

УДК: 678.5, 541.64

АСКОРБАТ ВА НАНОАСКОРБАТ ХИТОЗАН СИНТЕЗИ ҲАМДА УЛАРНИНГ БИОЛОГИК ФАОЛ ХОССАЛАРИ

Пирниязов Қудрат Қадамбаевич,

кичик илмий ходим;

Рашидова Сайёра Шараповна,

кимё фанлари доктори, профессор, академик, институт директори

ФА ЎЗР Полимерлар кимёси ва физикаси институти

Аннотация. Атроф-муҳитга зарарсиз бўлган бактерицид, ўсишни рағбатлантирувчи ва фунгицид хусусиятларга эга бўлган хитозан ҳосилаларидан аскорбат ва наноаскорбат хитозан дунёда катта қизиқиш уйғотади. Хитозаннинг юқоридаги ҳосилаларини олишга оид ва уларнинг физик-кимёвий хоссалари ёритилган замонавий илмий адабиётлар тадқиқ қилинди. Наноаскорбат хитозан намуналарини ионотроп гел шаклланиш усули ёрдамида синтез қилишнинг иқтисодий самарадор бўлган мақбул шароитлари аниқланди. Илк бора аскорбат ва наноаскорбат хитозан намуналарини *Вотбух торі* хитозани асосида олишнинг принципиал имкониятлари асосланди. Манбалар ва шахсий тадқиқотларимиз асосида аскорбат ва наноаскорбат хитозан *Вотбух торі* намуналарининг ўсимлик ва инсон организмидаги патогенларга нисбатан, шунингдек, қишлоқ хўжалиги ўсимликлари уруғларини экишдан олдин ишлов беришда капсуллашнинг инновацион технологиясини қўллаш орқали намён қиладиган биологик фаол хоссалари келтирилди.

Таянч тушунчалар: аскорбат хитозан, хитозан *Вотбух торі*, аскорбин кислотаси, донор-акцептор боғланиш, наноаскорбат хитозан, ионотроп гел шаклланиш, нанозаррача, биологик фаол хоссалар.

СИНТЕЗ АСКОРБАТА И НАНОАСКОРБАТА ХИТОЗАНА И ИХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СВОЙСТВА

Пирниязов Қудрат Қадамбаевич,

младший научный сотрудник;

Рашидова Сайёра Шараповна,

доктор химических наук, профессор, академик, директор института

Институт химии и физики полимеров АН РУз

Аннотация. Повышенный интерес в мире вызывают производные хитозана, в частности аскорбат и наноаскорбат хитозана, обладающие бактерицидными, ростостимулирующими и противогрибковыми свойствами и нетоксичные для окружающей среды. Исследована современная научная литература по получению названных производных хитозана и изучению их физико-химических свойств. Определены оптимальные условия синтеза наноаскорбата хитозана методом ионотропного гелеобразования как экономически эффективного. Впервые показаны принципиальные возможности получения аскорбата и наноаскорбата хитозана на основе хитозана *Вотбух торі*. На основе литературных и собственных экспериментальных данных показана ярко выраженная биологическая активность аскорбата хитозана и наноаскорбата хитозана *Вотбух торі* по подавлению патогенов человека и растений, в процессе предпосевной обработки семян сельскохозяйственных культур инновационной технологией капсулирования.

Ключевые слова: аскорбат хитозана, хитозан *Вотбух торі*, аскорбиновая кислота, донорно-акцепторная связь, наночастицы, наноаскорбат хитозана, ионотропное гелеобразование, биологически активные свойства.

SYNTHESIS AND BIOLOGICALLY ACTIVE PROPERTIES OF ASCORBATE AND NANOASCORBATE CHITOSAN

Pirniyazov Kudrat Kadambayevich,
Junior Researcher;

Rashidova Sayyora Sharafovna,
Doctor of Chemical Sciences, Professor, Academician, Director of the Institute

Institute of Chemistry and Physics of Polymers of the Academy of
Sciences of the Republic of Uzbekistan

Abstract. Chitosan derivatives, in particular, ascorbate chitosan and nanoascorbate chitosan, which are not toxic to the environment and have bactericidal, growth-promoting and antifungal properties, is the subject of great interest in the world. Modern scientific literature has been studied, highlighting the preparation and physicochemical properties of these derivatives of chitosan. The optimal synthesis conditions were determined by ionotropic gelation of nanoascorbate chitosan as a cost-effective one. For the first time, the principal possibilities of obtaining ascorbate and nanoascorbate chitosan based on chitosan *Bombyx mori* are shown. Based on the published and own experimental data, the pronounced biological activity of ascorbate chitosan and nanoascorbate chitosan *Bombyx mori* is shown to suppress human and plant pathogens during the presowing treatment of agricultural seeds with innovative encapsulation technology.

Keywords: chitosan ascorbate, chitosan *Bombyx mori*, ascorbic acid, donor-acceptor bond, nanoascorbate chitosan, ionotropic gelation, nanoparticles, biologically active properties.

Введение

В последние годы количество исследований в области биомедицинских и сельскохозяйственных аспектов применения производных хитозана растет в геометрической прогрессии, поскольку получение экологически безопасных природных полимеров является актуальной задачей [1-15].

Из научной литературы известно, что оптимальные условия и механизмы получения наноаскорбата хитозана (ХЗ) и нанохитозана *Bombyx mori* малоизучены. Впервые описано получение нанохитозана *Bombyx mori* в виде порошка с высоким выходом без ультразвукового диспергирования и при отсутствии стабилизатора [2]. Синтез проводился методом ионотропного гелеобразования, в исследованиях установлена зависимость образования наночастиц хитозана от условий синтеза. Полученные результаты подтверждают, что с уменьшением pH раствора размер частиц уменьшается, а эквимолярное соотношение компонентов хитозана и стабилизатора обуславливают образование наночастиц с узким распределением по размерам.

Синтезированный нанохитозан *Bombyx mori* испытан при обработке семян хлоп-

чатника и пшеницы. Энергия активации и всхожесть обработанных нанохитозаном образцов превосходят контроль [2]

Характерные для полимеров уникальные свойства эффективно проявляются, когда получены на их основе нановолоконные материалы. Используемый метод электроспиннинга позволяет формировать нановолокна из растворов и смесей полимеров под действием высокого напряжения постоянного тока. В работе автора А.А. Холмуминова впервые описано получение нановолокна на основе хитозана *Bombyx mori* с помощью метода электроспиннинга [3]. Установлено, что толщина полученных нановолокон может быть регулирована в интервале 50–300 нм, а поры в нетканых материалах могут иметь размеры в интервале 30–150 нм. Полученные результаты показывают, что механические свойства нановолокон повышаются по сравнению с исходным волокном хитозана, а толщина нановолокон способствует увеличению прочностных характеристик материалов.

Работа авторов Д.М. Саттаровой, М.Р. Кодирханова и С.Ш. Рашидовой посвящена изучению особенностей формирования нановолокон на основе хитозана *Bombyx mori* и поливинилового спирта

(ПВС) методом электроспиннинга, также ими были проведены исследования получения нановолокон ХЗ *Bombux mori* в различных условиях процесса. Концентрация растворов ХЗ/ПВС в исследованиях была варьирована от 3 до 6 %. Установлено, что 6 %-ный раствор полимеров для получения нановолокон является оптимальным, диаметр нановолокон был охарактеризован методом СЭМ, средний диаметр полученных НВ был найден приблизительно 100-120 нм [4]. Очень интересна работа, связанная с получением нановолокна из карбоксиметилхитозана (КМХ) методом электроспиннинга [5].

Основная часть

К настоящему времени одним из наиболее известных методов формирования наночастиц (НЧ) хитозана и его водорастворимых производных является осадительная коацервация, основанная на получении наночастиц без использования токсичных сшивающих агентов. В работе [6] описаны способы получения водорастворимых нанопроизводных хитозана *Bombux mori*, в частности карбоксиметилхитозана (КМХЗ). Были исследованы кинетические закономерности образования наночастиц карбоксиметилированного хитозана в зависимости от времени истечения раствора осадителя хлорида CaCl_2 . Установлено, что с увеличением времени истечения осадителя – хлорида кальция наблюдается увеличение размера наночастиц от 200 нм до 1 мкм. Результаты получения КМХ представлены в диссертации и патенте [7, 8].

Известно, что с варьированием рН раствора хитозана *Bombux mori* с ионами меди возможно синтезировать наноструктурные полимер-металлокомплексы [9, 10]. Отмечено, что с увеличением рН раствора до 5 наблюдается снижение размера частицы в интервале 100-200 нм, с узким распределением. Данные наносистемы применяются для профилактики и лечения монилиоזה плодовых культур.

Наличие в макромолекуле хитозана аминокрупп обеспечивает способность образования комплексов с органическими кислотами. При этом в процессе донорно-

акцепторного взаимодействия происходит протонирование аминокрупп хитозана, которое придает полимеру растворимость в воде. Основные причины повышенного внимания исследователей к данному полимеру связаны с биологической совместимостью благодаря близости его свойств к функциональным качествам живых тканей [16], бактерицидностью [17], противовирусностью [18], антимикотичностью [19], нетоксичностью [20], способностью к ранозаживлению и регенерации тканей живых организмов [21, 22]. Кроме того, хитозан метаболизируется некоторыми ферментами человека, особенно лизоцимом [23]. Благодаря положительному заряду аминокрупп при физиологическом значении рН хитозан проявляет высокие биоадгезивные свойства, что обуславливает использование макромолекул хитозана в качестве носителя лекарственных веществ [24, 25], способствуя повышению проницаемости лекарственных веществ через эпителий [26, 27].

Хитозан получают из постоянно возобновляемого природного сырья, в частности из крабов и креветок. Оказалось, что источником получения хитозана из хитина могут быть и куколки тутового шелкопряда – отхода шелкомотальной промышленности [28]. Производство хитозана имеет сравнительно низкую себестоимость, сам процесс получения является экологически безопасным.

Для создания препаратов медицинского и фармакологического назначения используют различные водорастворимые производные хитозана, а именно, комплексы с неорганическими и органическими кислотами [29], N- и O-замещенные хитозаны [30], сополимеры водорастворимых производных хитозана с полистиролом [31] и другие. Для этих же целей хитозан применяется в качестве компонента гидрогелей, стабилизированных сшивающими агентами [32-34]. Для получения нетоксичных гидрогелей производных хитозана в качестве сшивающих реагентов возможно использование диальдегидных производных нуклеотидов и нуклеозидов [35]. Наилучшей

биосовместимостью обладают гидрогели хитозана, полученные посредством донорно-акцепторного взаимодействия протонированных аминогрупп с низкомолекулярными анионами, в частности органическими кислотами [36-39].

Большое число публикаций посвящено получению, изучению свойств и применению гидрогелей на основе полиэлектролитных комплексов (ПЭК) хитозана с противоположно заряженными полиэлектролитами, в том числе гиалуроновой кислотой, хондраитинсульфатами и поверхностно-активными веществами [40-42]. Такие системы открывают новые возможности для регулирования растворения хитозана в воде путем варьирования стехиометрией ПЭК [43]. Однако данное направление мало изучено экспериментально и остается дискуссионным [44].

Использование водных растворов биологически активных органических кислот, например, аскорбиновой, является перспективным направлением для практического применения в медицине и сельском хозяйстве. Так, исследования аскорбата хитозана показали его хорошую адсорбцию к жирным кислотам [45-47], также аскорбат хитозана обладает высокой хелатирующей способностью к тяжелым металлам и радионуклидам [48], проявляет противовоспалительную и другую биологическую активность [49]. Получение аскорбата хитозана в присутствии восстановителя посредством реакции Шиффа понижает антибактериальную активность, поскольку при этом происходит образование иминной и ковалентной связей, вследствие чего наблюдается уменьшение совокупного заряда макромолекулы [47-51]. Полученный на основе реакции Шиффа аскорбат хитозана обладает более высокой антиоксидантной способностью по сравнению с хитозаном. Определены минимальные ингибирующие концентрации хитозана и аскорбат хитозана против бактерии *P. Aeruginosa*, *S. Typhimurium*, *S. Aures*. Следуют подчеркнуть, что антибактериальная активность аскорбата хитозана уменьшается по

сравнению с исходным хитозаном за счет снижения свободных аминогрупп. Таким образом, с увеличением степени сшивки аминогрупп хитозана наблюдалось уменьшение антимикробной активности производных хитозана [50].

Аскорбиновая кислота известна как водорастворимый витамин, регулирующий процессы образования коллагена и других органических составляющих внутриклеточного слоя кожи, костей и других соединительных тканей [52]. Аскорбиновая кислота стимулирует процессы гидроксилирования остатков пролина и лизина, что приводит к образованию коллагена. Гидроксипролины играют важную роль в образовании сшитой структуры коллагена [53]. Аскорбиновая кислота участвует во всех фазах заживления ран, в воспалительной фазе она способствует синтезу и созреванию коллагена, обладает антибактериальной активностью по отношению к *Salmonella typhimurium* и *Escherichia coli*.

Таким образом, аскорбат хитозана обладает не только ранозаживляющими свойствами, но также может выступать в качестве антимикробного соединения [54-56].

С целью получения ранозаживляющего композита авторы [56] использовали аскорбат хитозана и молочную кислоту. Также для улучшения качества композитов были добавлены глицерин и полиэтиленгликоль. Результаты показали биосовместимость с клетками фибробластов.

В работах [57-59] были исследованы возможности клинического применения аскорбат хитозана в качестве многофункциональной повязки, которую можно использовать в полости рта. Действие аскорбат хитозана оценивали с учетом его гемостатических, гигроскопических и пленкообразующих свойств, а также степени адгезии к мягким тканям. Результаты данной работы подтверждают, что аскорбат хитозана обладает антибактериальной активностью в полости рта в отношении оральной микробиоты [60]. Здоровье полости рта остается серьезной

проблемой в большинстве промышленно развитых стран. Развитие зубного кариеса в основном происходит за счет бактерий *Lactobacillispp.* и *Streptococcus-mutans*. Применение водорастворимых производных хитозана, в частности аскорбата хитозана, в концентрации 400 мг/мл считается минимальной дозой для лечения и профилактики кариеса [61].

Выявлено, что аскорбат хитозана посредством препарата изониазида обладает антиоксидантными свойствами к бактериям, вызывающим туберкулез [62].

В работе [63] описано влияние хитозана с добавлением аскорбиновой кислоты на снижение видимой усвояемости жира у крыс, которых кормили пищей с высоким содержанием жира, что подтверждает синергетический эффект аскорбата хитозана на ингибирование жира при переваривании. Механизм синергетического эффекта наблюдается за счет снижения вязкости желудочного сока, более высокой совместимостью с липидом, чем у хитозана, и способностью удерживать молекулы жира в виде геля [46].

Производные хитозана с аскорбиновой кислотой играют многофункциональную роль в развитии сельскохозяйственных культур, обладают биологической активностью к бактериям *Staphylococcus aureus*, *Escherichiacoli*, *Pseudomonasaeruginosa* и *Bacillus cereus*. Кроме того, аскорбат хитозана имеет бактериостатические, регенерирующие, гигроскопические, адгезивные свойства [50, 64, 65].

В работе [66] отмечено, что использование природных антимикробных веществ в виде растворов и пленок является превосходным способом сохранения свежесрезанных фруктов. Раствор аскорбата хитозана значительно замедляет микробный рост при хранении ягод, яблок и других фруктов в комнатных условиях.

Несмотря на проявленный интерес ученых к синтезу и биологической активности аскорбата хитозана, его синтез вызывает много вопросов.

Предполагается, что образование

аниона аскорбата идет за счет (наиболее кислого) атома водорода у С-3. Так в работе [67] сообщается об образовании комплекса высокомолекулярного хитозана и аскорбиновой кислоты в среде изопропилового спирта в атмосфере азота посредством протонирования аминогруппы наиболее кислым гидроксидом у С-3. Однако в работе [50] предположили, что в водной среде взаимодействие хитозана и аскорбиновой кислоты идет по реакции Шиффа с образованием иминной связи. Так как в литературе встречаются разные точки зрения о механизмах взаимодействия хитозана с аскорбиновой кислотой, то изучение структурных характеристик аскорбата хитозана остается актуальным. Следует отметить, что взаимодействие хитозана с аскорбиновой кислотой носит сложный характер, поэтому рядом авторов изучены возможности образования химических связей с проведением компьютерного моделирования [68].

В работах [69, 70] впервые проведены квантово-химические расчеты взаимодействия хитозана *Bombyx mori* с аскорбиновой кислотой. Выявлено, что в результате этого взаимодействия образуются донорно-акцепторные связи.

В работе [71] впервые использовали донорно-акцепторный механизм образования аскорбата хитозана *Bombyx mori*. В результате реакции образования аскорбата хитозана можно представить следующим образом (рис. 1).

В литературных источниках проанализировано взаимодействие хитозана с органическими кислотами в водном растворе, в результате которого с помощью донорно-акцепторного механизма образуется аскорбат хитозана [67, 71]. Также в присутствии восстановителя устанавливаются иминные связи [48, 50]. При высоких температурах в водно-изопропиловой смеси кислотные производные синтезируются благодаря амидной связи. Таким образом, взаимодействие хитозана с аскорбиновой кислотой зависит от условий синтеза, особенно от СДА, рН среды раствора.

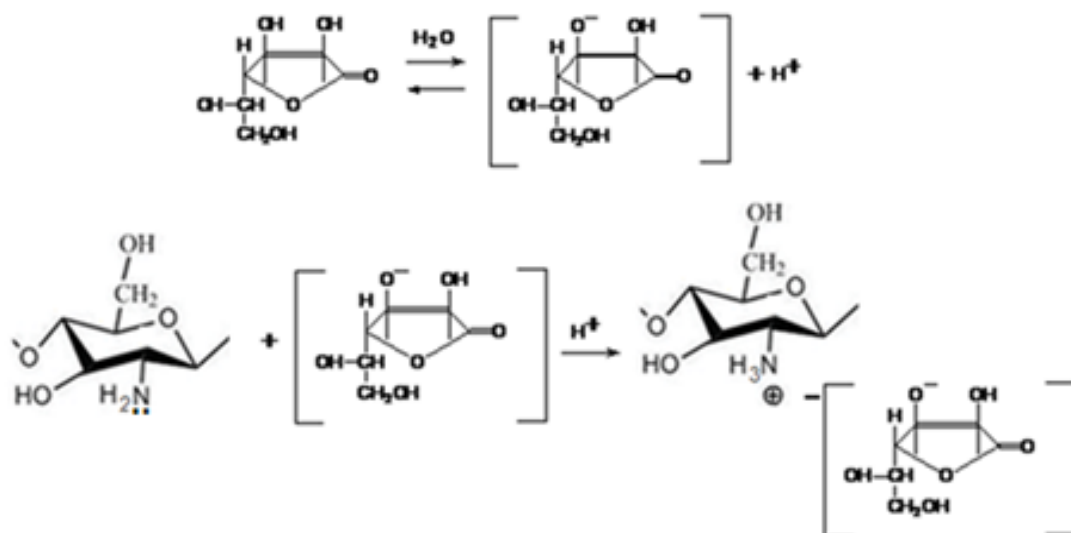


Рис. 1. Реакция образования аскорбата хитозана

Производные хитозана могут быть получены путем химической модификации с использованием таких методов, как ацилирование, алкилирование, сульфатирование, гидроксילирование, кватернизация, привитая сополимеризация и этерификация. Производные хитозана по физико-химическим свойствам превосходят немодифицированный хитозан.

Хитозан благодаря своим экологически безопасным физико-химическим и уникальным биологическим свойствам находит применение во многих отраслях промышленности, включая медицинскую, биохимическую, биомедицинскую, пищевую, химическую, косметическую отрасли; он применяется также при очистке воды. Основным недостатком, ограничивающим широкое применение хитозана в животных организмах, является его нерастворимость в водных растворах [72]. Однако хитозан имеет ряд функциональных групп, таких как амино- и гидроксильные группы, которые позволяют получить водорастворимые производные хитозана. Кроме того, в составе макромолекул хитозана присутствуют функциональные группы, которые обладают различной реакционной способностью при увеличении pH раствора – реакции с участием аминогрупп происходят с большей скоростью по сравнению с участием гидроксильных групп благодаря свободным NH₂ группам [73]. Следовательно, алкили-

рование хитозана происходит в основном через аминогруппу с образованием N-алкилированных производных хитозана. Производные хитозана, особенно N-алкилированные, обладают наибольшими коагулирующими свойствами и проявляют большую кровоостанавливающую активность, чем немодифицированный хитозан [74, 75]. Водородная связь между молекулами N-алкилированных производных хитозана значительно уменьшается в присутствии алкильных групп, поэтому модифицированный хитозан обладает растворимостью в воде и является более перспективным для биомедицинского применения.

Группы -NH₂ и -OH в молекуле хитозана могут участвовать в реакции образования сложного эфира или амида с ангидридом или хлорангидридом органической кислоты. В реакции ацилирования хитозана необходимо обратить внимание на температуру реакции и тип используемого катализатора [74].

С целью получения карбоксилсодержащих модификаций хитозана обычно используют монохлоруксусную и глиоксиловую кислоты в различных условиях. В результате реакции образуется карбоксиметилхитозан. Растворимость в воде карбоксиметилхитозана зависит от условий модификации и степени карбоксиметилирования [7, 8, 76, 77]. Карбоксилирование хитозана не толь-

ко улучшает растворимость в воде, но и проявляет хорошую поверхностную активность и пленкообразующую способность.

Наночастицы производных хитозана используются для доставки лекарств благодаря их стабильности, биосовместимости и растворимости в воде. Полимерные наночастицы широко применяются в биомедицинской области в качестве ингредиентов для диагностики и лечения заболеваний [78]. В качестве носителя полимерные наночастицы могут адсорбировать или взаимодействовать с несколькими лекарственными молекулами, могут инкапсулировать лекарственные средства на своих поверхностях. Эти свойства нашли применение в генной терапии [79].

Нанопроизводные хитозана имеют в большом количестве неподеленные электронные пары и обладают реакционной способностью за счет донорно-акцепторного взаимодействия со свободной орбиталью [80]. Они используются в лекарствах и доставке генов [81, 82], биосенсорах [83, 84]. Эта функция наночастиц производных хитозана зависит от однородности и размера частиц наносистемы. Размер частиц влияет на количество и распределение антигена, что обуславливает иммунную активность крови. Структура наносистемы, размер поверхностных микропор и скорость высвобождения антигена влияют на функцию наночастиц.

Наночастицы производных хитозана получают рядом методов: ионотропным гелеобразованием, распылительной сушкой и осадительной коацервацией. Кроме того, при образовании наночастиц происходит улучшение свойств, таких как стабильность и адгезивность. Для получения наноструктурных производных хитозана широко используются триполифосфат или метафосфат натрия как ионно-сшивающие агенты.

Метод распылительной сушки основан на разнице летучести растворенного вещества в фазе раствора с обработкой ультразвуком и включает в себя подго-

товку раствора, распыление раствора через форсунку и сушку до образования наночастиц. После отгонки органического растворителя с помощью ультразвука наночастицы производного хитозана получают в виде порошка.

Методом коацервации наночастицы могут быть получены осаждением с использованием сульфата натрия в качестве осаждающего агента. Количество осадка нанопроизводных хитозана зависит от концентрации сульфата натрия. В методе коацервации используют неорганические соли, меняющие ионную силу раствора, в результате чего образуются наночастицы производных хитозана.

Методом кислотного гидролиза полисахаридов также возможно получение наноструктурных образцов. Вышеуказанные способы включают в себя много этапов и являются затратными.

Метод ионотропного гелеобразования протекает при комнатной температуре в водном растворе и не требует проведения перекристаллизации и диализа полученных веществ [85, 86].

В работе [87] отмечено, что при деструкции макромолекул хитозана перекисью водорода происходит образование наночастиц. Известно, что при окислительной деполимеризации наблюдается расщепление гликозидных центров макромолекул хитозана, за счет чего образуется низкомолекулярный хитозан, размеры частиц которого находятся в пределах 100-400 нм. Для окислительной деполимеризации хитозана содержание перекиси водорода в растворе составляло 2%. Реакцию деструкции исследовали при температуре 20-70 °C.

Также известен способ получения наночастиц полисахаридов методом электроспиннинга. Это эффективный и простой метод получения нановолокнистых материалов, которые обладают большими поверхностями для улучшения механических характеристик и небольшими порами, что позволяет применять их в качестве носителя лекарственных веществ [88]. Необходимо отметить, что в

процессе образования нановолокна наиболее важными факторами являются концентрация и pH раствора.

На основе хитозана возможно получение нановолокна, растворимого в воде и улучшающего транспортировку лекарственных веществ. Для этого необходимо провести синтез посредством фосфорсодержащего раствора. В качестве стабилизатора наночастиц выбран триполифосфат натрия (ТПФNa), поскольку он нетоксичен, и данный подход является технологически эффективным [89]. С физико-химической точки зрения, взаимодействие хитозана с ионами триполифосфата натрия происходит за счет внутримолекулярного и межмолекулярного сшивания анионов триполифосфорной кислоты ($P_3O_{10}^{5-}$) и катионов – NH_3^+ хитозана. Наночастицы ХЗ – ТПФNa использовались в качестве платформы для доставки лекарств в медицине [90].

В работе Ш.М. Ваел [87] описано влияние природы, концентрации электролита и pH среды на размер наночастиц хитозана с молекулярной массой 10 кДа. В качестве электролитов, стабилизирующих частицы хитозана в дисперсии, в указанной работе изучены NH_4OH и триполифосфат натрия (ТПФNa). Установлено, что в случае использования NH_4OH образуются нестабильные наночастицы хитозана, которые с течением времени агрегируют до больших размеров. Использование ТПФNa приводит к образованию неизменяемых со временем наночастиц хитозана. Показано, что на размер частиц существенно влияют концентрации ТПФNa и хитозана. При концентрации хитозана менее 0,1 мг/мл получают дисперсии с широким разбросом по размерам частиц. Наиболее стабильные результаты исследований получены при концентрации хитозана 0,2 мг/мл, поскольку при увеличении концентрации хитозана наблюдается возрастание размеров частиц за счет агрегации макромолекул со временем.

Обычно наночастицы полисахаридов получают методом ионотропного гелеобразования, который основан на реак-

ции сшивания хитозана с триполифосфатом натрия. В этом процессе положительно заряженные макромолекулы хитозана взаимодействуют с отрицательно заряженным сшивателем – триполифосфатом натрия [87]. В работе [91] показано, что для раствора хитозана с концентрациями 0,1, 0,2, 0,3 % был использован стабилизатор ТПФNa с концентрациями 0,02, 0,05, 0,08 % при комнатной температуре. В результате реакции образуются наночастицы с меньшим диаметром (~ 138 нм) и хорошей стабильностью при хранении при комнатной температуре по сравнению с исходным хитозаном.

С целью получения водорастворимых нанопроизводных хитозана используются водные растворы аскорбиновой кислоты. Реакцию образования наноаскорбата хитозана проводят с варьированием pH раствора в интервале от 4 до 5,5. Для этого необходимо добавить водный раствор аскорбиновой кислоты в хитозан с варьированием показателей pH, затем получают наноаскорбат хитозана путем титрования триполифосфатом натрия в концентрации 0,14 мг/мл. Размер полученных частиц наноаскорбата хитозана составляет от 200 нм до 400 нм [90].

Для варьирования размера частиц аскорбата хитозана методом ионотропного гелеобразования хитозан растворяют в 1 %-ном водном растворе аскорбиновой кислоты с различными концентрациями (0,5, 1, 1,5 %) при постоянном перемешивании и комнатной температуре. После полного растворения хитозана в аскорбиновой кислоте бюреткой по капле добавляется ТПФNa при равномерном перемешивании до появления молочно-белой суспензии. После 30 минут интенсивного перемешивания раствор центрифугировали также в течение 30 минут и полученный осадок промыли дистиллированной водой. Наночастицы лиофилизировали и хранили при комнатной температуре до дальнейшего использования [63].

Анализ многочисленных работ

показывает, что при получении наноструктурных производных хитозана с органическими кислотами, в частности молочной и аскорбиновой кислот, необходимо контролировать pH раствора с использованием NaOH. В полученную суспензию хитозана добавляют эквивалентное количество аскорбиновой кислоты, затем получают раствор хитозана, с добавлением раствора ТПФNa в интервале времени 30-60 минут образуется наноаскорбат хитозана [90-94].

В работе [95] наночастицы производных хитозана исследуются в качестве носителя лекарств, оказывающих свое действие в желудке. В желудке белок легко гидролизуется посредством препаратов на основе нанопроизводных хитозана и ферментами желудочно-кишечного тракта. Наночастицы производных хитозана могут значительно повысить стабильность лекарственного средства, контролируя высвобождение лекарств, улучшают биодegradацию белков и ассимиляцию гидрофильных веществ через эпителиальный слой.

В работе [96] показана физиологическая роль аскорбата хитозана и исходного хитозана, как гиполипидемических и антикоагулянтных препаратов для крови. Обнаружено, что аскорбат хитозана более эффективен по сравнению с хитозаном в борьбе с гиперхолестеролом и атеросклерозом.

В работе [80] проводили синтез наносистемы аскорбата хитозана посредством ТПФNa методом ионотропного гелеобразования. Авторы подтверждают, что с увеличением количества стабилизатора в реакционных системах происходит снижение степени связывания аскорбиновой кислоты в составе наноаскорбат хитозана.

В работе [97] авторы отметили, что в процессе синтеза значительное количество аскорбиновой кислоты остается в избытке или свободном виде за счет уменьшения количества свободных аминок групп хитозана. Рентгеноструктурный анализ (РСА) полученного наноаскорбат хитозана показал пики в области

$2\theta = 32,62^\circ$ и $35,56^\circ$, образованные благодаря межмолекулярному взаимодействию хитозана и ТПФNa. В результате ИК-спектроскопического исследования наноаскорбата хитозана наблюдаются характеристические полосы поглощения в области 1203 см^{-1} и 1239 см^{-1} , что свидетельствует о наличии P = O и P-O группы в составе наноаскорбата хитозана.

В работе [98] были получены наноструктурные производные хитозана методом ионотропного гелеобразования с аскорбиновой и липовой кислотой. Также для синтеза наносистемы использовали поверхностно-активное вещество *Tween 80*. Полученные результаты показывают, что размер частицы наноаскорбата хитозана составляет 266 нм.

Известно, что в методе ионотропного гелеобразования размер наночастиц зависит от молекулярной массы и степени дезацетилирования исходного хитозана. Чем выше молекулярная масса хитозана, тем больше количество протонированных аминок групп в результате взаимодействия с органическими кислотами. Это связано с наличием большого количества положительных зарядов, которые могут взаимодействовать с отрицательными зарядами триполифосфата натрия, что предполагает более высокую степень сшивки. Кроме того, чем выше степень дезацетилирования хитозана, тем больше аминок групп, которые могут наиболее активно взаимодействовать с аскорбиновой кислотой. Стабилизатор же способствует образованию наночастиц в необходимом наноразмере. Также в работе [98] предполагается, что с увеличением pH раствора от 6 до 8 происходит депротонирование аминок групп, чем может объясняться увеличение размеров наночастиц при высоком показателе pH.

В работе [78] выявлено, что синтезированный наноаскорбат хитозана обладал мукоадгезивными, ранозаживляющими и противомикробными свойствами. При сравнении растворов в одинаковых концентрациях наночастиц аскорбата хитозана и исходного хитозана

установлено повышение антимикробной активности первого, в частности к кишечной палочке и золотистому стафилококку.

В работе авторов Silvia Rossi и др. [94] показано, что наноаскорбат хитозана с добавлением антибиотика тригидрата амоксициллина улучшает ранозаживление на фибробластах человека. Для доступности амоксициллина в полости влажной использовали наноаскорбат хитозана и наблюдалось увеличение антимикробного действия к *Enterococcus hirae* и *Streptococcus pyogenes* в сравнении с исходным аскорбат хитозаном. Впоследствии наночастицы аскорбат хитозана были добавлены в полимерные матрицы поливинилпирролидона, маннита и глицина. Матрицы были получены путем лиофилизации водных растворов трех гидрофильных наполнителей. Они обладали механической устойчивостью, подходящей для введения во влажную полость и легко растворялись во влажной жидкости. Такие наносистемы предназначены для ускорения заживления атрофии влажной и вагинальной доставки антибиотика.

В другом исследовании также проводили синтез наносистемы методом ионотропного гелеобразования, и получены монодисперсные системы с диаметрами частицы (~138 нм) и хорошей стабильностью при хранении в комнатной температуре. В работе отмечали, что снижение pH, концентрации уксусной кислоты и температуры реакционных систем влияют на образование наночастицы с узким распределением по размеру в пределах 100-200 нм. Температура реакции влияет на образование наночастицы аскорбата хитозана. Установлено, что с увеличением температуры синтеза наноаскорбата хитозана наблюдается увеличение размера частицы. Это свидетельствует о том, что с увеличением температуры синтеза уменьшается интенсивность стабилизации наночастицы посредством стабилизатора [99].

На основе аскорбиновой кислоты и хитозана авторы [100] с помощью метода *spray drying* получили микрочастицы

комплексов аскорбата хитозана. В процессе комплексообразования используют глутаровый альдегид или водный раствор натриевой соли триполифосфата как сшивающий агент (*cross-linking agents*). Синтез наноструктурного аскорбата хитозана проводили с помощью метода ионотропного гелеобразования с использованием натриевой соли триполифосфата (Na-ТПФ).

Наноструктурированные производные хитозана с аскорбиновой кислотой получали с использованием мало концентрированных растворов стабилизатора триполифосфата натрия [101, 102]. Результаты электронной микроскопии показали, что размер частиц аскорбат хитозана – в интервале 150-400 нм.

Наноаскорбат хитозана синтезирован ионотропным гелеобразованием [63]. Для проведения синтеза наноаскорбата хитозана подготовили 0,1 %-ный раствор низкомолекулярного хитозана, используя 0,1 %-ный раствор аскорбиновой кислоты. Затем проводили титрование 0,1 %-ным раствором ТПФ, и перемешиваемый раствор обрабатывали ультразвуком в течение 10 минут. Полученный раствор подвергали центрифугированию при 12000 об/мин. в течение 30 минут. Полученные наносистемы промывали водой и мгновенно замораживали в жидком азоте, затем лиофилировали в течение 6 часов.

В целом нужно отметить, что в литературе определены интервалы параметров: pH раствора и время реакции, необходимые для синтеза наноаскорбата хитозана. В частности, время синтеза наноаскорбата хитозана составляет от 30 минут до 1 часа, температура синтеза – не более 50 °C, концентрация хитозана – от 0,1 до 2,5 %. Авторы подтверждают, что с увеличением концентрации хитозана наблюдается значительное увеличение размеров частиц [94, 103].

Аскорбиновую кислоту во многих случаях используют как сильный антиоксидант и растворитель при проведении синтеза наноструктурных систем. Для синтеза наноаскорбат хитозана 1 %-ная

концентрация аскорбиновой кислоты считается оптимальной. В работе [62, 93] описана реакция образования водорастворимых образцов наноаскорбата хитозана с варьированием концентрации аскорбиновой кислоты. Выявлено, что с увеличением концентрации аскорбиновой кислоты размер частиц наноаскорбата хитозана уменьшается [104].

Концентрация стабилизатора также играет немаловажную роль в процессе образования наночастиц аскорбата хитозана. Авторы [85, 93, 105] установили, что с варьированием концентрации стабилизатора в пределе от 0,1 до 1 % можно регулировать размер частиц, и эти концентрации являются оптимальными. В работе [94] подтверждается, что с увеличением доли стабилизатора по сравнению с аскорбатом хитозана также происходит уменьшение размера частиц наноаскорбата хитозана.

Молекулярная масса исходного хитозана оказывает значительное влияние на размер частиц полученного наноаскорбата хитозана. В работе [85] показано, что с уменьшением молекулярной массы хитозана от 480 до 65 кДа наблюдается уменьшение размера частиц в пределах от 600 до 180 нм.

Анализ многочисленных работ показывает, что влияние pH раствора на образование наноаскорбата хитозана малоизучено и до конца не выяснено. В ряде работ предлагают интервал pH раствора – 4,5-5,5, который дает возможность получить наноструктурные производные хитозана [60, 92, 100].

В источниках отмечено, что образование наночастиц аскорбата хитозана – процесс многофакторный. Особенности влияния на формирование наночастиц аскорбата хитозана оказывают pH раствора, концентрация компонентов и стабилизаторов реакции, молекулярная масса исходного хитозана. Авторы *Silvia Rossi* и др. [94] свидетельствуют о том, что в соотношении компонентов АХЗ: ТПФNa от

2,6:1 до 3,6:1 уменьшается размер частиц с увеличением доли стабилизатора в пределах 260-215 нм соответственно.

Синтез наночастиц аскорбата хитозана различными методами на основе местного сырья открывает широкую возможность создания новых полимерных материалов, интересных как с теоретической, так и прикладной точек зрения. Несмотря на проявленный интерес ученых к образованию и биологическую активность аскорбата хитозана и наноаскорбата хитозана в литературе не встречается информация их синтеза на основе хитозана *Bombyx mori*. Исходя из этого, впервые синтезирован наноаскорбат хитозана из хитозана *Bombyx mori*. Установлено, что наноаскорбат хитозана является эффективным ростостимулятором для развития пшеницы [106]. Полученные данные подтверждают, что при соотношении компонентов 4:1 образцы наноаскорбата хитозана более эффективны по сравнению с эталоном и исходными компонентами – хитозаном и аскорбиновой кислотой.

Выводы

Таким образом, сравнительный анализ биологической активности нанопроизводных хитозана с органическими кислотами определил повышенный интерес к нанопроизводному хитозана с аскорбиновой кислотой, поскольку полученный в результате реакции продукт считается нетоксичным для окружающей среды и обладает биологической активностью. На основе литературных данных показана ярко выраженная биологическая активность аскорбата хитозана и наноаскорбата хитозана к заболеваниям человека и растений. Использование производных хитозана с аскорбиновой кислотой в процессе предпосевной обработки семян сельскохозяйственных культур подавляет грибковые, бактериальные заболевания растений и оказывает ростостимулирующее действие.

Источники и литература

1. Милушева Р.Ю., Рашидова С.Ш. Хитин, хитозан *Bombyx mori* и наносистемы на их основе // Фан. – 2016. – С. 94-99.
2. Рашидова С.Ш., Милушева Р.Ю. Хитин и хитозан *Bombyx mori*: синтез, свойства и применение. – Т.: Фан, 2009. – С. 15-17.
3. Холмунинов А.А. Полимерные нановолокна: получение, структура, свойства // Нанополимерные системы на основе природных и синтетических полимеров: синтез, свойства и применение: сборник тезисов докладов Международ. научно-практ. конф. – Т., 2014. – С. 34.
4. Sattarova D.M. Preparation of carboxymethyl chitosan *Bombyx mori* nanofibers by electrospinning process // Materials and chemistry. – 2019. – Vol. 9 (2). – С. 29-33.
5. Кlicheва О.Б., Рашидова С.Ш. Получение нановолокон карбоксиметилхитозана *Bombyx mori* методом электроспиннинга // Поликонденсационные процессы и полимеры: матер. I Коршаковской Всеросс. конф. с международ. участием. – М., 2019. – 18-20 февраля. – С. 96.
6. Кlicheва О.Б., Рашидова С.Ш. Синтез наночастиц в матрице карбоксиметилхитозана *Bombyx mori* методом осадительной коацервации // Universum: химия и биология: электрон. научн. журн. – 2020. – № 2 (68). – С. 36-40 [Электронный ресурс]. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/sintez-nanochastits-v-matritse-karb-oksimetilhitozana-Bombyx-mori-metodom-osaditelnoy-koatservatsii/> (дата обращения: 10.10.2020).
7. Кlicheва О.Б. Синтез, свойства и применение О-карбоксиметилхитозана: дисс. ... докт. философ. (PhD) по хим. наук. – Т., 2017. – С. 22-27.
8. Патент № IAP 05672. Способ получения карбоксиметилхитозана / С.Ш. Рашидова, О.Б. Кlicheва // Дата поступления заявки: 29.11.2013. Номер заявки IAP 2013 0498.
9. Вохидова Н.Р., Рашидова С.Ш. Полимерметаллические системы хитозана *Bombyx mori*. – Т.: Фан, 2016. – С. 29-31, 85-99.
10. Патент № IAP 2011 0348. Способ получения полимерных металлсодержащих наноккомплексов / С.Ш. Рашидова, Н.Р. Вохидова, К.К. Пирниязов // Ихтиролар. Расмий ахборотнома. – 2011. – № 9. – 30.09.2011.
11. Vokhidova N.R. Nanostructures obtaining on the basis of *Bombyx mori* chitosan hydroxyapatite / N.R. Vokhidova, K.H. Ergashev, S.M. Yugay, S.Sh. Rashidova // American journal of polymer science. – 2019. – Vol. 9 (1). – Pp. 1-9.
12. Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications // Prog. Polym. Sci. – 2006. – Vol. 31. – No. 7. – Pp. 603-632.
13. Muzzarelli R.A.A. Chitosan composites with inorganics, morphogenetic proteins and stem cells, for bone regeneration // Review Article. Carbohydr. Polym. – 2011. – Vol. 83. – No. 4. – Pp. 1433-1445.
14. He C., Nie W., Feng W. Engineering of biomimetic nanofibrous matrices for drug delivery and tissue engineering // J. Mater. Chem. B. – 2014. – Vol. 2. – No. 45. – Pp. 7828-7848.
15. Li K. Composite mesoporous silica nanoparticle/chitosan nanofibers for bone tissue engineering / K. Li, H. Sun, H. Sui, Y. Zhang, H. Liang, X. Wu, Q. Zhao // RSC Adv. – 2015. – Vol. 5. – No. 23. – Pp. 17541-17549.
16. Samal S.K. Cationic polymers and their therapeutic potential / S.K. Samal, M. Dash, S.V. Vlierberghe., D.L. Kaplan, E. Chiellini, C.V. Blitterswijk, L. Moroni, P. Dubruel // Chem. Soc. Rev. – 2012. – Vol. 41. – No. 21. – Pp. 7147-7194.
17. Wu F. Antibiotic-loaded chitosan hydrogel with superior dual functions: antibacterial efficacy and osteoblastic cell responses / F. Wu, G. Meng, J. He, Y. Wu, Z. Gu // ACS Appl. Mater. Interfaces. – 2014. – Vol. 6. – No. 13. – Pp. 10005-10013.
18. Smith A.A.A. Macromolecular (pro) drugs in antiviral research / A.A.A. Smith, M.B.L. Kryger, B.M. Wohl, P. Ruiz-Sanchis, K. Zuwala, M. Tolstrup, A.N. Zelikin // Polym. Chem. – 2014. – Vol. 5. – No. 22. – Pp. 6407-6425.
19. Куликов С.Н. Антимикотическая активность хитозана и его производных в отношении *Candida albicans* / С.Н. Куликов, Д.Р. Шакирова, В.Е. Тихонов, Е.А. Безродных, А.В. Ильина, А.Н. Левов, В.П. Варламов // Проблемы медицинской микологии. – 2012. – Т. 14. – № 4. – С. 50-54.
20. Vasiliev Y.M. Chitosan-based vaccine adjuvants: incomplete characterization complicates preclinical and clinical evaluation // Expert review of vaccines. – 2015. – Vol. 14. – No. 1. – Pp. 37-53.
21. Bonferoni M.C. Ionic polymeric micelles based on chitosan and fatty acids and intended for wound healing. Comparison of linoleic and oleic acid / Bonferoni M.C., Sandri G., Delleria E., Rossi S., Ferrari F., Mori M., Caramella C. // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 2014. – Vol. 87. – No. 1. – Pp. 101-106.
22. Lau H.K., Kiick K.L. Opportunities for multicomponent hybrid hydrogels in biomedical applications // Biomacromolecules. – 2015. – Vol. 16. – No. 1. – Pp. 28-42.
23. Muzzarelli R.A.A. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives // CMLS. – 1997. – Vol. 53. – No. 2. – Pp. 131-140.
24. Куржанова Е.А. Методы анализа мукоадгезии: от фундаментальных исследований к практическому применению в разработке лекарственных форм / Куржанова Е.А., Хуторянский В.В.,

- Балабушевич Н.Г., Харенко А.В., Демина Н.Б. // *Разработка и регистрация лекарственных средств.* – 2014. – Т. 8. – № 3. – С. 66-80.
25. Menchicchi B. *Biophysical analysis of the molecular interactions between polysaccharides and mucin* / Menchicchi B., Fuenzalida J.P., Hensel A., Swamy M.J., David L., Rochas C., Goycoolea F.M. // *Biomacromolecules.* – 2015. – Vol. 16. – No. 3. – Pp. 924-935.
26. Casattari L., Illum L. *Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs* // *J. Control. Release.* – 2014. – Vol. 190. – Pp. 189-200.
27. Takeuchi H. *Mucoadhesive properties of carbopol chitosan-coated liposomes and their effectiveness in the oral administration of calcitonin receptor agonists* / Takeuchi H., Matsui Y., Yamamoto H., Kawashima Y. // *J. Control. Release.* – 2003. – Vol. 86. – No. 2. – Pp. 235-242.
28. Патент № IAP 05849. *Способ комплексной безотходной переработке хитинсодержащего сырья* / Рашидова С.Ш., Рузиев Ф.И., Вохидова Н.Р., Кlicheва О.Б., Бекчанов И.К. // *Дата поступления заявки: 03.07.2013. Номер заявки IAP 2013 0270.*
29. Huang Y. *Degradation of chitosan by hydrodynamic cavitation* / Huang Y., Wu Y., Huang W., Yang F. // *Polym. Degrad. Stab.* – 2013. – Vol. 98. – No. 1. – Pp. 37-43.
30. Ji J. *Chemical modifications of chitosan and its applications* / Ji J., Wang L., Yu H., Chen Y., Zhao Y., Zhang H., Amer W.A., Sun Y., Huang L., Saleem M. // *Polym.-Plast. Techn. Eng.* – 2014. – Vol. 53. – No. 14. – Pp. 1494-1505.
31. Chen J. *Synthesis and characterization of water-soluble chitosan grafted with hydrophilic aliphatic polyester* / Chen J., Zheng L., Chen X., Wang Z., Li C., Xiao Y., Guan G., Zhu W. // *Int. J. Bio. Macromol.* – 2015. – Vol. 74. – Pp. 433-438.
32. Перминов П.А. *Структурообразование растворов хитозана в присутствии сшивающего реагента при получении биологически активных полимерных материалов* / Перминов П.А., Кильдеева Н.Р., Тимофеева Л.М., Абронин И.А., Бабак В.Г., Никонов В.В. // *Изв. вузов; Химия и хим. Технология.* – 2007. – Т. 50. – Вып. 3. – С. 53-56.
33. Никонов В.В. *Синтез криогелей хитозана, сшитого глутаровым альдегидом, и изучение их свойств* / Никонов В.В., Иванов Р.В., Кильдеева Н.Р., Булатникова Л.Н., Лозинский В.И. // *Высокомолек. Соед. А.* – 2009. – Т. 52. – No. 8. – С. 1436-1443.
34. Pawar S.V., Yadav G.D. *PVA/chitosan–glutaraldehyde cross-linked nitrile hydratase reusable biocatalyst for conversion of nitriles to amides* // *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* – 2014. – Vol. 101. – Pp. 115-121.
35. Патент РФ № 2408618. *Новые сшивающие агенты для получения биосовместимых материалов на основе хитозана* / Михайлов С.Н., Кильдеева Н.Р., Перминов П.А., Никонов В.В., Захарова А.Н., Донецкая А.И. // *Бюлл.* – 2011. – № 1. – 8 с.
36. Dambies L. *Preparation of chitosan gel beads by ionotropic polybdate gelation* / Dambies L., Vincent T., Domard A., Guibal E. // *Biomacromolecules.* – 2001. – Vol. 2. – No. 4. – Pp. 1198-1205.
37. Shu X.Z., Zhu K.J. *Controlled drug release properties of ionically cross-linked chitosan beads: the influence of anion structure* // *Int. J. Pharm.* – 2002. – Vol. 233. – No. 1. – Pp. 217-225.
38. Berger J.M. *Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications* / Berger J.M., Reist J.M., Mayer O.F., Peppas N.A. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2004. – Vol. 57. – No. 1. – Pp. 19-34.
39. Bhattarai N., Gunn J., Zhang M. *Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery* // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2010. – Vol. 62. – Pp. 83-99.
40. Краюхина М.А., Самойлова Н.А., Ямсков И.А. *Полиэлектролитные комплексы хитозана: формирование, свойства и применение* // *Усп. хим.* – 2008. – Т. 77. – № 9. – С. 854-869.
41. Chung Y.C., Yeh J.Y., Tsai C.F. *Antibacterial characteristics and activity of water-soluble chitosan derivatives prepared by the Maillard reaction* // *Molecules.* – 2011. – Vol. 16. – No. 10. – Pp. 8504-8514.
42. Birch N.P., Schiffman J.D. *Characterization of self-assembled polyelectrolyte complex nanoparticles formed from chitosan and pectin* // *Langmuir.* – 2014. – Vol. 30. – No. 12. – Pp. 3441-3447.
43. Шиповская А.Б. *Новые антимикробные препараты на основе комплексной соли хитозана с хиральным органическим лигандом* / Шиповская А.Б., Зудина И.В., Фомина В.И., Малинкина О.Н. // *Бутлеровские сообщения.* – 2015. – Т. 41. – № 3. – С. 82-94.
44. Патент РФ № 2535141. *Гелеобразная композиция широкого спектра биологического действия* / Зудина И.В., Фомина В.И., Шиповская А.Б. // *Бюлл.* – 2014. – № 34. – 13 с.
45. Osman M. *Protective effects of chitosan, ascorbic acid and gymnema sylvestre against hypercholesterolemia in male rats* / Osman M., Fayed S.A., Ghada I.M., Romeilah R.M. // *Aust. J. Basic Appl. Sci.* – 2010. – Vol. 4. – No. 1. – Pp. 89-98.
46. Kanauchi O. *Increasing effect of a chitosan and ascorbic acid mixture on fecal dietary fat excretion* / Kanauchi O., Deuchi K., Imasato Y., Kobayashi E. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 1994. – Vol. 58. – No. 9. – Pp. 1617-1620. DOI: 10.1271/bbb.58.1617/.
47. Tsujikawa T. *Supplement of a chitosan and ascorbic acid mixture for Crohn's disease* / Tsujikawa T., Kanauchi O., Andoh A., Saotome T., Sasaki M., Fujiyama Y., Bamba T. // *Nutrition.* – 2003. – Vol. 19. – No. 2. – Pp. 137-139. DOI: 10.1016/S08999007(02)00958-9/.

48. Muzzarelli R.A.A. Removal of uranium from solutions and brines by a derivative of ascorbic acid and chitosan // *Carbohydr. Polym.* – 1985. – Vol. 5. – No. 2. – Pp. 85–89. DOI: 10.1016/0144-8617(85)90026-8 19/.
49. Yanagiguchi K. Wound healing following direct pulp capping with chitosan-ascorbic acid complex in rat incisors // *Korean Chitin Chitosan Journal.* – 2000. – Vol. 5. – No. 3. – Pp. 182–182.
50. Hafsa J. Synthesis, characterization, antioxidant and antibacterial properties of chitosan ascorbate / Hafsa J., Charfeddine B., Smach M. A., Limem K., Majdoub H., Sonia R. // *Intern. J. Pharm. Chem. Biol. Sci.* – 2014. – Vol. 4. – No. 4. – Pp. 1072–1081.
51. Muzzarelli R. Reconstruction of parodontal tissue with chitosan / Muzzarelli R., Biagini G., Pugnali A., Filippini O., Baldassarre V., Castaldini C., Rizzoli C. // *Biomaterials.* – 1989. – Vol. 10. – No. 9. – Pp. 598–603. DOI: 10.1016/01429612(89)90113-0/.
52. Da Rocha R.P. Effects of a vitamin pool (vitamins A, E, and C) on the tissue necrosis process: experimental study on rats / Da Rocha R.P., Lucio D.P., De Lima Souza T., Pereira S.T., Fernandes G.J.M. // *Aesthetic Plastic Surgery.* – 2002. – Vol. 26. – No. 3. – Pp. 197–202.
53. Gross R. L. The effect of ascorbate on wound healing // *International Ophthalmology Clinics.* – 2000. – Vol. 40. – No. 4. – Pp. 51–57.
54. Moores J. Vitamin C: a wound healing perspective // *British Journal of Community Nursing.* – 2013. – Vol. 18. – No. 12. – Pp. S6–S11.
55. De Keersmaecker S.C.J. Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid / De Keersmaecker S.C.J., Verhoeven T.L.A., Desair J., Marchal K., Vanderleyden J., Nagy I. Strong // *FEMS Microbiology Letters.* – 2006. – Vol. 259. – No. 1. – Pp. 89–96.
56. Moe T., Khaing T. Lactic acid-chitosan films' properties and their in vivo wound healing activity // *International Journal of Medical, Health, Biomedical, Bioengineering and Pharmaceutical Engineering.* – 2014. – Vol. 8. – No. 9. – Pp. 633–637.
57. Kochańska B., Śramkiewicz J. Evaluation of chitosan ascorbate application as a multifunctional dressing during dental operation within the region of dental cervix // Muzzarelli RAA (ed) *Chitosan per os: from dietary supplement to drug carrier Grottammare.* – 2000. – Pp. 257–264.
58. Kochańska B., Witek E., Śramkiewicz J. Haemostatic properties of chitosan and its application in stomatology // *Chitin World. Monograph.* – Wirtschaftsverlag NW, Bremerhaven. – 1994. – Pp. 520–529.
59. Kochańska B., Kędzia A., Gębska A. Sensitivity to chitosan ascorbate microaerophilic bacteria isolated from infections of oral cavity // *PCACD.* – 2016. – Vol. 21. – Pp. 109–113.
60. Kochańska B., Lukaszewsk M. Determination of the hydrolytic activity of whole saliva using chitosan ascorbate as a substrate // *Progress on chemistry and application of chitin and its derivatives.* – 2018. – Vol. XIII. – Pp. 97–102.
61. Chen Yu, Chung Ch. Antibacterial effect of water-soluble chitosan on representative dental pathogens *Streptococcus mutans* and *Lactobacilli brevis* // *J Appl Oral Sci.* – 2012. – Vol. 20 (6). – Pp. 620–627.
62. Archana B., Narendra K., Mohan L. Therapeutic management of pulmonary tuberculosis by mannosylated chitosan ascorbate microspheres: preparation and characterization // *Journal of Drug Delivery Therapeutics.* – 2019. – V. 9 (3). – Pp. 13–25.
63. Sekar V. Synthesis and characterization of chitosan ascorbate nanoparticles for therapeutic inhibition for cervical cancer and their in silico modeling // *Journal of Industrial and Engineering Chemistry.* – 2018. – V. 62. – Pp. 239–249.
64. Zudina I.V., Shipovskaya A.B. Immunotropic and antibacterial properties of biomaterials based on chitosan salts // *Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues 4th: International Conference.* – 2013. – Pp. 22–23.
65. Белоусова Ю.Б. Применение изделия медицинского назначения «Хаг-бол» для вторичной профилактики хронического генерализованного пародонтита у больных сахарным диабетом I типа: дисс. ... канд. мед. наук. – Красноярск, 2010. – С. 26–27.
66. Kübra S.Ö., Vural G. Effect of Chitosan-Ascorbic Acid Coatings on the Refrigerated Storage Stability of Fresh-Cut Apples // *Coatings.* – 2019. – V. 9. – P. 503. DOI:10.3390/coatings9080503/.
67. Tian X.L., Tian D.F. Synthesis and evaluation of chitosan-vitamin C complex // *Indian J. Pharm Sci.* – 2009. – V. 71 (4). – Pp. 371–376.
68. Малинкина О.Н., Провозина А.А., Шиповская А.Б. Оценка химического взаимодействия гидрохлорида хитозана с аскорбиновой кислотой методами ИК- и ЯМР-спектроскопии // *Известия Саратовского университета: сер. химия, биология, экология.* – 2014. – Т. 14. – Вып. 3. – С. 20–24.
69. Нурғалиев И.Н. Компьютерное моделирование хитина, хитозана и его производных. – Т.: Фан, 2016. – С. 63–68.
70. Нурғалиев И.Н. Оценка химического взаимодействия хитозана с аскорбиновой кислотой // *Полимеры без границ: взгляд молодых ученых, молодежная научная конференция.* – Т., 2016. – С. 3–5.
71. Pirniyazov K.K., Rashidova S.Sh. Synthesis and structural characteristics of the ascorbate chitosan *Bombyx mori* // *American journal of research.* – 2019. – No. 7-8. – Pp. 114–119. DOI: <http://dx.doi.org/10.26739/2573-5616-2019-8-10/>.

72. Ngo D.H. *Biological effects of chitosan and its derivati ves* / Ngo D.H., Vo T.S., Ngo D.N., Kang K.H., Je G.Y., Pham H.N., Вyun H.G., Kim S.K. // *Food Hydrocoll.* – 2015. – V. 51. – Pp. 200–216. [CrossRef].
73. Петросян Г.С., Ерицяң Л.Н. Ерицяң М.Л. Полимер аналогичные превращения на основе хитозана // *Вестник НПУА.* – 2016. – № 1. – С. 27-36.
74. Choi C.Y. *EffectofN-acylationon structure and properties of chitosan fibers* / ChoiC.Y., KimS.B., PakP.K., YooD.I., ChungY.S. // *Carbohydr. Polym.* – 2007. –V. 68. –Pp. 122–127. [CrossRef]
75. Chen Z. *Bloodcoagulation evaluation of N-alkylated chitosan* / ChenZ., YaoX., LiuL., Guan], LiZ., Yang], HuangS., Wu], TianF., JingM. // *Carbohydr. Polym.* – 2017. – V. 173. – Pp. 259–268. [CrossRef] [PubMed].
76. Chen X.G., Park H.J. *Chemical characterization of O-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions* // *Carbohydr. Polym.* –2003. – V. 53. –Pp. 355–359. [CrossRef]
77. Ключева О.Б. *Синтез, свойства и применение O-карбоксиметилхитозана: автореф. дис. ... PHD хим. наук.* – Т., 2017. – С. 8-15.
78. Zhao D. *Biomedical Applications of Chitosan and Its Derivative Nanoparticles* / Zhao D., Yu Sh., Sun B., Gao Sh., Guo S., Zhao K. // *Polymers.* – 2018. – V. 10. – Pp. 462. DOI:10.3390/polym10040462/.
79. De Jong W.H., Borm P.J. *Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards* // *Int. J. Nanomed.* – 2008. – V. 3. – Pp. 133–149. [CrossRef].
80. Desai K.G.H., Park H. J. *Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying* // *J. Microencapsul.* – 2005. – V. 22. – Pp. 179-192.
81. Verma M.S. *Size-tunable nanoparticles composed of dextran-β-poly (D, L-lactide) for drug delivery applications* / Verma M.S., Liu S., Chen Y.Y., Meerasa A., Gu F. // *Nano Res.* – 2012. – V. 5. – Pp. 49–61. [CrossRef].
82. Guo P. *General method for producing organic nanoparticles using nanmoporous membranes* / Guo P., Martin C.R., Zhao Y., Ge J., Zare R.N.// *Nano Lett.* – 2010. – V. 10. – Pp. 2202–2206. [CrossRef] [PubMed].
83. Majedi F.S. *On-chip fabrication of paclitaxel-loaded chitosan nanoparticles for cancer therapeutics* / Majedi F.S., Hasani-Sadrabadi M.M., Van Dersarl J.J., Mokarram N. // *Adv. Funct. Mater.* – 2014. – V. 24. – Pp. 432–441. [CrossRef].
84. Wei P. *Synthesis of chitoson-coated near-infrared layered double hydroxide nanoparticles for in vivo optical imaging* / Wei P., Cheng S., Liao W., Kao K., Weng C., Lee C. // *J. Mater. Chem.* – 2012. – V. 22. – Pp. 5503-5513. [CrossRef].
85. Nayak B. *Evolution of antioxidant and anticancer efficacy of chitosan based nanoparticles* // *Thesis submitted to National institute of technology master degree in life science.* – 2015. – P. 48.
86. Alishahi A., Mirvaghefi A. *Shelf life and delivery enhancement of vitamin C using chitosan nanoparticles* // *Food chemistry.* – 2011. – Pp. 935-940.
87. Ваел Ш.М. *Наночастицы хитозана как носители биологически активных веществ: автореф. дисс. ... канд. мед. наук . 02.00.06-высокомолекулярные соединения.* – М., 2012.
88. Susana E.S. *Phosphorylation of gelatinand chitosan as an excipient for asiaticoside nanofibers* // *The Malaysian Journal of Analytical Sciences.* – 2014. – Vol. 18. – No. 1. – Pp. 58-67
89. Gan Q., Wang T. *Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–TPP nanoparticles intended for gene delivery* // *Colloid Surface B.* – 2005. – No. 44. – Pp. 65-73.
90. Zhang H., Oh M., Allen C. et al. *Monodisperse chitosan nanoparticles for mucosal drug delivery* // *Biomacromolecules.* – 2004. – No. 5. – Pp. 2461-2468.
91. Nuri A.E. *Formulation and characterization of ascorbic acid nanoparticle with chitosan as a carrier for topical administration* // *Proceeding of International Conference on Drug Development of Natural Resources.* – 2012. – Pp. 317-321.
92. Nurhanisah O. et al. *Synthesis and optimization of chitosan nanoparticles loaded with L-ascorbic acidthymoquinone* // *Nanomaterials.* – 2018. – No. 8. – P. 920.
93. Aylin A. Onder S. et al. *Controlled release of vitamin C from chitosan nanoparticles* // *Hacettepe J. Biol. Chem.* – 2018. – Vol. 46. – No. 1. – Pp. 69-77.
94. Silvia R., Barbara V. et al. *Chitosan ascorbate nanoparticles for the vaginal delivery of antibiotic drugs in atrophic vaginitis* // *Mar. Drugs.* –2017. – No. 15. – Pp. 319-320.
95. Sinha V.R. *Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs* / Sinha V.R., Singla A.K., Wadhawan S., Kaushik R., Kumria K., Bansal K.; Dhawan S. // *Int. J. Pharm.* – 2004. – V. 274. – Pp. 1–33. [CrossRef] [PubMed].
96. Yalinca Z. et al. *Blood contact properties of ascorbyl chitosan* // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition.* – 2013. – Vol. 24. – No. 17. – Pp. 1969-1987. <http://dx.doi.org/10.1080/09205063.2013.816929/>.
97. Altınışık A.T. et al. *Controlled Release of Vitamin C from Chitosan Nanoparticles* // *Hacettepe J. Biol. Chem.* – 2018. – V. 46. – No. 1. – Pp. 69-77.
98. Rosales-Martinez et al. *Optimization of the conditions for the elaboration of chitosan nanoparticles charged with alpha lipoic acid, ascorbic acid and alpha tocopherol* // *Revista Mexicana de Ingenieria Quimica.* – 2017. – Vol. 16. – No. 1. – Pp. 321-337.
99. Fan W. *Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique* / Fan W., Yan W., Xu Z., Ni H. // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* – 2012. – V. 90. – Pp. 21-27. [CrossRef] [PubMed].

100. Chen F. *Modification of chitosan for simultaneous antioxidant and antibacterial functions*// A thesis submitted for the degree of engineering department of chemical and biomolecular engineering. – National university of Singapore. – 2009. – P. 31.

101. Adamiec J., Modrzejewska Z. *Sorptivity and structural characteristics of spray-dried chitosan microparticles* // *Drying 2004-Proceedings of the 14 th International Drying Symposium*. – San-Paulo,Brazil. – 2004. – Pp. 1510-1517.

102. Keum-Il J., Lee Hyeon Gyu. *Stability of chitosan nanoparticles for L-ascorbic acid during heat treatment in aqueous solution*// *Agr. and food chem.* – 2008. – 56.–No. 6. – P. 1936-1941. *РЖХ 2009 г. Том 16. 09.16-19P1.43.*

103. Madni A., Khan R., Ikram M. et al. *Fabrication and Characterization of Chitosan–Vitamin C–Lactic Acid Composite Membrane for Potential Skin Tissue Engineering* // *Hindawi International Journal of Polymer Science – Vol. 2019*. – Pp. 1-8. Article ID 4362395, 8 pages <https://doi.org/10.1155/2019/4362395/>.

104. Chen Ch.Yu, Chung Y.Ch. *Antibacterial effect of water-soluble chitosan on representative dental pathogens Streptococcus mutans and Lactobacilli brevis* // *Pharmaceutical Development and Technology*. – 2008. – No. 13. – Pp. 513-521. DOI: 10.1080/10837450802288865/.

105. Tan F.W., Dong F., Zhang J. *Physical and Antioxidant Properties of Edible Chitosan Ascorbate* // *Journal of Agricultural and Food Chemistry Article*. – 2019. – V. 67. – Pp. 2530-2539. DOI:10.1021/acs.jafc.8b04567/.

106. Пирниязов К.К., Рашидова С.Ш. *Влияние наноаскорбата хитозана на рост и развитие семян пшеницы* // *Қишлоқ хўжалиги экинларини зарарли организмлардан уйғунлашган ҳимоя қилишининг ҳозирги ҳолати ва истиқболлари: Ҳалқаро илмий-амалий конф. матер.* – Т., 2019. – С. 220-223.

Рецензент:

Раҳманбердыева Р.К., доктор химических наук, ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией химии высокомолекулярных растительных веществ ИХРВ АН РУз.