

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДЫ РАСТВОРИТЕЛЯ И ОСВЕЩЕНИЯ НА ИЗОМЕРИЗАЦИЮ И ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ ДЕСТРУКЦИЮ АСТАКСАНТИНА

© 2020 г. Е.А. Куликов*, И.С. Куликова*, Р.Г. Васильев*, А.А. Селищева*, **

*Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123182, Москва, пл. Академика Курчатова, 1

**Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1

E-mail: www.kulikov.e.a.93@mail.ru

Поступила в редакцию 29.11.2019 г.

После доработки 29.11.2019 г.

Принята к публикации 17.02.2020 г.

Астаксантин и его эфиры, относящиеся ко «вторичным» каротиноидам, синтезируются при действии стресса в клетках *Haematococcus pluvialis*, которые из вегетативного состояния переходят в состояние гематоцист. Стрессовые факторы могут влиять не только на скорость и направление синтеза, но и на конформационные изменения в молекуле пигментов, вызывая переход *trans*-изомеров в *cis*-изомеры. Целью данного исследования является оценка эффективности действия разных факторов (полярности среды и света) на процесс изомеризации *trans*-изомеров в *cis*-изомеры астаксантина. При изучении действия этих факторов на процесс образования 9-*cis*- и 13-*cis*-изомеров из растворов *all-trans*-астаксантина при 50°C показали, что растворители средней полярности более эффективно стабилизируют *cis*-изомеры, чем сильно полярные, в то время как аполярные растворители не способствуют стабилизации *cis*-изомеров. Наличие π -связей в молекуле растворителя также положительно сказывается на процессе изомеризации. При изучении влияния показателя преломления различных растворителей на поляризуемость астаксантина выявили разные зависимости для полярных и аполярных растворителей. Предположили, что растворители средней полярности облегчают процесс *trans-cis*-изомеризации астаксантина благодаря снижению энергии крутильного момента и стабилизации молекулы в *cis*-конформации за счет снижения отталкивания диполей метильных групп в полиеновой цепи и иононовом кольце. Облучение светом растворов астаксантина при 25°C приводило к большему образованию *cis*-изомеров в начальный период времени (четыре часа) по сравнению с облучением в течение шести и более часов. При более длительном освещении происходил распад астаксантина с образованием продуктов деструкции и окисления.

Ключевые слова: астаксантин, *trans*- и *cis*-изомеры, полярность, показатель преломления, метод ВЭЖХ.

DOI: 10.31857/S0006302920030102

Астаксантин относится к ксантофиллам и содержит две гидроксильные и две карбонильные группы в молекуле. Как и другие каротиноиды, астаксантин имеет длинную полиеновую углеводную цепь, поэтому молекула может существовать в виде большого количества геометрических (рис. 1) и оптических изомеров. В природе астаксантин представлен в основном *all-trans*-изомером, когда углеводные при всех двойных связях располагаются в *trans*-положении относительно друг друга. В то же время *cis*-изомеры астаксантина могут накапливаться в телах животных, напри-

мер, в человеческой крови до 30% от всего астаксантина может приходится на долю *cis*-изомеров [1]. Также известно, что *cis*-изомеры лучше сорбируются плазмой крови, чем *all-trans*-изомеры [2]. Как и другие представители каротиноидов, астаксантин обладает антиоксидантными свойствами [3, 4], причем известно, что *cis*-изомеры обладают более высокой антиоксидантной активностью [5], а значит, могут оказывать более высокий антиоксидантный эффект на весь организм.

Было показано, что реакция изомеризации обратима [6], поэтому менее стабильные *cis*-изомеры со временем переходят в свою более устойчивую *all-trans*-конфигурацию. Известно, что

Сокращение: ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография.

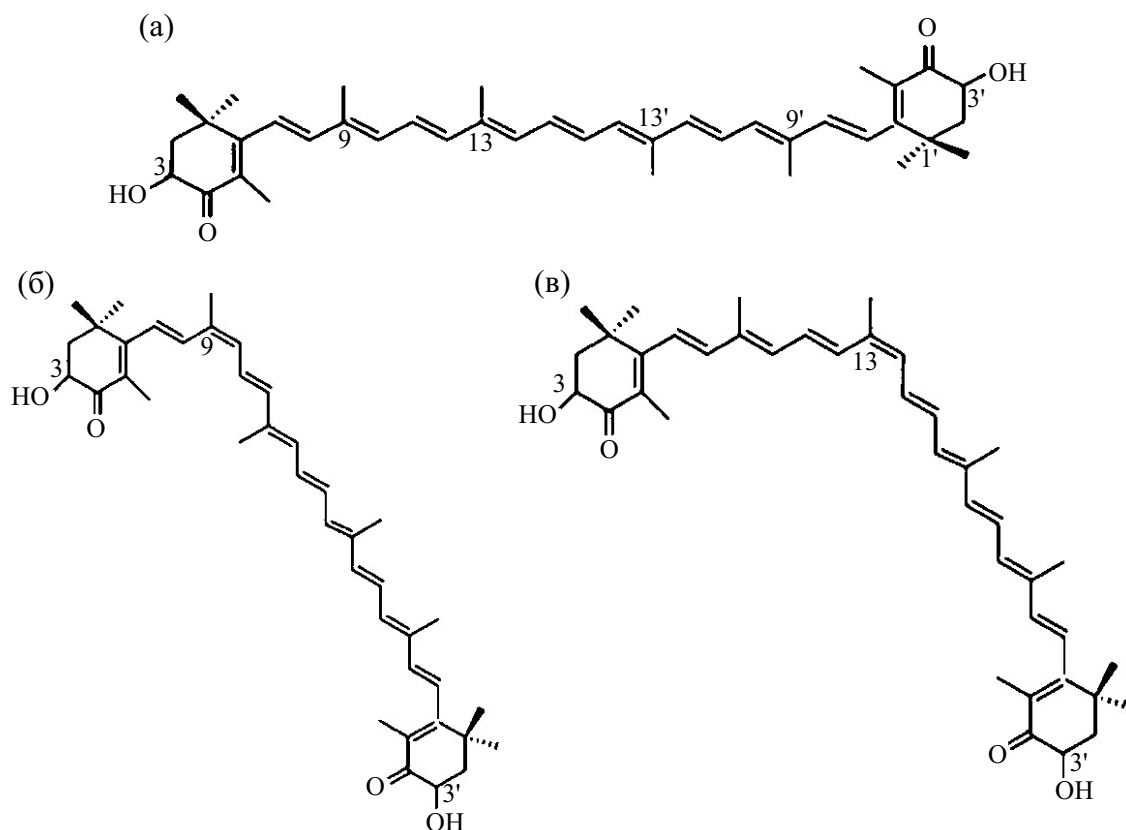


Рис. 1. Геометрические изомеры астаксантина: (а) – *all-trans*-изомер, (б) – *9Z*-изомер, (в) – *13Z*-изомер.

изомеризация астаксантина активируется под действием многих факторов: растворителей, температуры, ионов металлов, рН реакционной среды [6–9]. Несмотря на многочисленность исследований, небольшое число используемых растворителей не позволило сформулировать закономерности процесса. Кроме того, практически отсутствуют систематические исследования по влиянию света на процесс изомеризации, хотя астаксантин и его эфиры синтезируются микроводорослями именно под действием интенсивного облучения, что делает необходимым исследования такого типа. Ранее было показано, что интенсивное освещение эфиров астаксантина вызывает окислительную деструкцию и образование апо- и эпокси-производных астаксантина [10, 11]. На примере других каротиноидов, например зеаксантина, было показано, что свет вызывает изомеризацию каротиноидов [12].

Целью данного исследования является оценка эффективности действия разных факторов (полярности среды, строения молекулы растворителя и влияние света) на процесс изомеризации *trans*-изомеров в *cis*-изомеры астаксантина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Используемые реактивы. В работе были использованы астаксантин, гексан для ВЭЖХ, ацетонитрил для ВЭЖХ, метанол для ВЭЖХ, этилацетат для ВЭЖХ (все – производства компании Sigma-Aldrich, США); ацетон, хлороформ, дихлорметан, тетрахлорметан, толуол, бензол, бутанол-1, тетрагидрофуран, диметилсульфоксид, изопропанол, этанол, пиридин, диоксан (все – квалификации «х.ч.», производства компании «Химмед», Россия). Деионизованную воду с удельным сопротивлением 18.2 МОм/см получали с помощью очистительной системы Milli-Q Integral 10 (Millipore, США).

Идентификация *all-trans*- и *cis*-изомеров астаксантина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-детекцией и детекцией в видимой области. Разделение изомеров свободного астаксантина оценивали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на жидкостном хроматографе Agilent 1200 series (Agilent Technologies, США) с диодноматричным детектором на обратно-фазовой колонке Eclipse XDB-C18 (250×4.6 мм, размер частиц 5 мкм). Детекцию осуществляли при длине волны 480 нм. В качестве подвижной фазы использовали систему: MeOH : CH₂Cl₂ : CH₃CN : H₂O – 82.5 : 5 : 5.5 : 7.

Режим – изократический на протяжении всего анализа, скорость потока 800 мкл/мин, объем вводимой пробы 40 мкл, температура 30°C.

ВЭЖХ с масс-детекцией проводили в режиме положительных ионов в диапазоне масс-ионов 0–1000 m/z .

Образование *cis*-изомеров астаксантина в присутствии органических растворителей при 50°C. Стоковый раствор свободного астаксантина в метаноле (0,01 мг/мл) объемом 1,5 мл разделяли на 15 образцов по 100 мкл и упаривали на концентраторе. Упаренный образец растворяли в 1,5 мл органического растворителя и инкубировали в термостате при постоянной температуре 50°C в полной темноте в течение 4 ч. Детектировали содержание образовавшихся *cis*-изомеров методом ВЭЖХ каждый час.

Все пробы, вводимые в хроматографическую колонку, были растворены в метаноле. Для расчета концентраций *all-trans*-, 9-*cis*- и 13-*cis*-изомеров в исследуемых образцах использовали соответственно коэффициенты экстинкции 125000 л/(моль · см), 247660 л/(моль · см) и 190512 л/(моль · см) [13].

Образование *cis*-изомеров и деструкция астаксантина под действием синего света при температуре 25°C. Стоковый раствор свободного астаксантина в метаноле (0,01 мг/мл) объемом 2 мл разделяли на два образца по 1 мл. Контрольный образец находился без доступа света в холодильнике (5°C) на протяжении четырех суток, опытный образец освещали синим спектром излучения (450–500 нм) с интенсивностью 500 мкмоль · м⁻² · с⁻¹ при комнатной температуре (25°C) в течение четырех суток. На спектрофотометре UV-Vis Cary 50 (Varian, США) раз в сутки измеряли оптическую плотность исследуемых растворов, а процесс изомеризации *trans* → *cis* изучали методом ВЭЖХ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Зависимость спектра поглощения раствора астаксантина от полярности растворителя. При исследовании спектров поглощения астаксантина в органических растворителях отметили, что происходит сдвиг максимума поглощения для астаксантина от 478 нм к 490 нм, при переходе от растворителей с меньшим показателем преломления n (ацетон, метанол) к растворителям с большим значением (пиридин, бензол, ДМСО) (табл. 1). Эти результаты хорошо согласуются с литературными данными [14], поскольку энергетический переход электронов на S_2 очень чувствителен к n .

Корреляция между максимумом поглощения хромофора в растворителе и показателем преломления этого растворителя выражается уравнением [15]:

$$\Delta\nu(\text{см}^{-1}) = -5.5 \times 10^4 \times \Delta\alpha \times M_{\text{W}}^{-1} \times \frac{(n^2 - 1)}{(n^2 + 2)},$$

где $\Delta\alpha$ – разница между поляризуемостью в возбужденном и основном состоянии, M_{W} – молекулярная масса, n – показатель преломления среды, $\Delta\nu$ – дисперсионный сдвиг растворителя.

Используя собственные и литературные данные, мы получили линейную зависимость максимума поглощения астаксантина в см⁻¹ (ν) от показателя преломления (n) растворителя:

$$\nu = \nu_0 + p \cdot f(n^2),$$

где ν_0 – значение максимума поглощения хромофора в состоянии вакуума, p – наклон кривой.

На рис. 2 изображены полученные зависимости для астаксантина в различных растворителях, разбитых на две группы: полярные ($\epsilon > 1.15n^2$) и неполярные ($\epsilon \leq 1.15n^2$) [16], где ϵ – диэлектрическая проницаемость среды.

Как видно из представленного рисунка, данные по зависимости для полярных и неполярных растворителей отличаются показателем ν_0 , которые равны соответственно 23.799 и 22.964 для неполярных и полярных растворителей и углом наклона p (–11.383 против –8.847).

При разделении всех растворителей на две группы – неполярные и полярные, согласно критерию $\epsilon > 1.15n^2$ для полярных и $\epsilon \leq 1.15n^2$ для неполярных – коэффициент корреляции оказался выше (–0.9596 и –0.9742), чем при объединении всех растворителей в одну группу (–0.941), что видно из табл. 2.

Это означает, что взаимодействие между молекулой астаксантина и растворителем различается в растворителях разной полярности, поэтому необходимо рассматривать его поведение отдельно в двух группах. Вероятно, такая зависимость связана с тем фактором, что при поглощении энергии молекула хромофора становится диполем, который по-разному взаимодействует с неполярными и полярными растворителями [17].

Идентификация *all-trans*- и *cis*-изомеров астаксантина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с детекцией в видимой области и масс-детектором. Как уже отмечалось выше, *all-trans*-изомеры астаксантина способны при повышении температуры или при облучении образовывать *cis*-изомеры. Идентификация *all-trans*- и *cis*-изомеров проводилась методом ВЭЖХ по известной методике [6]. Для анализа использовался раствор астаксантина в метаноле, содержащий 10% *cis*-изомеров. Он был получен инкубацией метанольного раствора астаксантина в течение 4 ч при 50°C. На рис. 3 представлена хромато-

Таблица 1. Физико-химические параметры органических растворителей

| № точки | Растворитель | $\nu_{\text{act}} \cdot 10^3$, см ⁻¹ | n | $\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2}$ | ϵ | μ , Дебай | Число неподеленных электронных пар | Число π -связей |
|-------------------------|---------------------------------|---|-------|---------------------------|------------|---------------|------------------------------------|---------------------|
| Неполярные растворители | | | | | | | | |
| 1 | н-Гексан* | 21.19 | 1.365 | 0.223 | 1.88 | 0.00 | 0 | 0 |
| 2 | Петролейный эфир* | 21.1416 | 1.428 | 0.257 | 1.88 | 0.00 | 0 | 0 |
| 3 | Циклогексан* | 20.92 | 1.429 | 0.258 | 2.02 | 0.00 | 0 | 0 |
| 4 | Диоксан | 20.75 | 1.42 | 0.253 | 2.21 | 0.00 | 4 | 0 |
| 5 | Тетрахлорметан | 20.62 | 1.46 | 0.274 | 2.24 | 0.00 | 12 | 0 |
| 6 | Бензол | 20.49 | 1.501 | 0.295 | 2.23 | 0.00 | 0 | 3 |
| 7 | Толуол* | 20.408 | 1.497 | 0.293 | 2.378 | 0.37 | 0 | 3 |
| 8 | CS ₂ * | 19.76 | 1.624 | 0.353 | 2.64 | 0.00 | 4 | 2 |
| Полярные растворители | | | | | | | | |
| 9 | Метанол | 21.14 | 1.329 | 0.203 | 32.66 | 1.71 | 2 | 0 |
| 10 | Ацетонитрил | 21.1 | 1.345 | 0.212 | 38.00 | 3.94 | 1 | 2 |
| 11 | Ацетон | 21.05 | 1.359 | 0.220 | 20.70 | 2.85 | 2 | 1 |
| 12 | EtAc | 21.05 | 1.37 | 0.226 | 27.8 | 1.78 | 4 | 1 |
| 13 | Этанол | 21.01 | 1.362 | 0.222 | 24.55 | 1.68 | 2 | 0 |
| 14 | Изо-пропанол | 20.92 | 1.384 | 0.234 | 18.30 | 1.68 | 2 | 0 |
| 15 | Бутанол-1 | 20.92 | 1.40 | 0.242 | 17.80 | 1.68 | 2 | 0 |
| 16 | Дихлорметан | 20.58 | 1.424 | 0.255 | 9.08 | 1.55 | 6 | 0 |
| 17 | Хлороформ | 20.45 | 1.446 | 0.267 | 4.72 | 1.06 | 9 | 0 |
| 18 | Пиридин | 20.33 | 1.509 | 0.299 | 12.3 | 2.20 | 1 | 3 |
| 19 | ДМСО | 20.33 | 1.479 | 0.284 | 46.45 | 3.96 | 4 | 2 |
| 20 | Бензиловый спирт | 20.32 | 1,54 | 0.315 | 13.0 | 1.71 | 2 | 3 |
| 21 | Хлорбензол* | 20.28 | 1.525 | 0.306 | 5.61 | 1.69 | 3 | 3 |
| 22 | Иодметан* | 20.16 | 1.53 | 0.309 | 7.0 | 1.64 | 3 | 0 |
| 23 | Этиловый эфир коричной кислоты* | 20.16 | 1.56 | 0.323 | 6.1 | 2.14 | 4 | 5 |

Примечание. Знаком * помечены данные из работы [14]; ν_{act} – положение максимума поглощения, выраженное в см⁻¹.

Таблица 2. Значения основных параметров уравнения $\nu = \nu_0 + p \cdot f(n^2)$ для растворов астаксантина

| Растворители | ν_0 | $-p$, см ⁻¹ | Коэффициент корреляции r |
|--------------------------|---------|-------------------------|----------------------------|
| Неполярные | 23.799 | 11.383 | -0.9596 |
| Полярные | 22.964 | 8.847 | -0.9742 |
| Сумма всех растворителей | 23.161 | 9.4423 | -0.941 |

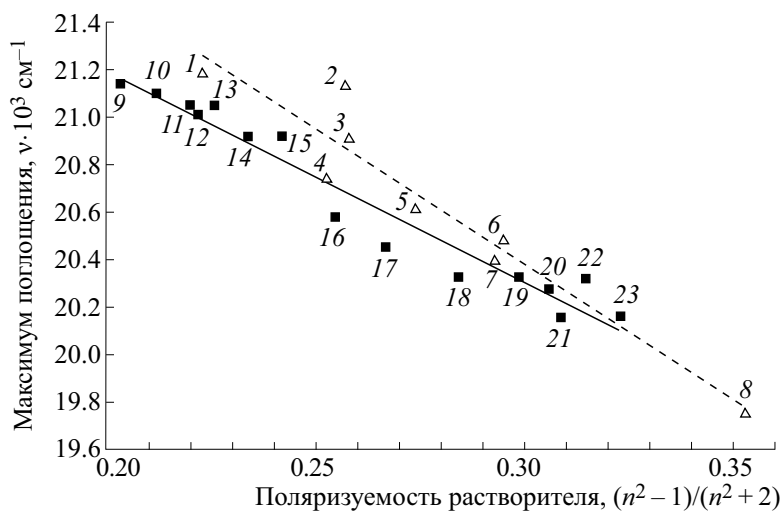


Рис. 2. Зависимости максимумов поглощения растворов астаксантина в различных органических растворителях от поляризуемости растворителя. Точки на рисунке соответствуют номерам в табл. 1. Обозначения: треугольники – неполярные растворители, пунктирная линия – тренд для неполярных растворителей; квадраты – полярные растворители, сплошная линия – тренд для полярных растворителей.

грамма данного образца. Как видно из рисунка, смесь изомеров удалось разделить на четыре пика, каждый пик соответствует определенному изомеру (*all-trans* – пик 1, *9-cis* – пик 3, *13-cis* – пик 4). Пик 2 идентифицировать не удалось.

Для качественного подтверждения изомеров для каждого пика были сняты спектры в видимой области (рис. 4). Как видно из рис. 4а, максимум поглощения для пика 1 соответствует известным значениям *all-trans*-изомера и равен 480 нм [6]. Спектр поглощения пика 2 аналогичен пику 1, но, поскольку в 100%-м чистом *all-trans*-изомере он не наблюдается, был сделан вывод, что пик 2

соответствует неизвестному нам изомеру (рис. 4б). Пики 3 и 4 были идентифицированы как *9-cis*- (рис. 4в) и *13-cis*-изомеры (рис. 4г) соответственно по характерному сдвигу максимума поглощения в область меньших длин волн (для *13-cis*-изомера – 468 нм, для *9-cis*-изомера – 472 нм), а также по появлению второго максимума поглощения для *13-cis*-изомера (370 нм).

Методом масс-спектрометрии установили, что пики 1–4 имеют один и тот же масс-ион, равный 597.3, что соответствует свободной форме астаксантина. Это подтверждает вывод о том, что

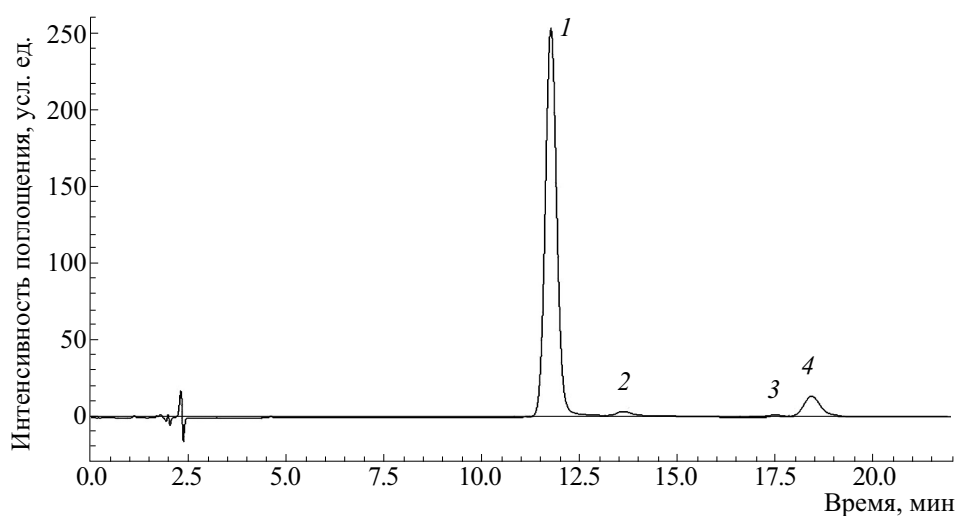


Рис. 3. Хроматограмма раствора астаксантина в метаноле, содержащего 10% *cis*-изомеров: 1 – *all-trans*-астаксантин, 2 – неизвестный *cis*-астаксантин, 3 – *9-cis*-астаксантин, 4 – *13-cis*-астаксантин.

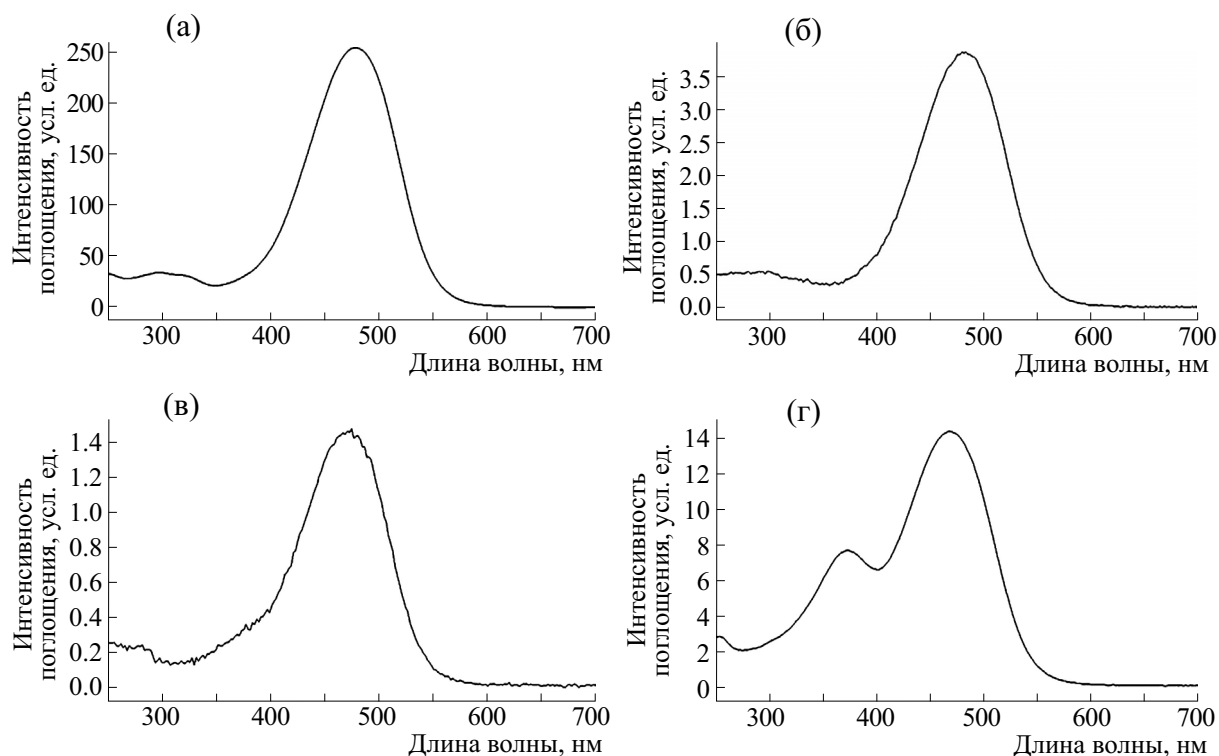


Рис. 4. Спектры поглощения пиков 1–4 хроматограммы, представленной на рис. 3: (а) – *all-trans*-астаксантин, (б) – неизвестный изомер астаксантина, (в) – *9-cis*-астаксантин, (г) – *13-cis*-астаксантин.

пики 1–4 являются изомерами одного и того же вещества.

Образование *cis*-изомеров астаксантина в присутствии органических растворителей при 50°C. Далее исследовали процесс изомеризации *all-trans*-астаксантина при 50°C в течение 4 ч в растворе четырнадцати органических растворителей, отличающихся друг от друга показателем преломления, диэлектрической проницаемостью, дипольным моментом и количеством неподеленных электронных пар и π -связей (табл. 1). Дополнительно для некоторых растворителей на рис. 5 приведены структурные формулы, на кото-

рых изображены электронные облака неподеленных электронных пар и волнистыми линиями – π -связи. Температура 50°C была выбрана потому, что скорость изомеризации растет с повышением температуры [7], однако параллельно с этим протекает и термическая деструкция астаксантина: при значениях выше 50°C его молекула начинает разрушаться.

Предварительно исследовали состояние кристаллического астаксантина при нагревании до 50°C в течение 4 ч, при котором не наблюдалось появления *cis*-изомеров. В отличие от кристаллического состояния, растворенный астаксантин

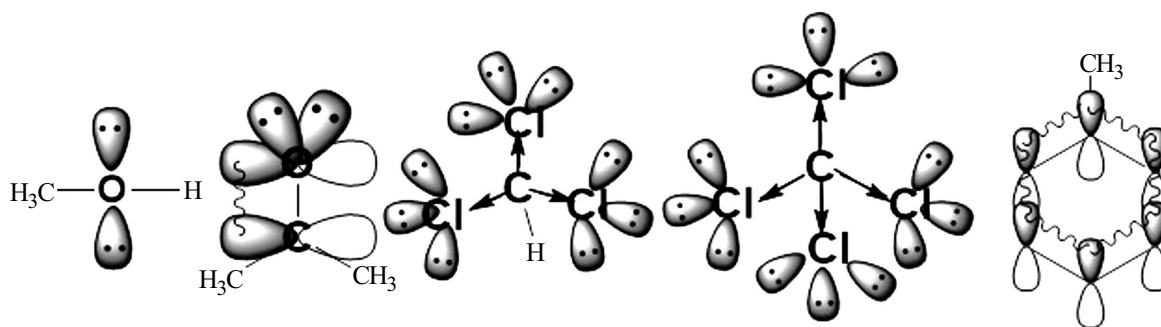


Рис. 5. Примеры структур некоторых растворителей (слева направо: метанол, ацетон, хлороформ, тетрахлорэтан, толуол).

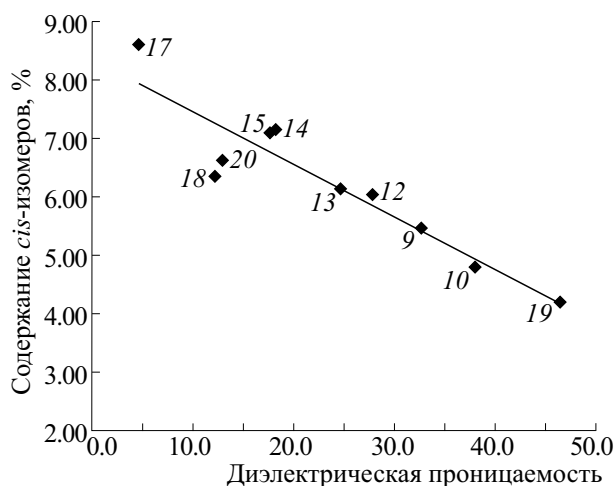


Рис. 6. Зависимость содержания *cis*-изомеров астаксантина в анализируемой пробе от диэлектрической проницаемости растворителя при инкубации в течение 4 ч при 50°C. Нумерация образцов соответствует нумерации в табл. 1. Коэффициент корреляции $r = -0.97$.

подвергается изомеризации, но в каждом растворителе содержание *cis*-изомеров различается между собой.

Итак, процесс изомеризации происходит только в растворе, причем эффект стабилизации растворителями отличается для полярных и неполярных растворителей. Поэтому далее проанализировали наличие корреляции между накоплением *cis*-изомеров в реакционной среде после инкубации при 50°C и диэлектрической проницаемостью растворителя отдельно для полярных растворителей. Точки на рисунке 6 соответствуют среднему значению после трех повторов и указаны согласно порядковому номеру растворителя в таблице 1. Оказалось, что зависимость между этими показателями имеет достаточно высокий коэффициент корреляции, который составил $r = -0.97$.

Стоит отметить, что при проведении эксперимента в ацетоне значительно уменьшилась ин-

тенсивность как *all-trans*-изомера, так и *cis*-изомеров, что объясняется деструкцией молекулы. Это предположение подтверждается появлением продуктов распада в образце, поглощающих в области 200–250 нм. Поскольку в других используемых нами растворителях не наблюдается подобной деструкции астаксантина, зависимость содержания *cis*-изомеров от ϵ изучалась без учета ацетона и не была учтена при расчете коэффициента корреляции.

Поскольку в ходе изомеризации образуются сразу несколько *cis*-изомеров (преимущественно 9-*cis*- и 13-*cis*-изомеры), то для правильного отражения эффекта растворителя на стабильность изомеров использовалась их сумма. Этот момент имеет большое значение, поскольку в некоторых растворителях (например, в диметилсульфоксиде и ацетонитриле) содержание 9-*cis*-изомера равняется 0.3%, а в ацетоне – достигает почти 3%.

Образование *cis*-изомеров и деструкция астаксантина под действием синего света при температуре 25°C. Другим фактором для инициации процесса изомеризации стало облучение синим светом ($\lambda = 450\text{--}500$ нм). Свет именно такого диапазона был выбран потому, что максимум поглощения астаксантина в большинстве органических растворителей попадает в эту область. Метанол был выбран в качестве растворителя для данного анализа, поскольку способствует стабилизации *cis*-изомеров, не вызывает деструкции астаксантина и устойчив к облучению в отличие от, например, хлороформа, в котором астаксантин обесцвечивался всего за несколько часов облучения.

Метанольный раствор астаксантина непрерывно облучался в течение четырех суток синим светом при комнатной температуре (25°C). Методом ВЭЖХ каждый час изучали состав облученного образца, усредненные результаты по трем повторам представлены в табл. 3. Как можно видеть из представленных данных, содержание изомеров при облучении в течение первых пяти часов резко увеличивалось, а затем выходило на

Таблица 3. Зависимость содержания *cis*-изомеров в метанольном образце астаксантина от времени облучения

| Изомеры астаксантина | Время облучения, ч | | | | | | | | | | | |
|---|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 24 | 48 | 72 | 96 |
| Содержание изомеров в зависимости от времени облучения, % | | | | | | | | | | | | |
| <i>All-trans</i> - | 100 | 89.46 | 89.78 | 90.65 | 90.65 | 91.71 | 91.56 | 89.64 | 88.53 | 87.86 | 86.23 | 85.75 |
| 9- <i>cis</i> - | 0 | 0.31 | 0.55 | 0.67 | 0.85 | 1.15 | 1.09 | 1.13 | 1.14 | 1.17 | 1.2 | 1.21 |
| 13- <i>cis</i> - | 0 | 1.71 | 2.44 | 2.87 | 3.04 | 3.04 | 3.90 | 2.76 | 2.60 | 2.53 | 2.27 | 2.08 |

Примечание. Значения усреднены по трем опытам.

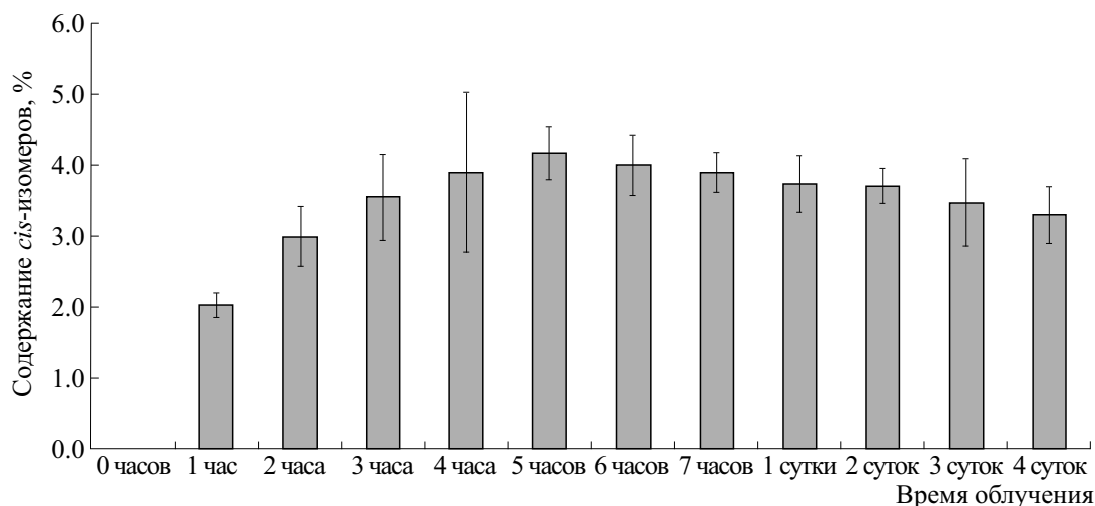


Рис. 7. Суммарное содержание *cis*-изомеров астаксантина в образце в зависимости от времени его облучения.

плато, и начинало снижаться. После облучения в течение семи часов было обнаружено достоверное падение содержания 13-*cis*-изомеров, и следующее измерение было проведено на 24-й час с момента облучения, а затем измерялось каждые 24 часа. Как видно из табл. 3, содержание 13-*cis*-изомеров продолжало уменьшаться до конца эксперимента. Исходя из этого, можно сделать вывод, что при длительном облучении происходит разрушение молекулы астаксантина.

Суммарное содержание обоих *cis*-изомеров повторяет динамику содержания 13-*cis*-изомера (рис. 7).

Концентрация *all-trans*-астаксантина начинает падать уже после первого часа, это означает, что астаксантин медленно разрушается под действием света. Продукты деградации видны на спектрах поглощения облученных растворов (рис. 8). Рост оптической плотности в синей области является подтверждением того, что полиеновая цепь разрушилась до более коротких продуктов распада (апо- и эпокси-соединения). Увеличение поглощения в области 250–260 нм соответствует максимуму поглощения апо-9-астаксантинона [11]. Полученные данные говорят о том, что при облучении светом в течение четырех часов уже образуется этот продукт деградации.

ОБСУЖДЕНИЕ

Зависимость электронного переноса $S_0 \rightarrow S_2$ от структуры каротиноида. Ранее в работе [18] была продемонстрирована систематическая зависимость измеренного времени жизни состояния S_1 от длины конъюгации для толуольных растворов β -каротина.

Подобную зависимость можно наблюдать и для максимума поглощения растворов каротиноидов. Однако в случае каротиноидов эта зависимость отличается от других хромофоров за счет иононового кольца, а также карбонильных групп, которые также оказываются сопряженными с главной цепью. Для учета сопряженных связей в концевых циклах принято использовать показатель N_{eff} [19], который равняется $0.3N$ по сравнению с обычным сопряжением. Такое значение связано с уменьшением перекрытия *p*-орбиталей для сопряженных двойных связей полиеновой цепи и кольца, расположенного вне плоскости цепи из-за стерических факторов. Хотя конъюгированный концевой цикл вносит вклад в длину цепи конъюгации, он расширяет ее на эквивалент только 0.3 связи C=C.

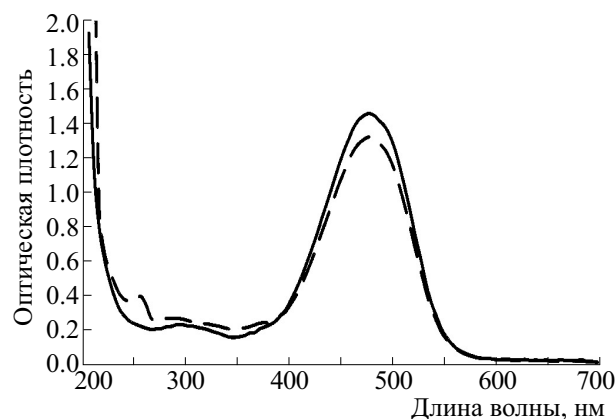


Рис. 8. Спектры поглощения раствора астаксантина в метаноле до облучения (сплошная линия) и после облучения в течение 4 ч (прерывистая линия).

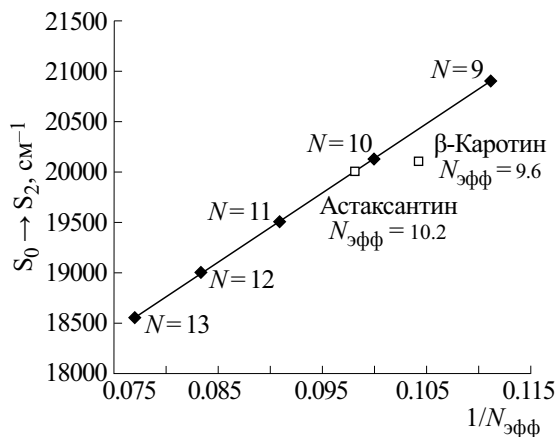


Рис. 9. Зависимость электронного переноса $S_0 \rightarrow S_2, \text{ cm}^{-1}$ от обратного числа сопряженных двойных связей (N) для линейных каротиноидов в гексане [19].

Таким образом, с учетом всех двойных связей астаксантина, получается, что молекула содержит девять С=С-связей полиеновой цепи, две С=C- и две С=О-связи в ионновом кольце. С учетом этого $N_{\text{эфф}} = 9.0 + 0.6 + 0.6 = 10.2$. Это значение полностью соответствует зависимости максимума поглощения от длины сопряжения (рис. 9). На рис. 9 добавлены собственные данные к имеющимся в работе [19].

Стабилизация органическими растворителями *cis*-изомеров астаксантина. При пространственном рассмотрении строения *cis*-изомеров астаксантина (рис. 10) видно, что метильные группы при пятом и тринадцатом атомах углерода, которые образуют диполи с зарядом δ^+ , при определенном изгибе молекулы могут быть расположены близко друг к другу, из-за чего возникают сильные электронные отталкивания.

Это отталкивание особенно важно для 9-*cis*-изомера, поскольку при повороте молекулы вокруг двойной С9=С10 связи метильная группа при С13 оказывается близко расположена по отношению к метильной группе при С5. Таким об-

разом, возникающее диполь-дипольное отталкивание положительно заряженных метильных групп вызывают вращающий момент, благодаря чему *cis*-изомер стремится вернуться в исходное *all-trans* состояние. Этого взаимодействия не наблюдается для 13-*cis*-изомера, поскольку метильная группа при С13 и С13' располагается с другой стороны полиеновой цепи. Этим объясняется тот факт, что содержание 13-*cis*-изомера значительно выше, чем 9-*cis*-изомера.

Известно, что для инициации процесса изомеризации необходимо преодолеть энергетический барьер для крутильных колебаний вокруг двойной связи. Чтобы преодолеть этот барьер, молекулу астаксантина облучают светом. В таком случае образуется радикальный аддукт, а двойная связь по свойствам становится близка к одинарной, атомы углерода находятся в sp^3 -гибридизации, благодаря чему появляется способность к вращению вокруг центральной связи. При поглощении энергии в виде света или тепла электроны переходят в возбужденное состояние $\pi \rightarrow \pi^*$. Если не происходит флуоресценции, то энергия возбужденного электрона может переходить в колебательную и вращательную энергию. Вращение вокруг центральной связи может стать таким, что возбужденные *cis-trans*-состояния могут переходить друг в друга. Поскольку энергия возбужденного состояния *cis*-изомера выше, чем возбужденного *trans*-изомера, то молекула больше времени находится в виде *cis*-изомера.

При использовании растворителей с примерно одинаковой диэлектрической проницаемостью (точки 4–6), содержание *cis*-изомеров астаксантина выше в том растворителе, который содержит сопряженную π -электронную систему (бензол). Мы предполагаем, что π -электроны растворителя взаимодействуют с возбужденными π^* -электронами подвергающейся изомеризации двойной связи. В результате такого взаимодействия происходит стабилизация *cis*-изомера (рис. 11).

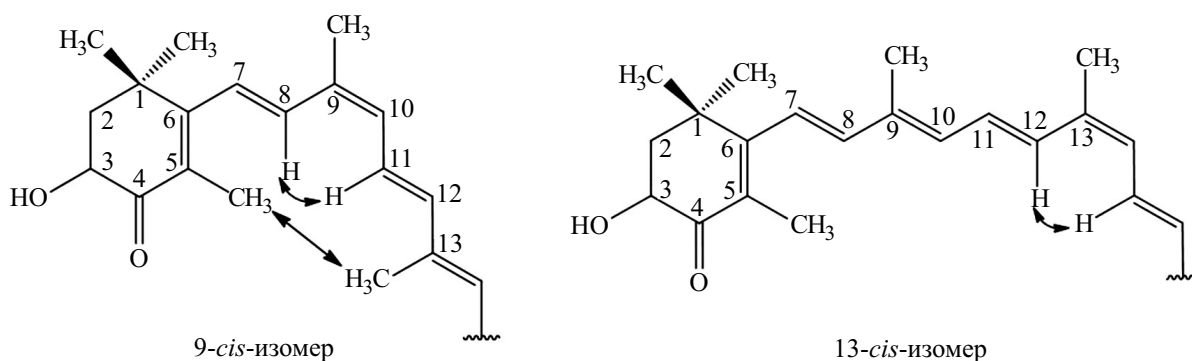


Рис. 10. Структура *cis*-изомеров астаксантина.

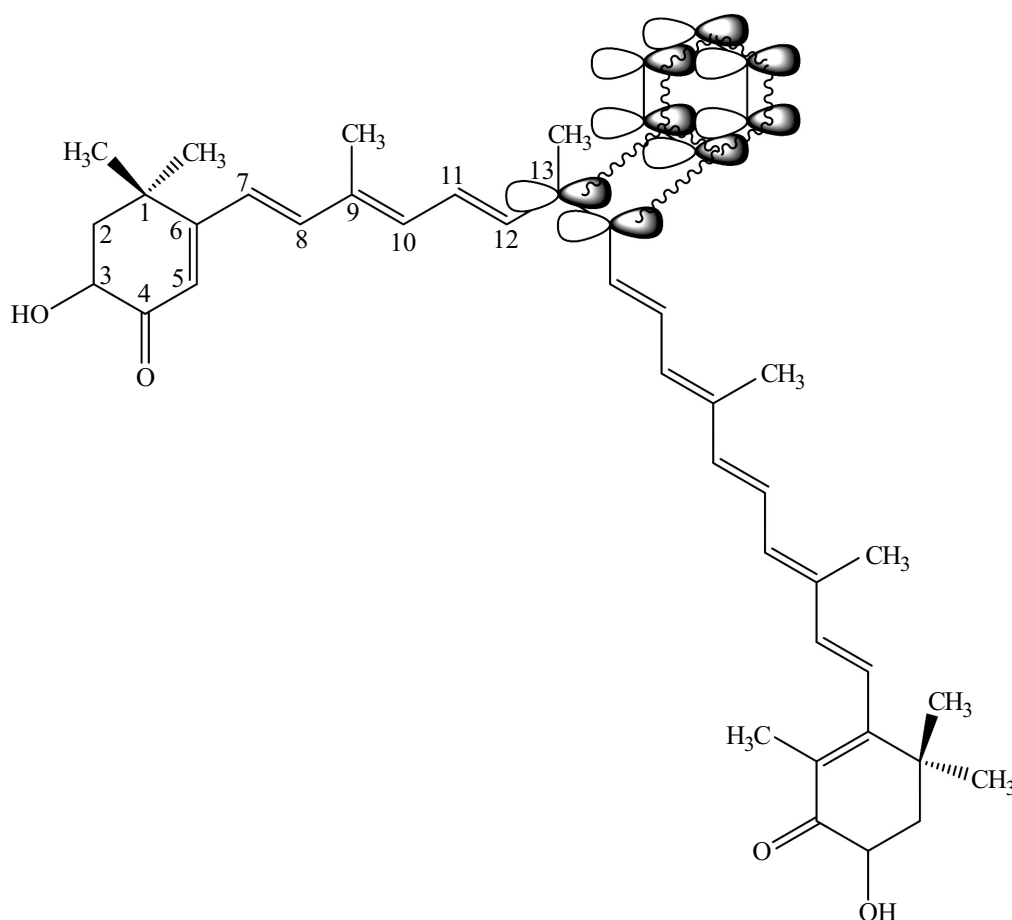


Рис. 11. Стабилизация *cis*-изомера астаксантина растворителем с π -системой на примере бензола. Волнистой линией указаны π -связи в бензоле и их сопряжение с π -электронами астаксантина в месте протекания изомеризации.

Также наблюдается определенная зависимость содержания *cis*-изомеров от диэлектрической проницаемости растворителя. В неполярных растворителях *cis*-изомеров значительно меньше, чем в полярных. Вероятно, это связано с отсутствием диполь-дипольных взаимодействий между астаксантином, который после возбуждения получает дипольный момент, и неполярным растворителем, не имеющим дипольный момент (для растворителей $4-6 \mu = 0$). В полярных же растворителях содержание *cis*-изомеров оказалось выше, причем с увеличением полярности это значение линейно падает. Это означает, что процесс изомеризации в очень полярных и очень неполярных растворителях протекает хуже, чем в растворителях со средней полярностью.

Как видно из представленных данных, *cis*-изомеры в небольших количествах присутствуют во всех растворителях. Чтобы проверить, как будет происходить изомеризация без влияния окружающей среды, были проведены опыты на кристаллах астаксантина, которые облучали либо подвергали термической обработке при $T = 50^\circ\text{C}$ в течение четырех часов. После их растворения в

метаноле методом ВЭЖХ было показано, что как первые, так и вторые образцы не содержат *cis*-изомеров. Это означает, что изомеризация не протекает (либо протекает очень медленно) в кристаллическом виде, т.е. растворитель выполняет роль стабилизатора в процессе изомеризации.

Можно предположить, что молекулы растворителя взаимодействуют с диполями метильных групп астаксантина при сопряженной полиеновой цепи. Кроме того, в случае 9-*cis*-изомера молекулы растворителя взаимодействуют с C5- и C13-метильными группами и снимают напряжение, благодаря чему в растворе появляется стерически затрудненный 9-*cis*-изомер. Также, судя по всему, растворитель взаимодействует с делокализованными π -электронами астаксантина, стабилизируя радикальный аддукт, благодаря чему появляется больше времени для вращения вокруг центральной связи. По всей видимости, если в растворителе присутствует π -система, то она дополнительно стабилизирует *cis*-изомеры.

Процесс фотоизомеризации и деструкции астаксантина. При длительном облучении астаксантина светом с длиной волны в диапазоне 450–500 нм, что соответствует максимальному перекрытию с областью поглощения молекулы, наблюдается рост *cis*-изомеров астаксантина. Стоит заметить, что содержание образующихся изомеров резко увеличивается в первые два часа, а затем это значение растет очень медленно (рис. 7). На пятом часу облучения было зафиксировано самое высокое значение для суммы 9-*cis*- и 13-*cis*-изомеров. После пятого часа содержание *cis*-изомеров начинает уменьшаться.

Подобную зависимость можно объяснить тем фактором, что в растворе протекают одновременно две реакции: фотоизомеризация астаксантина (*trans*→*cis*) и разрушение его молекулы. В первые часы скорость реакции фотоизомеризации очень высока, а деструкция практически не происходит, поскольку астаксантин дезактивирует образующиеся свободные радикалы, поэтому мы наблюдаем рост *cis*-изомеров. Затем скорость первой реакции начинает падать, в то же время антиоксидантная активность астаксантина начинается снижаться. Чем дольше происходит облучение, тем быстрее деградируют молекулы астаксантина, а после пятого часа скорость реакции разрушения становится выше скорости реакции фотоизомеризации. Эти выводы подтверждает и тот факт, что концентрация *all-trans*-астаксантина начинает падать уже после первого часа, в то время как наблюдается увеличение поглощения в области 250–260 нм, что соответствует максимуму поглощения апо-9-астаксантинона [11]. Рост оптической плотности в синей области является подтверждением того, что полиеновая цепь разрушилась до более коротких продуктов распада (апо- и эпоксисоединения).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Был изучен процесс фотоизомеризации астаксантина, а также изомеризации при нагревании до 50°C в присутствии различных органических растворителей. Показано, что растворители стабилизируют *cis*-изомеры астаксантина, причем в растворителях со значением диэлектрической проницаемости от 4 до 30 процесс изомеризации протекает лучше, чем в сильнополярных и неполярных. Растворители с сопряженной π-электронной системой также увеличивают содержание *cis*-изомеров. В кристаллическом состоянии астаксантин не образует *cis*-изомеров ни при нагревании, ни при облучении. В случае фотоизомеризации протекают два процесса: образование *cis*-изомеров и деструкция молекулы. Показано, что после пяти часов облучения синим светом скорость реакции разрушения становится выше

скорости образования *cis*-изомеров, поэтому их содержание начинает снижаться.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Источник финансирования: НИР согласно Приказу № 1363 от 25 июня 2019 г. по НИЦ «Курчатовский институт».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. G. N. Coral-Hinostroza, T. Ytrestoyl, B. Ruyter, and B. Bjerken, *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicology & Pharmacology* **139** (1-3), 99 (2004).
2. M. Osterlie, B. Bjerken, and S. Liaaen-Jensen, *J. Nutritional Biochem.* **11** (10), 482 (2000).
3. Y. M. Naguib, *J. Agricult. Food Chem.* **48** (4), 1150 (2000).
4. M. Kobayashi, T. Kakizono, N. Nishio, et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48** (3), 351 (1997).
5. X. Liu and T. Osawa, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **357** (1), 187 (2007).
6. J. P. Yuan and F. Chen, *J. Agricult. Food Chem.* **47** (9), 3656 (1999).
7. Food chemistry J. P. Yuan and F. Chen, *Food Chem.* **73** (2), 131 (2001).
8. J. Lerfall and S. Birkeland, *Int. J. Food Sci. Tech.* **49**, 294 (2014).
9. S. Yang, Q. Zhou, L. Yang, et al., *J. Oleo Sci.* **64** (3), 243 (2015).
10. W. J. De Bruijn, Y. Weesepeel, J. P. Vincken, and H. Gruppen, *Food Chem.* **194**, 1108 (2016).
11. Y. Weesepeel, H. Gruppen, W. de Bruijn, and J. P. Vincken, *J. Agricult. Food Chem.* **62** (42), 10254 (2014).
12. J. Milanowska and W. I. Gruszecki, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **80** (3), 178 (2005).
13. L. Zhao, F. Chen, G. Zhao, et al., *J. Agricult. Food Chem.* **53** (24), 9620 (2005).
14. M. Buchwald and W. P. Jencks, *Biochemistry* **7** (2), 834 (1968).
15. Н. Г. Бахшиев, О. П. Гирин и И. В. Питерская, *Оптика и спектроскопия* **16** (5), 821 (1964).
16. I. Renge and E. Sild, *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* **218** (1), 156 (2011).

17. Г. Г. Мартинович, Л. А. Сазанов и С. Н. Черенкович, *Клеточная биоэнергетика: Физико-химические и молекулярные основы: Учебное пособие* (ЛЕНАНД, М., 2017).
18. M. R. Wasielewski and L. D. Kispert, *Chem. Phys. Lett.* **128** (3), 238 (1986).
19. M. J. Llansola-Portoles, A. A. Pascal, and B. Robert, *J. Roy. Soc. Interface* **14** (135), 20170504 (2017).

Effects of Solvent Nature and Light on Isomerization and Oxidative Destruction of Astaxanthin

E.A. Kulikov*, I.S. Kulikova*, R.G. Vasilov*, and A.A. Selishcheva*, **

*National Research Center "Kurchatov Institute", pl. Akademika Kurchatova, Moscow, 123182 Russia

**Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, Moscow, 119991 Russia

Astaxanthin and its esters are referred to as "secondary" carotenoids and synthesized under stress conditions in the cells of *Haematococcus pluvialis*, transformed from vegetative cells to hematocysts. Stress factors can affect not only the rate and direction of synthesis, but also the conformational changes in the pigment molecule, that cause *trans*-isomers to convert to *cis*-isomers. The aim of this study is to assess the efficiency of different factors (medium polarity and light) which have impact on the process of *trans-cis* astaxanthin isomerization. While studying the effect of these factors on the formation of 9-*cis*- and 13-*cis*-isomers from all-*trans* astaxanthin solutions at 50°C, it was shown that medium polarity solvents more effectively stabilize *cis*-isomers than highly polar solvents. Apolar solvents do not contribute to stabilization of *cis*-isomers. The presence of π -bonds in the solvent molecule also has a positive effect on the isomerization process. When studying the effects of the refractive index of different solvents on polarizability of astaxanthin, there were differences in the dependencies for polar and apolar solvents. Solvents of medium polarity were supposed to facilitate the process of *trans-cis* astaxanthin isomerization due to a reduction in the energy of the rotating moment and stabilization of the *cis*-conformation molecule as a result of reduced dipole-dipole repulsion force between methyl groups in the polyene chain and ionone ring. Exposure of astaxanthin solutions to light at 25°C induced formation of *cis*-isomers the quantity of which was higher within the first 4 hours of exposure as compared to that after exposure for 6 and more hours. Exposure of astaxanthin to irradiance for longer period caused the decay of astaxanthin and the formation of degradation and oxidation products.

Keywords: astaxanthin, trans- and cis-isomers, polarity, refractive index, HPLC method