



## ХИМИЯ

УДК 615.074:577.16:547.917

### НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ СИНТЕЗА КОМПЛЕКСОВ ВКЛЮЧЕНИЯ $\beta$ -ЦИКЛОДЕКСТРИНА И ЭФИРОВ КАРОТИНОИДОВ<sup>1</sup>

**М.С.Лапшова,  
Е.В.Захаренко,  
В.И.Дейнека, Л.А.Дейнека,  
Р.Н.Саенко, М.Ю.Третьяков**

Белгородский государственный  
национальный  
исследовательский  
университет, Россия, 308015,  
Белгород, ул. Победы, 85

E-mail: [deineka@bsu.edu.ru](mailto:deineka@bsu.edu.ru)

В работе обсуждается метод получения супрамолекулярных комплексов «гость-хозяин»  $\beta$ -циклодекстрина (ЦД) с эфирами ксантофиллов (ЭК) смешиванием растворов индивидуальных компонентов – ЦД в воде и ЭК в ацетоне. В качестве молекул «гостей» использованы практически важные смеси диэфиров ксантофиллов, образованные насыщенными высшими жирными кислотами. Особенность такого типа «гостей» вытекает из специфики комплексообразования между  $\beta$ -циклодекстрином и *n*-гексаном: полость молекулы «хозяина» может захватить радикалы кислот соседних молекул, в идеале образуя бесконечные цепи. Показаны возможности использования оптической и электронной микроскопии для анализа строения полученных комплексов. Приведены данные по сохранности лиофильно высушенных комплексов эфиров ксантофиллов из экстракта лепестков цветков бархатцев и коробочек физалиса декоративного.

Ключевые слова: комплексы включения;  $\beta$ -циклодекстрин, эфиры ксантофиллов, *Tagetes*, *Physalis*, оптическая микроскопия, сканирующая электронная микроскопия.

#### Введение

В двух патентах США [1, 2] утверждается, что перевод ряда каротиноидов (ликопина, лютеина и зеаксантина) в комплексы включения с циклодекстринами (ЦД):  $\alpha$ -циклодекстрином ( $\alpha$ -ЦД),  $\beta$ -циклодекстрином ( $\beta$ -ЦД),  $\gamma$ -циклодекстрином ( $\gamma$ -ЦД) и с гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрином (HP- $\beta$ -ЦД), – позволяет существенно увеличить степень усвоения каротиноидов в опытах *in vitro*. Поэтому был предложен улучшенный метод получения таких комплексов, который включает следующие стадии: 1) получение комплексов включения; 2) лиофилизация полученного комплекса; диспергирование высушенного комплекса в смеси лецитина с растительным маслом для получения желатиновых капсул. Комплексы включения могут быть образованы в широком диапазоне соотношения компонентов (циклодекстрин : каротиноид) – от 0.5:1 до 10:1, причем опытами *in vivo* подтверждено лучшее усвоение лютеина по сравнению с композицией без циклодекстрина. Комплекс включения лютеина с  $\gamma$ -циклодекстрином (в соотношении 1:2) получали гомогенизацией водной суспензии при комнатной температуре в течение 1 – 3 ч; образование комплекса контролируется по изменению вязкости смеси. Лиофильно высушенный продукт представлял собой оранжевый порошок, содержащий 20% лютеина с выходом по каротиноиду 95%, в то время как потери по технологии высушивания распылением составляли порядка 50%). Для получения комплексов включения лютеина с  $\alpha$ -,  $\beta$ - и HP- $\beta$ -циклодекстринами перед гомогенизацией перемешивали компоненты вначале с небольшой добавкой органического растворителя (0.1 % ацетона или этанола) или полимера типа карбоксиметилцеллюлозы (0.1 ÷ 0.2 %) для солюбилизации одного из компонентов.

Задача настоящей работы – разработка методов получения комплексов включения  $\beta$ -ЦД с эфирами (диэфирами) ксантофиллов обусловлена тем, что ксантофиллы именно в виде эфиров накапливаются в растительном материале [3, 4], а омыление в некотором смысле излишне, поскольку биоусвоение ксантофиллов не зависит от степени их этерификации [5].

#### Объекты и методы исследования

В работе использовали  $\beta$ -циклодекстрин (Китай), дистиллированную воду, ацетон ч.д.а. (ЭКОС-1) и *n*-гексан ч.д.а. (Компонент-Реактив). Каротиноиды экстрагировали из лепестков цветков бархатцев и из чашечек физалиса.

<sup>1</sup> Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ «Государственное задание вузу на 2012 г, проект 3.1785.2011 г.

Образцы комплексов включения отделяли от маточного раствора центрифугированием (Электрон-М, 2700 об/мин, 10 мин.) и лиофильно высушивали на установке LABCONCO FreeZone 2.5.

Электронные спектры записывали на спектрофотометре СФ-56 в кварцевых или стеклянных кюветах. Лиофильно высушенные образцы комплексов исследовали при помощи оптической спектроскопии (микроскоп МИКМЕД-5), и электронной микроскопии – приборы HITACHI SU1510 и растрового ион-электронного микроскопа Quanta 200 3D (ЦКП НИУ БелГУ).

### Результаты и их обсуждение

Комплексы включения каротинов и неацилированных ксантофиллов с ЦД обстоятельно исследованы, например, в работах Полякова Н.Е. [6], и новая информация по этому вопросу вряд ли может быть получена. Однако следует учесть, что многие ксантофиллы накапливаются в растениях в этерифицированном состоянии, причем по нашим наблюдениям, чем выше степень этерификации, тем выше уровень накопления каротиноидов. При этом комплексообразование диэфиров ксантофиллов должно существенно отличаться от комплексообразования самих ксантофиллов, хотя бы вследствие принципиального различия строения обоих концов молекул.

При добавлении практически не смешиваемого с водой *n*-гексана (Гк) в водный раствор  $\beta$ -циклодекстрина легко образуется золь, при стоянии медленно (за сутки) расслаивающийся с образованием более тяжелого, чем вода геля белого цвета, легко переходящего в золь при встряхивании (рис. 1).

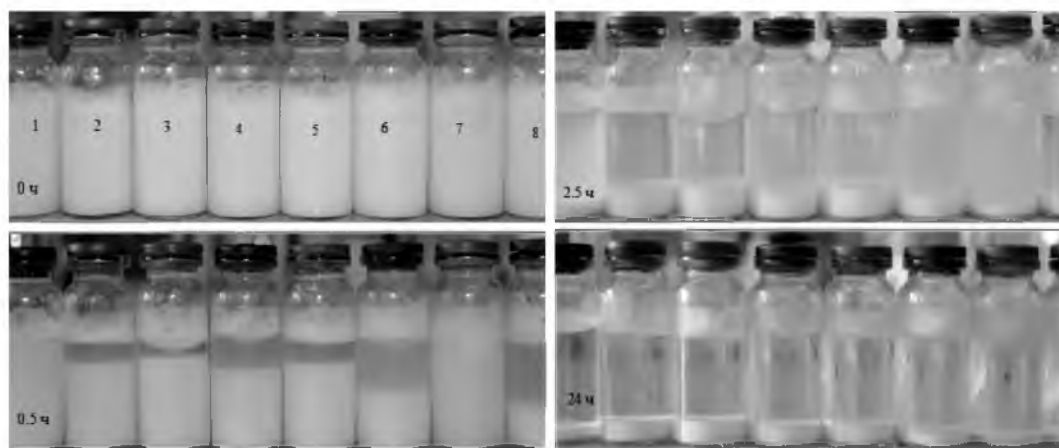


Рис. 1. Коллоидные системы вода –  $\beta$ -циклодекстрин – *n*-гексан

Устойчивая дисперсная система при этом возникает в широком диапазоне исследованных мольных соотношений Гк:ЦД – от минимального 1:1 до 40:1. И хотя в полости одной молекулы  $\beta$ ЦД может разместиться два углеводородных радикала [7], но для 40 молекул Гк места, очевидно, недостаточно, т.е. по мере увеличения указанного соотношения мицеллы, образованные с участием ЦД могут «обрастать» несвязанными полостью ЦД молекулами углеводорода. Отметим, что при сильном встряхивании коллоидной системой захватывается воздух, образуя устойчивую пену. На рис.1 показано изменение коллоидных систем вода –  $\beta$ -циклодекстрин – *n*-гексан, в которых изменялся только один параметр – количество введенного в систему *n*-гексана, табл.

Таблица

Состав смеси коллоидных систем вода –  $\beta$ -циклодекстрин – *n*-гексан

Номер образца	1	2	3	4	5	6	7	8
Объем воды, мл	10	10	10	10	10	10	10	10
<i>N</i> ( <i>n</i> -гексан), ммоль	0.208	0.417	0.625	0.833	1.667	2.500	4.167	5.833
<i>N</i> ( $\beta$ -циклодекстрин), ммоль	0.132	0.132	0.132	0.132	0.132	0.132	0.132	0.132
<i>N</i> (Гк): <i>N</i> ( $\beta$ ЦД)	1.58	3.16	4.74	6.31	12.6	18.9	31.6	44.2

В образце №1 (соотношение *N*(Гк) : *N*( $\beta$ ЦД) = 1.58) были получены высокодисперсные частицы комплексов включения; при росте числа моль *n*-гексана наблюдаются нелинейные изменения в скорости седиментации частиц образовавшихся комплексов и в объемах седиментации, что свидетельствует о перестройках структуры ассоциатов.

Эти факты позволяют предположить, что возможно образование комплексов включения эфиров (моно- и диэфиров) ксантофиллов с  $\beta$ -циклодекстрином за счет внедрения в полость молекулы «хозяина» ацильных радикалов.

Известные методы синтеза комплексов включения используют растворимость, по крайней мере, одного из компонентов в некотором растворителе. Понятно, что более эффективным будет метод, в котором смешиваются два истинных раствора – «гостя» и «хозяина».

Диэфиры ксантофиллов обладают существенно более высокой гидрофобностью по сравнению с неэтерифицированными ксантофиллами, поэтому могут растворяться только в неполярных растворителях из которых выбрали смешиваемый с водой ацетон. Смешивание с водой довольно важно, поскольку циклодекстрины растворимы в воде и не растворимы в органических растворителях. Следовательно, смешивание водного раствора циклодекстрина и ацетонового раствора каротиноидов можно рассматривать как идеальную модель для получения комплексов включения из «мономерного» состояния каждого из компонентов. При этом возможны два различных способа смешивания.

По первому из них к раствору  $\beta$ ЦД в воде добавляют раствор эфиров ксантофиллов в ацетоне. Можно рассчитывать на то, что при постепенном добавлении небольшого количества ацетона скорость кристаллизации  $\beta$ ЦД может быть невысокой и не должна образовывать гетерофазы  $\beta$ ЦД без включения каротиноидов в полость «хозяина». С другой стороны эфиры ксантофиллов при этом не будут выделяться в гетерофазу, поскольку способны образовывать ассоциаты [7].

По второму варианту смешивания к ацетоновому раствору каротиноидов добавляют водный раствор  $\beta$ ЦД. При этом должна резко упасть растворимость  $\beta$ ЦД при некотором снижении растворимости каротиноидов, но высокая концентрация ацетона, который также может конкурировать за заполнения полости «хозяина» не будет способствовать образованию комплекса, поэтому такой вариант смешивания может быть менее эффективным.

При добавлении ацетона (как с растворенными в нем каротиноидами, так и без них) в 0.01 М раствор  $\beta$ ЦД в воде до объемного соотношения 1:1 осадок образуется медленно и в небольших количествах, а для больших объемов добавленного ацетона рост массы влажного осадка, отделенного центрифугированием, представлен на рис. 2.

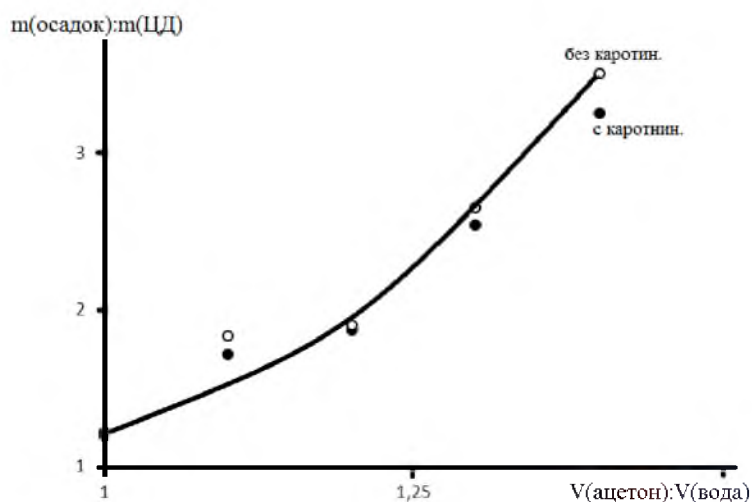


Рис. 2. Осадки комплексов включения при различном соотношении вода: ацетон

Масса осадка при этом превышает массу растворенного в воде ЦД, что может соответствовать сильной гидратации углевода водой (избыток ацетона удаляли выветриванием до отсутствия запаха). Любопытно, но при очевидной неравновесности условий проведения процесса массы осадков оказались очень близкими для двух опытов – с растворенными каротиноидами и без них.

Полученные образцы комплексов были лиофильно высушены и оставлены на хранение в морозильной камере бытового холодильника в пластиковой (негерметичной) таре. Ксантофиллы из комплексов легко экстрагируются ацетоном, что позволяет легко анализировать сохранность ксантофиллов. Такие исследования показали, что при хранении в течение более 30 дней полностью сохраняются ксантофиллы как бархатцев (диэфиры лютеина), так и физалиса (эфиры зеаксантина и  $\beta$ -криптоксантина), рис. 3.

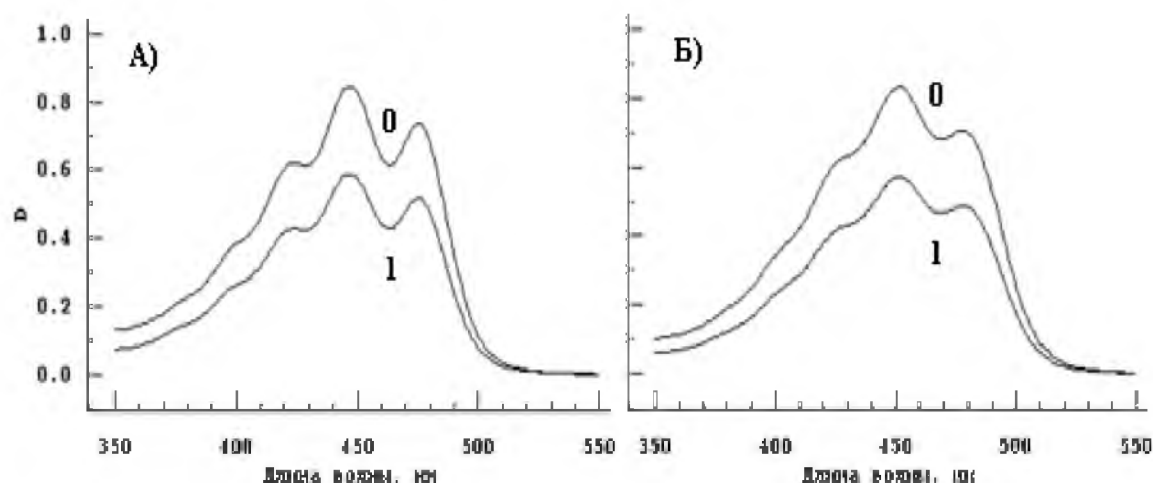


Рис. 3. Спектры исходных экстрактов лепестков цветков бархатцев (А) и чашечек физалиса (Б) до комплексообразования (0) и экстрагированных из лиофильно высушенных комплексов (1)

Однако попытки определить морфологию агрегатов комплексов оказались не столь удачными. Так при использовании оптической микроскопии удается лишь установить, что комплексы включения образуют микрочастицы с высокой подвижностью под покровным стеклом, рис. 4А, а при наблюдении без покровного стекла быстро происходит испарение раствора и кристаллизация  $\beta$ -циклодекстрина с потерей информативности об изначальной структуре микрочастиц, рис. 4Б.

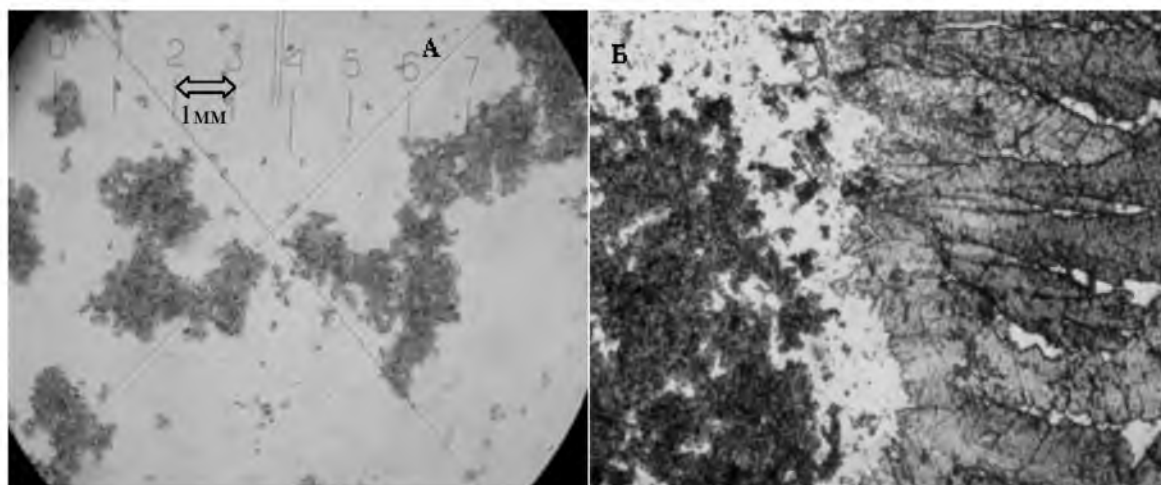


Рис. 4. Фотография микрочастиц комплексов включения в маточном растворе (А) и после высыхания на воздухе (Б). Микроскоп МИКМЕД-5

Попытка наблюдения структуры лиофильно высушенных частиц комплексов с помощью растрового ион-электронного микроскопа Quanta 200 3D оказалась неудачной из-за разрушения комплексов в потоке электронов: электроны легко захватываются полиеновой системой каротиноидов, и одноименно заряженные молекулярные ионы отталкиваются, выходя из зоны пучка электронов.

Тем не менее, несмотря на разрушение комплексов, на рис. 5 А и Б видны отдельные фрагменты в виде вытянутых фибрилл толщиной порядка 100-200 нм. Эти ассоциаты могут быть образованы следующим образом: молекулы ксантофилла с обоих концов объединяются молекулами ЦД в цепи (напомним, что в полость ЦД можно ввести минимум два углеводородных радикала – от двух последовательных молекул). А такие цепи могут ассоциировать в параллельные нити-фибриллы. Отметим, что именно образование фибрилл диэффиров ксантофиллов отвечает за гипераккумуляцию ксантофиллов в хромопластах клеток перца сладкого [8].

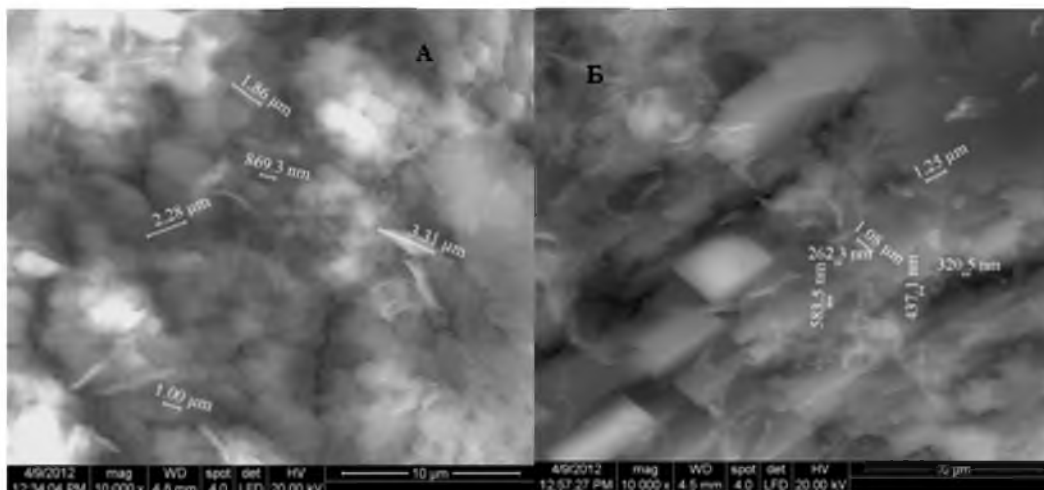


Рис. 5. Фотографии микрокристаллов комплексов, полученные на электронном микроскопе Quanta 200 3D

Понятно, вероятность образования фибрилл тем выше, чем меньше число моль ЦД на Э1 моль эфира ксантофилла. При росте этого соотношения молекулы диэфиров в конечном итоге будут заполнять полости двух молекул циклодекстрина с обоих концов, что не будет способствовать образованию фибрилл. Но при этом вырастет вероятность образования мелкокристаллических структур за счет ассоциации молекул циклодекстрина между собой (по внешней поверхности). В принципе это подтверждается исследованием комплексов, рис.6, в которых от №1 до №3 возрастает доля молекул ЦД: крупные волокнистые структуры при избытке диэфиров лютеина заменяются микрокристаллической структурой при избытке циклодекстрина.

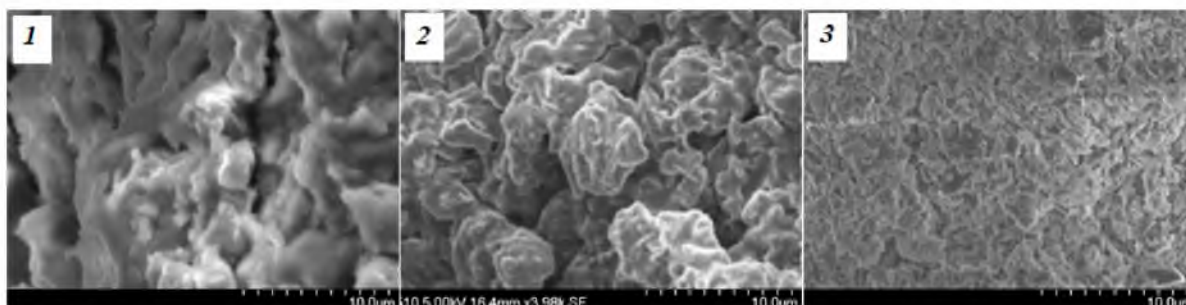


Рис. 6. Микрофотографии комплексов включения диэфиров лютеина и β-циклодекстрина. Фотографии получены с использованием электронного микроскопа HITACHI SU1510

### Выводы

Таким образом, смешиванием ацетоновых экстрактов эфиров ксантофиллов и водного раствора β-циклодекстрина могут быть получены комплексы включения, морфология кристаллов которых зависит от соотношения этих компонентов и такие комплексы могут быть лиофильно высушены и могут храниться в морозильной камере по крайней мере в течение месяца.

### Список литературы

- 1 Madhavi D.L., Kagan D.I. Bioavailable carotenoid-cyclodextrin formulations for soft-gels and other encapsulation systems / Patent USA 7446101.
2. Bartlett M.R., Mastaloudis A., Smidt C.R., Poole S.J. Nanosized carotenoid cyclodextrin complexes / Patent USA 7781572.
3. Дейнека В.И., Сорокопудов В.Н., Дейнека Л.А., Третьяков М.Ю. Исследование цветков Tagetes sp. как источника лютеина // Хим.-фарм. ж. - 2007. - Т.41, №10. - С.30-32.
4. Дейнека В.И., Сорокопудов В.Н., Дейнека Л.А., Третьяков М.Ю., Фесенко В.В. Исследование плодов Physalis alkekengi L. как источника ксантофиллов // Хим.-фарм. ж. - 2008. - Т.42, № 2. - С. 36-37.
5. Bowen P.E. Herbst-Espinosa S.M., Hussain E.A., Stacewicz-Sapuntzakis M. Esterification Does Not Impair Lutein Bioavailability in Humans // J. Nutr. - 2002. - Vol. 132. - P. 3668-3673.



6. Polyakov N.E., Leshina T.V., Konovalova T.A., Hand E.O., Kispert L.D. Inclusion complexes of carotenoids with cyclodextrins:  $^1\text{H}$  NMR, EPR, and optical studies // *Free Radical Biol. Med.* – 2004. - Vol. 36. - P. 872 – 880.

7. Лапшова М.С., Дейнека В.И., Дейнека Л.А., Тихова А.А. Получение и свойства комплексов включения диэфиров лютеина с  $\beta$ -циклодекстрином // *Научные ведомости БелГУ. Сер. Медицина. Фармация.* - 2011. - № 22 (117), Вып.16/2. – С. 193-197.

8. Deruere J., Romer S., d'Harlingue A., Backhaus R.A., Kuntz M., Camara B. Fibril Assembly and Carotenoid Overaccumulation in Chromoplasts: A Model for Supramolecular Lipoprotein Structures // *Plant Cell.* – 1004. - V.6. – P. 119-133.

## SOME ASPECTS OF INCLUSION COMPLEXES SYNTHESIS BETWEEN $\beta$ -CYCLODEXTRIN AND CAROTENOID ESTERS

**M.S. Lapshova, E.V. Zakcharenko,  
V.I. Deineka, L.A. Deineka,  
R.N. Saenko, M.Yu. Tret'yakov**

*Belgorod State National Research University, Pobedy St., 85, Belgorod, 308015, Russia*

*E-mail: deineka@bsu.edu.ru*

The method of “host-guest” supramolecular complexes synthesis of  $\beta$ -cyclodextrin (CD) with xanthophyll esters (XE) is discussed by mixing together of solutions of individual substances – CD in water and CE in acetone. As “guest” molecules carotenoid saturated fatty acids diesters were explored because of their high practical significance. The particularity of the guest structure is a consequence of readiness of hexane – CD complexation: CD is able to connect diesters into long chains grasping two hydrocarbon radicals of adjacent molecules into one cavity. Possibilities of optical as well as electron microscopy methods for aggregates structure investigations are shown. The stability of lyophilized complexes of xanthophylls of African marigold petals and Chinese lanterns is proved.

Key words: inclusion complexes;  $\beta$ -cyclodextrin, xanthophyll diesters, *Tagetes*, *Physalis*, optical microscopy, scanning electron microscopy.