

УДК 577.355.2

J-АГРЕГАТЫ АСТАКСАНТИНА, ЕГО МОНО- И ДИЭФИРОВ

Е.А. Куликов*, В.А. Туранова, С.В. Алешин, Р.Г. Васильев, А.А. Селищева

(Национальный исследовательский центр «Курчатовский Институт»; *e-mail: www.kulikov.e.a.93@mail.ru)

Оптимизированы условия получения агрегатов эфиров астаксантина и определены их физико-химические характеристики (размер, спектры поглощения) в зависимости от условий получения. Фракции моно- и диэфиров выделены методом колоночной хроматографии из смеси эфиров астаксантина. Впервые для получения агрегатов использована водная смесь метанола и тетрагидрофурана, благодаря чему удалось получить J-агрегаты моно- и диэфиров астаксантина, образование которых установлено методом спектрофотометрии. Обнаружено изменение положения равновесия в реакции мономер \leftrightarrow агрегаты при длительном хранении в течение месяца. Изучено действие ионной силы на образование J-агрегатов эфиров астаксантина.

Ключевые слова: моно- и диэфиры астаксантина, J-агрегаты, мономеры астаксантина, спектрофотометрия.

Известно, что каротиноиды могут образовывать в смеси воды и органического растворителя (спирта или ацетона) большие агрегаты, которые получили название супрамолекулярных комплексов [1]. Эти сведения, как правило, относятся к незамещенной форме каротиноидов, и только для зеаксантина показано образование J-агрегатов из его моно- и диэфиров [2]. В многочисленных работах для неэтерифицированной формы астаксантина (рис. 1), как и для других каротиноидов, были получены два типа комплексов (H и J), которые образуются в разных условиях [3–7]. Они различаются размерами, структурной организацией, спектрами поглощения и кругового дихроизма [8].

Агрегация каротиноидов происходит не только в искусственных системах, но является также важным фактором правильного функционирования фотосинтетического аппарата [9]. Изучение агрегации каротиноидов представляет большой интерес, поскольку в зависимости от типа агрегации меняются фотохимические свойства каро-

тиноидов, что может влиять на их стабильность и биодоступность. Было высказано предположение, что такие агрегаты могут образовываться либо в клетках микроводоросли, либо в фотосинтетическом аппарате, либо в липидном бислое [10].

Известно, что максимумы поглощения мономеров астаксантина и его эфиров располагаются в области 468–495 нм в зависимости от природы растворителя [5]. В растворах с высоким содержанием воды астаксантин образует H-агрегаты с гипсохромным смещением спектра поглощения (в область меньших длин волн), молекулы располагаются «голова-к-голове» параллельно друг другу в так называемой «card packed»-форме и удерживаются водородными связями; J-агрегаты образуются тоже в полярном растворителе, но с меньшим количеством воды. Они вызывают bathochromный сдвиг спектра поглощения (в область больших длин волн). В таком случае молекулы располагаются «голова-к-хвосту», поэтому принято считать, что водородные связи не участвуют в образовании J-агрегатов [11].

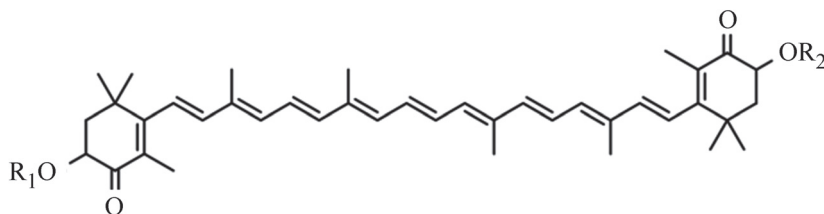


Рис. 1. Структурные формулы неэтерифицированной (незамещенной) формы астаксантина ($R_1 = H$, $R_2 = H$), его моно- (R_1 – остаток жирной кислоты, $R_2 = H$) и диэфиров (R_1 и R_2 – остаток жирной кислоты)

В литературе практически отсутствуют сведения об образовании агрегатов эфиром атаксантина (рис. 1), содержание которых в стрессированной клетке *Haematococcus pluvialis* достигает 80% от массы всех каротиноидов [12, 13].

Цель настоящей работы – получение J-агрегатов эфиром атаксантина и сопоставление их физико-химических характеристик (размера, спектров поглощения) с характеристиками агрегатов незэтерифицированной формы атаксантина.

Материалы и методы

Используемые реактивы. Атаксантин, эфиры атаксантина из *Haematococcus pluvialis*, гексан и метанол для ВЭЖХ, хлорид натрия («Sigma-Aldrich», США). Ацетон «х.ч.», тетрагидрофуран (ТГФ) «х.ч.» («Химмед», Россия). Деионизованную воду Milli-Q 18.2 MΩ·см получали с помощью очистительной системы «Millipore Integral 10».

Выделение и очистка моно- и диэфиров атаксантина. Выделение и очистку моно- и диэфиров атаксантина проводили методом

колоночной хроматографии на силикагеле 40–60 мкм («Merck», Германия) из препарата «Эфиры атаксантина из *Haematococcus pluvialis*» («Sigma-Aldrich», США). В качестве подвижной фазы использовали смесь растворителей гексана (А) и ацетона (Б) в режиме градиентного элюирования, начиная со 100% А и заканчивая смесью 85% А и 15% Б. Идентификацию каждого компонента проводили методом тонкослойной хроматографии (подвижная фаза – смесь гексана и ацетона в соотношении 3:1), спектры поглощения получали с использованием спектрофотометра «Varian UV-Vis Cary 50», Австралия. В составе эфиром основными жирными кислотами являются олеиновая, линолевая, линоленовая и гексадекатриеновая.

Получение J-агрегатов атаксантина и его эфиром. Атаксантин в незамещенной или этерифицированной форме растворяли в 100 мкл ТГФ с конечной концентрацией 50 мкг/мл. Полученный раствор смешивали с 300 мкл метанола (MeOH), а затем к образовавшейся смеси органических растворителей по каплям добавляли либо воду, либо

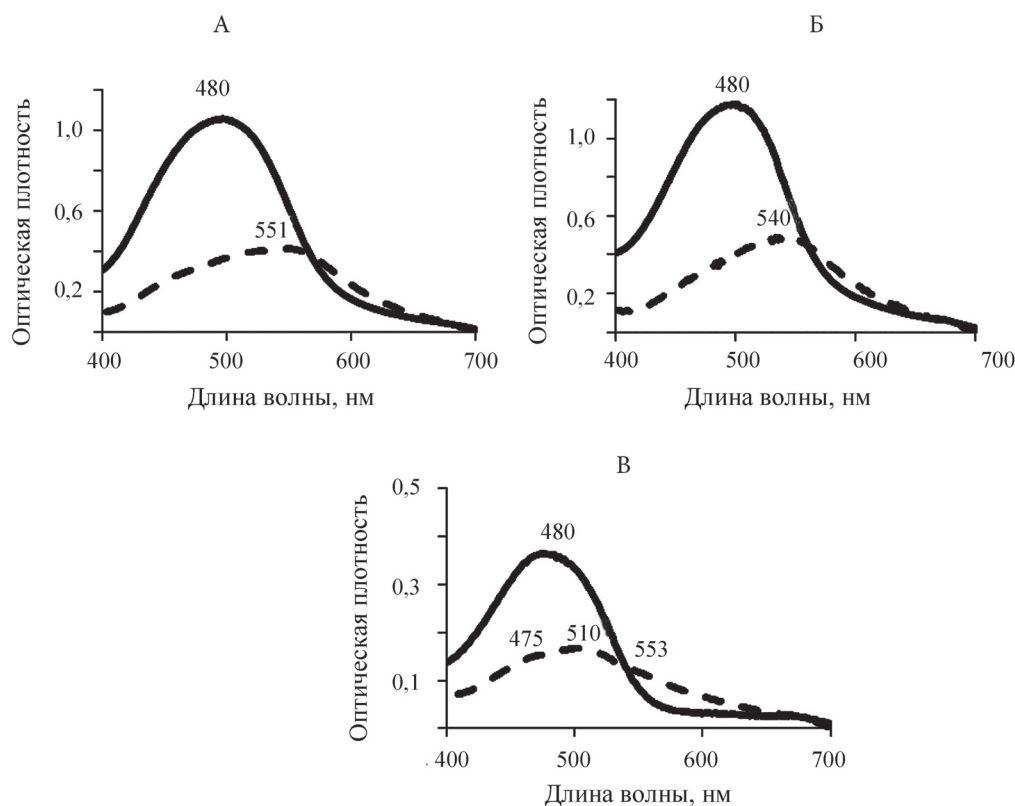


Рис. 2. Спектры поглощения растворов каротиноидов в ТГФ : MeOH : 0,7 М NaCl (1:3:10) (сплошная линия) и инкубированных в полной темноте при 25 °С в течение 1 ч (А, Б) и в течение 24 ч (В) (пунктирная линия); А – незамещенный атаксантин, Б – моноэфиры атаксантина, В – диэфиры атаксантина

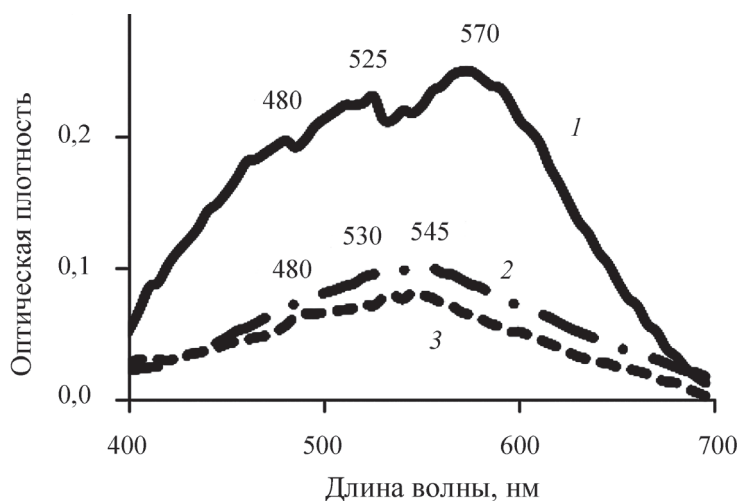


Рис. 3. Спектры поглощения образцов незамещенного астаксантина (1), его моно- (2) и диэфиров (3) в среде ТГФ : МеОН : 0,7 М NaCl (1:3:10) при их хранении в течение 40 дней (4 °С, в темноте)

водный раствор NaCl объемом 1000 мкл. Спектры поглощения полученных растворов регистрировали во времени.

Определение размеров частиц. Гидродинамический диаметр (d , нм) J-агрегатов определяли на приборе «Zetasizer Nano» («Malvern», Англия) методом динамического светорассеяния в режиме измерения «по размеру частиц». Использовали следующие условия: показатель преломления 1,590; показатель поглощения 0,01; температура кюветы 37 °С. Для каждого образца проводили четыре измерения.

Результаты и обсуждение

Спектрофотометрические характеристики J-агрегатов астаксантина и его эфиров. Обычно J-агрегаты астаксантина получают в водно-спиртовых растворах или в смеси воды с ацетоном. В нашей работе мы использовали смесь воды с тетрагидрофураном и метанолом. Астаксантин или его эфиры сначала растворяли в смеси ТГФ и МеОН (1:3). Максимум поглощения такого раствора находится при 480 нм, что свидетельствует о наличии мономеров в полученной смеси. Затем добавляли воду или 0,7 М NaCl. При дальнейшей инкубации интенсивность поглощения при 480 нм снижалась, а максимум спектра поглощения каротиноида смещался в область 510–610 нм, что, согласно литературным данным [4], свидетельствует об образовании J-агрегатов (рис. 2). В случае незамещенного астаксантина и его моноэфиров за 1 ч происходило смещение на 60–70 нм в область больших длин волн (рис. 2, А, Б). Стоит от-

метить, что образование J-агрегатов диэфиров астаксантина происходит значительно медленнее (рис. 2, В) и требует большего времени инкубации (24 ч). При хранении незамещенного астаксантина и его моноэфиров в течение 24 ч в темноте при 25 °С наблюдается сдвиг максимума поглощения более чем на 120 нм.

При длительном хранении полученного раствора незамещенного астаксантина в течение 40 дней при температуре 4 °С, кроме двух максимумов (525 и 570 нм), которые соответствуют J₁- и J₂-типам агрегатов [1], был также обнаружен максимум на 480 нм, свидетельствующий о присутствии мономерной формы в растворе (рис. 3). Для моно- и диэфиров астаксантина спектр поглощения оказался смещенным не так сильно – до 545 нм. Однако, если агрегаты незамещенного астаксантина продолжают находиться в растворенной форме с незначительным количеством осадка, то этерифицированный астаксантин со временем расслаивается, образуя масляную фазу на поверхности воды и стенках пробирок. Спустя 60 дней в водной фазе не было обнаружено астаксантина. Это свидетельствует о том, что J-агрегаты эфиров астаксантина коалесцируют и не могут долгое время существовать в водно-спиртовом растворе, а незамещенный астаксантин осаждается на дно пробирки.

На спектрах поглощения J-агрегатов эфиров астаксантина также наблюдается увеличение оптической плотности в коротковолновой области (200–400 нм), что связано с мутностью полученных растворов. Флуоресценции агрегатов, как и флуоресценции мономерной формы астаксантина не наблюдалось.

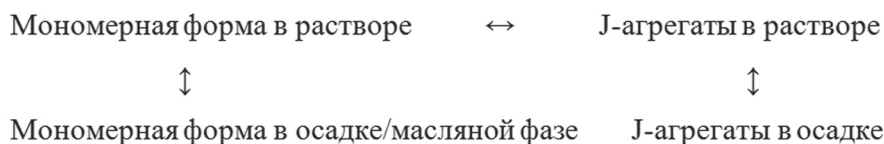


Рис. 4. Схема распределения мономерной и агрегированной форм астаксантина в растворе ТГФ : МеОН : H₂O (1:3:10)

При изучении влияния содержания ТГФ на скорость агрегации установлено, что увеличение доли ТГФ в водно-спиртовой смеси ТГФ : МеОН : 0,7 М NaCl с (1:3:10) до (2:3:10) приводит к росту скорости агрегации астаксантина и его эфиров. Однако одновременно с этим растет скорость осаждения/расслоения и увеличивается мутность растворов.

Согласно спектрам, представленным на рис. 2, образование агрегатов сопровождается значительным падением оптической плотности. Это может быть обусловлено: 1) образованием осадка в случае незамещенной формы или образованием масляной фазы, в случае эфиров; 2) изменением коэффициента экстинкции агрегатов по сравнению с мономерной формой (такие предположения неоднократно выдвигались в литературе [14]). В результате определения содержания астаксантина в осадке и в растворенном виде установлено, что при падении оптической плотности на 95% в виде осадка находится не более 20% астаксантина (данные не приводятся). Таким образом, эти результаты подтверждают высказанное ранее предположение о значительном падении коэффициента экстинкции астаксантина в составе агрегатов по сравнению с мономерной формой.

Приведенные результаты свидетельствуют о сложном характере поведения мономеров и агрегатов в системе, которое описывается схемой, представленной на рис. 4.

Можно предположить, что образующийся осадок содержит кристаллы астаксантина, у которых молекулы располагаются в виде J-агрегатов, поскольку группа исследователей показала [15] с помощью автоэмиссионного сканирующего электронного микроскопа, что осажденные из водно-ацетонового раствора кристаллы астаксантина содержат агрегаты.

Иную причину (деструкцию молекул астаксантина и его эфиров при длительном хранении) следует исключить, так как методами спектрофотометрии и тонкослойной хроматографии показано отсутствие продуктов распада в растворе, содержащем J-агрегаты. Также следует исклю-

чить деструкцию под действием света, поскольку образцы хранились в темноте.

Определение размеров J-агрегатов методом динамического рассеяния света. Образцы J-агрегатов астаксантина и его эфиров после инкубации в среде ТГФ : МеОН : 0,7 М NaCl (1:3:10) в течение 24 ч при 4 °С были проанализированы методом динамического рассеяния света для определения размеров образовавшихся в растворе частиц. Данные, полученные этим методом, представлены в таблице. Следует иметь в виду, что в случае применения метод определения по размеру частиц используют приближение, согласно которому все частицы сферические, хотя считается, что агрегаты могут иметь разнообразные формы [6]. Вместо оценки стабильности такой системы по индексу полидисперсности была выбрана оценка устойчивости с помощью показателя разброса (ПР), рассчитанного по формуле:

$$\text{ПР} = [D(v0,9) - D(v0,1)] / D(v0,5),$$

где $D(v0,9)$ – размер, меньше которого имеют 90% частиц, $D(v0,1)$ – размер, меньше которого имеют 10% частиц, $D(v0,5)$ – размер, меньше которого имеют 50% частиц (среднее распределение частиц по размерам). Если при длительном хранении разброс остается на прежнем уровне, считается, что система устойчива. Согласно данным таблицы, показатель разброса для неэтерифицированной формы астаксантина и его моноэфиров постоянен при хранении, что свидетельствует об устойчивости системы. Это не согласуется с данными по индексу полидисперсности, значение которого в случае незамещенного астаксантина и его моноэфира превышает 0,3, что означает неустойчивость системы.

Влияние ионной силы раствора на скорость агрегации. Исследовали влияние ионной силы на скорость образования J-агрегатов и их стабильность. Ионную силу раствора рассчитывали по закону Льюиса. В экспериментах использовали 1,45 и 0,7 М хлорид натрия или деионизованную воду, не содержащую натрия хлорид. Скорость образо-

**Размер J-агрегатов астаксантина и его эфиров при инкубации в среде ТГФ : MeOH : 0,7 M NaCl (1:3:10)
в течение 24 ч и 40 суток при 4 °С**

Форма каротиноида	Размер частиц, нм		Индекс полидисперсности		Разброс	
	24 ч	40 суток	24 ч	40 суток	24 ч	40 суток
Незамещенный астаксантин	400 ± 100	600 ± 200	0,534	0,766	0,569	0,654
Моноэфиры астаксантина	900 ± 100	600 ± 200	0,350	0,474	0,600	0,633
Диэфиры астаксантина	2500 ± 200	расслоение	0,070	–	0,632	–

вания агрегатов регистрировали, либо по оптической плотности раствора на 480 нм, где поглощает только мономерная форма, либо по сдвигу максимума поглощения в сторону больших длин волн, что характерно для образования агрегата. Оказалось, что во время инкубации незамещенного астаксантина при 25 °С в смеси ТГФ : MeOH : 0,7 M NaCl смещение максиму-

ма поглощения происходит значительно быстрее по сравнению с водно-спиртовой смесью, не содержащей соли (рис. 5, А). В случае моноэфиров агрегация протекает медленно в отсутствие хлорида натрия и останавливается в области 510 нм (рис. 5, А), а в присутствии соли этот процесс протекает практически так же хорошо, как и при использовании неэтерифицированной формы (рис. 5).

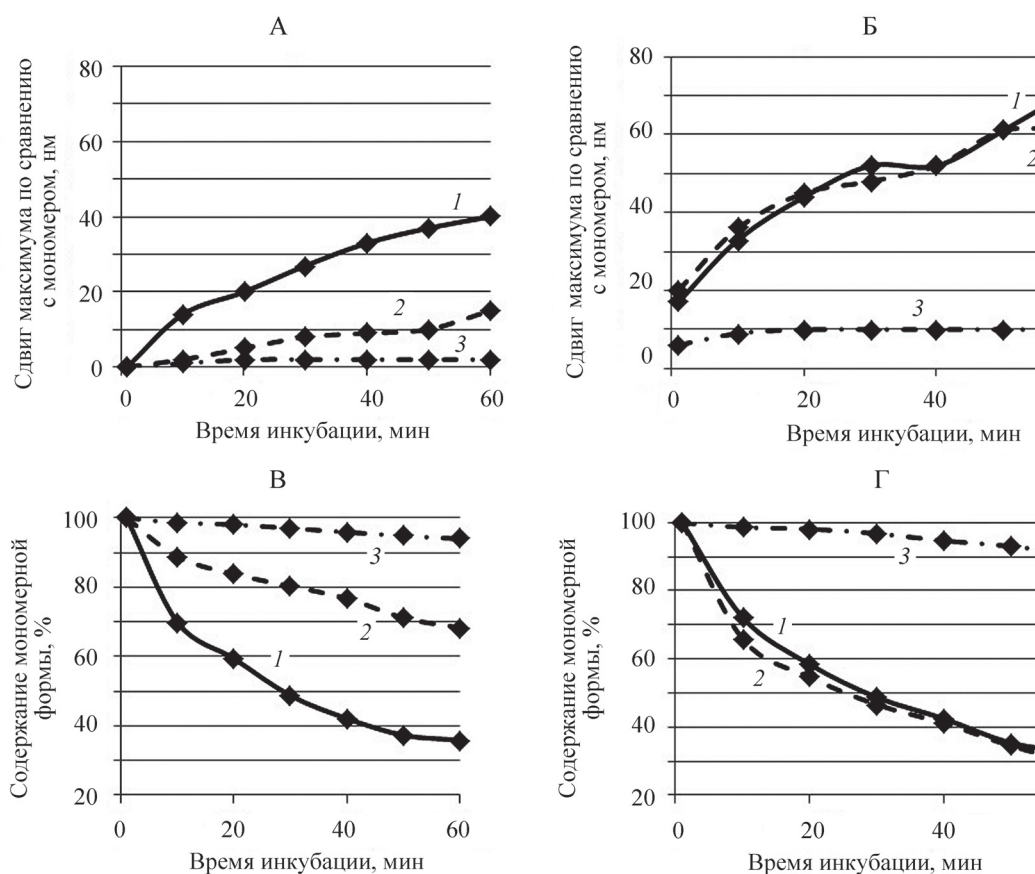


Рис. 5. Зависимость изменения положения максимума поглощения раствора по сравнению с мономерной формой (480 нм) (А, Б) и содержания мономерной формы (В, Г) от времени инкубации незамещенного астаксантина (1), его моноэфиров (2) и диэфиров (3) в растворе ТГФ : MeOH : H₂O (А, В) и в растворе ТГФ : MeOH : 0,7 M NaCl (Б, Г) при 25 °С

Иной оказалась ситуация с диэфирами астаксантина: в присутствии воды Milli-Q агрегация вовсе не протекала, а в присутствии 0,7 М NaCl спектр поглощения раствора начал смещаться в красную область, однако с гораздо более низкой скоростью, чем при использовании других форм (рис 5, А). Полноценные спектры J-агрегатов диэфиров астаксантина удалось увидеть лишь спустя 24 ч (рис. 2).

Из данных, представленных на рис. 5, можно сделать несколько выводов. Во-первых, в деионизированной воде агрегация протекает хуже при переходе от астаксантина к его моноэфиром и тем более к диэфирам. Во-вторых, добавление хлорида натрия способствует образованию агрегатов, а в случае диэфиров является необходимым условием для получения J-агрегатов. В отсутствие солей процесс агрегации моноэфиров останавливается в некоторой точке равновесия (490–515 нм), после чего происходит постепенное расслоение водной и масляной фаз. В третьих, падение оптической плотности не всегда связано с агрегацией, но образование агрегатов всегда приводит к падению оптической плотности.

Увеличение концентрации NaCl с 0,7 до 1,45 М приводит к тому, что максимум поглощения незамещенного астаксантина мгновенно смещается в область 520 и 550 нм, максимум поглощения моноэфиров – в область 495 и 520 нм, а раствор диэфиров становится мутным (данные не приводятся). В течение суток все три раствора полностью обесцвечиваются, астаксантин либо выпадает в осадок, либо образует масляную фазу (как в случае этерифицированных форм).

Таким образом, увеличение ионной силы значительно ускоряет процесс агрегации, но в то же время ухудшает стабильность полученных растворов, что приводит к быстрому падению оптической плотности.

Заключение

Основные усилия большинства исследователей были направлены на получение J- и H-агрегатов незамещенного астаксантина, в то время как относительно его моно- и диэфиров было высказано мнение, что они неспособны образовывать агрегаты в силу того, что ОН-группы полностью или частично замещены остатком жирной кислоты [16]. В то же время именно эфиры астаксантина накапливаются в клетках микроводоросли *Haematococcus pluvialis*, проникают в хлоропласты и встраиваются в мембраны. Для получения агрегатов эфиров астаксантина в настоящей работе впервые использована водная смесь органических

растворителей ТГФ : MeOH : H₂O / 0,7 М NaCl (1:3:10) и оптимизированы условия получения J-агрегатов моно- и диэфиров астаксантина. При изучении динамики их образования методом спектрофотометрии установлено, что скорость образования J-агрегатов значительно вырастает при повышении ионной силы среды, а это свидетельствует в пользу гидрофобных сил взаимодействия в агрегатах. Можно представить такое строение J-агрегатов, в которых остатки жирных кислот в ионовых кольцах одного ряда молекул каротиноида располагаются между полиеновыми цепями молекул каротиноида другого ряда за счет гидрофобного взаимодействия. Поскольку в клетках присутствует большое количество различных солей, в первую очередь ацетаты и хлориды, которые добавляют для увеличения накопления астаксантина и его эфиров, то можно предположить, что агрегаты также могут образовываться в клетке и оказывать влияние на ее фотохимические свойства.

Изучение динамики агрегации для незамещенного астаксантина в водно-органической смеси показало, что реакция проходит практически полностью, в то время как для моно- и диэфиров равновесие смещается в сторону агрегатов только в присутствии солей. На самом деле сложность этой динамической системы заключается еще и в том, что агрегаты моно- и диэфиров, которые, вероятно, из-за своей повышенной гидрофобности имеют малую растворимость в водно-метанольной смеси, образуют капли, которые коагелируются и образуют на поверхности отдельную фазу. Однако все эти рассуждения не опровергают сделанное для астаксантина заключение о том, что образующиеся агрегаты имеют значительно меньший коэффициент экстинкции, чем исходный мономер.

Методом спектрофотометрии показано изменение при длительном хранении равновесия между мономерной и агрегационной формами. J-агрегаты эфиров астаксантина медленно отслаиваются в масляную фазу до полного выхода из водной части, в то время как J-агрегаты незамещенного астаксантина способны дольше храниться в водно-органических смесях и медленно выпадать в осадок.

Авторы благодарят РЦ молекулярной и клеточной биологии и РЦ оптической микроскопии и спектроскопии в НИЦ «Курчатовский институт».

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках проекта № 19-54-04003.

Конфликта интересов нет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang C., Berg C.J., Hsu C.C., et al. // J. Physical Chemistry B. 2012. Vol. 116. N 35. P. 10617 (DOI: 10.1021/jp3069514).
2. Hempel J., Schädle C.N., Leptihn S., et al. // J. Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. 2016. Vol. 317. P. 161 (DOI: 10.1016/j.jphotochem.2015.10.024).
3. Köpsel C., Möltgen H., Schuch H., et al. // J. molecular structure. 2005. Vol. 750. N 1–3. P. 109 (DOI: 10.1016/j.molstruc.2005.02.038).
4. Giovannetti R., Alibabaei L., Pucciarelli F. // Spectrochimica Acta. Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2009. Vol. 73. N 1. P. 157 (DOI: 10.1016/j.saa.2009.02.017).
5. Buchwald M., Jencks W.P. // Biochemistry. 1968. Vol. 7. N 2. P. 834 (DOI: 10.1021/bi00842a042).
6. Lu L., Hu T., Xu Z., et al. // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2017. Vol. 185. P. 85–92 (DOI: 10.1016/j.saa.2017.05.031).
7. Fuciman M., Durchan M., Šlouf V. et al. // Chem. Phys. Lett. 2013. Vol. 568. N 21–25 (DOI: 10.1016/j.cplett.2013.03.009).
8. Dudek M., Zajac G., Kaczor A., Baranska M. // J. Phys. Chem. B. 2016. Vol. 120. N 32. P. 7807 (DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b05514).
9. Ruban A.V., Horton P., Young A.J. // J. Photochemistry and Photobiology B: Biology. 1993. Vol. 21. N 2–3. P. 229 (DOI: 10.1016/1011-1344(93)80188-F).
10. Pšenčík J., Arellano J.B., Collins A.M., et al. // J. bacteriology. 2013. Vol. 195. N 8. P. 1727 (DOI: 10.1128/JB.02052-12).
11. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. Carotenoids. Vol. 4: natural functions. Basel, Switzerland, 2008.
12. Denery J.R., Dragull K., Tang C.S., Li Q.X. // Analytica chimica acta. 2004. Vol. 501. N 2. P. 175 (DOI: 10.1016/j.aca.2003.09.026).
13. Boussiba S., Fan L., Vonshak, A. / Methods in enzymology. 1992. Vol. 213. P. 386 (DOI: 10.1016/0076-6879(92)13140-S).
14. Olsina, J., Durchan, M., Minofar, B. et al. // arxiv preprint arxiv:1208.4958. 2012.
15. Subramanian B., Tchoukanova N., Djaoued Y., et al. // J. Raman Spectroscopy. 2013. Vol. 44. N 2. P. 219 (DOI: 10.1002/jrs.4194).
16. Polyakov N.E., Magyar A., Kispert L.D. // J. Physical Chemistry B. 2013. Vol. 117. N 35. P. 10173 (DOI: 10.1021/jp4062708).

Поступила в редакцию 10.05.2020
Получена после доработки 12.05.2020
Принята к публикации 20.05.2020

J-AGGREGATES OF ASTAXANTHIN, ITS MONO- AND DIESTERS

E.A. Kulikov*, V.A. Turanova, S.V. Aleshin, R.G. Vasilov, A.A. Selishcheva

(National Research Center "Kurchatov Institute"; *e-mail: www.kulikov.e.a.93@mail.ru)

The conditions for the production of astaxanthin ester aggregates was optimized and their physicochemical characteristics (size, absorption spectra) depending on the conditions of preparation was determined. Mono and diester fractions were separated by column chromatography from astaxanthin esters mixture. For the first time, an aqueous mixture of methanol and tetrahydrofuran was used to obtain J-aggregates of astaxanthin mono- and diesters, which formation was established by spectrophotometry. A change in the equilibrium position in the reaction monomer \leftrightarrow aggregates was discovered during long-term storage for a month. The effect of ionic strength on the formation of astaxanthin esters J-aggregates was studied.

Key words: Mono- and diesters of astaxanthin, J-aggregates, astaxanthin monomers, spectrophotometry.

Сведения об авторах: Куликов Евгений Александрович – аспирант Национального исследовательского центра «Курчатовский Институт» (www.kulikov.e.a.93@mail.ru); Туранова Валерия Александровна – студентка Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева (lera.turanova.00@mail.ru); Аleshин Сергей Валерьевич – сотр. Национального исследовательского центра «Курчатовский Институт», канд. физ.-матем. наук (neos.1991@gmail.com); Вasilov Раиф Гаянович – профессор Национального исследовательского центра «Курчатовский Институт», докт. биол. наук (raifvasilov@mail.ru); Селищева Алла Анатольевна – сотр. биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (aselo@yandex.ru).