ЖУРНАЛ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ, 2017, том 72, № 3, с. 259–265

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 543.54

ОБНАРУЖЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ АГРЕГАТОВ ХИТОЗАНА КАПИЛЛЯРНЫМ ЗОННЫМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗОМ С ПРИМЕНЕНИЕМ ДАВЛЕНИЯ

© 2017 г. Т. Г. Джераян*, [1], Н. Г. Ванифатова*, А. А. Бурмистров*, Е. В. Лазарева, А. В. Руднев***

**Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского Российской академии наук 119991 Россия, Москва, ул. Косыгина, 19*

***Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет 119991 Россия, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, 1, стр. 3*

[1]E-mail: dzherajan@mail.ru

Поступила в редакцию 16.06.2016 г.
После доработки 10.10.2016 г.

Предложен новый подход к обнаружению и определению агрегатов хитозана в уксуснокислых растворах методом капиллярного зонного электрофореза с применением давления. Исследованы процессы агрегирования хитозана в зависимости от состава дисперсионной среды и времени хранения. Впервые обнаружено присутствие нескольких видов положительно заряженных агрегатов хитозана. Методами сканирующей электронной микроскопии, статического и динамического светорассеяния определены размеры частиц, изменяющиеся в интервале 20–2500 нм. Установлена зависимость вида электрофореграмм от полученных в тех же условиях распределений частиц по размеру. Установлена тенденция изменения электрофоретической подвижности в зависимости от размера агрегата, позволяющая приблизительно оценивать полидисперсность растворов хитозана. Хитозан использован для эффективной динамической модификации капилляров, не требующей введения модификатора в фоновый электролит.

Ключевые слова: хитозан, капиллярный зонный электрофорез, статическое светорассеяние, динамическое светорассеяние, сканирующая электронная микроскопия.

DOI: 10.7868/S0044450217030057

Среди большого разнообразия биополимеров особое место занимает хитозан. Уникальность хитозана обусловлена широким спектром проявляемых им свойств, среди которых следует особо выделить биологическую активность, биосовместимость, нетоксичность и биоразлагаемость, что исключает возможность его накопления в организме человека и окружающей среде. Это позволяет использовать хитозан в фармацевтической и пищевой промышленности, в медицине и косметологии. Небольшие различия в молекулярном строении хитозана и дисперсности могут влиять на растворимость, вязкость, реакционную способность, биоактивность, биосовместимость, биоразложение и, следовательно, на эффективность применения. Природное многообразие хитозана определяет необходимость контроля его молекулярной массы, степени ацетилирования и степени ассоциации в растворах.

Хитозан представляет собой продукт частичного деацетилирования хитина, включающий звенья D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина [1, 2]. В кислых средах первичные аминогруппы D-глюкозамина протонируются (pK_a 6.3–7.2) [3, 4], превращая хитозан в катионный полиэлектролит, который может быть исследован методом капиллярного зонного электрофореза (**КЗЭ**).

КЗЭ относится к эффективным методам определения и разделения биомакромолекул, позволяет характеризовать физико-химические свойства синтетических и природных полиэлектролитов. Описано [5] определение высокомолекулярного хитозана в немодифицированном кварцевом капилляре с применением КЗЭ. Несмотря на использование триэтиламина в составе фонового электролита (pH 2.0), авторам не удалось подавить адсорбцию хитозана, возникающую при увеличении продолжительности анализа в результате снижения скорости миграции хитозана или увеличения длины капилляра. Предложено использовать КЗЭ с фосфатным раствором (pH 2.0) в качестве фонового электролита для разделения высокомолекулярного хитозана и карбоксиметилхитозана в немодифицированном капилляре [6]. КЗЭ с детекти-

рованием методом лазерно-индуцированной флуоресценции применили для разделения смеси олигосахаридов хитина после дериватизации 9-аминопирен-1,4,6-трисульфонатом [7] и для разделения смеси олигосахаридов хитина и хитозана после дериватизации 8-аминопирен-1,3,6-трисульфокислотой [8]. В работах Мнатсаканьян [9] и Ву [10] оценена перспективность использования КЗЭ для разделения хитозанов по степеням деацетилирования и определения степени деацетилирования хитозана. Авторами обнаружено небольшое увеличение электрофоретической подвижности хитозана с ростом степени деацетилирования в интервале значений 55.3–96.2% для образцов высокомолекулярного хитозана со средней и высокой плотностью заряда. Определены средние значения степеней деацетилирования и профили распределения степеней деацетилирования в образцах хитозана, достигнуто полное разрешение двух хитозанов.

Следует отметить, что в указанных выше работах авторы считали растворы хитозана состоящими из макромолекул с различными молекулярными массами и степенями деацетилирования, не принимая во внимание возможность их ассоциации. В то же время известно, что полимерные цепи хитозана стремятся взаимодействовать друг с другом посредством межмолекулярных водородных связей, гидрофобных и электростатических взаимодействий, что приводит к образованию агрегатов и кластеров с большей вероятностью при более высоких концентрациях хитозана [11–14]. Согласно результатам исследования методом лазерного светорассеяния Па с сотр. [12], повышение концентрации протонированных аминогрупп при увеличении концентрации уксусной кислоты (снижении pH) усиливает внутримолекулярное электростатическое отталкивание, приводит к вытягиванию цепи и облегчению межмолекулярных взаимодействий. Полученное на основе экспериментальных данных распределение гидродинамических радиусов частиц хитозана указывает на присутствие как молекул хитозана, так и агрегатов, состоящих из нескольких молекул. Ву с сотр. [13], используя комбинацию методов статического (**СР**) и динамического (**ДР**) светорассеяния, показали, что хитозан со степенью деацетилирования 91% в растворах состава 0.2 М CH_3COOH–0.1 М CH_3COONa имеет вытянутую конформацию и склонность к агрегированию даже в разбавленных растворах. Результаты исследования 0.05–0.6%-ных растворов хитозана методом **СР** указывают на наличие обратимого агрегирования при достаточно высоких концентрациях хитозана и на присутствие только определенных по размеру агрегатов [14]. Электронная микроскопия образцов хитозана со степенями ацетилирования 0.01 и 0.15 свидетельствует о присутствии агрегатов (супрамолекулярных структур) с размерами 200–1000 нм. Размер агрегатов уменьшается с понижением концентрации хитозана в интервале 0.03–0.003%.

Цель настоящей работы – оценка перспективности использования КЗЭ с применением давления для исследования процессов агрегирования хитозана в уксуснокислых растворах в зависимости от состава дисперсионной среды и времени хранения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. Использовали хитозан (ООО "Биопрогресс", Щелково) со средневязкостной молекулярной массой 87 кДа и степенью деацетилирования 82%; уксусную кислоту (ГОСТ 61-75, Россия). Все растворы готовили с использованием деионированной воды.

Раствор хитозана в уксусной кислоте готовили добавлением 3 мл воды к 0.02 г порошка хитозана, суспензию перемешивали и оставляли на ночь для набухания. Затем добавляли 10.0 мл 0.10 М уксусной кислоты и воду до объема 20 мл и перемешивали.

Аппаратура. Для электрофоретических исследований использовали систему капиллярного электрофореза Капель-105 (Люмэкс, Санкт-Петербург), снабженную спектрофотометрическим детектором с переменной длиной волны (190–380 нм). Эксперименты проводили в кварцевом капилляре внутренним диаметром 75 мкм, общей длиной 0.38 м и длиной до детектора 0.29 м при 25°С и длине волны 220 нм. Применяли источники высокого напряжения положительной и отрицательной полярностей. Маркером электроосмотического потока (**ЭОП**) служила вода. Между измерениями капилляр промывали раствором фонового электролита, контролируя степень очистки капилляра по базовой линии электрофореграммы (**ЭФГ**) и положению маркера.

Для обработки результатов использовали программу МультиХром для Windows-95/98/NT. Электрофоретическую подвижность частиц рассчитывали по разности между наблюдаемой скоростью миграции частиц и скоростью потока.

Растворы хитозана исследовали методом сканирующей электронной микроскопии (**СЭМ**) на сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM-6700F (Япония) с холодным катодом с полевой эмиссией. Раствор предварительно наносили на очищенную полированную кремниевую подложку, что позволяло добиться лучшего контраста при наблюдении за индивидуальными частицами хитозана.

Размеры частиц определяли методами ДР и СР. ДР-измерения проводили на приборе NanoBrook Omni Particle Analyzer с лазерным диодом в качестве источника света при угле рассеяния 172.5° и

25°С. Диапазон измерения размера частиц составлял от 0.3 нм до 10 мкм.

СР-измерения проводили на приборе SALD-7500nano в емкостной кварцевой ячейке объемом 5 см^3, снабженной лопастной мешалкой с вертикальным перемещением. В качестве источника света использовали ультрафиолетовый полупроводниковый лазер с длиной волны 405 нм. Диапазон измерения частиц составлял от 7 нм до 400 мкм. Раствор хитозана перед анализом отстаивали в течение 10 мин для удаления крупных нерастворившихся частиц либо дополнительно пропускали полученный раствор через фильтр с размером пор 1.2 мкм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Модификация поверхности капилляра. При изучении высокомолекулярных катионных полиэлектролитов методом капиллярного электрофореза обычно возникает проблема адсорбции аналита на внутренней стенке капилляра. Для снижения адсорбции используют модификацию внутренней поверхности капилляра различными соединениями либо путем их ковалентного присоединения, либо путем физической адсорбции за счет электростатического взаимодействия и/или образования водородных связей. Описано [4, 15–18] применение различных модифицирующих агентов, в том числе катионных полимеров, содержащих аминогруппы. Хитозаны с молекулярными массами 7–300 кДа предложены в качестве реагентов для модификации внутренней поверхности капилляра при анализе основных лекарств, определении белков и ароматических кислот [4, 15–17], а также анионов [18]. В качестве недостатков покрытия авторы отмечают невысокую устойчивость и возможность использования только в узком интервале pH (3.0–5.5). В фоновых электролитах с более высокими значениями pH ухудшается воспроизводимость, так как из-за понижения плотности заряда на хитозане покрытие стенок капилляра становится менее эффективным, а при pH > 6 происходит флокуляция хитозана [16].

Таким образом, при электрофоретическом исследовании растворов хитозана требуется предварительная модификация внутренних стенок капилляра. В то же время, принимая во внимание достаточно сильную адсорбционную способность хитозана, нельзя исключить его возможную конкуренцию за активные центры и десорбцию модификатора со стенок капилляра, что приведет к появлению посторонних соединений в составе фонового электролита и, следовательно, к неправильным результатам. Учитывая все это, мы оценили возможность использования капилляров, модифицированных исследуемым хитозаном. Адсорбционную способность хитозана и устойчивость покрытия оценивали в 0.05 М растворах уксусной кислоты, используемых в качестве фонового электролита. При проведении КЗЭ раствора хитозана в немодифицированном капилляре с источником высокого напряжения положительной полярности пиков хитозана на электрофореграмме обнаружить не удалось. При повторных экспериментах пики хитозана на ЭФГ также отсутствовали, а время миграции маркера ЭОП постепенно увеличивалось и, наконец, наступало обращение ЭОП. Полученные результаты указывают на модификацию стенок капилляра в результате достаточно эффективной адсорбции хитозана, когда введенная проба практически полностью адсорбируется при движении по капилляру. Благодаря проведенным экспериментам оптимизированы условия модификации, включающие заполнение капилляра раствором хитозана в 0.05 М уксусной кислоте, выдерживание раствора в капилляре в течение 10 мин и последующую промывку капилляра фоновым электролитом.

Исследована устойчивость ЭОП в модифицированных капиллярах. Показано, что скорость ЭОП монотонно увеличивается с повышением напряжения. При этом абсолютная величина электроосмотической подвижности несколько снижается (от 44×10^{-9} до 41×10^{-9} м^2 В$^{-1}$ с$^{-1}$) при изменении приложенного напряжения от –15 до –25 кВ. Наблюдаемый эффект может быть обусловлен незначительным повышением степени десорбции хитозана с поверхности капилляра с увеличением скорости потока. С целью оценки влияния скорости потока на электроосмотическую подвижность изучены зависимости скорости потока от давления в интервале значений 0–80 мбар при постоянных напряжениях, равных –15 и –25 кВ (рис. 1). Как видно, зависимости скорости потока от давления представляют собой прямые, наклон которых практически не зависит от величины приложенного напряжения. Электроосмотическая подвижность несколько уменьшается с ростом давления, но не более чем на 10% при использовании максимального давления. Относительное постоянство величины электроосмотической подвижности обеспечивает возможность проведения до 150 пробегов без дополнительной модификации капилляра. Повышение pH с 3.0 до 4.0 (максимальное значение, позволяющее удерживать хитозан в растворенном состоянии) приводит к снижению средней скорости потока, но не более чем на 12% (с 5.2×10^{-3} до 4.6×10^{-3} м/с) при использовании максимального давления и напряжения –15 кВ.

Введение пробы. Учитывая, что вязкость растворов хитозана может значительно превышать вязкость воды, и исследуемый хитозан имеет достоточно высокую молекулярную массу, необходимо оценить влияние условий введения пробы на ее реальный объем. Динамическую вязкость

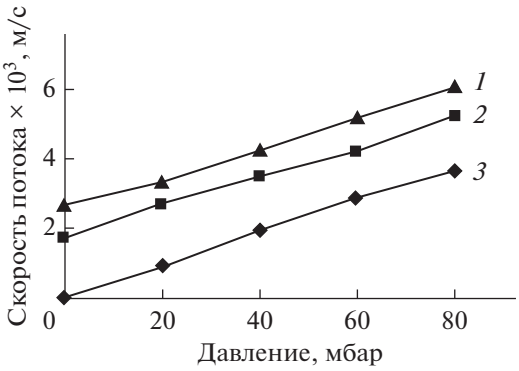

Рис. 1. Влияние давления на скорость потока в зависимости от напряжения. Фоновый электролит 0.05 М уксусная кислота, pH 3.2.

раствора хитозана оценивали на основе экспериментально определенного времени миграции хитозана до детектора по методике, предложенной Белло с сотр. [19]. Она составила 38.4×10^{-4} Па с. По изменению площади пиков хитозана на ЭФГ установлено, что при введении раствора хитозана в течение 10 с давление ввода пробы должно превышать 10 мбар. Расчеты, проведенные с использованием определенной величины динамической вязкости хитозана, показали, что реальный объем пробы, вводимый при давлении 30 мбар в течение 10 мин, составляет 4.95% объема капилляра до детектора. Следует отметить, что отличие этого объема от объема пробы воды, введенной при аналогичных условиях, не превышает 6%. Эти условия ввода пробы выбраны в качестве оптимальных.

Капиллярный зонный электрофорез. Изучено электрофоретическое поведение раствора хитозана в 0.05 М уксусной кислоте (pH 3.2) в зависимости от приложенного напряжения и состава фонового электролита. В качестве примера на рис. 2а представлена ЭФГ, полученная при напряжении −15 кВ. На ЭФГ присутствуют 2 пика: отрицательный пик воды-маркера и положительный пик хитозана, время миграции которого практически совпадает со временем миграции маркера. Аналогичные ЭФГ получены также при напряжении −25 кВ, т.е. при условии, обеспечивающем возможность регистрации пиков, соответствующих положительно заряженным агрегатам хитозана с электрофоретическими подвижностями, абсолютная величина которых не превышает 32×10^{-9} м^2 В$^{-1}$ с$^{-1}$ при продолжительности анализа 10 мин.

Влияние давления. Для обнаружения положительно заряженных агрегатов хитозана с более высокими абсолютными значениями электрофоретических подвижностей требуется повышение скорости потока. С этой целью электрофоретическое поведение хитозана исследовано при одновременном действии давления и напряжения. В качестве примера на рис. 2б представлена ЭФГ, полученная через 7 дней после приготовления раствора хитозана при напряжении −15 кВ и давлении 80 мбар с использованием 0.05 М уксусной кислоты (pH 3.2) в качестве фонового электроли-

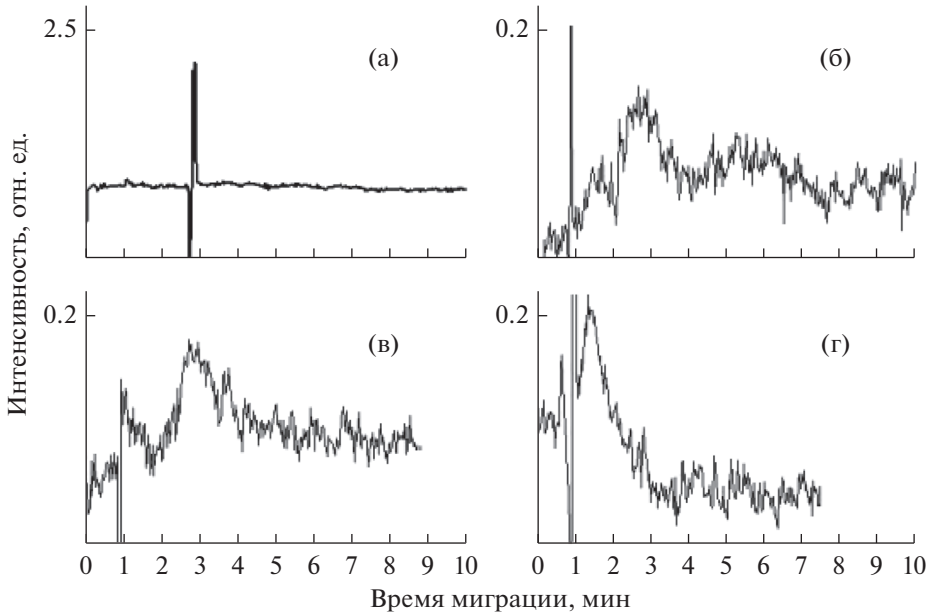

Рис. 2. Электрофореграммы растворов хитозана. Фоновый электролит 0.05 М уксусная кислота; pH 3.2 (а), (б), (в); 0.05 М ацетатный буферный раствор, pH 4.0 (г); напряжение −15 кВ; давление 0 мбар (а), напряжение −15 кВ, давление 80 мбар (б), (в), (г).

та. Как видно, на ЭФГ присутствуют 5 пиков: отрицательный пик воды-маркера, узкий интенсивный пик, время миграции которого практически совпадает со временем миграции маркера, и три пика, обусловленные наличием в пробе положительно заряженных агрегатов хитозана. На основе результатов 18 измерений, полученных в разные дни, рассчитаны средние значения, относительные стандартные отклонения, а также доверительные интервалы электрофоретических подвижностей для трех указанных форм хитозана при доверительной вероятности 0.90. Для первого пика значения электрофоретических подвижностей, соответствующие положению вершины пика, равны $(46.5 \pm 1.4) \times 10^{-9}$ м^2 В$^{-1}$ с$^{-1}$ ($s_r = 0.07$). Второй и третий широкие пики с нечетко определенными вершинами, вероятно, представляют собой огибающую нескольких пиков, поэтому нами рассчитаны значения электрофоретических подвижностей, соответствующих началу и концу этих пиков. Они составили $(68.8 \pm 3.3) \times 10^{-9}$ м^2 В$^{-1}$ с$^{-1}$ ($s_r = 0.08$) для начала и $(104.4 \pm 2.5) \times 10^{-9}$ м^2 В$^{-1}$ с$^{-1}$ ($s_r = 0.04$) для конца второго пика, а также $(119.5 \pm 3.7) \times 10^{-9}$ м^2 В$^{-1}$ с$^{-1}$ ($s_r = 0.03$) для конца третьего пика. Скорость миграции хитозана пропорциональна давлению, что свидетельствует об отсутствии влияния давления на его электрофоретическую подвижность [20]. Кроме того, электрофоретическая подвижность хитозана практически не зависит от приложенного напряжения в интервале значений от –10 до –25 кВ, а также от концентрации уксусной кислоты в пределах 0.025–0.10 М. Таким образом, изменение времени миграции агрегатов при изменении напряжения и/или давления не влияет на электрофоретическую подвижность, что может служить косвенным доказательством неизменности состояния суспензии в процессе определения. Следует отметить, что на ЭФГ, полученых через день после приготовления раствора хитозана, интенсивность третьего пика существенно ниже. Повышение pH фонового электролита до 4.0 (максимально допустимое значение) приводит к снижению воспроизводимости положения пиков на ЭФГ. При этом первый пик становится более интенсивным и несколько смещается в сторону, соответствующую меньшим значениям электрофоретических подвижностей, а два других пика практически исчезают (рис. 2г).

С целью отнесения пиков на ЭФГ и выяснения влияния размера частиц хитозана на электрофоретическую подвижность проведен КЗЭ фильтратов, полученных после фильтрования 0.1%-ного раствора хитозана через фильтр с размером пор 1.2 мкм (рис. 2в). Сравнение ЭФГ указывает на практически полное исчезновение после фильтрования пика, время миграции которого практически совпадает со временем миграции маркера. На основании полученных данных этот пик был отнесен к наиболее крупным частицам. При снижении кислотности раствора до pH 4.0, т.е. при условиях, более благоприятных для агрегации хитозана, на электрофореграммах наблюдается относительное увеличение интенсивности первого пика, что также указывает на тенденцию уменьшения электрофоретической подвижности с укрупнением частиц и позволяет отнести этот пик к частицам среднего размера. Исчезновение двух других пиков, относящихся к частицам хитозана с более высокими электрофоретическими подвижностями, свидетельствует о значительном снижении концентрации мелких частиц.

Статическое и динамическое светорассеяние. Сканирующая электронная микроскопия. Методом СР изучено распределение частиц хитозана по размеру в 0.05 М растворах уксусной кислоты (pH 3.2) после фильтрования через фильтр с размером пор 1.2 мкм, так как именно область нано- и субмикрочастиц представляет интерес при сопоставлении данных СР- и КЗЭ-определений. Кроме того, фильтрование позволяет уменьшить негативное влияние крупных частиц на СР-определение частиц малого размера. Получено бимодальное распределение частиц по размеру с интервалами 20–500 и 500–1200 нм для первого и второго пиков. Для удобства исследования изменений гранулометрического состава суспензий в процессе хранения область размеров, в которой были обнаружены частицы, разделили на 3 условных интервала. Результаты оценивали как среднее из нескольких параллельных опытов. На рис. 3 представлены гистограммы распределения частиц хитозана. Как видно из гистограммы через день после приготовления раствора (Ф1), около 70% всех частиц хитозана, находящихся в растворе, имели размеры в диапазоне 100–200 нм. Через неделю значительно увеличилось относительное содержание наночастиц с размерами менее 100 нм и уменьшилось количество частиц с размерами 100–200 нм (Ф7). Аналогичные диаграммы распределения частиц по размерам получены для растворов хитозана, впервые отфильтрованных через неделю (НФ7). При хранении в течение более 5 мес. в растворе хитозана увеличивалось относительное содержание частиц с размерами, превышающими 300 нм, но сохранялись нано- и субмикрочастицы с размерами менее 300 нм. Полученные данные позволили сделать вывод о том, что агрегативное состояние хитозана в 0.05 М растворе уксусной кислоты стабилизируется на 4–5 день после приготовления и не изменяется в течение месяца. На диаграммах распределения частиц по размерам, полученных методом ДР, присутствуют два пика, соответствующие размерам 45–160 и 300–2500 нм. Общие интервалы размеров частиц, обнаруженные двумя методами,

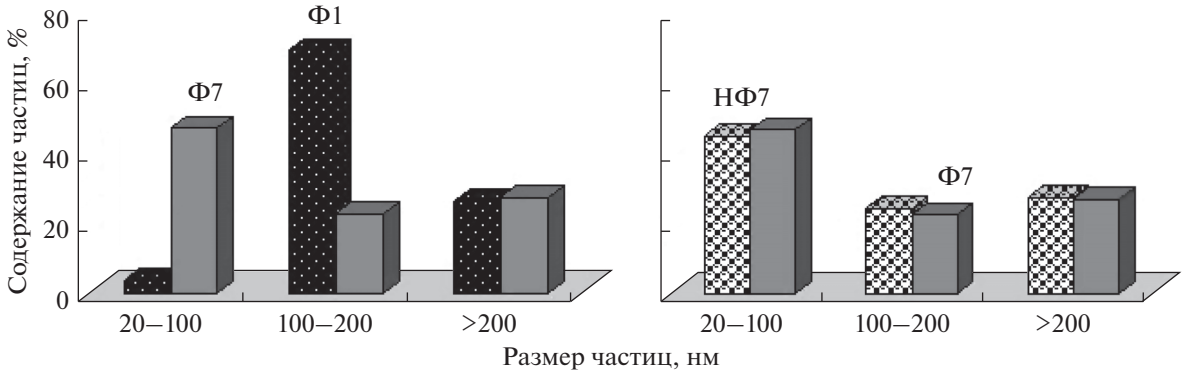

Рис. 3. Гистограммы распределения частиц хитозана по размеру. Дисперсионная среда – 0.05 М уксусная кислота. Суспензии хитозана: Ф1 – через 1 день после приготовления и фильтрования; Ф7 – через 7 дней после приготовления; НФ7 – впервые отфильтрованная через 7 дней после приготовления.

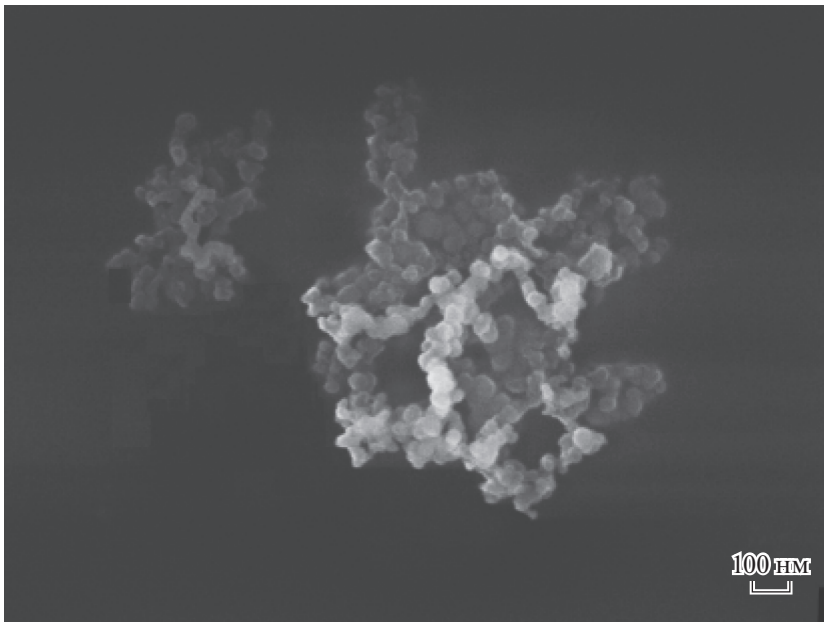

Рис. 4. Микрофотография агрегатов хитозана.

совпадают, однако размеры, относящиеся к первому и второму пикам, различаются.

Методом СЭМ обнаружены агрегаты хитозана с размерами до 2000 нм, состоящие из наночастиц размером 20–30 нм. В качестве примера на микрофотографии (рис. 4) представлены агрегаты хитозана с размерами 360 × 380 и 780 × 830 нм.

Сопоставление данных, полученных методом КЗЭ, с результатами СР и ДР позволяет сделать вывод о возможности использования КЗЭ для оценки агрегативного состояния хитозана в уксуснокислом растворе. В обоих случаях зарегистрированы несколько видов агрегатов хитозана, различающихся либо по электрофоретической подвижности, либо по размеру. Установлена тенденция изменения электрофоретической подвижности в зависимости от размера частиц, позволяющая приблизительно оценивать размеры агрегатов и их изменения, а также полидисперсность растворов хитозана по положению и относительной интенсивности пиков на электрофореграммах. Например, узкий пик, время миграции которого практически совпадает со временем миграции маркера, исчезающий при фильтровании, может быть отнесен к наиболее крупным частицам с размерами, близкими или превышающими 1 мкм. Остальные пики соответствуют более мелким частицам, причем их размер тем меньше, чем выше электрофоретическая подвижность. Наблюдаемое увеличение интенсивности третьего пика на ЭФГ, полученных через неделю после приготовления раствора хитозана, согласуется с повышением от-

носительного содержания частиц в интервале до 100 нм на СР-гистограмме и позволяет отнести указанные агрегаты к этому пику.

Корректное отнесение пиков хитозана на ЭФГ к агрегатам определенного размера возможно только при наличии фракций хитозана с узким гранулометрическим распределением. Получить такие фракции с субмикрочастицами размером менее 700–800 нм не представляется возможным из-за того, что присутствующие в суспензии частицы находятся в динамическом равновесии. Размеры субмикро- и наночастиц, к которым относятся три пика на ЭФГ, можно было бы косвенно оцененить путем сопоставления данных КЗЭ, СР и ДР. Однако различие СР- и ДР-распределений частиц по положению пиков, а также несовпадение числа полученных пиков с числом пиков на ЭФГ не позволило выполнить такое отнесение пиков.

***

Таким образом, одновременное использование напряжения и давления при КЗЭ-определении хитозана позволило не только обнаружить различные положительно заряженные агрегаты хитозана, но и оценить степень полидисперсности хитозана в растворах по положению и соотношению интенсивностей пиков на ЭФГ. Следует также отметить, что применение давления позволяет получать наиболее полную информацию при КЗЭ-определении соединений, которые, подобно хитозану, обладают высокой способностью адсорбироваться на кварцевых стенках капилляра и могут изменять направление ЭОП.

Авторы признательны научному сотруднику лаборатории концентрирования Ермолину М.С. за выполнение измерений методом статистического светорассеяния на приборе SALD-7500nano.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Скрябин К.Г., Михайлов С.Н., Варламов В.П.* Хитозан. М.: Центр “Биоинженерия” РАН, 2013. 593 с.
2. *Rinaudo M.* // Prog. Polym. Sci. 2006. V. 31. № 7. P. 603.
3. *Sorlier P., Denuzière A., Viton C., Domard A.* // Biomacromolecules. 2001. V. 2. № 3. P. 765.
4. *Буданова Н.Ю., Шаповалова Е.Н., Шпигун О.А.* // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2006. Т. 47. № 3. С. 177.
5. *Ban E, Choi O.-K., Ryu J.-C., Young S.* // Electrophoresis. 2001. V. 22. № 11. P. 2217.
6. *Fu X., Huang L., Zhai M., Li W., Liu H.* // Carbohydr. Polym. 2007. V. 68. № 3. P. 511.
7. *Wang Chin-Yu, Hsieh You-Zung* // J. Chromatogr. A. 2002. V. 979. № 1–2. P. 431.
8. *Beaudoin M.-E., Gauthier J., Boucher I., Waldron K.C.* // J. Sep. Sci. 2005. V. 28. № 12. P. 1390.
9. *Mnatsakanyan M., Thevarajah J.J., Roi R.S., Lauto A., Gaborieau M., Castignolles P.* // Anal. Bioanal. Chem. 2013. V. 405. № 21. P. 6873.
10. *Wu C.* // Carbohydr. Polym. 2014. V. 111. P. 236.
11. *Филиппова О.Е. Корчагина Е.В.* // Высокомолек. соед. Сер. А. 2012. Т. 54. № 7. С. 1130. (*Philippova O.E., Korchagina E.V.* // Polym. Sci. Ser. A. 2012. V. 54. № 7. P. 552.)
12. *Pa J-H., Yu T.L.* // Macromol. Chem. Phys. 2001. V. 202. № 7. P. 985.
13. *Wu C., Zhou S., Wang W.* // Biopolymers. 1995. V. 35. № 4. P. 385.
14. *Anthonsen M.W., Varum K.M., Hermansson A.M., Smidsrod O., Brant D.A.* // Carbohydr. Polym. 1994. V. 25. № 1. P. 13.
15. *Sun P., Landman A., Hartwick R.A.* // J. Microcolumn Sep. 1994. V. 6. № 4. P. 403.
16. *Yao Y.J., Li S.F.Y.* // J. Chromatogr. A. 1994. V. 663. № 1. P. 97.
17. *Huang X., Wang Q., Huang B.* // Talanta. 2006. V. 69. № 2. P. 463.
18. *Takayanagi T., Motomizu S.* // Anal. Sci. 2006. V. 22. № 9. P. 1241.
19. *Bello M.S., Rezzonico R., Righetti P.G.* // J. Chromatogr. A. 1994. V. 659. № 1. P. 199.
20. *Vanifatova N., Rudnev A., Spivakov B.* // Electrophoresis. 2013. V. 34. № 15. P. 2145.