

## ЭНЕРГЕТИКА СОЛЕОБРАЗОВАНИЯ И НАДМОЛЕКУЛЯРНОЕ УПОРЯДОЧЕНИЕ *L*- И *D*-АСКОРБАТОВ ХИТОЗАНА

© 2023 г. О. Н. Малинкина<sup>а,\*</sup>, А. Б. Шиповская<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского.  
Институт химии 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83, Россия

\*e-mail: Olga-Malinkina@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.09.2023 г.

После доработки 23.10.2023 г.

Принята к публикации 13.11.2023 г.

На примере двух образцов хитозана (*D*-глюкана) со средневязкостной молекулярной массой  $40 \times 10^3$  и  $200 \times 10^3$  исследовано влияние диастереомерной формы (*L*- и *D*-) аскорбиновой кислоты на энергетику формирования, структуру и надмолекулярное упорядочение гетеро-(*D*-*L*) и гомохиральных (*D*-*D*) солевых комплексов полимер–кислота. Установлено, что тепловой эффект при взаимодействии хитозана с *L*-аскорбиновой кислотой в водной среде и степень протонирования (*D*-*L*)-солей меньше по сравнению с *D*-изомером кислоты. Гомохиральные (*D*-*D*)-соли в отличие от гетерохиральных (*D*-*L*)-солей отличаются меньшим количеством кристаллизационной воды, высокой степенью кристалличности и более уплотненной надмолекулярной структурой с высоким уровнем меж- и внутримолекулярных контактов.

DOI: 10.31857/S2308112023600059, EDN: DDFOKH

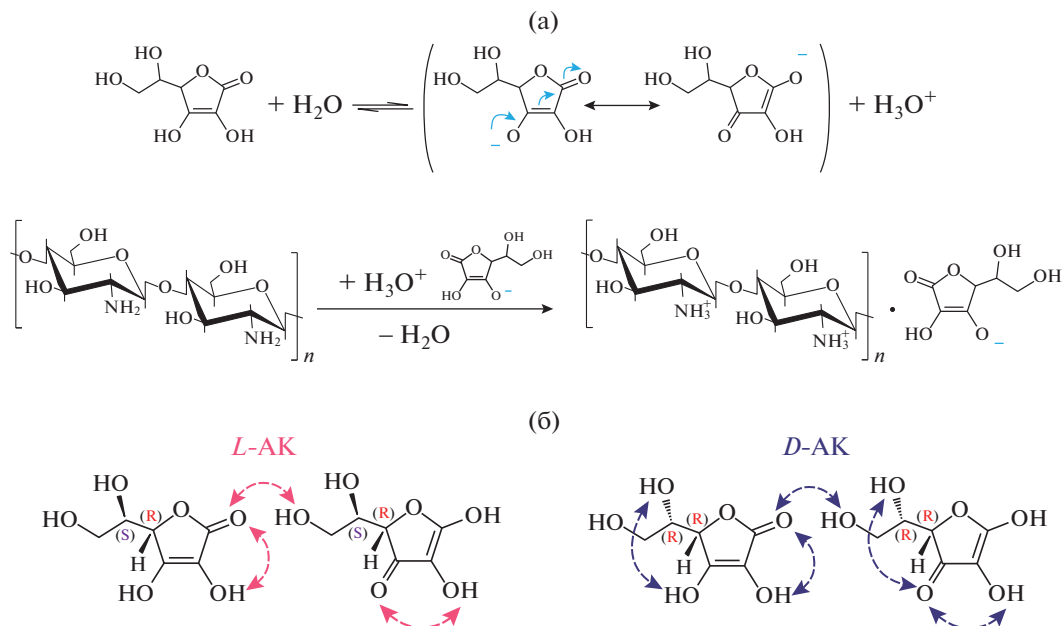
### ВВЕДЕНИЕ

Аминополисахарид хитозан относится к классу *D*-глюканов и вследствие катионногенной природы, комплекса биологически ценных свойств, коммерческой доступности весьма перспективен при создании материалов биомедицинского назначения [1, 2]. К настоящему времени достоверно установлено, что биологическая активность хитозана зависит от молекулярной массы полимера и совокупного заряда макроцепи, растущего с повышением степени деацетилирования образца [2–4]. Недавние исследования показали значимое влияние на биологические свойства хитозана молекулярной хиральности макромолекул и построенных из них надмолекулярных структур [5–7]. Обнаружено антибатное изменение биохимической активности энантиомеров хлорфеноксисловых гербицидов в присутствии хирального хитозана [8].

Кроме того, в последние годы отмечается значимое влияние на структуру, свойства и функциональные характеристики хитозансодержащих материалов природы органической кислоты, используемой для растворения хитозана, т.е. формирования солевых комплексов полимер–кислота. Например, хитозан в солевых пленках, полученных из растворов уксусной кислоты, характеризуется аморфно-кристаллическим упорядочением, а в пленках, полученных из растворов в лимонной

и молочной кислотах – практически полностью аморфным надмолекулярным упорядочением [9]. Это соответственно понижает прочность пленок цитрата и лактата хитозана по сравнению с пленкой ацетата хитозана [10]. Вместе с тем композитные пленки цитрата хитозана с поливиниловым спиртом обладают повышенной прочностью, устойчивостью к ползучести и способностью восстанавливать форму [11], а пленки сукцината хитозана с метилцеллюлозой – повышенной термостабильностью [12]. Хитозановые губки, сформированные из растворов полимера в угольной кислоте, демонстрируют существенно более высокие механико-прочностные и пористые характеристики, чем полученные из растворов хитозана в уксусной кислоте [13].

Применение биологически активных карбоновых кислот и аминокислот для получения солевой формы хитозана приводит к целенаправленному улучшению биологических свойств материалов посредством синергизма биохимических активностей макромолекулы аминопполисахарида и аниона кислоты [5, 14–18]. В таких солевых комплексах, кроме водородных, классических кулоновских и гидрофобных взаимодействий, характерных для солей хитозана с традиционными кислотами-растворителями, возможны специфические кулоновские (в виде ионных ассоциатов) и ион-дипольные меж- и внутримолекулярные контакты [5, 9, 11, 13–16]. По нашему мнению,



**Рис. 1.** Схема формирования резонансно-стабилизированного сопряженного основания АК (аниона аскорбата) и аскорбата хитозана (а), а также химическая структура и основные внутри- и межмолекулярные взаимодействия (пунктирные стрелки) в *L*- и *D*-АК (б). Цветные рисунки можно посмотреть в электронной версии.

это должно приводить к формированию конформационно-лабильных пространственно-сшитых структур, определяющих особенности надмолекулярного упорядочения, физико-химических и биологических свойств получаемых солей.

Одной из перспективных биологически активных органических кислот, обеспечивающих надежное донорно-акцепторное взаимодействие при получении солей хитозана, является аскорбиновая кислота (АК) [7, 17–26]. Так, ее использование в качестве источника протонов для формирования солевой формы хитозана (рис. 1а) приводит к проявлению высокой мукоадгезии [20], повышению индекса пролиферации эндотелиальных клеток [21], усилению антиоксидантных свойств [22, 23], антибактериальной [6, 24, 25] и ранозаживляющей активности [17, 20, 24, 26] хитозансодержащих препаратов.

Аскорбаты хитозана относятся к высококристаллическим солям и представляют собой безводные кристаллы, в которых молекулы воды заменены на анионы кислоты [27, 28]. Молекулярная структура дегидратированных полиморфов содержит две молекулы воды на один период идентичности и по сравнению с гидратированными солями, например, с традиционно используемыми для растворения хитозана монокарбоновыми кислотами (НСООН, СН<sub>3</sub>СООН), стабилизирована многочисленными Н-связями с участием алифатических атомов водорода гликозидных звеньев [29, 30]. Экваториальные дифракционные профили гидратированных модификаций

хитозана характеризуются четкими интенсивными рефлексами при углах отражения  $2\theta \sim 10^\circ$  и  $20^\circ$ – $22^\circ$ , а профили безводных кристаллов — уменьшением интенсивности и смещением данных рефлексов в область  $2\theta \sim 15^\circ$  и  $22^\circ$ – $24^\circ$  [29, 31].

Аскобиновая кислота относится к классу оптически активных веществ и имеет две пары (диа)стереоантиподов, из которых коммерчески доступны природный *L*-изомер (витамин С) и его синтетический *D*-диастереоантипод, имеющие противоположную конфигурацию хирального центра при С-5 (рис. 1б) [32]. Оба диастереомера имеют жесткое практически плоское лактонное кольцо с окислительно-восстановительной ендольной группировкой, обуславливающей кислотные свойства водного раствора АК за счет ионизации енольного гидроксила при С-3 и формирования резонансно-стабилизированного аскорбат-аниона, гидроксильный протон которого более кислый, чем в изолированной ОН-группе (рис. 1а). В силу обращения конфигурации атома С в положении 5 эпимеры АК различаются температурой и энтальпией плавления, растворимостью в воде, первой константой ионизации  $pK_{a1}$  ( $pK_{a1}(L-AK) = 4.26$ ,  $pK_{a1}(D-AK) = 4.18$ ,  $pK_{a2}(L-AK) \sim pK_{a2}(D-AK) \sim 11.6$ ), параметрами элементарной ячейки и системой меж- и внутримолекулярных контактов. Так, в *D*-АК, помимо характерных для *L*-АК внутримолекулярных водородных связей между С-2-ОН и функциональных фрагментов С-1 или С-3 и межмолекулярных Н-свя-

зей С-1 и С-6-ОН, реализуются С-5-ОН...С-3 внутримолекулярные взаимодействия [32].

*L*-АК (витамин С) выполняет крайне важные биологические функции: выступает в качестве кофермента гидроксилаз, катализирует метаболизм фолиевой кислоты, проявляет антиоксидантную активность, стимулирует синтез коллагена и пролиферацию фибробластов, участвует во всех фазах заживления ран и т.д. [33]. Для *D*-АК имеется лишь несколько сообщений о его невысокой антиоксидантной и коллагенстимулирующей активности, составляющей лишь ~5% биологической активности *L*-АК [34, 35]. Между тем, в комплексах с межмолекулярным переносом заряда именно *D*-аскорбаты хитозана (хитозан·*D*-АК) проявляют большую антибактериальную, противовоспалительную и ранозаживляющую активность, значительно повышают жизнеспособность фибробластов, чем *L*-аскорбаты хитозана (хитозан·*L*-АК) [6, 24, 26].

Представляется, что различия в биологической активности *L*- и *D*-аскорбатов хитозана обусловлены стерическими особенностями хирального органического лиганда (кислотного остатка). В зависимости от диастереомера АК формируются гетеро-(*D*–*L*) или гомохиральные (*D*–*D*) солевые комплексы *D*-глюкан–кислота, обеспечивающие дифференциацию пространственной структуры и соответственно свойств и биологической функциональности изомерной солевой формы полимера. При этом принципам гомохиральности живой природы соответствует лишь солевой комплекс *D*-глюкан–*D*-АК. Однако в подавляющем числе исследовательских работ при получении солевой формы хитозана используется *L*-АК как наиболее биологически активная форма данной кислоты [18–23, 25].

Следует отметить, что специфическая биологическая роль *D*-изомеров биологически активных веществ уже не считается нетривиальной, поскольку исследования последнего десятилетия выявили отклонение от заявленной ранее “хиральной чистоты” биосистем, в частности принципа построения природных белков только из *L*-аминокислот. *D*-изомеры аминокислот обнаружены в клетках прокариот, эукариот и млекопитающих, в том числе человека [36]. Предполагается, что они участвуют в регуляции нейротрансмиссии, врожденного иммунитета и барьерной функции живого организма [37]. Установлена высокая эффективность *D*-аминокислот при терапии некоторых заболеваний [36, 38], разрушении биопленок и снижении антибиотикорезистентности, достижении биостабильности синтетических пептидов [39], что открывает новые направления получения биомедицинских материалов не только с улучшенными, но и принципиально новыми биологическими функциями [36–39].

Обнаружено также, что хитозан·*L*-АК и хитозан·*D*-АК отличаются параметрами псевдоорторомбической элементарной ячейки кристаллитов [40], хирооптическими характеристиками [6, 7], физико-механическими и гидродинамическими свойствами [6, 17, 41]. Вероятно, гетеро-(*D*–*L*) или гомохиральные (*D*–*D*) солевые комплексы хитозан–АК должны отличаться структурными характеристиками и надмолекулярным упорядочением макроцепей, а различия в кислотности диастереомеров АК должны отражаться на химическом сродстве реагирующих компонентов и соответственно на энергетических параметрах солеобразования.

Цель настоящей работы – оценка энергетики донорно-акцепторного взаимодействия хитозана с *L*- и *D*-диастереомерами АК в водной среде и особенностей надмолекулярного упорядочения формирующихся при этом *D*–*L* и *D*–*D* хиральных солевых комплексов полимер–кислота.

## ЭСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Материалы

Для исследования выбраны образцы хитозана со средневязкостной молекулярной массой  $\bar{M}_\eta = 40 \times 10^3$  (в форме гидрохлорида) и  $200 \times 10^3$ , близкой степенью деацетилирования 80–82 мол. % производства Закрытого акционерного общества “Биопрогресс” (Шелково, Россия), далее обозначаемые хитозан-40 и хитозан-200. Значение  $\bar{M}_\eta$  рассчитывали по уравнению Марка–Куна–Хаувинка  $[\eta] = 1.38 \times 10^{-4} \bar{M}_\eta^{0.85}$  [42], где  $[\eta]$  – характеристическая вязкость (дл/г) раствора хитозана в 0.33 М  $\text{CH}_3\text{COOH} + 0.2$  М  $\text{CH}_3\text{COONa}$  при  $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . Количество  $\text{Cl}^-$  в образце хитозан-40, определенное потенциометрическим титрованием, составило 0.57 мол. %  $\text{HCl}$ .

Использовали *L*-АК с содержанием основного вещества 99% (Общество с ограниченной ответственностью “Мелиген”, Россия); *D*-АК с содержанием основного вещества 98% (Общество с ограниченной ответственностью “База Химреактивов”, Россия);  $\text{NaOH}$ ,  $\text{HCl}$  (фиксанал),  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (Общество с ограниченной ответственностью “Завод химических реактивов”, Россия); *L*-ментол (“Alfa Aesar”, Англия); 95% этиловый спирт (Общество с ограниченной ответственностью “РФК”, Россия); ацетон (Закрытое акционерное общество “Экос 1”, Россия); бидистиллированную воду.

### Объекты исследования

Водные растворы хитозана-40(–200) в *L*-(*D*)-АК с концентрацией хитозана 0.25–5.0 мас. % получали при мольном соотношении  $[\text{AK}] : [-\text{NH}_2] =$

= 1.0 моль/осново-моль (для устранения влияния несвязанной АК) при перемешивании на магнитной мешалке при  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  в течение 1–3 ч. Для обеспечения тождественности условий сравнительного анализа образцов хитозана разной  $\bar{M}_n$  в отдельных опытах использовали водные растворы гидрохлорида *L*-(*D*)-аскорбата хитозана-200 (хитозан-200+HCl · *L*-(*D*)-АК), которые получали добавлением 0.1 Н HCl в раствор хитозана-200 в *L*-(*D*)-АК до достижения той же степени замещения  $\text{NH}_2$ -групп, что и в образце гидрохлорида хитозана-40. В специальных экспериментах показано, что в данных условиях реализуется максимально возможная степень протонирования аминогрупп полимера,  $(-\text{NH}_3^+)_{\text{max}}$ . Поскольку аскорбат хитозана в водной среде окисляется до дегидроаскорбата хитозана, который вступает в реакцию Шиффа с образованием полимерного кетимина [43], и даже низкие концентрации несвязанной АК могут вызывать деструкцию полимера [44], в экспериментах использовали только свежеприготовленные растворы.

Порошки хиральных солей хитозана-40(-200) · *L*-(*D*)-АК получали из растворов с концентрацией хитозана 3.0 мас. % лиофилизацией на Bench-Top 2K (“VirTis”, США) при температуре  $-57^\circ\text{C}$  и давлении 2–5 мм рт.ст. Образцы подвергали диализу против воды с использованием трубчатой мембраны Cellu-Sep (“Sigma-Aldrich”, США) с пределом по молекулярной массе  $(12\text{--}14) \times 10^3$ . Модуль диализной ванны 1 : 100, время диализа – 36 ч. Диализат заменяли каждые 8 ч до достижения pH 5.0, значение которого контролировали комбинированным ионоселективным электродом “Mettler Toledo Five Easy FE20” (MTD, Сингапур). Образцы диализованных порошков вновь лиофильно сушили как описано выше и хранили в эксикаторе при нулевой влажности.

Для выделения порошков полимера в среде оптически активного осадителя раствор хитозана-40(-200), хитозан-200+HCl в *L*-(*D*)-АК с концентрацией хитозана 4–5 мас. % смешивали с 5%-ным раствором *L*-ментола в 95%  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  в объемном соотношении 1 : 1 и вливали тонкой струей (при перемешивании) в ацетон до полного осаждения компонентов. Полученный осадок отделяли фильтрованием и сушили в воздушной атмосфере при  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  в течение 24 ч до полного испарения жидкой среды.

#### Методы исследования

Теплоту растворения  $\Delta H$  определяли в адиабатической калориметрической системе “Parr Solution Calorimeter 6755” (“Parr Instrument Company”, США) по величине температурного скачка в процессе растворения навесок полимера и кислоты в бидистиллированной воде, концентрация хито-

зана 0.25 мас. %. Чувствительность термодатчика  $10^{-4}$  град, повторность трехкратная.

Потенциометрическое титрование проводили на автоматическом титраторе “Mettler Toledo G20” (MTD, Германия) при  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . Индикаторный электрод – стеклянный DGi115SC, встроенный электрод сравнения – хлорид-серебряный. Начальный объем раствора полимера – 40 мл, концентрация хитозана 0.5 мас.%. В качестве титранта использовали 0.05 Н NaOH, концентрацию уточняли по фиксаналу 0.1 Н HCl. Точки эквивалентности определяли по максимумам производной кривой титрования  $\Delta\text{pH}/\Delta V = f(V)$ , повторность трехкратная. Степень протонирования  $\alpha$  рассчитывали по формуле из работы [45].

Элементный анализ (C, H) выполняли на анализаторе “Vario Micro Cube” (“Elementar”, Германия) в токе  $\text{O}_2$ , N – в токе  $\text{CO}_2$ . Погрешность составила  $\pm 0.5$  мас. %. Содержание C/N/H элементов рассчитывали на беззольную пробу.

ИК-спектры регистрировали на вакуумном ИК-фурье-спектрометре “Vertex 70 v” (“Bruker”, США) с термовариацией PIKE GladiATR и разрешением  $4\text{ см}^{-1}$ , используя в среднем 36 сканирований в диапазоне  $4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$  методом НПВО. Спектры обрабатывали в программе OPUS. Соотношение полос поглощения ИК-спектров исходных образцов хитозана и его хиральных солей с *L*- и *D*-АК приведено в таблице SI-1 Онлайн-ресурса.

Рентгеновские дифрактограммы получали на дифрактометре ДРОН-3 (Научно-производственное предприятие “Буревестник”, Россия) с излучением  $\text{CuK}_\alpha$  при  $U = 22\text{ кВ}$  и  $I_a = 20\text{ мА}$  с автоматической регистрацией данных. Монохроматизацию осуществляли с помощью Ni-фильтра. Степень кристалличности  $\chi$  рассчитывали как отношение интегральной интенсивности суммарного рассеяния кристаллитов к полному рассеянию от аморфных и кристаллических областей графическим интегрированием (программа QCAD 3.15) [46]. Характеристика кристаллитов и степень кристалличности исходных образцов Научно-производственного предприятия “Буревестник” и его хиральных солей с *L*- и *D*-АК приведены в таблице SI-2 Онлайн-ресурса.

Электронно-микроскопические изображения получали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на микроскопе “MIRA\LMU” (“Tescan”, Чехия) при напряжении 7 кВ и проводящем токе 400 пА. На образцы напыляли слой золота толщиной 5 нм на установке “K450X Carbon Coater” (“Emitech”, Англия).

Статистический анализ проводили для трехкратных повторов эксперимента. Результаты представлены в виде средних значений со стандартным отклонением.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Процесс взаимодействия хитозана с *L*- и *D*-АК в водной среде характеризуется отрицательными значениями энтальпии растворения, а доля групп  $(-\text{NH}_3^+)_{\text{max}}$  в условиях максимально возможного протонирования аминогрупп полимера не превышает 75 мол. % (табл. 1). При этом тепловой эффект при растворении хитозана в *L*-АК и степень протонирования *L*-хиральных солевых комплексов меньше, чем при растворении в среде *D*-АК.

Обнаруженные отличительные особенности солевых комплексов хитозан·*L*-АК и хитозан·*D*-АК в растворе отражаются и на физико-химических параметрах их твердой фазы.

ИК-спектры хитозана-40 и хитозана-200 показывают все типичные для данного полимера характеристические частоты колебаний, в частности, включенных в систему водородных контактов связей ОН– и NH– (широкие полосы 3600–3300  $\text{см}^{-1}$ ),  $-\text{NHCO}-$  (1638  $\text{см}^{-1}$ , Амид I) и валентных колебаний C–N вторичной аминогруппы (1315 и 1324  $\text{см}^{-1}$ , Амид III), связей C–O и C–C глюкопиранозного кольца (1149–1033  $\text{см}^{-1}$ ) (рис. 2, спектры 1 и 1', табл. SI-1) [5, 22, 47, 48]. В ИК-спектрах хитозан-200·*L*-(*D*-)АК (рис. 2, спектры 2' и 3', табл. SI-1) появляется составная полоса Амид II, характерная для асимметричных деформационных колебаний N–H и валентных колебаний C–N протонированных (ассоциированных) аминогрупп  $(-\text{NH}_3^+)$  при 1535 и 1530  $\text{см}^{-1}$ , что подтверждает солеобразование хитозан-200 с *L*-(*D*-)АК [5, 14, 49, 50]. В спектрах солей хитозан-40 *L*-(*D*-)АК, полученных из гидрохлорида хитозан-40, наблюдается сдвиг данной полосы при 1537  $\text{см}^{-1}$  в низкочастотную область: 1525 и 1532  $\text{см}^{-1}$  (рис. 2, спектры 2 и 3, табл. SI-1).

Отличительной особенностью ИК-спектров *L*- и *D*-аскорбатов хитозан-40(-200) от ИК-спектров исходных образцов хитозан-40(-200) является сдвиг полос поглощения валентных колебаний N–H, O–H и C=O, а также деформационных колебаний C=O полосы Амид I в область низких частот (табл. SI-1). Как известно, такое смещение характеристических полос обусловлено формированием водородных связей [1, 15]. Это могут быть Н-связи между соседними цепями полимера или удаленными по цепи “изгибными” сегментами одной и той же макромолекулы, между макроцепями и молекулами воды [13, 15, 40]. Кроме того, возможны меж- и внутримолекулярные контакты между макромолекулами полимера и свободными функциональными группами молекул кислоты [14, 16]. Наибольшее количество Н-связей наблюдается для *D*-солевых комплексов хитозан-40(-200), что согласуется с отличительными особенностями индивидуальных диасте-

**Таблица 1.** Энтальпия растворения и степень протонирования хитозана в водном растворе *L*- и *D*-АК

| Кислота      | $\Delta H$ , кДж/моль | $\alpha^*$ , мол. %   | pH  |
|--------------|-----------------------|-----------------------|-----|
| Хитозан-40   |                       |                       |     |
| <i>L</i> -АК | $-23.1 \pm 2.1$       | 72.6<br>(58.5 + 14.1) | 3.0 |
| <i>D</i> -АК | $-31.0 \pm 2.4$       | 74.0<br>(57.4 + 16.6) | 2.9 |
| Хитозан-200  |                       |                       |     |
| <i>L</i> -АК | $-16.3 \pm 1.4$       | 69.8<br>(54.6 + 15.2) | 4.4 |
| <i>D</i> -АК | $-19.8 \pm 1.7$       | 69.6<br>(52.3 + 17.3) | 4.3 |

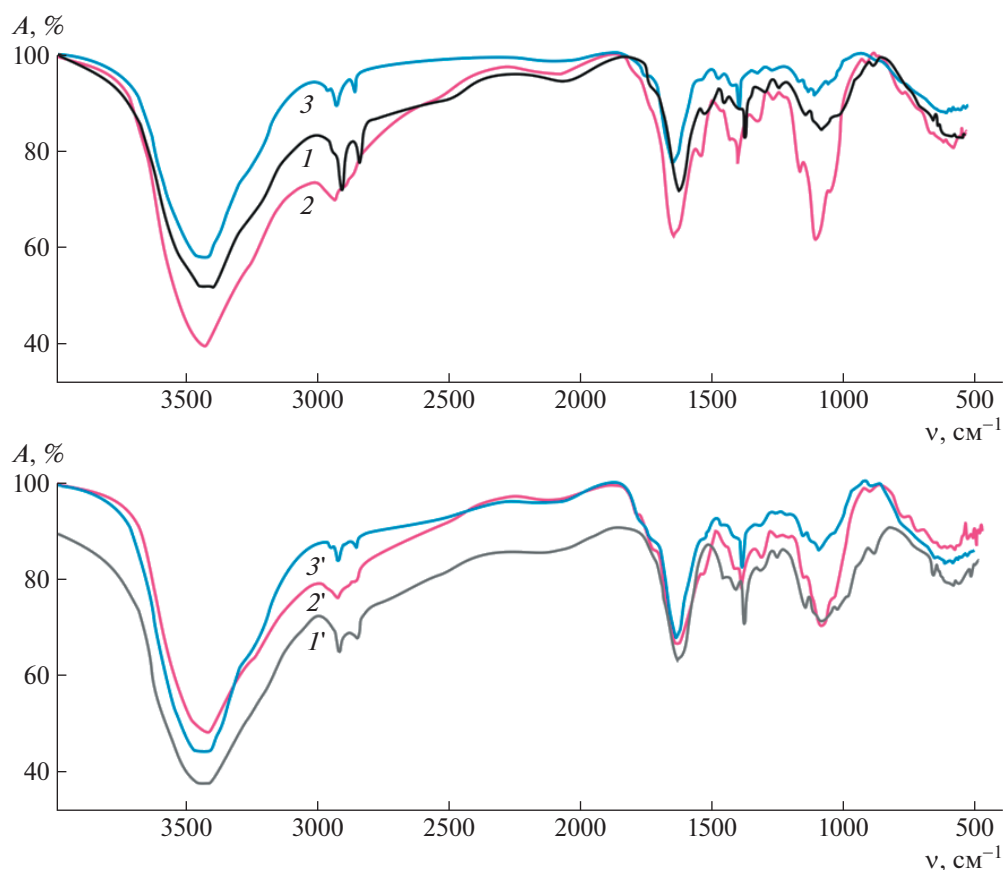
\*Суммарная степень протонирования в условиях  $(-\text{NH}_3^+)_{\text{max}}$ , в скобках – степень протонирования групп  $\text{NH}_2$  полимера HCl и АК соответственно.

реомеров АК, в частности, с отсутствием в ИК-спектре *D*-АК полосы поглощения групп ОН при C-5, поскольку они участвуют в образовании внутримолекулярных Н-связей C-3...C-5 (рис. 16) [32].

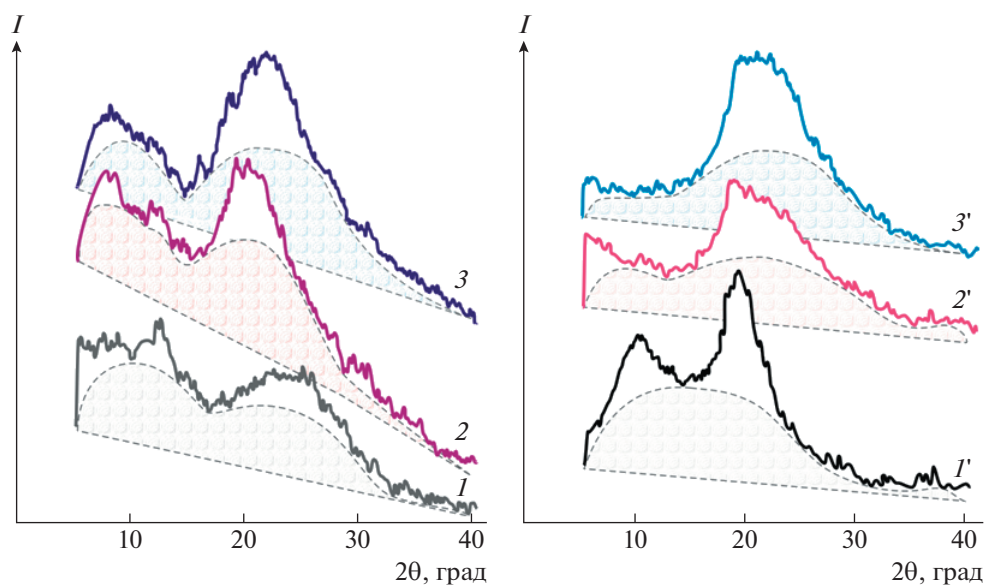
Таким образом, спектральные характеристики хиральных солей хитозана с *L*- и *D*-АК указывают на развитую систему меж- и внутримолекулярных контактов в надмолекулярной структуре образцов, что не типично для солевой формы хитозана. При этом наиболее развитой системой Н-связей характеризуются *D*-аскорбаты хитозана.

На рентгеновских дифрактограммах исходных порошков хитозана-40 и хитозана-200 (рис. 3, спектры 1 и 1') на фоне аморфного гало проявляются основные кристаллические рефлексы при  $2\theta \sim 11.3^\circ$ – $12.5^\circ$  (гидратированные кристаллы),  $15.2^\circ$ – $16.5^\circ$  (безводные кристаллы),  $19.3^\circ$ – $20.3^\circ$  и при  $2\theta \sim 27.1^\circ$  для гидрохлорида хитозан-40. Дифрактограммы являются типичными для аморфно-кристаллических полимеров с невысокой степенью кристалличности, в частности хитозан [9, 14, 15]. Значения межплоскостных расстояний в кристаллических решетках исследованных образцов согласуются с описанными в литературе (табл. SI-2) [5, 49].

На экваториальных рентгеновских профилях диастереомерных солей хитозан-40·*L*-(*D*-)АК по сравнению с исходным порошком хитозан-40 наблюдается значимое повышение интенсивности основных рефлексов в диапазоне  $2\theta \sim 19.3^\circ$ – $20.3^\circ$  град для хитозан-40·*L*-АК и  $2\theta \sim 20.8^\circ$ – $22.6^\circ$  град для хитозан-40·*D*-АК, а рефлекс при  $2\theta \sim 28.2^\circ$  (хитозан-40·*L*-АК) и  $27.1^\circ$  (хитозан-40·*D*-АК) практически исчезает (рис. 3, спектры 2 и 3). Фиксируется также слабый пик при  $2\theta \sim 14.2^\circ$ – $16.2^\circ$  и  $16.0^\circ$  (хитозан-40·*L*-АК и хитозан-40·*D*-



**Рис. 2.** ИК-спектры исходного порошка хитозана ( $I$ ,  $I'$ ) и его хиральных солевых комплексов с  $L$ - ( $2$ ,  $2'$ ) и  $D$ -АК ( $3$ ,  $3'$ ) для образцов хитозан-40 ( $I-3$ ) и хитозан-200 ( $I'-3'$ ).



**Рис. 3.** Рентгеновские дифрактограммы и степень кристалличности исходного порошка хитозана ( $I$ ,  $I'$ ) и его хиральных солевых комплексов с  $L$ - ( $2$ ,  $2'$ ) и  $D$ -АК ( $3$ ,  $3'$ ) для образцов хитозан-40 ( $I-3$ ) и хитозан-200 ( $I'-3'$ ).  $\chi = 32.6$  ( $I$ ), 28.3 ( $2$ ), 34.4 ( $3$ ), 36.9 ( $I'$ ), 37.3 ( $2'$ ) и 40.3% ( $3'$ ). Обозначенная пунктиром заштрихованная область соответствует диффузному рассеянию.

Таблица 2. Некоторые характеристики исходных порошков хитозана и его хиральных солей с *L*- и *D*-АК

| Кислота      | Содержание элемента, мас.% |      |      | C/N   | Формула                                                        |
|--------------|----------------------------|------|------|-------|----------------------------------------------------------------|
|              | C                          | H    | N    |       |                                                                |
| Хитозан-40   |                            |      |      |       |                                                                |
| —            | 37.98                      | 7.44 | 6.95 | 5.47  | $C_{6.4}H_{11.4}NO_{4.2} \cdot 1.8 H_2O$                       |
| <i>L</i> -АК | 35.63                      | 7.15 | 5.06 | 7.04  | $C_{6.4}H_{11.4}NO_{4.2} \cdot 0.3 L-C_6H_8O_6 \cdot 3.0 H_2O$ |
| <i>D</i> -АК | 37.17                      | 6.82 | 5.03 | 7.39  | $C_{6.4}H_{11.4}NO_{4.2} \cdot 0.4 D-C_6H_8O_6 \cdot 2.3 H_2O$ |
| Хитозан-200  |                            |      |      |       |                                                                |
| —            | 39.10                      | 7.32 | 7.14 | 5.48  | $C_{6.4}H_{11.4}NO_{4.2} \cdot 1.5 H_2O$                       |
| <i>L</i> -АК | 39.51                      | 6.14 | 3.91 | 10.10 | $C_{6.4}H_{11.4}NO_{4.2} \cdot 0.9 L-C_6H_8O_6 \cdot 1.7 H_2O$ |
| <i>D</i> -АК | 39.85                      | 6.57 | 5.29 | 7.53  | $C_{6.4}H_{11.4}NO_{4.2} \cdot 0.4 D-C_6H_8O_6 \cdot 1.4 H_2O$ |

АК соответственно), характерный для дегидратированных солевых форм хитозана [29, 31].

На дифракционных картинах диастереомерных солей хитозан-200 · *L*-(*D*-)АК по сравнению с исходным образцом хитозан-200 первый основной рефлекс при  $2\theta \sim 11.8^\circ$  малоинтенсивен, второй смещается в область больших значений углов дифракции: до  $\sim 21.7^\circ$ – $24.8^\circ$  для хитозан-200 · *L*-АК и  $\sim 21.8^\circ$ – $24.4^\circ$  для хитозан-200 · *D*-АК (рис. 3, спектры 2' и 3'). Кроме того, рентгеновские дифрактограммы хитозан-200 · *L*-(*D*-)АК характеризуются уширением и уменьшением интенсивности пика второго основного рефлекса, что свидетельствует о наличии в них меньших по размеру структурных элементов. В совокупности изменений экваториальных профилей рентгеновской дифракции можно заключить, что в структуре *L*-(*D*-)аскорбатов хитозана-40 и хитозана-200 присутствуют полиморфы гидратированной и безводной формы полимера.

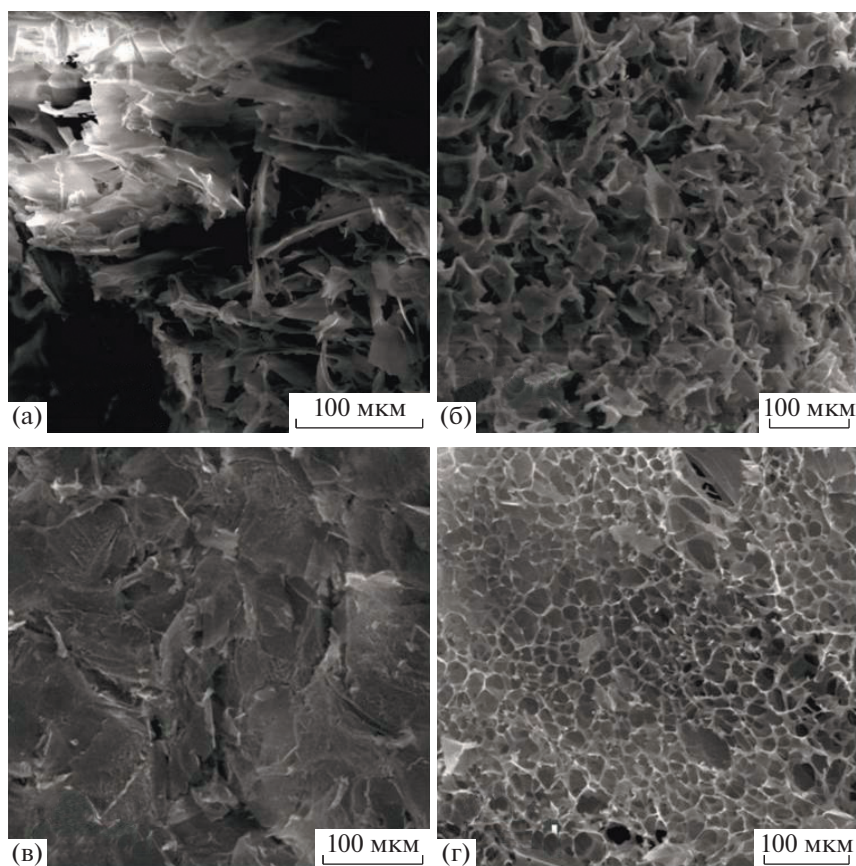
Несмотря на некоторое снижение интенсивности отдельных рефлексов по сравнению с исходным полимером, степень кристалличности хиральных солей хитозан-40 · *L*-(*D*-)АК и хитозан-200 · *L*-(*D*-)АК достаточно высокая по сравнению с солевыми формами хитозана с традиционными монокрабовыми кислотами-растворителями, значение  $\chi$  которых, как правило, не превышает 25–30% [30, 31, 46]. Значения межплоскостных расстояний в кристаллической решетке, определенные при  $2\theta \sim 14.2^\circ$ – $16.2^\circ$  (хитозан-40 · *L*-(*D*-)АК) увеличиваются, а при  $2\theta \sim 19.3^\circ$ – $22.6^\circ$  (хитозан-40 · *L*-(*D*-)АК, хитозан-200 · *L*-(*D*-)АК) — уменьшаются (табл. SI-2). Обнаруженные структурные изменения наиболее выражены для *D*-изомерных солевых комплексов хитозана. Наиболее высокие значения степени

кристалличности также наблюдаются для *D*-аскорбатов хитозана.

Элементный анализ показал, что соотношение C/N в порошках хиральных солей хитозан-40 · *L*-(*D*-)АК и хитозан-200 · *L*-(*D*-)АК значительно больше по сравнению с исходным полимером (табл. 2). Полученные результаты, как и данные ИК-спектроскопии, подтверждают, что взаимодействие хитозана с *L*-(*D*-)АК идет с переносом протона кислоты на аминогруппу полимера с образованием протонированных аминогрупп и соответственно солевой формы хитозана. При стехиометрическом пересчете содержания элементов на усредненное элементарное звено полимера (формульная единица) установлено, что в *L*-солях хитозана-40 и хитозана-200 содержится большее количество кристаллизационной воды, чем в *D*-солевых комплексах.

СЭМ-микроскопия показала, что стереоизомерия кислотного остатка значимо отражается и на надмолекулярном упорядочении порошков хиральных солевых комплексов хитозан-40(–200) · *L*-(*D*-)АК. Так, пористая структура твердой фазы *L*-солей хитозан-40(–200) представлена регулярной последовательностью разнонаправленных борозд, в то время как структура *D*-солей — ячейками близкой к сферической формы (рис. 4).

При осаждении полимера из водного раствора хитозан-40 · *L*-АК с использованием этанольного раствора *L*-ментола (специфический оптически активный осадитель) и ацетона (традиционный осадитель) формируется структура с преимущественно анизометрическими надмолекулярными образованиями, а при осаждении из раствора хитозан-40 · *D*-АК — с плотно упакованными конфокальными доменами сферической формы (рис. 5а, 5б).



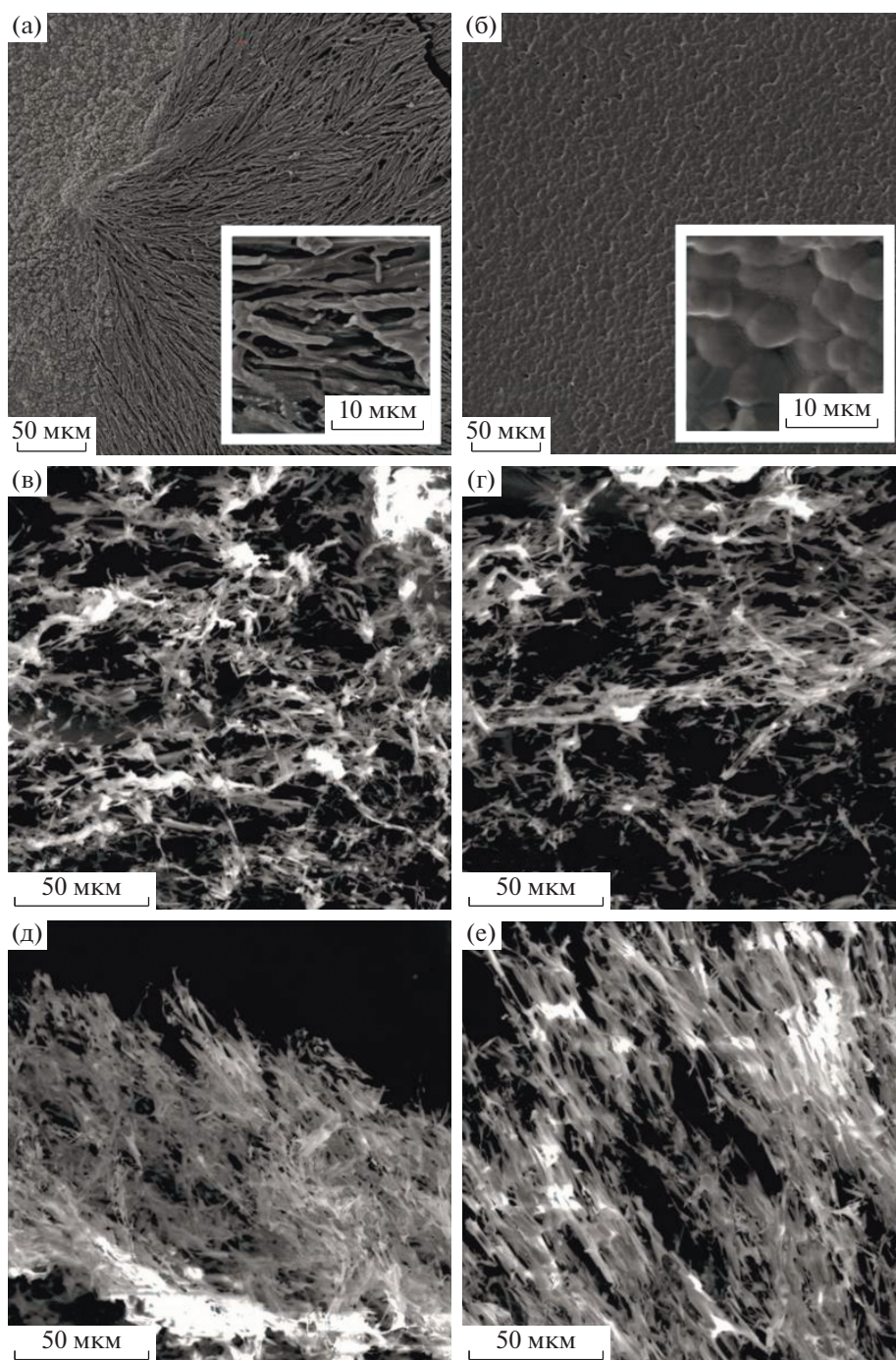
**Рис. 4.** Электронно-микроскопические изображения морфоструктуры порошков хиральных солевых комплексов хитозан-40 (а, б) и хитозан-200 (в, г) с *L*- (а, в) и *D*-АК (б, г).

В случае осаждения хитозан-200 · *L*-(*D*-)АК в тех же условиях формируется пористая архитектура с системой взаимосвязанных анизотропных пор (рис. 5в, 5г). Использование гидрохлорида-аскорбата хитозан-200 также приводит к образованию рыхлой морфоструктуры осадка (рис. 5д, 5е). Это свидетельствует о слабом влиянии  $\text{Cl}^-$  на стереоструктуру образцов и подтверждает наше предположение, что надмолекулярное упорядочение солей хитозана с *L*- и *D*-АК определяются стереоизомерией кислотного остатка. Как для хитозана-200, так и для хитозан-200+HCl большая пористость и меньший размер пор наблюдаются для *L*-солевых комплексов.

Таким образом, и лиофильно-высушенные порошки *L*-солей хитозана-40(–200), и выделенные оптически активным осадителем из соответствующих растворов характеризуются более “рыхлым” надмолекулярным упорядочением по сравнению с *D*-солевыми комплексами хитозана-40(–200) и порошков, перекристаллизованных из них в среде *L*-ментол+этанол+ацетон.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что при формировании *L*- и *D*-аскорбатов хитозана наиболее сильное энергетическое взаимодействие реализуется при формировании гомохиральных солевых комплексов *D*-глюкан – *D*-диастереомер АК. Положение и ширина валентных колебаний N–H и O–H, их сдвиг в область низких частот, аналогичный сдвиг полос поглощения валентных и деформационных колебаний C=O свидетельствуют о существовании меж- и внутримолекулярных контактов в надмолекулярной структуре образцов с наиболее развитой системой таких контактов для *D*-аскорбата хитозана. *D*-диастереомерные солевые комплексы хитозана характеризуются более высокой степенью кристалличности и наибольшим изменением межплоскостных расстояний в кристаллитах по сравнению как с хитозаном · *L*-АК, так и с солевыми комплексами хитозана с другими карбоновыми кислотами [5, 14, 40]. В солевых формах хитозана с *D*-изомером АК присутствует меньшее количество приходящейся на макромолекулярное звено кристаллизационной воды, что косвенно указывает на сильное взаимодействие компонентов соли,



**Рис. 5.** Электронно-микроскопические изображения морфологии осадков, выделенных этанольным раствором *L*-ментола и ацетоном из водных растворов хитозана-40 (а, б), хитозана-200 (в, г) и хитозан-200+HCl (д, е) в *L*- (а, в, д) и *D*-АК (б, г, е).

вследствие чего на взаимодействие с водой остается меньше центров и групп. Надмолекулярная структура и пространственное упорядочение солей хитозан с *L*- и *D*-АК также в значительной мере определяются пространственной конфигурацией хирального лиганда. Во всех случаях суммарная пористость порошков выше для *L*-аскорбатов хитозана.

Как известно, протонизация глюкозаминных звеньев хитозана исключает возможность участия аминогрупп в формировании водородных связей и вследствие внутримолекулярного электростатического отталкивания частично ослабляет исходную жесткую кристаллическую структуру полимера. Однако гетеро- (*D*–*L*) и гомохиральные (*D*–*D*) солевые комплексы хитозан–АК показы-

вают уплотненную надмолекулярную ориентацию макроцепей, стабилизированную многочисленными меж- и внутримолекулярными контактами. Совокупность полученных результатов позволяет констатировать, что хиральные солевые комплексы хитозана с *L*- и *D*-АК представляют собой стереоспецифические полимерные сетки, сшитые как посредством классических водородных и ион-дипольных связей, так и специфических кулоновских и других взаимодействий, в которых немаловажную роль выполняет диастеремерная форма АК. Не исключено, что наиболее развитая система меж(внутри)молекулярных контактов при гомохиральном солеобразовании *D*-глюкан–*D*-кислота и обеспечивает наилучшую биологическую активность солей хитозан · *D*-АК, о чем сообщалось нами в работах [6, 7, 24, 26].

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 22-23-00320).

Авторы выражают благодарность центру коллективного пользования “Физико-химические методы исследования и анализа веществ и материалов” Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского за получение СЭМ-фотографий и рентгеновских дифрактограмм порошков хиральных солей хитозана.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kou S.G., Peters L., Mucalo M. // Carbohydr. Polym. 2022. V. 282. P. 119132.
- Kulish E.I., Lazdin R.Y., Shurshina A.S., Kolesov S.V., Zakharova E.M., Zakharov V.P. // Polymer Science A. 2021. V. 63. № 1. P. 54.
- Liu N., Chen X.G., Park H.J., Liu C.G., Liu C.S., Meng X.H., Yu L.J. // Carbohydr. Polym. 2006. V. 64. № 1. P. 60.
- Namli S., Guven O., Simsek F.N., Gradišek A., Sumnu G., Yener M.E., Oztop M. // Int. J. Biol. Macromol. 2023. V. 250. P. 126123.
- Singh J., Dutta P.K. // Int. J. Biol. Macromol. 2009. V. 45. № 4. P. 384.
- Gegel N.O., Zhuravleva Y.Y., Shipovskaya A.B., Malinkina O.N., Zudina I.V. // Polymers. 2018. V. 10. № 3. P. 259.
- Shipovskaya A.B., Malinkina O.N., Gegel N.O., Zudina I.V., Lugovitskaya T.N. // Russ. Chem. Bull. 2021. V. 70. P. 1765.
- Wen Y., Yuan Y., Chen H., Xu D., Lin K., Liu W. // Environ. Sci. Technol. 2010. V. 44. № 13. P. 4981.
- Qiao C., Ma X., Wang X., Liu L. // Lwt. 2021. V. 135. ID 109984.
- Melro E., Antunes F.E., da Silva G.J., Cruz I., Ramos P.E., Carvalho F., Alves L. // Polymers. 2021. V. 13. № 1. ID 1.
- Jiang S., Qiao C., Liu R., Liu Q., Xu J., Yao J. // Carbohydr. Polym. 2023. V. 312. P. 120842.
- Bochek A.M., Zabivalova N.M., Popova E.N., Lebedeva M.F., Lavrent'ev V.K., Yudin V.E. // Polymer Science A. 2021. V. 63. № 1. P. 63.
- Pigaleva M.A., Portnov I.V., Rudov A.A., Blagodatskikh I.V., Grigoriev T.E., Gallyamov M.O., Potemkin I.I. // Macromolecules. 2014. V. 47. P. 5749.
- Demarger-Andre S., Domard A. // Carbohydr. Polym. 1994. V. 23. № 3. P. 211.
- Lugovitskaya T.N., Shipovskaya A.B., Shmakov S.L., Shipenok X.M. // Carbohydr. Polym. 2022. V. 277. P. 118773.
- Li Q.X., Song B.Z., Yang Z.Q., Fan H.L. // Carbohydr. Polym. 2006. V. 63. № 2. P. 272.
- Shipovskaya A.B., Zhuravleva Y.Y., Khonina T.G., Malinkina O.N., Gegel N.O. // J. Sol-Gel Sci. Technol. 2019. V. 92. P. 349.
- Sekar V., Rajendran K., Vallinayagam S., Deepak V., Mahadevan S. // J. Ind. Eng. Chem. 2018. V. 62. P. 239.
- Ashurov N.S., Yugai S.M., Shakhobutdinov S.S., Kumbetov A.S., Atakhanov A.A. // Russ. Chem. Bull. 2022. V. 71. № 2. P. 227.
- Rossi S., Vigani B., Puccio A., Bonferoni M.C., Sandri G., Ferrari F. // Marine Drugs. 2017. V. 15. № 10. P. 319.
- Augustine R., Dan P., Schlachet I., Rouxel D., Menu P., Sosnik A. // Int. J. Pharm. 2019. V. 559. P. 420.
- Hafsa J., Charfeddine B., Smach M.A., Limem K., Majdoub H., Sonia R. // Int. J. Pharm., Chem. Biol. Sci. 2014. V. 4. № 4.
- Tan W., Zhang J., Zhao X., Li Q., Dong F., Guo Z. // Int. J. Biol. Macromol. 2020. V. 146. P. 53.
- Gegel N.O., Zudina I.V., Malinkina O.N., Shipovskaya A.B. // Microbiology. 2018. V. 87. № 5. P. 732.
- Zain N.M., Stapley A.G., Shama G.J.C.P. // Carbohydr. Polym. 2014. V. 112. P. 195.
- Malinkina O.N., Zhuravleva Y.Y., Shipovskaya A.B. // Appl. Biochem. Microbiol. 2022. V. 58. № 2. P. 161.
- Ogawa K., Yui T., Okuyama K. // Int. J. Biol. Macromol. 2004. V. 34. № 1–2. P. 1.
- Kawada J., Yui T., Okuyama K., Ogawa K. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2001. V. 65. № 11. P. 2542.
- Naito P.K., Ogawa Y., Kimura S., Iwata T., Wada M. // J. Polym. Sci., Polym. Phys. 2015. V. 53. № 15. P. 1065.
- Baklagina Y.G., Kononova S.V., Petrova V.A., Poshina D.N., Skorik Y.A., Klechkovskaya V.V., Orekhov A.S. // Crystallogr. Rep. 2018. V. 63. № 3. P. 303.
- Kobaisi M.A., Murugaraj P., Mainwaring D.E. // J. Polym. Sci., Polym. Phys. 2012. V. 50. № 6. P. 403.
- Dolle C., Magrone P., Riva S., Ambrosi M., Fratini E., Peruzzi N., Nostro P.L. // J. Phys. Chem. B. 2011. V. 115. № 40. P. 11638.
- Rizzo J.A., Rowan M.P., Driscoll I.R., Chung K.K., Friedman B.C. // Critical Care Clinics. 2016. V. 32. № 4. P. 539.
- Fidler M.C., Davidsson L., Zeder C., Hurrell R.F. // Am. J. Clin. Nutr. 2004. V. 79. № 1. P. 99.
- Munoz-Munoz J.L., Garcia-Molina F., Garcia-Ruiz P.A., Varon R., Tudela J., Garcia-Cánovas F., Rodriguez-Lopez J.N. // Biochim. Biophys. Acta. 2009. V. 1794. № 2. P. 244.

36. *Bastings J.J., van Eijk H.M., Olde Damink S.W., Rensen S.S.* // *Nutrients*. 2019. V. 11. № 9. P. 2205.
37. *D'Aniello A.* // *Brain Res. Rev.* 2007. V. 53. № 2. P. 215.
38. *Shi Y., Hussain Z., Zhao Y.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 18. P. 10794.
39. *Jia F., Wang J., Peng J., Zhao P., Kong Z., Wang K., Wang R.* // *Acta Biochim. Biophys. Sinica*. 2017. V. 49. № 10. P. 916.
40. *Ogawa K., Nakata K., Yamamoto A., Nitta Y., Yui T.* // *Chem. Mater.* 1996. V. 8. № 9. P. 2349.
41. *Malinkina O.N., Gegel N.O., Shipovskaya A.B.* // *J. Mol. Liq.* 2019. V. 284. P. 75.
42. *Gamzazade A.I., Šlimak V.M., Skljar A.M., Štykova E.V., Pavlova S.S., Rogožin S.V.* // *Acta Polymerica*. 1985. V. 36. № 8. P. 420.
43. *Muzzarelli R.A., Tanfani F., Emanuelli M.* // *Carbohydr. Polym.* 1984. V. 4. № 2. P. 137.
44. *Zoldners J., Kiseleva T., Kaiminsh I.* // *Carbohydr. Polym.* 2005. V. 60. № 2. P. 215.
45. *Rinaudo M., Pavlov G., Desbrieres J.* // *Polymer*. 1999. V. 40. P. 7029.
46. *Shipovskaya A.B., Shmakov S.L., Gegel N.O.* // *Carbohydr. Polym.* 2019. V. 206. P. 476.
47. *Kumirska J., Czerwicka M., Kaczyński Z., Bychowska A., Brzozowski K., Thöming J., Stepnowski P.* // *Marine Drugs*. 2010. V. 8. № 5. P. 1567.
48. *Brugnerotto J., Lizardi J., Goycoolea F.M., Argüelles-Monal W., Desbrieres J., Rinaudo M.* // *Polymer*. 2001. V. 42. № 8. P. 3569.
49. *Prashanth K.H., Kittur F.S., Tharanathan R.N.* // *Carbohydr. Polym.* 2002. V. 50. № 1. P. 27.
50. *Singh J., Dutta P.K., Dutta J., Hunt A.J., Macquarrie D.J., Clark J.H.* // *Carbohydr. Polym.* 2009. V. 76. № 2. P. 188.