

КОНФОРМАЦИЯ МОЛЕКУЛ ХИТОЗАНА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

© 2018 г. В.Н. Давыдова, И.М. Ермак

*Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159*

E-mail: viktorina@piboc.dvo.ru

Поступила в редакцию 05.06.17 г.

Приведен обзор литературы, посвященной изучению физико-химических свойств хитозанов. Основное внимание уделено анализу данных, описывающих конформацию молекул этого полимера в растворах в зависимости от молекулярной массы и степени N-ацетилирования хитозана, а также от внешних факторов – природы растворителя, pH и ионной силы среды.

Ключевые слова: хитозан, конформация молекул, степень N-ацетилирования.

DOI: 10.1134/S0006302918040038

Хитозан представляет собой сополимер глюкозамина и N-ацетилглюкозамина. Благодаря биоразлагаемости, биосовместимости [1] и низкой токсичности [2] хитозан широко применяется как вектор для доставки генетического материала, как мукоадгезивный наполнитель и потенциальный носитель различных фармацевтических препаратов [2–4]. Хитозан обладает разнообразными биологическими свойствами – гипохолестеринемическими, противомикробными, ранозаживляющими и др. [5]. Все это создает предпосылки для интенсивного изучения этого полимера, и на протяжении нескольких десятилетий число работ, посвященных исследованию хитозана, неуклонно возрастает. В подавляющем большинстве это исследования, связанные с изучением его разнообразной биологической активности и его использованием в генной инженерии, медицине, легкой и пищевой промышленности. Определенная часть публикаций связана с изучением гидродинамических свойств полимера, которые зависят от ряда параметров: молекулярной массы, молекулярно-массового распределения, источника выделения хитозана, степени ацетилирования и распределения ацетатов вдоль полимерной цепи. На перечисленные выше параметры также влияет состояние ионизации первичных аминогрупп хитозана, которое в свою очередь зависит от внешних параметров, включающих pH и ионную силу растворов. Совокупность этих факторов определяет конформацию полимера в

растворе, его физические, физико-химические и биологические свойства.

В настоящем обзоре рассмотрены основные закономерности и факторы, определяющие физико-химические свойства и конформацию хитозана в растворе.

ПОЛУЧЕНИЕ ХИТОЗАНА

В природе хитозан присутствует в клеточной стенке грибов [6], однако в основном этот полисахарид получают путем дезацетилирования хитина – N-ацетил-D-глюкозамина – основного компонента клеточных стенок ракообразных [7]. В зависимости от источника выделения хитин существует в нескольких формах, каждая из которых имеет свои специфические свойства. Альфа-хитин извлекается из оболочек креветок или крабов и имеет антипараллельную ориентацию молекул с сильными межмолекулярными водородными связями. Бета-хитин получают из гладиуса кальмаров, он формирует более слабые межмолекулярные водородные связи благодаря параллельному расположению полимерных цепей [8]. Известен также гамма-хитин, который встречается в коконах жуков *Ptinus*. Гамма-хитин содержит две цепи, упакованные параллельно, и третью цепь, ориентированную в противоположном направлении [9].

Хитозан, получаемый из гладиуса кальмаров, заметно чище, чем образцы хитина и хитозана из панцирей крабов и креветок, и не содержит примесей каротиноидов. Полисахарид из этого источника имеет более высокую степень ацетилирования, чем хитозан ракообразных, а также более высокие значения вязкости

Сокращения: GlcN – глюкозамин, GlcNAc – N-ацетилглюкозамин, SA – степень N-ацетилирования.

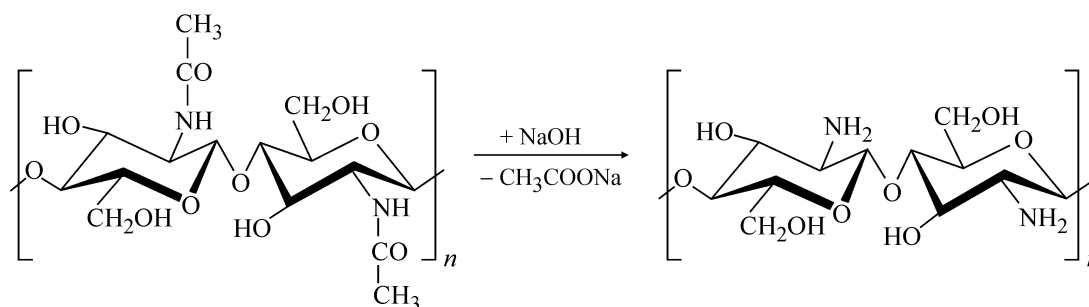


Схема деацетилирования хитина.

и предела текучести, что имеет важное практическое значение [10].

Как правило, хитозан получают путем обработки хитина концентрированной щелочью при повышенных температурах и длительном воздействии (рисунок) [7].

В результате реакции щелочного деацетилирования хитозан приобретает первичную аминогруппу, что приводит к его растворимости в разбавленных кислых растворах, в которых аминогруппа протонируется. Именно с катионными свойствами хитозана исследователи связывают уникальность его свойств и большой потенциал использования.

В зависимости от глубины протекания реакции деацетилирования получают продукты с разным соотношением звеньев глюкозамина (GlcN) и N-ацетилглюкозамина (GlcNAc). Количество остатков GlcNAc в конечном продукте или степень ацетилирования (СА) является одним из важных параметров, определяющих свойства получаемого полисахарида. На основании значения этой величины полимер относят к хитину или хитозану [2,3] – полисахарид со СА ниже 50% принято называть хитозаном [7, 11]. Согласно другой классификации [12], хитозаном называют полимер, полностью растворимый в 0,1 М уксусной кислоте.

Хитозан, получаемый методом щелочного деацетилирования, представляет собой смесь нескольких фракций молекул с различной СА [13]. Реакция деацетилирования также сопровождается дополнительной деградацией полимерной молекулы. Таким образом, в зависимости от условий протекания реакции и источника хитина получаемые хитозаны наряду с разной СА имеют различную молекулярную массу. Распределение по молекулярной массе для хитозанов из разных партий даже с одинаковой СА достаточно широкое и имеет разные максимумы, которые варьируют от одной партии к другой в зависимости от времени года и источника хитина [14].

Хитозан с одной и той же СА может быть получен двумя различными способами – путем деацетилирования хитина в гетерогенных условиях (рисунок) [15] либо частичным реакетилированием полностью деацетилированного хитозана в гомогенных условиях [2,3]. Авторы работы [16] показали, что деацетилирование хитина в гетерогенных условиях преимущественно приводит к сополимерам блочного типа, а деацетилирование в гомогенных условиях дает сополимеры со случайным распределением единиц GlcN и GlcNAc. Растворимость, степень агрегации и физико-химические свойства хитозанов, полученных деацетилированием в гетерогенных условиях, отличаются от свойств хитозанов, полученных ацетилированием в гомогенных условиях [17].

РАСТВОРИМОСТЬ ХИТОЗАНОВ

Для корректного определения физико-химических параметров и изучения биологической активности требуется хорошая растворимость хитозана. В соответствии с природой полисахарида, этого не всегда удается достичь, особенно при использовании большинства коммерческих продуктов. Кроме того, молекулы хитозана имеют тенденцию к образованию агрегатов в растворе [18].

Коммерческие хитозаны обычно растворимы только при низких значениях pH. Отсутствие растворимости в нейтральных водных растворах этих полимеров в ряде случаев может быть преимуществом, например, для удаления хитозанов из растворов путем регулирования pH, в то же время это сильно осложняет их использование как биологически активных препаратов при физиологических значениях pH.

Известно несколько растворителей, которые могут растворять хитин и хитозан при более высоких значениях pH – это фторированные растворители [19], смесь метанола с хлоридом кальция, 1-бутил-3-метилимидазолий ацетат [20], концентрированные щелочи [21]. Недавно было

показано, что хитозан с высокой СА может быть растворен в разбавленном растворе гидроксида Na, содержащем мочевины, с применением процедуры замораживания/оттаивания [22]. Однако эти реагенты не подходят для промышленного использования из-за высокой стоимости, сложности регенерации, летучести или токсичности.

Растворимость хитозана в водных растворах определяется его молекулярной массой и СА, а также распределением ацетильных групп вдоль полимерной цепи [23]: сополимеры с блочным распределением ацетилмов, т.е. полученные дезацетилированием хитина, имеют гораздо меньшую растворимость, чем образцы с той же самой СА, но полученные путем ацетилирования. Авторы работы [23] связывают это с разрушением кристаллической структуры, которое характерно для полисахаридов со случайным распределением заместителей, что приводит к повышению гидрофильности молекулы. В работе [24] при фракционировании хитозана и его деградированных производных по растворимости при рН 7,5 было обнаружено, что фракции, растворимые при нейтральных значениях рН, содержат хитозан с более высокими значениями СА, чем нерастворимые не зависимо от степени деполимеризации полисахарида. При этом растворимые фракции хитозана также имели близкое к случайному распределение ацетильных групп.

На растворимость хитозана оказывает влияние тип кислоты, которую используют для создания необходимого значения рН. Наиболее часто для этого применяют 1% уксусную кислоту. Полимер также растворяется в 1% соляной и разбавленной азотной кислотах и не растворяется в серной и фосфорной кислотах [19]. Ацетат-ионы имеют наибольшее сродство к хитозану, и полисахарид в ацетатной форме является более гидрофильным, чем в виде соли соляной кислоты, поэтому растворимость одних и тех же образцов хитозана в уксуснокислых растворах выше, чем в солянокислых [25]. Методом молекулярного моделирования показано [26], что ацетат-ионы могут взаимодействовать с остатками глюкозамина за счет образования электростатических и водородных связей с участием аминогруппы и гидроксильной группы при третьем атоме углерода в моносахаридном остатке. В случае хлорид-иона образуются простые ионные пары, которые не повышают растворимость полимера в воде, поскольку анионы хлора не могут участвовать в образовании водородных связей. Описанное выше влияние кислоты наиболее выражено при низких значениях СА, тогда как

при СА более 50% влияние природы противоиона на растворимость полимера нивелируется [27].

Добавление в среду растворения солей приводит к увеличению диапазона рН, в котором хитозан существует в растворенном виде. Это связано с тем, что увеличение ионной силы препятствует гидрофобным взаимодействиям и формированию агрегатов за счет водородных связей [11]. В работе [28] показано, что концентрация хлорида натрия, равная 0,1 М, является критической и последующее добавление соли не оказывает существенного влияния на процесс осаждения хитозана с ростом рН. Такая концентрация соли часто рассматривается как минимальная концентрация, которая позволяет экранировать внутри- и межмолекулярные электростатические взаимодействия [29,30].

Для увеличения растворимости хитозана в нейтральных водных растворах проводят его химическую модификацию путем синтеза производных, например N-карбоксиметилхитозана и хитозан-фосфатов [24]. Увеличить растворимость также можно путем регулирования содержания ацетильных групп в хитозане. Полисахариды с полной растворимостью при нейтральных значениях рН были получены при относительно высокой молекулярной массе хитозана с величинами СА от 40 до 60% [31].

Таким образом, наилучшими растворителями для хитозана считаются буферные растворы уксусной кислоты, содержащие хлорид натрия (с мочевиной или без нее), в которых наблюдается полное растворение полимера, с минимальными внутри- и межмолекулярными взаимодействиями между его макромолекулами [32].

КОНСТАНТА ДИССОЦИАЦИИ ХИТОЗАНА

Традиционно исследования хитозана в растворах проводят в буферных системах при рН близких к 4,5. При этом значении рН остатки глюкозамина почти полностью протонированы [33], а логарифм константы диссоциации (pK_a) свободных аминогрупп возрастает от 6,46 при СА 5% до 7,14 при СА 89% [11].

До сих пор существуют некоторые расхождения относительно зависимости значений pK_a хитозана от СА. Одно из первых исследований [34] было выполнено на хитозанах с различной молекулярной массой и СА от 0 до 25%. В ней авторы предлагают считать pK_a хитозана близкой к 6,5 и постоянной для исследованных образцов при ионной силе 0,1 М.

В работах других исследователей значения pK_a колеблются в пределах от 6,1 до 7,0 в

зависимости от типа хитозана и условий измерения [8,9]. В работе [35] методом ^1H ЯМР показано, что олигомеры хитозана с СА 50% и СА 0% имеют одно и тоже значение pK_a – 6,6. В то же время в работе [34], а затем в работе [11] методом потенциометрического титрования образцов хитозана и хитина с постоянной длиной цепи и СА от 5 до 89%, полученных мягким ацелированием, было установлено, что pK_a увеличивается от 6,3 до 7,2 с ростом СА. Вне зависимости от СА экранирующий эффект, связанный с увеличением ионной силы, всегда наблюдается, что, в свою очередь, приводит к уменьшению электростатического потенциала молекулы. Следствием этого является увеличение значения pK_a при увеличении ионной силы. Однако с ростом СА экранирующий эффект ионной силы постепенно ослабевает, и поведение хитозана все больше зависит от баланса между гидрофобными взаимодействиями и водородными связями [11].

Авторы работы [11] выделяют три интервала значений СА, которые характеризуются различной зависимостью pK_a от степени ацелирования. Первый характерен для СА < 28%, другой – для СА > 50%. Между этими двумя интервалами значений СА существует переходная область. pK_a чувствителен к структуре, особенно диэлектрическому окружению ионных сайтов, поэтому при СА ниже 28% pK_a уменьшается с увеличением содержания заряженных аминокрупп или с повышением плотности заряда. Для хитозанов с величиной СА, превышающей 50%, плотность заряда очень низкая и повышение СА приводит к увеличению степени гидрофобного окружения заряженных групп и росту pK_a [11].

При хранении растворов хитозанов с высокой СА и высокой степенью ионизации аминокрупп было отмечено увеличение pK_a и, как следствие, небольшое повышение рН растворов, что связано со снижением кажущейся плотности заряда в полимере за счет образования водородных связей [25]. При снижении степени ионизации (< 0,6) уменьшение рН растворов было более быстрым, а при низких значениях СА сопровождалось полным осаждением полимера вследствие образования обширной сети внутри- и межмолекулярных водородных связей и гидрофобных взаимодействий. В случае высокой СА (более 50%) скорость образования агрегатов замедлялась и полного осаждения не наблюдалось даже спустя трое суток. Такое поведение хитозана в растворах авторы связывают с важной ролью, которую играют N-ацелированные остатки, определяющие стабильность растворов в большом диапазоне рН за счет уве-

личения pK_a и жесткости полимерных цепей [25].

Таким образом, в зависимости от СА, величина логарифма константы диссоциации аминокрупп находится в диапазоне от 6,46 до 7,32 [11,34,36]. Увеличение рН раствора хитозана способствует образованию водородных связей, которые будут заменять значительную часть гидрофобных взаимодействий, в результате чего pK_a уменьшается.

СПОСОБНОСТЬ ХИТОЗАНА К ФОРМИРОВАНИЮ АГРЕГАТОВ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

Одной из особенностей полисахаридов, в том числе и хитозана, является их способность к формированию агрегатов в водных растворах. Агрегация создает трудности и является причиной расхождений в определении физико-химических параметров природных полимеров. Для некоторых полисахаридов, таких как альгинаты [37] и пектины [38], агрегаты молекул могут быть полностью удалены с помощью фильтрации и ультрацентрифугирования. В то же время авторы работы [18] показали, что избавиться от агрегатов в растворе хитозана не удастся ни с помощью центрифугирования в течение 4 ч при 100000 g, ни с помощью трех последовательных фильтраций с использованием фильтров Millipore-GS (0,22 мкм). Причинами этого, по мнению авторов, могут быть ассоциаты, которые не удаляются фильтрованием или седиментацией из-за их малого размера, или агрегаты, которые возникают вновь за счет взаимодействия с более низкомолекулярными компонентами [18], поскольку присутствие агрегатов в отфильтрованных растворах наблюдалось для хитозанов с низкой молекулярной массой [39]. Вместе с тем авторы работы [40], используя хитозан со случайным распределением ацетатов, показали, что двухстадийная фильтрация полисахарида позволяет избавиться от ассоциатов. Возможно такое расхождение результатов связано с тем, что в раствор хитозана добавляли ацетат аммония для предотвращения образования водородных связей. Разрушение агрегатов хитозанов с молекулярной массой, не превышающей 12 кДа, в растворах 0,1М AcOH/0,3М AcONa, также наблюдалось в процессе вискозиметрии [39].

Хотя самоассоциация хитозана и определяется его концентрацией [18], некоторая часть полисахарида может существовать в агрегированной форме даже в разбавленных растворах [27,41]. Содержание таких агрегатов не превышает 5% [18,41], их гидродинамический ра-

диус не зависит от степени полимеризации хитозана и, вероятно, связан с наличием неэкранированных заряженных групп в полимере, заряд которых, в случае низкой СА, не подавляется полностью даже в растворах с высокой ионной силой [41].

Было показано [42], что существует по крайней мере два вида агрегатов. Один из них – это ассоциаты индивидуальных молекул, а второй тип представляют собой вторичные агрегаты ассоциированных молекул [42]. В работе [29] агрегаты хитозана рассматриваются как гетерогенные фрактальные структуры. Фрактальная размерность в трехмерном пространстве составляет 1,3, что позволяет авторам этой работы считать, что агрегаты хитозана представляют собой волокнистые или стержнеподобные частицы.

До настоящего времени существует разное мнение по поводу физической основы агрегации хитозана. Некоторые авторы считают, что гидрофобные фрагменты полисахарида, т.е. ацетильные группы и гликозидные кольца, играют существенную роль в формировании агрегатов за счет гидрофобных взаимодействий [40,43]. Согласно этой теории, при критических значениях pH, независимо от СА, среднее расстояние между ионными участками вдоль цепей остается постоянным, однако уменьшается гидратация цепей вследствие уменьшения плотности заряда, что запускает переход золь/гель [28]. Этот переход осуществляется за счет гидрофобных взаимодействий и водородного связывания, которые приводят к образованию высокомолекулярных ассоциатов [11,44].

В то же время в работе [45] было показано, что образцы хитозана с низкой СА и низкой молекулярной массой, в отличие от более ацетилированных и высокомолекулярных аналогов, имеют повышенную склонность к образованию гидрофобных доменов. Предполагается, что образование агрегатов происходит на концах цепей в силу их более высокой концентрации при низкой молекулярной массе. Высокая тенденция низкоацетилированных образцов участвовать в формировании агрегатов авторы объясняют повышенной жесткостью их молекул и более высокой характеристической вязкостью их растворов [46]. Авторы исключают участие ацетильных групп в образовании гидрофобных доменов и предполагают, что данные о склонности к агрегации хитозанов с высокой СА [40,43] могут быть следствием неполного растворения образца [45].

Согласно данным работы [47], гомогенное распределение N-ацетильных групп вдоль одной молекулы хитозана уменьшает количество

агрегатов, образующихся в растворах полимера.

Было показано [48], что хитозан способен образовывать гидрофобные домены в концентрированных растворах, в основном за счет межмолекулярной ассоциации, поскольку высокая степень ионизации аминогрупп полимера исключает внутримолекулярную агрегацию. Авторы этой работы считают, что причиной формирования гидрофобных агрегатов, наряду с N-ацетилглюкозаминовыми остатками, являются единицы глюкозамина, которые также способны взаимодействовать друг с другом посредством водородных связей. В результате такого взаимодействия гидрофильные группы, участвующие в образовании водородных связей, становятся «экранированы» от растворителя, в результате ослабляется гидрофильность полимера. Внесение в среду соли аммония [18,49] препятствует образованию межмолекулярных водородных связей и предотвращает агрегацию хитозана. В то же время добавление в среду хлорида или ацетата натрия усиливает гидрофобные взаимодействия за счет уменьшения электростатического отталкивания, что приводит к образованию дополнительных гидрофобных микродоменов [46], способствует увеличению вклада сил Ван-дер-Ваальса и приводит к образованию межмолекулярных ассоциатов хитозана [48,50].

При определенных условиях, которые определяются соотношением СА хитозана и pH раствора, при приближении к пределу растворимости полимера было отмечено существование дисперсии наночастиц [28]. Это явление связывают с уменьшением плотности заряда молекулы и образованием водородных связей при увеличении pH, что в свою очередь вызывает определенную агрегацию полимерных цепей. Наночастицы хитозана представляют собой компактные частицы сферической формы, средние размеры которых увеличиваются от 50–150 нм при СА 1% до 100–300 нм при СА 51% [28]. Предполагается, что увеличение средних размеров наночастиц с ростом СА связано с гидрофобными взаимодействиями, за счет N-ацетильных остатков, что способствует локальному увеличению жесткости полимерных цепей за счет создания дополнительных стерических затруднений, что в итоге приводит к увеличению гидродинамического радиуса молекулы [46]. При достижении некоторой критической концентрации существует динамическое равновесие между изолированными цепями, которые остаются гидрофильными, и многочисленными гидрофобными наноагрегатами [25, 45].

КОНФОРМАЦИЯ МОЛЕКУЛ ХИТОЗАНА
В РАСТВОРЕ

Одними из важных физико-химических характеристик хитозана является конформация и гибкость его молекул. Определение этих параметров важно для прогнозирования различных свойств, связанных с практическим использованием полисахаридов. Например, молекулы с жесткой стержнеобразной конформацией могут быть пригодны для создания на их основе нанотрубок, волокон, сетчатых каркасов, тогда как растворы полимеров с более компактной формой будут предпочтительны для получения микро- и наночастиц. Известно, что и активность полисахаридов определяется не только их химической структурой, но и конформацией макромолекул [51]. Так, противоопухолевую активность лентинана из *Lentinus edodes* [52] и шизофилана из *Schizophyllum commune* связывают со спиральной конформацией основной цепи этих (1–3)-βD-глюканов [53]. Спиральная конформация молекулы шизофилана является определяющей при получении нетоксичных систем доставки генов на основе его комплекса с гомополинуклеотидами ДНК или РНК [54].

Поскольку конформация определяется структурой полимера, свойствами растворителя, концентрацией, наличием низкомолекулярных компонентов, то качество образцов является ключевым параметром при изучении физико-химических свойств растворов хитозана. В связи с этим, необходимо выполнение ряда условий: полимер должен представлять собой серию однородных образцов, характеризующихся большим диапазоном СА, аналогичным молекулярно-массовым распределением, узкой полидисперсностью и хорошей растворимостью в выбранном растворе [11,28,40,46]. Часто встречающиеся в литературе противоречия в описании физико-химических свойств природных полиэлектролитов во многом обусловлены трудностями получения серии образцов, однородных по химической структуре и размеру полимерной молекулы. Для минимизации влияния этих факторов при определении конформации молекул хитозанов ряд исследователей предлагает использовать однородную серию образцов полисахарида со случайным распределением единиц GlcN и GlcNAc, полученных путем ацетилирования полностью дезацетилированного хитина [11,40,55].

Методы определения конформации хитозана.

Для изучения конформации хитозана в водных растворах используют различные методы – статическое и динамическое рассеяние света, аналитическое ультрацентрифугирование [40,55–

57], гельпроникающую хроматографию [47,58–60]. Изучение вязкости разбавленных растворов полимеров также позволяет оценить конформацию их молекул [32,56,61–64]. Характеристическая вязкость $[\eta]$, которая является наиболее часто определяемым параметром для характеристики гидродинамического поведения полимеров [32], рассматривается как мера объема отдельной полимерной молекулы в идеальном растворителе [33]. Наряду с этим экспериментально определяют такие величины, как коэффициент седиментации S [65], радиус вращения R_g [22,27,66,67], гидродинамический радиус R_h [22,41,68], коэффициент диффузии d [56,65], поверхностное натяжение [69].

Конформацию полимеров в растворах, т.е. размеры и конкретные формы, которые макромолекулы принимают в результате суммарного влияния теплового движения и внешних сил, оценивают на основании различных математических зависимостей, связывающих перечисленные выше экспериментальные параметры, подробный обзор которых приведен в работе [70].

Для оценки жесткости молекул используют [71,72] эмпирический параметр B , предложенный в работе [30]. Определение этого параметра основано на теориях Флори [73] и Фиксмана [74] и определяется исходя из зависимостей $[\eta] = KM^\alpha$ или $R_G = K'M^v$, где M – молекулярная масса, K, K', α и v – константы, определяемые экспериментальным путем. Поскольку теория Флори не учитывает взаимодействий между растворителем и полимером [75], то использование параметра B в качестве меры жесткости молекул ограничивается растворами относительно сильных полиэлектролитов, для которых доказано отсутствие конформационных переходов при изменении ионной силы раствора [30].

Ряд исследователей рассматривают параметр жесткости B в качестве основной конформационной характеристики молекул хитозана и считают его независимым от СА [39,60]. Напротив, другие авторы [61,66], обнаружив уменьшение значения параметра B с увеличением СА, предполагают увеличение жесткости цепей хитозана. Правомочность использования параметра B для хитозана доказана в работе [61], где показано, что молекулы полисахарида не претерпевают каких-либо конформационных переходов в исследованных растворах. Тем не менее авторы этой работы отмечают, что корректно сравнивать жесткость молекул различных хитозанов на основании параметра B возможно только для тех образцов, которые имеют одинаковую плотность зряда.

В работе [32] было предложено в качестве меры жесткости молекулы хитозана ввести эмпирическую функцию, которая включает в себя характеристическую вязкость, СА, ионную силу растворителя и рН раствора. Согласно этой зависимости высокие значения СА хитозана приводят к увеличению жесткости полимерной цепи, а повышение ионной силы и рН раствора – к более гибкой конформации [32].

На основании данных аналитического ультрацентрифугирования было предложено оценивать форму молекулы хитозана в растворе, используя такой параметр, как конформационная зона седиментации [76]. В зависимости от величины коэффициента седиментации, молекулярной массы и степени полимеризации полимер может располагаться в одной из пяти различных зон седиментации, первая из которых соответствует конформации сверхжесткого стержня, а последняя – сферическим или разветвленным макромолекулам. Анализ хитозанов различной структуры, проведенный на основании этой модели, показал, что все исследованные образцы располагались в зоне седиментации, соответствующей молекулам с жесткой стержнеобразной конформацией [77].

Персистентная длина цепи хитозана. Поскольку жесткость молекулы предотвращает контакт повторяющихся звеньев друг с другом, существует определенная длина цепи, ниже которой влияние исключенного объема (т.е. объема, из которого данная полимерная молекула вытесняет все другие молекулы за счет действия сил отталкивания между ними) на размеры и гидродинамические свойства молекулы незначительно. Вследствие этого для оценки конформации правомерно использовать такой параметр, как персистентная длина цепи (L_p) или термодинамический сегмент Куна [60,78]. Анализ литературных данных свидетельствует о том, что значения параметра L_p для хитозана варьируют в очень больших пределах. Так авторы работы [79] определили значение L_p , равное 22 нм для хитозанов со СА 15 и 42%; в работе [29] приводится значение L_p , равное 8,7 нм; в работе [63] показано, что в водных растворах хитозан со значением СА 25% представляет собой одноцепочечные червеобразные цепи с персистентной длиной около 6 нм, в то время как в работе [59] обнаружено небольшое увеличение L_p от 11 до 15 нм для образцов однородно ацетилизованного хитозана с ростом СА от 2 до 60% соответственно.

Авторы работы [40] определили персистентную длину цепи с учетом молекулярно-массового распределения и влияния исключенного объема для серии образцов хитозана со слу-

чайным распределением ацетатных остатков и привели значения параметра L_p в пределах 4,3–5,0 нм независимо от СА [40]. Эти значения близки к значению L_p , равному 6 нм, приведенному в работе [63], авторы которой при расчете значения L_p также учитывали полидисперсность системы и эффект исключенного объема.

Персистентная длина полиэлектролитов зависит от ионной силы и рН раствора [39,80]. Так, значения L_p уменьшались с 17,14 до 4,60 нм при увеличении ионной силы от $0,04 \cdot 10^{-2}$ до $24,30 \cdot 10^{-2}$ М, что доказывает увеличение гибкости хитозановых цепей вследствие уменьшения потенциала отталкивания между ними [39]. Помимо этого, величина параметра L_p зависит от характера распределения ацетильных групп вдоль полимерной цепи (блочное или случайное): протяженные участки глюкозаминовых звеньев имеют большую гибкость по сравнению с блоками, простроенными преимущественно из звеньев GlcNAc [59]. Наличие в растворах хитозана агрегатов также может приводить к завышению значений L_p [60].

Согласно современным теориям поведения полиэлектролитов персистентная длина молекулы $L_{p, \text{общ}}$ рассматривается как сумма двух составляющих: $L_{p, \text{вн}}$ – характеризующей локальную жесткость цепи и $L_{p, \text{эл}}$ – учитывающей электростатическое отталкивание между смежными ионными сайтами [55]. Авторы показали, что для хитозана $L_{p, \text{общ}}$ зависит не только от СА, но также и от степени полимеризации полимера. Однако вычлнить влияние СА и степени полимеризации на L_p очень трудно, поскольку персистентная длина очень сильно зависит от степени полидисперсности. Вследствие этого большие расхождения в значениях L_p хитозана могут быть также связаны с высоким индексом полидисперсности исследуемых образцов [55].

Расчет L_p для характеристики молекул полимеров включает ряд допущений, которые основываются на теории, а не только на экспериментальных данных. Кроме того, помимо различий L_p , вытекающих из различных теоретических соображений, существуют расхождения вследствие применения различных методов для определения этого параметра, например, вязкости и рассеяния света [71]. Как правило, получают завышенные значения L_p , когда для ее определения используют среднечисловую молекулярную массу вместо средневесовой [61].

Таким образом, при определении величины такого важного параметра, характеризующего жесткость молекулы хитозана, как персистент-

ная длина цепи, важно учитывать влияние множества факторов связанных как со структурой самого полимера, так и с условиями среды его растворения.

Факторы, влияющие на конформацию молекул хитозана. Природа растворителя и его взаимодействие с полимером оказывают значительное влияние на конформацию макромолекул. Если таких взаимодействий нет, конформация природных полимеров является гибкой и они ведут себя подобно синтетическим. При наличии полярно-полярных взаимодействий характеристическая вязкость растворов полимеров увеличивается, а их молекулы становятся более объемными по сравнению с незаряженными полимерами [75].

Наряду с этим, важным параметром, влияющим на поведение полимеров в растворе, является температура. Так, в идеальном Θ -растворителе повышение температуры приводит к уменьшению характеристической вязкости, молекулы полимера становятся более компактными в результате повышения энтропии системы с ростом температуры, поскольку в этих условиях протяженная конформация энергетически невыгодна. В то же время в неидеальном растворителе повышение температуры и энтропии приводит к более вытянутым молекулам и сопровождается увеличением характеристической вязкости [32]. Однако ограничиться только температурой как фактором, определяющим конформацию полимера в растворе, как правило, не удастся. Следует учитывать комбинацию нескольких переменных (наличия низкомолекулярных солей, pH, концентрации и молекулярной массы полимера), которые будут определять гидрофильные, гидрофобные и водородные взаимодействия [32,75]. В бессолевом водном растворе хитозан будет иметь наиболее протяженную конформацию и более высокую вязкость раствора по сравнению с растворами неионных полимеров вследствие электростатического отталкивания между положительными зарядами, распределенными вдоль макромолекулы. Добавление соли к раствору будет приводить к уменьшению объема молекулы благодаря эффекту экранирования. При высокой концентрации соли вязкость растворов хитозана будет приближаться к вязкости неионных полимеров [24,60], а конформация стремиться к максимально компактной независимо от молекулярной массы [64]. Повышение концентрации полимера также будет приводить к сжатию молекулы [39].

Для оценки взаимодействий полимера с растворителем используется значение второго вириального коэффициента A_2 , который обычно

определяют методом осмометрии или светорассеяния. Вторым вириальным коэффициентом – это мера прочности связывания растворителя с конкретным полимером. Наряду с этим для оценки взаимодействий между полимером и растворителем можно использовать характеристическую вязкость [75] и значения коэффициентов α и K уравнения Марка–Хаувинка–Куна, обзор значений которых для различных образцов хитозана приведен в работе [81].

Большинство авторов сходятся во мнении, что влияние молекулярной массы на конформацию цепей хитозана незначительно и этим параметром можно пренебречь, если отношение значений молекулярной массы не превышает двух, однако по мере расширения диапазона изменение молекулярной массы может инициировать конформационные переходы [64].

В работе [64] было показано, что образцы хитозанов с молекулярной массой менее 140 кДа являются более жесткими и вытянутыми полимерами, чем высокомолекулярные образцы с молекулярной массой, превышающей 220 кДа, что, по мнению авторов, связано с увеличением тенденции более высокомолекулярных хитозанов к образованию внутримолекулярных водородных связей. Однако эти данные расходятся с нашими результатами, полученными методами аналитического центрифугирования и капиллярной вискозиметрии [82]. Как было показано, низкомолекулярный хитозан обладает более гибкой конформацией, которая зависит от температуры [82]. Согласно данным электронной микроскопии, для хитозана с молекулярной массой, превышающей 100 кДа, характерно образование длинных червеобразных структур или длинных нитей, соединенных между собой, тогда как хитозан с молекулярной массой 30 кДа представляет собой более компактные частицы [82]. Подобный вывод подтверждается результатами исследования взаимодействия этих образцов с эндотоксинами: низкомолекулярный хитозан в силу гибкости его цепей способен проникать в агрегаты эндотоксина, вызывая их разукрупнение, что не характерно для высокомолекулярного полисахарида [83].

Более жесткая конформация высокомолекулярных хитозанов также была отмечена в работе [56], где показано, что деполимеризация полисахарида приводит к более компактной форме молекул. Поскольку полидисперсность полимеров сильно влияет на L_p и, следовательно, на гибкость молекулы [55], противоречие в отношении зависимости гибкости молекул хитозана от молекулярной массы может быть связано с тем, что авторы работы [64] исполь-

зовали набор образцов полисахаридов, полученных щелочной деполимеризацией, без дополнительных стадий их очистки от низкомолекулярных продуктов.

В полярных растворителях, например в воде, полиэлектролитные соли диссоциируют на заряженные полимерные цепи и противоионы, диспергированные в растворе или конденсированные вблизи их поверхности [84]. Вместе с этим хитозан и другие полиэлектролиты не растворяются в воде в неионизированном состоянии и поэтому могут рассматриваться как относительно гидрофобные полимеры. В этом случае конформация их молекул будет определяться балансом между гидрофобными и гидрофильными взаимодействиями и, следовательно, ключевым параметром, определяющим форму хитозанов в водном растворе будет СА [84]. Действительно, контроль этого параметра является ключевым моментом при производстве полисахаридных материалов, таких как гидрогели [85], полые волокна [86], наночастицы [28] и др.

Наиболее полное и комплексное исследование зависимости гидродинамических параметров хитозана от СА было выполнено Шатцем с соавторами [28,40,87], которые показали, что в соответствии со степенью ацетилирования для хитозана характерно три типа поведения в водных растворах. Позже эти данные были подтверждены рядом других исследователей [11,55,56].

1. При СА ниже 20% и полной ионизации аминогрупп хитозан ведет себя как катионный полиэлектролит, обладает самой высокой структурной плотностью заряда и характеризуется средним расстоянием между ионизированными группами в пределах 5–6 Å. Предпочтительными являются длинно дистанционные внутри- и межмолекулярные взаимодействия. Расширение цепей за счет внутримолекулярных электростатических отталкиваний, а также вызываемая течением раствора деформация двойного электрического слоя, окружающего каждую полимерную цепь [88], являются наиболее очевидными причинами для увеличения значений характеристической вязкости в этом диапазоне значений СА [40]. Электростатическое отталкивание между протонированными аминогруппами приводит к увеличению гидродинамического объема [40] и повышению жесткости молекул [55], которая при низких значениях СА сильно зависит от ионной силы. Добавление низкомолекулярных солей предотвращает электростатическое отталкивание аминогрупп, которое при высоких концентрациях солей подавляется в значительной степени [40].

В этом случае полимеры хитозана можно рассматривать как гибкие макромолекулы [55,59]. Молекулярно-динамическими расчетами показано, что жесткость полисахаридной цепи хитозана пропорциональна прочности внутримолекулярной водородной связи между атомом НО3 одного моносахаридного остатка и атомом О5 соседнего [89].

2. С увеличением СА поведение хитозана в растворах претерпевает значительные изменения. В области средних значений СА (20–50%) ацетилированные звенья могут быть вовлечены в образование внутримолекулярных водородных связей, тем самым ограничивая вращение вокруг β -(1–4)-гликозидных связей. Кроме того, эти группы являются более громоздкими, чем аминогруппы и, следовательно, создают стерические затруднения, ограничивая вращение цепей [56]. С ростом СА увеличивается вероятность взаимодействий между сегментами одной и той же молекулы полимера и снижается взаимодействие между растворителем и полимером. Это в свою очередь приводит к потере растворимости, которая связана с уменьшением гидрофильности полимерных цепей [40]. Кроме того, большое количество ацетильных групп вдоль цепи также способствует образованию гидрофобных связей и, как следствие, жесткость цепей хитозана возрастает с ростом СА [40] и с увеличением степени полимеризации [55]. Физико-химические параметры полимера, такие как вязкость и радиус инерции, остаются более или менее постоянными [28], что может быть результатом того, что воздействие гидрофильных и гидрофобных сил уравнивается [40]. В области значений СА 20–50% авторы работы [11] предлагают рассматривать хитозан в растворе как молекулу с изолированными зарядами, находящимися в гидрофобном окружении. В этой ситуации типичной является самоассоциация полимерных цепей, которая усиливается с ростом СА. Доля агрегатов в растворе хитозана, согласно литературным данным, будет возрастает до СА, равного 60% [24,43].

3. При дальнейшем увеличении содержания ацетиллов (СА более 50%) плотность зарядов становится в значительной степени разряженной и реализуются только коротко-дистанционные электростатические взаимодействия. Хитозан теряет свои полиэлектролитные свойства и принимает более жесткую конформацию как за счет образования водородных связей, так и за счет стерических затруднений, генерируемых ацетильными группами [28]. Гидрофобные взаимодействия, в связи с увеличением содержания ацетильных групп, становятся доминирующими. Это вызывает ассоциацию молекул, приво-

дит к высоким значениям радиуса вращения [28], увеличению жесткости молекул [55, 59]; растворы приближаются к дисперсиям высокосольватированных микрогелей. Увеличение степени полимеризации в этом диапазоне значений СА приводит к самоассоциации молекул хитозана и образованию дисперсии коллоидных частиц. Хотя концентрация таких агрегатов достаточно низкая ($< 7\%$ [55]) и не приводит к ошибочному описанию конформации, но все же является достаточно высокой и может быть причиной неверного определения персистентной длины цепи. В этом случае поведение хитозана в растворах уже не может быть адекватно описано с помощью моделей, которые применимы для разбавленных систем, и, соответственно, жесткость макромолекул может быть завышена [55].

Таким образом, по мере увеличения СА, хитозан в растворе переходит из состояния полиэлектролита к состоянию полимера с изолированными зарядами [11,40].

В работе [90] проведено систематическое исследование конформационной динамики гликозидных связей в хитине и хитозане с различным распределением ацетильных остатков вдоль полимерной цепи для ди-, три- и тетра-сахаридов. Согласно полученным данным, определенной гибкостью обладает связь между двумя остатками N-ацетилглюкозамина, а максимальной подвижностью – связь между глюкозамином и N-ацетилглюкозамином, расположенным на восстанавливающем конце. В то же время связи GlcNAc–GlcN и GlcN–GlcN имеют ограниченную подвижность из-за возможности образования водородной связи между гидроксильной группой у C3 на восстанавливающем конце и атомом кислорода у C5 на невосстанавливающем конце. Расчеты с участием молекул воды показали, что в случае заряженного первичного амина, смежного с OH-группой при C3 (в хитозане с СА 0%), происходит общая стабилизация конформации [89], а в случае ацетамида, смежного с OH при C3, влияние воды не столь выражено. Следовательно, гибкость полимерной молекулы будет определяться числом связей GlcN–GlcNAc и в меньшей степени – GlcNAc–GlcNAc [90]. Эти расчеты хорошо объясняют более жесткую конформацию хитозанов с СА $> 50\%$ [55], у которых количество GlcN–GlcNAc-связей уменьшается.

Физико-химические свойства растворов полимеров сильно зависят от их концентрации. В разбавленных растворах полимерные цепи изолированы друг от друга растворителем, и основными параметрами, определяющими физико-химические свойства, являются гидроди-

намический объем и конформация молекул. При увеличении концентрации конформация макромолекул хитозана стремится к более сферической и компактной, возрастает хаотическое переплетение макромолекул и их размеры становятся не зависимыми от концентрации полимера [64]. Величиной, позволяющей разграничить разбавленные и концентрированные растворы, принято считать концентрацию переплетения макромолекул (C^*), соответствующую концентрации полимера, при которой цепи начинают частично перекрываться. Таким образом, при концентрации $C < C^*$ – это разбавленный раствор, при $C > C^*$ – концентрированный раствор с переплетенными макромолекулами [50]. Значение C^* определяется экспериментально по отношению вязкости раствора полимера к вязкости растворителя. Это концентрация, при которой вязкость раствора полимера в два раза превышает вязкость растворителя [91].

Для описания конформации хитозана в концентрированных растворах лучше всего подходит модель «жемчужного ожерелья», предложенная в работе [70]. Согласно этой теории, гидрофобные полиэлектролиты могут быть смоделированы как последовательность из N мономеров размера b , из которых определенная фракция является заряженной. Конформация полиэлектролитов в воде определяется балансом между электростатическими и гидрофобными взаимодействиями. Таким образом, в разбавленном режиме нейтральный полимер, чтобы минимизировать свое взаимодействие с растворителем, будет образовывать сферические глобулы. При увеличении количества заряженных групп до некоторого критического значения, глобула будет расщепляться в последовательность более мелких шаровидных структур (бусинок), соединенных струнами (конформация жемчужного ожерелья) для уменьшения электростатической энергии системы [70]. В менее концентрированном растворе гидрофильные струны контролируют пространственную ориентацию бусинок. Когда концентрация полимера увеличивается, длина струн изменяется, и конформация цепи определяется бусинками [91].

Для концентрированных растворов также отмечалась важная роль СА, которая определяет конформацию полимера. Как и в случае разбавленных систем наблюдалось три различных интервала поведения хитозана в зависимости от СА. При СА $< 28\%$ хитозан ведет себя как полиэлектролит с высокой плотностью заряда, тогда как при СА $> 50\%$ он становится более гидрофобным полимером с низкой плот-

ностью заряда, а между этими двумя экстремальными точками наблюдается переходный интервал [92].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ литературных данных показал, что в зависимости от молекулярной массы и СА полимера, а также условий среды растворения (ионная сила, рН, температура) хитозаны имеют форму стержня [56,61,62], хаотичного [56,60,61,78] или уплотненного клубка [93]. Некоторые расхождения в определении конформации молекул полисахарида в водных растворах, приводимые разными группами исследователей, могут быть связаны с наличием агрегатов или недостаточно диспергированных остатков хитозана [18,29], что критически влияет на анализ данных для расчета конформации.

С развитием методов математического анализа данных появились компьютерные программы, позволяющие оценивать конформацию и жесткость молекул полимеров. Так, программа Multi_HYDFIT [67] позволяет оценить персистентную длину на основании данных характеристической вязкости и коэффициента седиментации, полученных для растворов полимеров с различными молекулярными массами. Программа также теоретически рассчитывает эти параметры и позволяет оценить процент совпадения теоретических и расчетных величин для проверки адекватности выбранной модели, описывающей конформацию молекул полимера. Анализ хитозана с использованием программы Multi_HYDFIT показал, что конформация полисахарида находится на границе двух модельных состояний: полугибкого клубка и жесткого стержня и имеет большое количество промежуточных форм. Таким образом, применение математического подхода позволило объяснить расхождения данных относительно возможных конформаций этого полимера.

Сложности описания поведения хитозана в растворе и определения его истинной конформации связаны со сложным многокомпонентным влиянием различных факторов. В работе [27] выделены три уровня структурной организации растворов полимера и предложено проводить комплексное описание физико-химических свойств хитозана с этих позиций. На первом – локальном уровне – предложено рассматривать взаимодействие макромолекулы и противоионов растворителя, которые образуют заряженный слой. Такая конденсация ионов, описанная в работе [84], уменьшает эффективный заряд макромолекулы и инициирует дальнедействующие эффекты электростатического притя-

жения макромолекул. На более сложном уровне следует описывать конформацию молекул как соответствующую последовательность сегментов или электростатических шариков – в разбавленном бессолевом растворе конформация полимера, таким образом, будет соответствовать протяженной цепочке из электростатических шариков, которая образуется в результате отталкивания между этими шариками. Внутри шарика форма молекулы не подвержена электростатическими взаимодействиями, но зависит от качества растворителя [27]. На третьем уровне было предложено учитывать внутри- и межмолекулярные ассоциаты полисахарида.

Таким образом, при описании конформации хитозана необходимо учитывать, как воздействия ближнего порядка (эффект исключенного объема, водородные связи, гидрофобные силы), так и дальнедействующие (электростатические) взаимодействия. Более того, детальные характеристики полисахаридной молекулы, например, распределение моносахаридных остатков, также важны, поскольку они контролируют явление противоионной конденсации [84], которая уменьшает эффективный заряд макромолекулы и влияет на ее жесткость за счет модификации электростатических взаимодействий [92].

Определяющим параметром, влияющим на физико-химические свойства и конформацию хитозана, является степень ацетилирования. Это связано, во-первых, с объемом N-ацетильных групп, которые могут создавать стерические затруднения и способствовать образованию внутримолекулярных водородных связей. Во-вторых, эффект отталкивания положительно заряженных свободных аминогрупп в кислых растворах, который максимально проявляется в растворах с низкой ионной силой для хитозанов с наименьшей СА, приводит к тому, что молекулы с самым высоким положительным зарядом будут иметь наиболее вытянутую конформацию [61]. Вместе с тем уже в растворах с ионной силой, равной 0,1, превалирующее влияние имеют N-ацетильные группы, а не электростатический эффект заряженных аминогрупп хитозана [61].

Наряду с этим немаловажную роль при описании поведения хитозана в растворах играет степень полимеризации образца, характер распределения ацетильных групп, степень полидисперсности, а также условия окружающей среды: природа растворителя, температура, рН раствора, наличие солей, их природа и концентрация.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Программой «Дальний Восток» (грант № 15-I-5-019).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. K. Shukla, A. K. Mishra, O. A. Arotiba, et al., *Int. J. Biol. Macromol.* **59**, 46 (2013).
2. L. Illum, *Pharm. Res.* **15** (9), 1326 (1998).
3. G. Borchard, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **52** (2), 145 (2001).
4. C. M. Lehr, J. A. Bouwstra, E. H. Schacht, and H. E. Junginger, *Int. J. Pharm.* **78**, 43 (1992).
5. H. Ueno, T. Mori, and T. Fujinaga, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **52** (2), 105 (2001).
6. R. A. A. Muzzarelli, J. Boudrant, D. Meyer, et al., *Carbohydr. Polym.* **87** (2), 995 (2012).
7. С. Н. Михайлов и В. П. Варламов в сб. *Хитозан*, под ред. К. Г. Скрябина, С. Н. Михайлова и В. П. Варламова (Центр «Биоинженерия» РАН, М., 2013), сс. 5–17.
8. S. Kim, S. Kim, and Y. Lee, *J. Polym. Sci. Part B* **34**, 2367 (1996).
9. M. K. Jang, B. G. Kong, et al., *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **42** (14), 3423 (2004).
10. R. Shepherd, S. Reader, and A. Falshaw, *Glycoconj. J.* **14** (4), 535 (1997).
11. P. Sorlier, A. Denezire, C. Viton, et al., *Biomacromolecules* **2** (3), 765 (2001).
12. M. X. Weinhold, J. C. Sauvageau, N. Keddig, et al., *Green Chem.* **11**, 498 (2009).
13. C. Wu, S. Zhou, and W. Wang, *Biopolymers* **35** (4), 385 (1995).
14. S. Hirano, S. Tsuneyasu, and Y. Kondo, *Agric. Biol. Chem.* **45** (6), 1335 (1981).
15. K. L. Chang, G. Tsai, J. Lee, et al., *Carbohydr. Res.* **303** (3), 327 (1997).
16. K. Kurita, T. Sannan, and Y. Iwakura, *Die Makromol. Chemie* **178** (12), 3197 (1977).
17. S. Ichi Aiba, *Int. J. Biol. Macromol.* **13** (1), 40 (1991).
18. M. W. Anthonsen, K. M. Varum, A. M. Hermansson, et al., *Carbohydr. Polym.* **25** (1), 13 (1994).
19. C. K. S. Pillai, W. Paul, and C. P. Sharma, *Prog. Polym. Sci.* **34** (7), 641 (2009).
20. Y. Wu, T. Sasaki, S. Irie, and K. Sakurai, *Polymer* **49** (9), 2321 (2008).
21. A. Einbu, S. N. Naess, A. Elgsaeter, and K. M. Varum, *Biomacromolecules* **5** (5), 2048 (2004).
22. Y. Fang, B. Duan, A. Lu, et al., *Biomacromolecules* **16** (4), 1410 (2015).
23. K. Kurita, M. Kamiya, and S. I. Nishimura, *Carbohydr. Polym.* **16** (1), 83 (1991).
24. K. M. Varum, M. H. Ottoy, and O. Smidsrud, *Carbohydr. Polym.* **25** (2), 65 (1994).
25. A. Domard, *Carbohydr. Polym.* **84** (2), 696 (2010).
26. R. Terreux, M. Domard, C. Viton, and A. Domard, *Biomacromolecules* **7** (1), 31 (2006).
27. N. Boucard, L. David, C. Rochas, et al., *Biomacromolecules* **8** (4), 1209 (2007).
28. C. Schatz, C. Pichot, T. Delair, et al., *Langmuir* **19** (23), 9896 (2003).
29. T. Matsumoto, M. Kawai, and T. Masuda, *Biopolymers* **31** (14), 1721 (1991).
30. O. Smidsrod and A. Haug, *Biopolymers* **10** (7), 1213 (1971).
31. T. Sannan, K. Kurita, and Y. Iwakura, *Die Makromol. Chemie* **177** (12), 3589 (1976).
32. M. R. Kasai, *Carbohydr. Polym.* **68** (3), 477 (2007).
33. C. N. Costa, V. G. Teixeira, M. C. Delpech, et al., *Carbohydr. Polym.* **133**, 245 (2015).
34. A. Domard, *Int. J. Biol. Macromol.* **9** (2), 98 (1987).
35. M. W. Anthonsen and O. Smidsrud, *Carbohydr. Polym.* **26** (4), 303 (1995).
36. M. Rinaudo, G. Pavlov, and J. Desbrieres, *Polymer* **40** (25), 7029 (1999).
37. O. Smidsrud and A. Haug, *Acta Chem. Scand.* **22** (6), 1989 (1968).
38. G. Berth, *Carbohydr. Polym.* **19** (1), 1 (1992).
39. I. V. Blagodatskikh, E. A. Bezrodnykh, S. S. Abramchuk, et al., *J. Polym. Res.* **20** (2), 73 (2013).
40. C. Schatz, C. Viton, T. Delair, et al., *Biomacromolecules* **4** (3), 641 (2003).
41. E. V. Korchagina and O. E. Philippova, *Biomacromolecules* **11** (12), 3457 (2010).
42. A. Domard, C. Gey, M. Rinaudo, and C. Terrassin, *Int. J. Biol. Macromol.* **9** (4), 233 (1987).
43. O. Ottoy, M.H., Varum, K.M., Christensen, et al., *Carbohydr. Polym.* **31** (4), 253 (1996).
44. L. Vachoud, N. Zydowicz, and A. Domard, *Carbohydr. Res.* **302** (3–4), 169 (1997).
45. R. Novoa-Carballal, R. Riguera, and E. Fernandez-Megia, *Polymer* **54** (8), 2081 (2013).
46. P. Sorlier, C. Rochas, I. Morfin, et al., *Biomacromolecules* **4** (4), 1034 (2003).
47. M. Yanagisawa, Y. Kato, Y. Yoshida, and A. Isogai, *Carbohydr. Polym.* **66** (2), 192 (2006).
48. O. E. Philippova, E. V. Volkov, N. L. Sitnikova, et al., *Biomacromolecules* **2** (2), 483 (2001).
49. A. Domard, and M. Rinaudo, *Polym. Commun.* **25**, 55 (1984).
50. J. Cho, M.-C. Heuzey, A. Bégin, and P. J. Carreau, *J. Food Engineer.* **74** (4), 500 (2006).
51. Y. Tao, L. Zhang, F. Yan, and X. Wu, *Biomacromolecules* **8** (7), 2321 (2007).
52. U. Surenjav, L. Zhang, X. Xu, et al., *Carbohydr. Polym.* **63** (1), 97 (2006).
53. A. Tsuzuki, N. Ohno, Y. Adachi, and T. Yadomae, *Drug Dev. Res.* **48** (1), 17 (1999).
54. K. Sakurai and S. Shinkai, *J. Am. Chem. Soc.* **122** (18), 4520 (2000).
55. G. Lamarque, J. M. Lucas, C. Viton, and A. Domard, *Biomacromolecules* **6** (1), 131 (2005).
56. N. Errington, S. E. Harding, K. M. Vårum, and L. Illum, *Int. J. Biol. Macromol.* **15** (2), 113 (1993).
57. J.-H. Pa and T. L. Yu, *Macromol. Chem. Phys.* **202** (7), 985 (2001).
58. R. G. Beri, J. Walker, E. T. Reese, and J. E. Rollings, *Carbohydr. Res.* **238**, 11 (1993).

59. J. Brugnerotto, J. Desbrières, G. Roberts, and M. Rinaudo, *Polymer* **42** (25), 09921 (2001).
60. M. Rinaudo, M. Milas, and P. Le Dung, *Int. J. Biol. Macromol.* **15** (5), 281 (1993).
61. M. W. Anthonsen, K. M. Varum, and O. Smidsrød, *Carbohydr. Polym.* **22** (3), 193 (1993).
62. W. Wang and D. Xu, *Int. J. Biol. Macromol.* **16** (3), 149 (1994).
63. G. Berth and H. Dautzenberg, *Carbohydr. Polym.* **47** (1), 39 (2002).
64. M. L. Tsaih and R. H. Chen, *Int. J. Biol. Macromol.* **20** (3), 233 (1997).
65. S. E. Harding, *Sedimentation analysis of polysaccharides* (The Royal Society of Chemistry, Nottingham, 1992).
66. B. E. Christensen, I. M. N. Vold, and K. M. Varum, *Carbohydr. Polym.* **74** (3), 559 (2008).
67. A. Ortega and J. García de la Torre, *Biomacromolecules* **8** (8), 2464 (2007).
68. R. H. Chen and M. I. N. L. Tsaih, *J. Appl. Polym. Sci.* **75** (3), 452 (1999).
69. G. Qun and W. Ajun, *Carbohydr. Polym.* **64** (1), 29 (2006).
70. A. V. Dobrynin and M. Rubinstein, *Prog. Polym. Sci.* **30** (11), 1049 (2005).
71. K. Kamide and M. Saito, *Adv. Polym. Sci.* **83**, 1 (1987).
72. M. Milas and M. Rinaudo, *Carbohydr. Res.* **158**, 191 (1986).
73. P. J. Flory, *Principles of polymer chemistry* (Cornell University Press, 1953).
74. M. Fixman, *J. Chem. Phys.* **41** (12), 3772 (1964).
75. M. R. Kasaai, *Carbohydr. Res.* **343** (13), 2266 (2008).
76. G. M. Pavlov, A. J. O. Rowe, and S. E. Harding, *Trends Anal. Chem.* **16** (7), 401 (1997).
77. G. A. Morris, J. Castile, A. Smith, et al., *Carbohydr. Polym.* **76** (4), 616 (2009).
78. V. Halabalova, L. Simek, and P. Mokrejs, *Rasayan J. Chem.* **4** (2), 223 (2011).
79. M. Terbojevich, A. Cosani, G. Conio, et al., *Carbohydr. Res.* **209** 251 (1991).
80. W. Y. Chen, C. H. Hsu, J. R. Huang, et al., *J. Polym. Res.* **18** (6), 1385 (2011).
81. S. E. Harding, *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **67** (2), 207 (1997).
82. В. Н. Давыдова, И. М. Ермак, В. И. Горбач и др., *Биофизика* **45** (4), 641 (2000).
83. V. N. Davydova, S. Y. Bratskaya, V. I. Gorbach, et al., *Biophys. Chem.* **136**, 1 (2008).
84. G. S. Manning, *J. Phys. Chem.* **185** (4), 1506 (1981).
85. A. Montembault, C. Viton, and A. Domard, *Biomaterials* **26** (14), 1633 (2005).
86. A. Wang, Q. Ao, W. Cao, et al., *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **79** (1), 36 (2006).
87. C. Schatz, A. Bionaz, J. M. Lucas, et al., *Biomacromolecules* **6** (3), 1642 (2005).
88. L. Jiang, D. Yang, and S. B. Chen, *Macromolecules* **34** (11), 3730 (2001).
89. E. F. Franca, R. D. Lins, L. C. G. Freitas, and T. P. Straatsma, *J. Chem. Theory Comput.* **4** (12), 2141 (2008).
90. S. Skovstrup, S. G. Hansen, T. Skrydstrup, and B. Schiott, *Biomacromolecules* **11** (11), 3196 (2010).
91. A. V. Dobrynin, R. H. Colby, and M. Rubinstein, *Macromolecules* **28** (6), 1859 (1996).
92. S. Popa-Nita, C. Rochas, L. David, and A. Domard, *Langmuir* **25** (11), 6460 (2009).
93. Л. А. Беркович, Г. И. Тимофеева, М. П. Цюрупа и В. А. Даванков, *Высокомоляр. соединения А22* (8), 1834 (1980).

Conformation of Chitosan Molecules in Aqueous Solutions

V.N. Davydova and I.M. Yermak

Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. 100-let Vladivostoku 159, Vladivostok, 690022 Russia

This paper presents a review of the literature focusing on the study of physicochemical properties of chitosans. The main attention is paid to the analysis of data on the conformation of the polymer molecules in aqueous solutions depending on the molecular weight and a degree of N-acetylation of chitosan as well as on the external factors such as the nature of the solvent, pH and ionic strength of the solutions.

Keywords: chitosan, molecular conformation, degree of N-acetylation