

**ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЙ КОМПЛЕКС ХИТОЗАНА И ХОНДРОИТИНА СУЛЬФАТА:
ФОРМИРОВАНИЕ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА****В.Ю. Новиков, Н.В. Долгопятова, И.Н. Коновалова, Ю.А. Кучина**

Виталий Юрьевич Новиков *

Лаборатория биохимии и технологии, Полярный научно-исследовательский институт морского рыбного хозяйства и океанографии им. Н.М. Книповича, ул. Акад. Книповича, 6, Мурманск, Российская Федерация, 183038

E-mail: nowitaly@yandex.ru *

Наталья Владимировна Долгопятова, Ирина Никандровна Коновалова *, Юлия Анатольевна Кучина

Кафедра химии, Мурманский государственный технический университет, ул. Спортивная, 13, Мурманск, Российская Федерация, 183010

E-mail: iranion@yandex.ru, konovalova-mgtu@rambler.ru *, uak2008@mail.ru

*Изучены условия образования, устойчивость и растворимость полиэлектролитного комплекса (ПЭК) хондроитина сульфата (ХС) и хитозана (ХТЗ). ХС был выделен из хрящевой ткани семги *Salmo salar*. Молекулярная масса, определенная нефелометрическим методом, составила 60 кДа. ХТЗ был получен из панциря камчатского краба *Paralithodes camtschaticus*, степень деацетилирования 68,8 %, молекулярная масса 368 кДа. Установлены условия образования ПЭК при смешивании растворов полисахаридов. Сравнение исходных полисахаридов и продуктов их взаимодействия проводили на основании изучения ИК спектров. Установлено наличие у ХС поглощения при волновом числе около 1250 см^{-1} , соответствующее валентным ассиметричным колебаниям $\text{-SO}_2\text{-}$ группы в органических сульфатах. Это поглощение отсутствовало у ХТЗ. В ИК спектрах ПЭК наблюдалось уменьшение характерного для ХС поглощения в 2 раза, что соответствовало молярному соотношению ХС и ХТЗ, равному 1:1. Отсутствие новых полос поглощения в ПЭК по сравнению со спектрами исходных ХТЗ и ХС было объяснено образованием связей за счет электростатического взаимодействия. Изучены условия образования ПЭК. При взаимодействии хитозана и хондроитина сульфата, полученных из морских гидробионтов, образуется суспензия ПЭК, затем выпадает плотный осадок ПЭК, в котором молярное соотношение этих полиэлектролитов остается постоянным. При добавлении раствора хондроитина сульфата к раствору хитозана в молярном соотношении 1:3; 1:6 образуется дисперсия полиэлектролитного комплекса, сохраняющая устойчивость в течение 2-3 сут. Рассмотрена возможность практического применения реакции образования ПЭК. Титрование раствора ХС раствором ХТЗ с известной степенью деацетилирования может быть использовано для количественного определения чистоты препарата ХС. Исследована возможность количественного выделения ХС непосредственно из сырья с применением раствора ХТЗ путем образования и отделения нерастворимого ПЭК. Для изучения возможности дальнейшего использования ПЭК была рассмотрена его стабильность в водных растворах электролитов. В щелочной среде наблюдается частичное растворение вещества с поглощением, близким к поглощению ХС на 1250 см^{-1} , в кислой среде – к поглощению ХТЗ. Таким образом, в щелочной и кислой среде происходит частичное разрушение ПЭК с образованием исходных полисахаридов, каждый из которых растворяется при соответствующем значении рН: ХС – в щелочном среде, ХТЗ – в кислой среде. Таким образом, в работе изучено образование ПЭК, его свойства и возможности практического использования.*

Ключевые слова: хитозан, хондроитина сульфат, полиэлектролитный комплекс, инфракрасные спектры, потенциометрическое титрование, растворимость

POLYELECTROLYTE COMPLEX OF CHITOSAN AND CHONDROITIN SULFATE: FORMATION, PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES

V.Yu. Novikov, N.V. Dolgopyatova, I.N. Konovalova, Yu.A. Kuchina

Vitaliy Yu. Novikov *

Laboratory of Biochemistry and Technology, Knipovich Polar Research Institute of Marine Fisheries and Oceanography, Acad. Knipovich st., 6, Murmansk, 183038, Russia
E-mail: nowitaly@yandex.ru *

Nataliya V. Dolgopyatova, Irina N. Konovalova *, Yuliya A. Kuchina

Department of Chemistry, Murmansk State Technical University, Sportivnaya st., 13, Murmansk, 183010, Russia
E-mail: iranion@yandex.ru, konovalova-mgtu@rambler.ru *, uak2008@mail.ru

*The formation conditions, stability and solubility of polyelectrolyte complex (PEC) of chondroitin sulphate (CS) and chitosan (CN) were studied. CS was isolated from cartilage of Atlantic salmon *Salmo salar*. The molecular weight determined by nephelometric method was 60 kDa. CN was prepared from the shell of crab *Paralithodes camtschaticus*, degree of deacetylation is 68.8%, molecular weight is 368 kDa. The conditions of PEC formation are established by mixing solutions of polysaccharides. The comparing the original polysaccharides and their interaction products was carried out on the basis of infrared (IR) spectra study. CS have revealed the presence of absorption near 1250 cm^{-1} , corresponding to the asymmetric stretching vibrations of $-\text{SO}_2-$ group in organic sulfates. This absorption was absent in the spectrum of CN. In the IR spectra of the PEC this absorption of CS decreased in 2 times that correspond to molar ratio of CS and CN equals to 1:1. The absence of new bands in PEC spectrum compared with spectra of CS and CN was been explained the bonds formation due to electrostatic interactions. PEC formation conditions are studied. At the interaction of CN and CS the PEC suspension is formed, and then dense sediment of PEC drops out, whereas the molar ratio of these polysaccharides remains constant. At addition of solution of CS to the CN solution in the molar ratio 1:3; 1:6 the PEC dispersion is formed that preserves stability during 2-3 days. Possibility of practical application of the PEC formation reaction is considered. The titration of CS solution by CN solution with a known degree of deacetylation can be used to quantify the CS drug's purity. We investigated the possibility of quantitative extraction of CS directly from raw material using CN solution through formation and separation of insoluble PEC. To study the possibilities for further use of PEC its stability in aqueous solutions of electrolytes was considered. In alkaline there is partial dissolution of substances with the absorption close to CS absorption (1250 cm^{-1}), in acid – to CS absorption. Thus, there is partial destruction of PEC in alkaline and acidic media with liberation of polysaccharides, each of which is dissolved at an appropriate pH: CS in alkaline medium, CN in acidic medium. Thus, the PEC formation, its properties and possibilities of practical application were studied in this work.*

Key words: chitosan, chondroitin sulfate, polyelectrolyte complex, infrared spectra, potentiometric titration, solubility

Для цитирования:

Новиков В.Ю., Долгопятова Н.В., Коновалова И.Н., Кучина Ю.А. Полиэлектролитный комплекс хитозана и хондроитина сульфата: формирование, физико-химические свойства. *Изв. вузов. Химия и хим. технология*. 2017. Т. 60. Вып. 2. С. 60–66.

For citation:

Novikov V.Yu., Dolgopyatova N.V., Konovalova I.N., Kuchina Yu.A. Polyelectrolyte complex of chitosan and chondroitin sulfate: formation, physico-chemical properties. *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.* 2017. V. 60. N 2. P. 60–66.

В настоящее время все больше внимания уделяется рациональному использованию природных ресурсов, в связи с чем становится актуальным создание новых технологий глубокой и комплексной безотходной переработки природного сырья. В Мурманской области эта проблема касается добычи и переработки морских организмов, отходы от промышленной переработки которых составляют от 30 до 60% их вылова. Среди этого неиспользуемого сырья интерес представляют источники хондроитина сульфата (ХС) и хитозана (ХТЗ). Для получения ХС могут использоваться отходы от переработки морских рыб, являющихся традиционными объектами промышленного лова (лососевые, скаты и др.) и аквакультуры (форель). Традиционным сырьем для производства ХТЗ являются панцирьсодержащие отходы от переработки камчатского краба, краба-стригуна и северной креветки.

Практическое применение ХТЗ постоянно расширяется, что объясняется его биосовместимостью с различными тканями живых организмов, биodeградируемостью, нетоксичностью для человеческого организма и ярко выраженной антимикробной активностью [1]. ХС входит в состав многих лекарственных препаратов, применяемых при заболеваниях суставов (хондропротекторов). В настоящее время в России для получения ХС используется костно-хрящевая ткань крупного рогатого скота. В мире широко изучаются и находят применение препараты на основе хрящевой ткани морских гидробионтов (например, хрящевых рыб).

Известно, что в результате реакции между противоположно заряженными полиэлектролитами в водных растворах образуются полиэлектролитные комплексы (ПЭК) – нерастворимые стехиометрические и растворимые нестехиометрические. Макромолекулы полиэлектролитов в таких комплексах удерживаются ионными, водородными связями, а также дисперсионными силами.

ХТЗ (поликатионный компонент) в растворе при контакте с ХС (полианионный компонент) образует ПЭК за счет прочных электростатических связей между $-\text{NH}_3^+$ -группами ХТЗ и $-\text{OSO}_3^-$ и $-\text{COO}^-$ -группами ХС. Кооперативный характер связей между полиионами придает ПЭК высокую стабильность в широком интервале рН среды [2].

Стехиометрические ПЭК применяют при получении мембран различного назначения, в качестве медицинских препаратов, адсорбентов, для капсулирования различных веществ, в частности, лекарственных форм пролонгированного действия [3-5].

Таким образом, исследование возможности производства ХС, ХТЗ и ПЭК на их основе, полученных из местного морского сырья, является актуальным.

В настоящей работе изучены условия образования и свойства ПЭК на основе ХС и ХТЗ, выделенных из гидробионтов Баренцева моря.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ХТЗ был получен из панциря камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* по известной технологии [6]. Степень деацетилирования ХТЗ составила 68,8%, молекулярная масса, определенная вискозиметрическим методом, – 368 кДа.

ХС был выделен из хрящевой ткани семги *Salmo salar* по технологии, заимствованной из патента [7]. Способ получения полисахаридов был модифицирован авторами в предыдущей работе [8] с целью получения очищенной субстанции ХС из хрящей рыб Баренцева моря. По этой технологии был получен белый порошкообразный препарат ХС, растворимый в воде. Молекулярная масса, определенная нефелометрическим методом, составила 60 кДа.

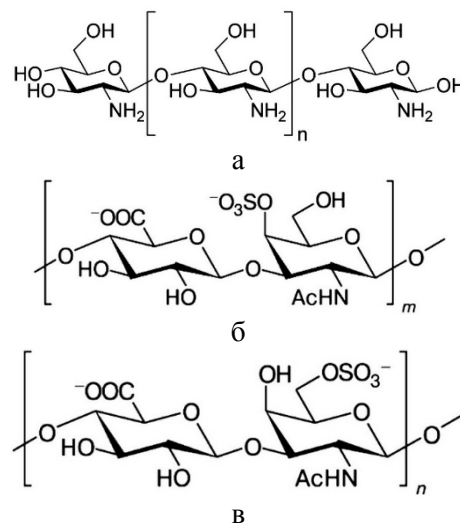


Рис. 1. Структурные формулы хитозана (а) и хондроитина сульфата А (б) и С (в)
Fig. 1. The structural formula of chitosan (a) and chondroitin sulfate A (б) and (C) (в)

Растворы полисахаридов для получения ПЭК готовили следующим образом: навеску ХТЗ растворяли в 0,5%-ном растворе CH_3COOH и оставляли раствор на сутки. ХС растворяли в воде. Величина рН приготовленных растворов составляла для ХТЗ 3,7, для ХС – 6,2. рН раствора ХТЗ доводили до рН 6,2 раствором NaOH ($C = 0,1$ моль/дм³).

Для приготовления ПЭК полученные 1%-ные растворы полисахаридов смешивали в молярных соотношениях ХС:ХТЗ, равных 1:6, 1:3, 1:1, 3:1. Соотношение масс ХС и ХТЗ рассчитывалось из условия стехиометрического связывания $-\text{OSO}_3^-$ и $-\text{COO}^-$ -групп ХС и $-\text{NH}_3^+$ -групп ХТЗ. При расчете учитывалась степень деацетилирования ХТЗ. Смеси тщательно перемешивались на магнитной мешалке. Осадки, образующиеся после смешивания растворов ХТЗ и ХС, отделяли центрифугированием, промывали водой и высушивали на воздухе при 60 °С.

Идентификация полученных образцов ХС была выполнена с помощью ЯМР [9] и подтвердила наличие в молекуле ХС остатков глюкуроновой кислоты и сульфатированного галактозамина. Было показано, что все остатки галактозамина полностью ацетилированы и в основном сульфатированы у С6-атома. В меньшей степени сульфатная группа присоединена к С4-атому.

Инфракрасные спектры (ИК спектры) ХТЗ, ХС и ПЭК снимали в таблетках КВг на инфракрасном спектрофотометре IR-420 («Shimadzu», Япония) в диапазоне волновых чисел от 4000 до 400 cm^{-1} . Для измерения спектров высушенные образцы ХТЗ, ХС и ПЭК массой 1,5 мг измельчали в агатовой ступке, смешивали со 150 мг КВг и готовили таблетки прессованием.

Оптическую плотность (А) на волновых числах 1250 и 1070 cm^{-1} определяли по формуле:

$$A = \lg(T_0/T),$$

где T_0 и T – интенсивность падающего и прошедшего ИК излучения, %.

Потенциометрическое титрование проводили с помощью иономера Анион 4151 (НПП «Инфраспак-Аналит», Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При смешивании растворов ХТЗ и ХС происходит образование ПЭК, который выделяется в виде новой фазы. При добавлении раствора ХС к раствору ХТЗ в молярных соотношениях 1:3; 1:6 образуется дисперсия ПЭК, устойчивая в течение всего времени наблюдения (до 3 сут).

При молярном соотношении смешиваемых растворов 1:1 (независимо от последовательности их смешения) образуется суспензия ПЭК, затем выпадает осадок. Образовавшийся осадок ПЭК отделяли центрифугированием, промывали водой, высушивали при температуре 60 °С.

Сравнение исходных полисахаридов и продуктов их взаимодействия проводили на основании изучения ИК спектров. В основном отмечалось

сходство инфракрасных спектров ХТЗ и ХС, что объясняется близким химическим строением этих двух полисахаридов. Наиболее характерным отличием являлось наличие у ХС поглощения при волновом числе около 1250 cm^{-1} , соответствующее валентным ассиметричным колебаниям $-\text{SO}_2-$ группы в органических сульфатах ($\nu_{\text{as}}(\text{O}=\text{S}=\text{O})$) [10, 11]. Это поглощение отсутствовало у ХТЗ. Инфракрасные спектры ХТЗ, ХС и их комплексов в интересующей нас области волновых чисел приведены на рис. 2.

С целью подтверждения образования ПЭК ХТЗ с ХС было проведено исследование ИК спектров продуктов взаимодействия этих полисахаридов. В осадке, полученном при взаимодействии ХТЗ и ХС, было обнаружено уменьшение поглощения при волновом числе 1250 cm^{-1} (рис. 2).

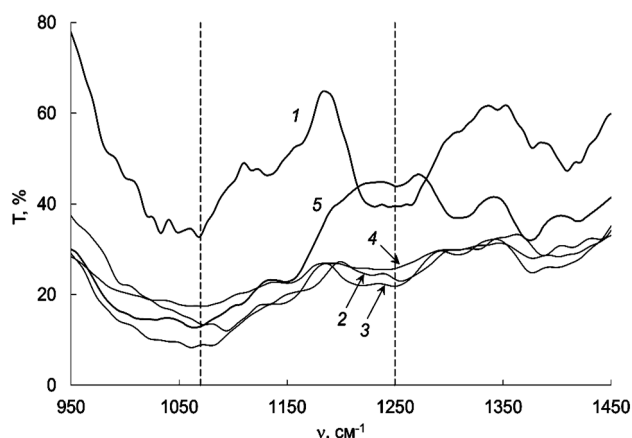


Рис. 2. Инфракрасные спектры поглощения осадка, полученного при разных молярных соотношениях ХС и ХТЗ. Молярная доля ХС: 1,00 (1), 0,75 (2), 0,50 (3), 0,25 (4) и 0,00 (5)
Fig. 2. The infrared absorption spectra of the residue obtained at different molar ratios of chondroitin sulfate and chitosan. The mole fraction of CS is: 1.00 (1), 0.75 (2), 0.5 (3), 0.25 (4) and 0.00 (5)

Для выяснения, является ли продукт взаимодействия исследованных полисахаридов механической смесью или представляет собой полиэлектролитный комплекс, вычисляли отношение оптической плотности при волновом числе 1250 cm^{-1} к оптической плотности при 1070 cm^{-1} . Поглощение образцов при волновом числе 1070 cm^{-1} было выбрано в качестве опорного согласно результатам работ Y. Shigemasa и др. [12] по изучению ИК спектров хитозана.

Результаты изучения зависимости поглощения при $\nu = 1250 \text{ cm}^{-1}$ от молярного соотношения ХТЗ:ХС в ПЭК (при смешивании растворов этих полисахаридов) и в механической смеси приведены в табл. 1.

Таблица 1

Отношение оптических плотностей поглощения ИК излучения при 1250 и 1070 см⁻¹ для продукта реакции ХС и ХТЗ и их механической смеси

Table 1. The ratio of optical densities of IR absorption at 1250 and 1070 cm⁻¹ for the product of the chondroitin sulfate and chitosan reaction, and their mechanical mixtures

Мольная доля ХС	A ₁₂₅₀ /A ₁₀₇₀	
	Полиэлектролитный комплекс	Механическая смесь ХТЗ и ХС
0,00	0,127	0,127
0,25	0,487	0,277
0,50	0,423	0,428
0,75	0,522	0,592
1,00	0,729	0,729

Если предположить, что осадок ХТЗ с ХС (или просто их смесь) имеет переменный состав (что соответствует просто их механической смеси), тогда в инфракрасном спектре мы должны наблюдать пик с переменной высотой. Однако при смешивании разных молярных соотношений ХТЗ и ХС были получены осадки, в которых высота пика при 1250 см⁻¹ оставалась постоянной, составляющей приблизительно половину высоты пика чистого ХС.

Отсутствие новых полос поглощения в ПЭК по сравнению со спектрами ХТЗ и ХС можно объяснить образованием связей только за счет электростатического взаимодействия. Аналогичный вывод был сделан авторами работы [13].

Образование нерастворимого ПЭК мы попытались использовать для количественного связывания ХС при решении двух задач.

Первая задача заключалась в количественном определении ХС в препарате с помощью титрования его раствора раствором ХТЗ. Для этого раствор ХС потенциметрически титровали раствором ХТЗ. (рис. 3).

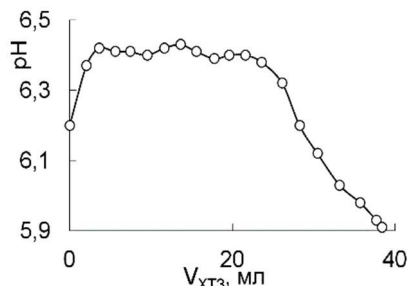


Рис. 3. Кривая потенциметрического титрования раствора ХС (30 мг ХС) раствором ХТЗ (1 мг/мл)

Fig. 3. The potentiometric titration curve of chondroitin sulfate solution (30 mg of chondroitin sulfate) by chitosan solution (1 mg/ml)

На кривой потенциметрического титрования точке эквивалентности (точке образования стехиометрического ПЭК) соответствует 23,3 мл раствора ХТЗ при pH 6,35. После расчета массовая доля ХС в навеске, взятой на анализ, составила 83,0%.

На основании этого расчета можно сделать вывод о том, что титрование раствора ХС раствором ХТЗ с известной степенью деацетилирования может быть использовано для количественного определения чистоты препарата ХС.

Вторая задача состояла в извлечении ХС из сырья, содержащего этот полисахарид (например, хрящевой ткани семги или северного ската). Для этого сырье растворяли в щелочи, нейтрализовали до pH около 6,2 и добавляли раствор ХТЗ с pH = 6,2. Образовавшийся нерастворимый ПЭК отделяли фильтрованием или центрифугированием.

Для изучения возможности дальнейшего использования ПЭК была рассмотрена его стабильность в водных растворах электролитов. ПЭК оказался нерастворимым в воде и растворах кислоты и щелочи. Была изучена устойчивость полученного ПЭК в водных растворах электролитов при разных значениях pH: в 5%-ном растворе NaCl (pH = 7), в растворе NaOH (pH 10) и растворе HCl (pH = 2,5). Для этого смешивали 200 мг ПЭК с 20 мл каждого из растворов. Полученные суспензии оставляли на 3 сут. Затем растворы отделяли от осадка центрифугированием, выпаривали под вакуумом и снимали ИК спектры полученного сухого вещества.

После выдерживания ПЭК в растворе NaCl в спектре полученного сухого вещества не были обнаружены полосы поглощения, присущие ХС, ХТЗ или ПЭК (рис. 4, кр. 1).

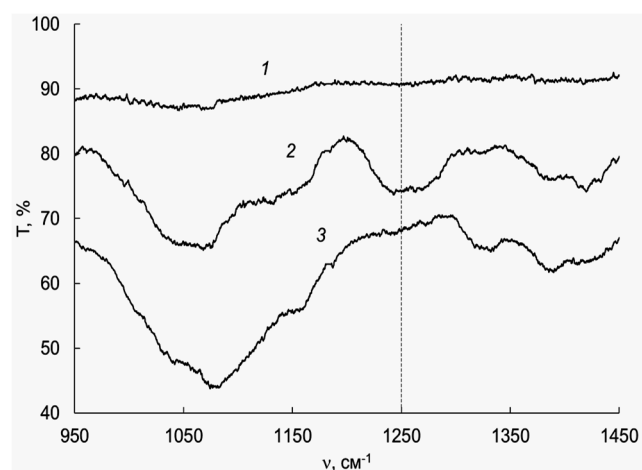


Рис. 4. Инфракрасные спектры растворенного вещества после выдерживания ПЭК в 5 %-ном растворе NaCl (1), растворе NaOH pH 10,0 (2), растворе HCl pH 2,5 (3)

Fig. 4. Infrared spectra of solute after storage of PEC in solution of 5% NaCl (1), NaOH solution at pH 10.0 (2), HCl solution at pH 2.5 (3)

В щелочной среде наблюдается растворение вещества с поглощением, близким к поглощению ХС на 1250 см^{-1} (рис. 4, кр. 2), в кислой среде – к поглощению ХТЗ (рис. 4, кр. 3). По-видимому, в щелочной и кислой среде происходит частичное разрушение ПЭК с образованием отдельных полисахаридов, каждый из которых растворяется при соответствующем рН: ХС – в щелочном растворе, ХТЗ – в кислотном растворе.

ВЫВОДЫ

При взаимодействии хитозана и хондроитина сульфата, полученных из морских гидробионтов, образуется осадок полиэлектролитного комплекса, в котором молярное соотношение этих полиэлектролитов остается постоянным, приблизительно 1:1. При добавлении раствора хондроитина сульфата к раствору хитозана в молярном соотно-

шении 1:3; 1:6 образуется дисперсия полиэлектролитного комплекса, сохраняющая устойчивость в течение 2-3 сут.

Титрование раствора хондроитина сульфата раствором хитозана с известной степенью деацетилирования может быть использовано для количественного определения чистоты препарата хондроитина сульфата.

В щелочной и кислой среде происходит частичное разрушение полиэлектролитного комплекса хитозана и хондроитина сульфата с образованием исходных полисахаридов, каждый из которых растворяется при соответствующем значении рН: хондроитина сульфат – в щелочном среде, хитозан – в кислой среде.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного фонда (Проект № 16-16-00076).

ЛИТЕРАТУРА

1. **Mao S., Sun W., Kissel T.** Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA: Chitosan-based formulations of drugs, imaging agents and biotherapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010. V. 62. N 1. P. 12-27. DOI: 10.1016/j.addr.2009.08.004.
2. Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение. Под ред. К.Г. Скрабина, Г.А. Вихорева, В.П. Варламова. М.: Наука. 2002. 365 с.
3. **Кабанов В.А.** Полиэлектролитные комплексы в растворе и в конденсированной фазе. *Успехи химии.* 2005. Т. 74. № 1. С. 5-23.
4. **Sui W., Huang L., Wang J., Bo O.** Preparation and properties of chitosan chondroitin sulfate complex microcapsules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2008. V. 65. N 1. P. 69-73. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2008.02.022.
5. **Huang L., Sui W., Wang Y., Jiao Q.** Preparation of chitosan/chondroitin sulfate complex microcapsules and application in controlled release of 5-fluorouracil. *Carbohydr. Polym.* 2010. V. 80. N 1. P. 168-173. DOI: 10.1016/j.carbpol.2009.11.007.
6. **No H.K., Meyers S.P.** Preparation and characterization of chitin and chitosan – a review. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 1995. V. 4. N 2. P. 27-52. DOI: 10.1300/j030v04n02_03.
7. Salmon-origin chondroitin sulfate: Patent US 20030162744. Int. Cl. A61K 031/737, C08B 037/00 / M. Takai, H. Kono. Appl. No. US 10/220539. Appl. 17.12.2002. Publ. 28.08.2003.
8. **Порцель-Снегерев М.Н., Новиков В.Ю., Коновалова И.Н.** Мембранное разделение полисахаридов и белков при извлечении хондроитина сульфата из морских гидробионтов. *Рыбное хозяйство.* 2009. № 4. С. 118-119.
9. **Крылов В.Б., Грачев А.А., Устюжанина Н.Е., Ушакова Н.А., Преображенская М.Е., Козлова Н.И., Порцель М.Н., Коновалова И.Н., Новиков В.Ю., Шашков А.С., Нифантьев Н.Э.** Предварительная структурная характеристика, противовоспалительная и антикоагулянтная активности хондроитинсульфатов из

REFERENCES

1. **Mao S., Sun W., Kissel T.** Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA: Chitosan-based formulations of drugs, imaging agents and biotherapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010. V. 62. N 1. P. 12-27. DOI: 10.1016/j.addr.2009.08.004.
2. Chitin and chitosan. Production, properties and usage. Ed. by K.G. Skryabin, G.A. Vikhoreva and V.P. Varlamov. M.: Nauka. 2002. 365 p. (in Russian).
3. **Kabanov V.A.** Polyelectrolyte complexes in solution and in bulk. *Russ. Chem. Rev.* 2005. V. 74. N 1. P. 3-20. DOI: 10.1070/rc2005v074n01abeh001165.
4. **Sui W., Huang L., Wang J., Bo O.** Preparation and properties of chitosan chondroitin sulfate complex microcapsules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2008. V. 65. N 1. P. 69-73. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2008.02.022.
5. **Huang L., Sui W., Wang Y., Jiao Q.** Preparation of chitosan/chondroitin sulfate complex microcapsules and application in controlled release of 5-fluorouracil. *Carbohydr. Polym.* 2010. V. 80. N 1. P. 168-173. DOI: 10.1016/j.carbpol.2009.11.007.
6. **No H.K., Meyers S.P.** Preparation and characterization of chitin and chitosan – a review. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 1995. V. 4. N 2. P. 27-52. DOI: 10.1300/j030v04n02_03.
7. Salmon-origin chondroitin sulfate: Patent US 20030162744. Int. Cl. A61K 031/737, C08B 037/00 / M. Takai, H. Kono. Appl. No. US 10/220539. Appl. 17.12.2002. Publ. 28.08.2003.
8. **Portsel-Snegereva M.N., Novikov V.Yu., Konovalova I.N.** Membrane separation of polysaccharides and proteins at chondroitin sulfate extraction from sea hydrocoles. *Rybnoe Khozaystvo.* 2009. N 4. P. 118-119 (in Russian).
9. **Krylov V.B., Grachev A.A., Ustyuzhanina N.E., Ushakova N.A., Preobrazhenskaya M.E., Kozlova N.I., Portsel M.N., Konovalova I.N., Novikov V.Yu., Shashkov A.S., Nifantiev N.E.** Preliminary structural characterization, anti-inflammatory and anticoagulant activities of chondroitin sulfates from marine fish cartilage. *Russ. Chem. Bull.* 2011. V. 60. N 4. P. 746-753. DOI: 10.1007/s11172-011-0115-x.

- хрящей морских рыб. *Известия Академии наук. Серия химическая*. 2011. Т. 60. № 4. С. 731-738.
10. **Наканиси К.** Инфракрасные спектры и строение органических соединений. Практическое руководство. М.: Мир. 1965. 216 с.
 11. **Васильева Н.Ю., Левданский А.В., Кузнецов Б.Н., Скворцова Г.П., Казаченко А.С., Djakovitch L., Pinel C.** Сульфатирование арабиногалактана сульфаминовой кислотой в диоксане. *Химия растительного сырья*. 2014. № 1. С. 87-95.
 12. **Shigemasa Y., Matsuura H., Sashiwa H., Saimoto H.** Evaluation of different absorbency ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin. *Int. J. Biol. Macromol.* 1996. V. 18. N 3. P. 237-242. DOI: 10.1016/0141-8130(95)01079-3.
 13. **Denuziere A., Ferrier D., Domard A.** Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes. Physico-chemical aspects. *Carbohydr. Polym.* 1996. V. 29. N 4. P. 317-323. DOI: 10.1016/s0144-8617(96)00035-5.
 10. **Nakanishi K.** Infrared Absorption Spectroscopy. Practical Guide. Tokyo: Nankodo; San-Francisco: Holden-Day, Inc. 1962. 223 p.
 11. **Vasilyeva N.Yu., Levdanskiy A.V., Kuznetsov B.N., Skvortsova G.P., Kazachenko A.S., Djakovitch L., Pinel C.** Sulfation of arabinogalactane with sulfanic acid in dioxane. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2014. N 1. P. 87-95 (in Russian).
 12. **Shigemasa Y., Matsuura H., Sashiwa H., Saimoto H.** Evaluation of different absorbency ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin. *Int. J. Biol. Macromol.* 1996. V. 18. N 3. P. 237-242. DOI: 10.1016/0141-8130(95)01079-3.
 13. **Denuziere A., Ferrier D., Domard A.** Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes. Physico-chemical aspects. *Carbohydr. Polym.* 1996. V. 29. N 4. P. 317-323. DOI: 10.1016/s0144-8617(96)00035-5.

Поступила в редакцию 05.10.2016
Принята к опубликованию 12.01.2016

Received 05.10.2016
Accepted 12.01.2016