерная форма оптических антиподов AspA. Солевой комплекс CS·*D*-AspA, в отличие от CS·*L*-AspA, характеризуется меньшим количеством кристаллизационной воды, более развитой системой меж- и внутримолекулярных контактов и более высокой степенью кристалличности.

Список литературы

1. Kou S. G., Peters L., Mucalo M. Chitosan: A review of molecular structure, bioactivities and interactions with the human body and micro-organisms // *Carbohydrate Polymers*. 2022. Vol. 282. ID 119132. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119132>
2. Варламов В. П., Ильина А. В., Шагдарова Б. Ц., Луньков А. П., Мысякина И. С. Хитин/хитозан и его производные: Фундаментальные и прикладные аспекты // *Успехи биологической химии*. 2020. Т. 60. С. 317–368.
3. Sajomsang W., Tantayanon S., Tangpasuthadol V., Daly W. H. Quaternization of N-aryl chitosan derivatives: synthesis, characterization, and antibacterial activity // *Carbohydrate Research*. 2009. Vol. 344, № 18. P. 2502–2511. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.09.004>
4. Xie Y., Liu X., Chen Q. Synthesis and characterization of water-soluble chitosan derivate and its antibacterial activity // *Carbohydrate Polymers*. 2007. Vol. 69. P. 142–147.
5. Ogawa K., Yui T., Okuyama K. Three D structures of chitosan // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2004. Vol. 34, № 1-2. P. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2003.11.002>
6. Ogawa Y., Naito P.-K., Nishiyama Y. Hydrogen-bonding network in anhydrous chitosan from neutron crystallography and periodic density functional theory calculations // *Carbohydrate Polymers*. 2019. Vol. 207. P. 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.04>
7. Kawahara M., Yui T., Oka K., Zugenmaier P., Suzuki S., Kitamura S., Okuyama K., Ogawa K. Fourth 3D Structure of the Chitosan Molecule: Conformation of Chitosan in Its Salts with Medical Organic Acids Having a Phenyl Group // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2003. Vol. 67, № 7. P. 1545–1550. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.1545>
8. Хакимова А. А., Поминов В. В., Бабичева Т. С., Шмаков С. Л., Захаревич А. М., Шиповская А. Б. Применение ПЭМ для изучения микро- и наносфер хитозана, полученных их его солей с разными кислотами // *Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки*. 2022. Т. 15, № 3.3. С. 381–385. <https://doi.org/10.18721/JPM.153.375>
9. Селиванова Н. М., Зимица М. В., Галяметдинов Ю. Г. Фазовое поведение хитозана в органических кислотах // *Жидкие кристаллы и их практическое использование*. 2019. Т. 19, № 3. С. 76–82.
10. Li Q., Song B., Yang Z., Fan H. Electrolytic conductivity behaviors and solution conformations of chitosan in different acid solutions // *Carbohydrate Polymers*. 2006. Vol. 63, № 2. P. 272–282. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.09.024>
11. Singh J., Dutta P. K. Preparation, circular dichroism induced helical conformation and optical property of chitosan acid salt complexes for biomedical applications // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2009. Vol. 45, № 4. P. 384–392. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.07.004>
12. 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 // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018. Vol. 62. P. 239. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.07.004>
13. Endres M. B., Weichold O. Sorption-active transparent films based on chitosan // *Carbohydrate Polymers*. 2019. Vol. 208. P. 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.031>
14. Pigaleva M. A., Portnov I. V., Rudov A. A., Blagodatikh I. V., Grigoriev T. E., Gallyamov M. O., Potemkin I. I. Stabilization of chitosan aggregates at the nanoscale in solutions in carbonic acid // *Macromolecules*. 2014. Vol. 47, № 16. P. 5749–5758. <https://doi.org/10.1021/ma501169c>
15. Kawada J., Yui T., Abe Y., Ogawa K. Crystalline features of chitosan-L- and D-lactic acid salts // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 1998. Vol. 62, № 4. P. 700–704. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.700>



16. Малинкина О. Н., Журавлёва Ю. Ю., Шиповская А. Б. Ранозаживляющая активность *in vivo* глицериогидрогелевых пластин на основе аскорбата хитозана, аллоэ вера и полиолата кремния // Прикладная биохимия и микробиология. 2022. Т. 58, № 2. С. 179–184. <https://doi.org/10.31857/S0555109922020143>
17. 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 // Известия Академии наук. Серия химическая. 2021. № 9. С. 1765–1774. <https://doi.org/10.1007/s11172-021-3281-5>
18. Гегель Н. О., Зудина И. В., Малинкина О. Н., Шиповская А. Б. Влияние изомерной формы аскорбиновой кислоты на антибактериальную активность её солей с хитозаном // Микробиология. 2018. Т. 87, № 5. С. 618–623. <https://doi.org/10.1134/S0026365618050105>
19. Gegel N. O., Zhuravleva Y. Y., 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, № 3. ID 259. <https://doi.org/10.3390/polym10030259>
20. Ayon N. J. Features, roles and chiral analyses of proteinogenic amino acids // AIMS Molecular Science. 2020. Vol. 7, iss. 3. P. 229–268. <https://doi.org/10.3934/molsci.202001>
21. Lee Tu, Lin Yu K. The origin of life and the crystallization of aspartic acid in water // Crystal Growth & Design. 2010. Vol. 10, № 4. P. 1652–1660. <https://doi.org/10.1021/cg901219f>
22. Червяков А. В., Захарова М. Н., Пестов Н. Б. Роль D-аминокислот в патогенезе нейродегенеративных заболеваний и при нормальном старении // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2014. Т. 8, № 2. С. 51–58.
23. Wang J., Wang J., Liu J., Wang S., Pei J. Solubility of D-aspartic acid and L-aspartic acid in aqueous salt solutions from (293 to 343) K // Journal of Chemical & Engineering Data. 2010. Vol. 55, № 4. P. 1735–1738. <https://doi.org/10.1021/je9007102>
24. Sang-Aroon W., Ruangpornvisuti V. Determination of aqueous acid-dissociation constants of aspartic acid using PCM/DFT method // International Journal of Quantum Chemistry. 2008. Vol. 108, № 6. P. 1181–1188. <https://doi.org/10.1002/qua.21569>
25. Apelblat A., Manzurola E., Orekhova Z. Electrical conductance studies in aqueous solutions with aspartic ions // Journal of Solution Chemistry. 2008. Vol. 37. P. 97–105. <https://doi.org/10.1007/s10953-007-9223-5>
26. Derissen J. L., Endeman H. J., Peerdeman A. F. The crystal and molecular structure of L-aspartic acid // Acta Crystallographica Section B: Structural Crystallography and Crystal Chemistry. 1968. Vol. 24, № 10. P. 1349–1354. <https://doi.org/10.1107/S05567740868004280>
27. 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.
28. 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>
29. Lugovitskaya T. N., Shipovskaya A. B., Shipenok X. M. Kinetic instability of a chitosan – aspartic acid – water system as a method for obtaining nano- and microparticle // Chimica Techno Acta. 2021. Vol. 8, iss. 4. ID 20218405. <https://doi.org/10.15826/chimtechn.2021.8.4.05>
30. Singh J., Dutta P. K. Preparation, circular dichroism induced helical conformation and optical property of chitosan acid salt complexes for biomedical applications // International Journal of Biological Macromolecules. 2009. Vol. 45, iss. 4. P. 384–392. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.07.004>
31. Луговицкая Т. Н., Зудина И. В., Шиповская А. Б. Получение и свойства аспарагиновокислых растворов хитозана // Журнал прикладной химии. 2020. Т. 93, вып. 1. С. 90–99. <https://doi.org/10.31857/S0044461820010090>
32. Shipovskaya A., Shipenok X., Lugovitskaya T., Babicheva T. Self-assembling nano- and microparticles of chitosan L- and D-aspartate: Preparation, structure, and biological activity // Materials Proceedings. 2023. Vol. 14, iss. 1. ID 31. <https://doi.org/10.3390/IOC2023-14492>
33. 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 // Carbohydrate Research. 2009. Vol. 344. P. 2591–2595. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.08.030>
34. Тарасевич Б. Н. ИК-спектры основных классов органических соединений. Справочные материалы. М.: Изд-во МГУ, 2012. 55 с.
35. Комаров Б. А., Малков Г. В., Васильев С. Г., Баскаков С. А., Эстрина Г. А., Гурьева Л. Л., Волков В. И., Фролова М. А., Албулов А. И. Окислительная деструкция хитозана и его стабильность // Высокомолекулярные соединения. Серия Б. 2019. Т. 61, № 2. С. 132–143. <https://doi.org/10.1134/S2308113919020037>
36. 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, iss. 5. P. 1567–1636. <https://doi.org/10.3390/md8051567>
37. Shipovskaya A. B., Shmakov S. L., Gegel N. O. Optical activity anisotropy of chitosan-based films // Carbohydrate Polymers. 2019. Vol. 206. P. 476–486. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.026>
38. Могилевская Е. Л., Акопова Т. А., Зеленецкий А. Н., Озерин А. Н. О кристаллической структуре хитина и хитозана // Высокомолекулярные соединения. Серия А. 2006. Т. 48, № 2. С. 216–226.
39. Дресвянина Е. Н., Гребенников С. Ф., Добровольская И. П., Масленникова Т. П., Иванькова Е. М.,



Юдин В. Е. Влияние наночитина на сорбционные свойства композиционных пленок на основе хитозана // *Высокомолекулярные соединения. Серия А*. 2020. Т. 62, № 3. С. 181–188. <https://doi.org/10.31857/S2308112020030050>

40. Агеев Е. П., Вихорева Г. А., Зоткин М. А., Матушкина Н. Н., Герасимов В. И., Зезин С. Б., Оболонкова Е. С. Структура и транспортные свойства хитозановых пленок, модифицированных термообработкой // *Высокомолекулярные соединения. Серия А*. 2004. Т. 46, № 12. С. 2035–2041.

References

1. Kou S. G., Peters L., Mucalo M. Chitosan: A review of molecular structure, bioactivities and interactions with the human body and micro-organisms. *Carbohydrate Polymers*, 2022, vol. 282, ID 119132. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119132>
2. Varlamov V. P., Ilyina A. V., Shagdarova B. Ts., Lunkov A. P., Mysyakina I. S. Chitin/chitosan and its derivatives: Fundamental problems and practical approaches. *Biochemistry (Moscow)*, 2020, vol. 85, no. Suppl. 1, pp. 154–176. <https://doi.org/10.1134/S0006297920140084>
3. Sajomsang W., Tantayanon S., Tangpasuthadol V., Daly W. H. Quaternization of N-aryl chitosan derivatives: Synthesis, characterization, and antibacterial activity. *Carbohydrate Research*, 2009, vol. 344, no. 18, pp. 2502–2511. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.09.004>
4. Xie Y., Liu X., Chen Q. Synthesis and characterization of water-soluble chitosan derivative and its antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers*, 2007, vol. 69, pp. 142–147.
5. Ogawa K., Yui T., Okuyama K. Three D structures of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2004, vol. 34, no. 1-2, pp. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2003.11.002>
6. Ogawa Y., Naito P.-K., Nishiyama Y. Hydrogen-bonding network in anhydrous chitosan from neutron crystallography and periodic density functional theory calculations. *Carbohydrate Polymers*, 2019, vol. 207, pp. 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.04>
7. Kawahara M., Yui T., Oka K., Zugenmaier P., Suzuki S., Kitamura S., Okuyama K., Ogawa K. Fourth 3D structure of the chitosan molecule: Conformation of chitosan in its salts with medical organic acids having a phenyl group. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2003, vol. 67, no. 7, pp. 1545–1550. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.1545>
8. Khakimova A. A., Pominov V. V., Babicheva T. S., Shmakov S. L., Zakharevich A. M., Shipovskaya A. B. TEM use for the study of chitosan microspheres and nanospheres obtained from its salts with several acids. *St. Petersburg Polytechnic University Journal. Physics and Mathematics*, 2022, vol. 15, no. 3.3, pp. 381–385 (in Russian). <https://doi.org/10.18721/JPM.153.375>
9. Selivanova N. M., Zimina M. V., Galyametdinov Y. G. Phase behavior of chitosan in organic acids. *Liquid Crystals and Their Practical Use*, 2019, vol. 19, no. 3, pp. 76–82 (in Russian).
10. Li Q., Song B., Yang Z., Fan H. Electrolytic conductivity behaviors and solution conformations of chitosan in different acid solutions. *Carbohydrate Polymers*, 2006, vol. 63, no. 2, pp. 272–282. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.09.024>
11. Singh J., Dutta P. K. Preparation, circular dichroism induced helical conformation and optical property of chitosan acid salt complexes for biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2009, vol. 45, no. 4, pp. 384–392. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.07.004>
12. 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. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, vol. 62, pp. 239. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.07.004>
13. Endres M. B., Weichold O. Sorption-active transparent films based on chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 2019, vol. 208, pp. 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.031>
14. 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. *Macromolecules*, 2014, vol. 47, no. 16, pp. 5749–5758. <https://doi.org/10.1021/ma501169c>
15. Kawada J., Yui T., Abe Y., Ogawa K. Crystalline features of chitosan-L- and D-lactic acid salts. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1998, vol. 62, no. 4, pp. 700–704. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.700>
16. Malinkina O. N., Zhuravleva Y. Y., Shipovskaya A. B. *In vivo* wound-healing activity of glycerohydrogel plates based on ascorbate chitosan, aloe vera, and silicon polyolate. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2022, vol. 58, no. 2, pp. 161–165 (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S0003683822020144>
17. Shipovskaya A. B., Malinkina O. N., Gegel N. O., Zudina I. V., Lugovitskaya T. N. Structure and properties of chitosan salt complexes with ascorbic and diastereomers. *Russian Chemical Bulletin*, 2021, vol. 70, no. 9, pp. 1765–1774 (in Russian). <https://doi.org/10.1007/s11172-021-3281-5>
18. Gegel N. O., Zudina I. V., Malinkina O. N., Shipovskaya A. B. Effect of ascorbic and isomeric forms on antibacterial activity of its chitosan salts. *Microbiology*, 2018, vol. 87, no. 5, pp. 732–737 (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S0026261718050107>
19. Gegel N. O., Zhuravleva Y. Y., 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, ID 259. <https://doi.org/10.3390/polym10030259>
20. Ayon N. J. Features, roles and chiral analyses of proteinogenic amino acids. *AIMS Molecular Science*, 2020, vol. 7, iss. 3, pp. 229–268. <https://doi.org/10.3934/molsci.202001>



21. Lee Tu, Lin Yu K. The origin of life and the crystallization of aspartic acid in water. *Crystal Growth & Design*, 2010, vol. 10, no. 4, pp. 1652–1660. <https://doi.org/10.1021/cg901219f>
22. Cherviakov A. V., Zakharova M. N., Pestov N. B. Role of D-amino acids in the pathogenesis of neurodegenerative diseases and in normal aging. *Annals of Clinical and Experimental Neurology*, 2014, vol. 8, no. 2, pp. 51–58 (in Russian).
23. Wang J., Wang J., Liu J., Wang S., Pei J. Solubility of D-aspartic acid and L-aspartic acid in aqueous salt solutions from (293 to 343) K. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 2010, vol. 55, no. 4, pp. 1735–1738. <https://doi.org/10.1021/je9007102>
24. Sang-Aroon W., Ruangpornvisuti V. Determination of aqueous acid-dissociation constants of aspartic acid using PCM/DFT method. *International Journal of Quantum Chemistry*, 2008, vol. 108, no. 6, pp. 1181–1188. <https://doi.org/10.1002/qua.21569>
25. Apelblat A., Manzurola E., Orekhova Z. Electrical conductance studies in aqueous solutions with aspartic ions. *Journal of Solution Chemistry*, 2008, vol. 37, pp. 97–105. <https://doi.org/10.1002/s10953-007-9223-5>
26. Derissen J. L., Endeman H. J., Peerdeman A. F. The crystal and molecular structure of L-aspartic acid. *Acta Crystallographica Section B: Structural Crystallography and Crystal Chemistry*, 1968, vol. 24, no. 10, pp. 1349–1354. <https://doi.org/10.1107/S0567740868004280>
27. Lugovitskaya T. N., Shipovskaya A. B. Physicochemical properties of aqueous solutions of L-aspartic acid containing chitosan. *Russian Journal of General Chemistry*, 2017, vol. 87, no. 4, pp. 782–787 (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S1070363217040193>
28. 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>
29. Lugovitskaya T. N., Shipovskaya A. B., Shipenok X. M. Kinetic instability of a chitosan – aspartic acid – water system as a method for obtaining nano- and micro-particle. *Chemica Techno Acta*, 2021, vol. 8, iss. 4, ID 20218405. <https://doi.org/10.15826/chimtech.2021.8.4.05>
30. Singh J., Dutta P. K. Preparation, circular dichroism induced helical conformation and optical property of chitosan acid salt complexes for biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2009, vol. 45, iss. 4, pp. 384–392. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.07.004>
31. Lugovitskaya T. N., Zudina I. V., Shipovskaya A. B. Obtaining and properties of L-aspartic acid solutions of chitosan. *Russian Journal of Applied Chemistry*, 2020, vol. 93, iss. 1, pp. 80–88 (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S1070427220010097>
32. Shipovskaya A., Shipenok X., Lugovitskaya T., Babicheva T. Self-assembling nano- and microparticles of chitosan L- and D-aspartate: Preparation, structure, and biological activity. *Materials Proceedings*, 2023, vol. 14, iss. 1, ID 31. <https://doi.org/10.3390/IOC2023-14492>
33. 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. *Carbohydrate Research*, 2009, vol. 344, pp. 2591–2595. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.08.030>
34. Tarasevich B. N. *ИК-спектры основных классов органических соединений. Справочные материалы* [IR spectra of the main classes of organic compounds. Reference materials]. Moscow, Moscow University Press, 2012. 55 p. (in Russian).
35. Komarov B. A., Malkov G. V., Vasil'ev S. G., Baskakov S. A., Estrina G. A., Gur'eva L. L., Volkov V. I., Frolova M. A., Albulov A. I. Oxidative destruction of chitosan and its stability. *Polymer Science, Series B*, 2019, vol. 61, no. 2, pp. 189–199. <https://doi.org/10.1134/S2308113919020037>
36. 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, iss. 5, pp. 1567–1636. <https://doi.org/10.3390/md8051567>
37. Shipovskaya A. B., Shmakov S. L., Gegel N. O. Optical activity anisotropy of chitosan-based films. *Carbohydrate Polymers*, 2019, vol. 206, pp. 476–486. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.026>
38. Mogilevskaya E. L., Akopova T. A., Zelenetsky A. N., Ozerin A. N. The crystal structure of chitin and chitosan. *Polymer Science, Series A*, 2006, vol. 48, no. 2, pp. 116–123 (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S0965545X06020039>
39. Dresvyanina E. N., Grebennikov S. F., Dobrovol'skaya I. P., Ivan'kova E. M., Yudin V. E., Maslennikova T. P., Ivanov'kova E. M., Yudin V. E. Effect of chitin nanofibrils on sorption behavior of chitosan-based composite films. *Polymer Science, Series A*, 2020, vol. 62, no. 3, pp. 181–188 (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S0965545X20030050>
40. Ageev E. P., Vikhoreva G. A., Zotkin M. A., Matushkina N. N., Gerasimov V. I., Zezin S. B., Obolonkova E. S. Structure and transport behavior of heat-treated chitosan films. *Polymer Science, Series A*, 2004, vol. 46, no. 12, pp. 1245–1250 (in Russian).

Поступила в редакцию 14.09.2023; одобрена после рецензирования 25.09.2023; принята к публикации 27.09.2023
The article was submitted 14.09.2023; approved after reviewing 25.09.2023; accepted for publication 27.09.2023