

УДК 615.074:577.16:547.917

ОСОБЕННОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ КОМПЛЕКСОВ ВКЛЮЧЕНИЯ ЛИКОПИНА И β -КАРОТИНА С β -ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ

**Е.В. ЗАХАРЕНКО, М.С. ЛАПШОВА
В.И. ДЕЙНЕКА, Л.А. ДЕЙНЕКА
А.Г. ДОРНИН**

*Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет*

e-mail: deyneka@bsu.edu.ru

В работе предложен метод частичного отделения ликопина от β -каротина при образовании комплексов включения смеси каротиноидов с β -циклодекстрином. Этот метод может быть использован при создании готовых форм ликопина – мощнейшего жирорастворимого антиоксиданта. Для получения комплексов предложено добавлять растертый порошок β -циклодекстрина к ацетоновому раствору каротиноидов, растворимость которых снижена добавлением воды. Показано, что на первой стадии развития системы каротиноиды соосажаются с β -циклодекстрином, но выдержка смеси позволяет получить комплексы включения с дифференциацией каротиноидов по афинности к молекулам «хозяина».

Ключевые слова: ликопин, β -каротин, β -циклодекстриин, комплексы включения.

Ликопин (I), синтезируемый в растениях и в некоторых микроорганизмах (но не в организме животных), – находится на вершине метаболизма тетратерпенов со сформированной центральной сопряженной полиеновой цепью, входящей в структуры большинства известных каротиноидов. Рис.1.

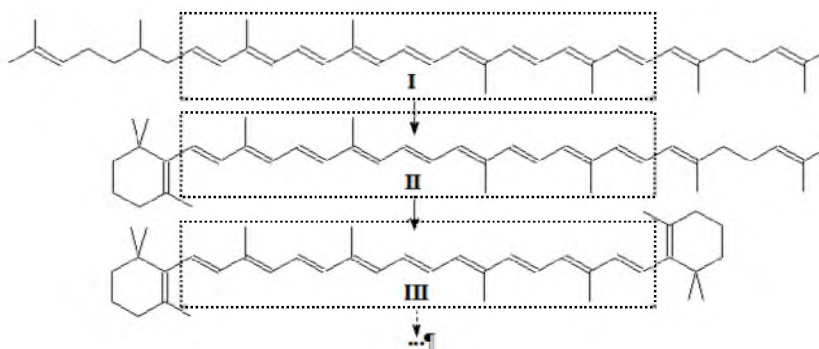


Рис.1. Структура ликопина (I), γ - (II) и β -каротина (III)

Это соединение содержит 11 полностью сопряженных (без стерических напряжений) двойных связей и поэтому имеет наиболее длинноволновый максимум абсорбции в ряду тетра-терпенов с аналогичным числом сопряженных связей, что обеспечивает окраску синтезирующих ликопин тканей в красный цвет, хорошо известный по цвету традиционных томатов или мякоти арбуза. При этом ликопин является не только эффективным природным колорантом, но и наиболее мощным среди каротиноидов антиоксидантом, – это свойство обуславливает высокую биологическую активность ликопина [1]. Уместно отметить, что не все пищевые добавки, которым присвоен код, как например, E-160d – ликопин, являются опасными веществами, употребление которых следует сократить до минимума.

Сегодня ликопин – один из наиболее разрекламированных проектов, разработка эффективных технологий получения которого имеет большое значение для фармацевтической промышленности. Из растительных источников наиболее эффективными являются виды растения рода момордика (*Momordica*), рубиново-красные околосемянники которой являются непревзойденными рекордсменами в растительном мире по уровню накопления ликопина [2, 3]. При этом в околосемянниках плодов *M. charantia* L. и *M. balsamina* L. осуществляется биосинтез почти исключительно ликопина, в то время, как в плодах популярного в Юго-Восточной Азии вида *M. cochinchinensis* Spreng. накапливается не только ликопин, но и β -каротин. Главным образом эти же два каротина накапливаются и в плодах томатов [3].

При разработке готовых форм биологически активных соединений особое внимание уделяется биодоступности этих соединений, что особенно важно для нерастворимых в воде ка-



ротиноидов. Известно, что лучшему усвоению каротиноидов способствует их введение в липидные матрицы [3]. Альтернативный способ повышения биодоступности – синтез комплексов включения каротиноидов с циклодекстринами, исследованию которого посвящено значительное число публикаций, однако выводы таких работ не всегда согласовываются между собой. При исследовании комплексообразования ликопина с α -, β - и γ -циклодекстринами при молярном соотношении 1:50 в работе исследователей из Бразилии [4] было установлено, что комплексы образуются только в случае β - и γ -циклодекстринов. При хранении в холодильнике в течение 180 дней комплекс ликопина с γ -циклодекстрином остался без изменения, а комплекс с β -циклодекстрином разрушился на 80%, при этом лучшие результаты получаются при приготовлении комплексов ликопин : γ -циклодекстрин в молярном соотношении 1 : 200. Но в патенте США [5] утверждается, что при добавлении в раствор 5 г α -циклодекстрина в 40 мл воды при 60°C 0,3 г ликопина (в виде раствора в хлороформе) при перемешивании в течение 20 мин (достаточном для полного испарения хлороформа) после охлаждения и отделения осадка получается темно-желтый раствор, содержащий 2 мкг ликопина на 1 мл раствора. Изменение окраски ликопина от красной до желтой при его комплексообразовании с β -циклодекстрином отмечалась и в работе [6] и объясняется агрегацией молекул ликопина, стабилизированной β -циклодекстрином. В работе испанских исследователей [7] из трех (α -, β - и γ -) циклодекстринов наилучшим для связывания полностью транс-ликопина признан β -циклодекстрин в молярном соотношении компонентов 0.0026 : 1, что обеспечило выход комплекса на уровне 94 %.

Приведенные выше разногласия в информации о комплексообразовании ликопина и β -каротина стали причиной проведения исследований в настоящей работе.

Материалы и методы исследования. В работе использовали плоды *M. charantia*, выращенные в сезоне 2012 г., β -каротин (фармакопейный) и β -циклодекстрин (Китай). Ликопин экстрагировали из околосемянника ацетоном. Концентрации каротиноидов в растворах определяли спектрофотометрическим методом с использованием литературных значений

удельных показателей поглощения: для ликопина $E_{1\text{см}}^{1\%} = 3450$ при $\lambda_{\text{max}} = 472$ nm [8] и для β -каротина $E_{1\text{см}}^{1\%} = 2592$ при $\lambda_{\text{max}} = 450$ nm [9]. Для ВЭЖХ определения состава растворов использовали хроматограф Agilent 1200 Infinity с диодно-матричным детектором (диапазон спектра 370–600 nm, хроматограммы записывали при 450 nm); колонка 250×4 мм Reprosil-Pur C18-AQ, 5 мкм; термостатирование при 30°C, подвижная фаза: 100% ацетон, 1 мл/мин.

В работе была предложена следующая технология получения комплексов включения: к V_1 мл раствора каротиноидов в ацетоне, концентрацию каротиноидов в котором определяли спектрофотометрическим методом, добавляли m_1 г растертого в порошок (в фарфоровой ступке) воздушно сухого β -циклодекстрина и смесь тщательно перемешивали. Добавляли V_2 мл дистиллированной воды, смесь тщательно перемешали встряхиванием и оставляли на 5 – 45 мин в ультразвуковой бане. Затем центрифугированием отделяли осадок. К отделенному от маточного раствора осадку добавляли V_1 мл ацетона для рекстракции каротиноидов; после седиментации β -циклодекстрина (бесцветный осадок, что свидетельствует о полном извлечении каротиноидов из комплексов) рекстракт использовали для спектрофотометрического и хроматографического анализа.

Результаты и их обсуждение. Электронные спектры ацетонового экстракта околосемянника момордики и раствора β -каротина в ацетоне представлены на Рис.2; максимумы абсорбции электронно-колебательной структуры соответствуют литературным данным для этих каротинов [10]: 448, 474 и 505 nm – для ликопина и 429 нм., 452 и 478 nm – для β -каротина. Не возникает проблем при подборе хроматографической системы для разделения этих соединений в условиях обращенно-фазовой хроматографии, Рис.3: при использовании традиционных (так называемых «мономерных» октадецилсилильных) C18-стационарных фаз удержание ликопина оказывается заметно слабее удерживания β -каротина при любых составах ацетон-ацетонитрильных подвижных фаз. Это находится в полном соответствии с ростом широко используемого в биологии и в фармацевтике расчетного параметра липофильности (например, по программе ALOGP), равным 9.16 и 9.72, соответственно (интерактивный расчет на сайте виртуальной химической лаборатории, <http://www.vclab.org/lab/alogps/start.html>).

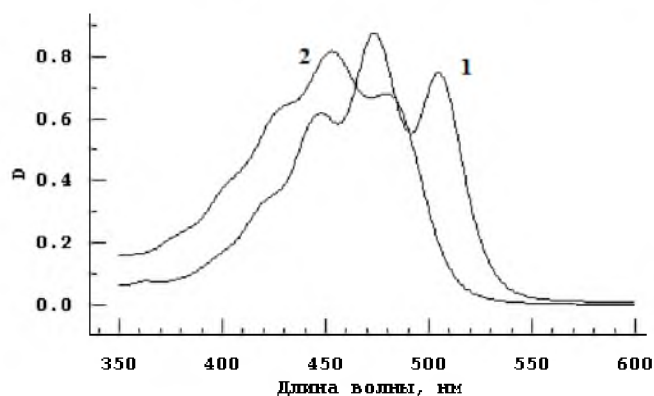


Рис.2. Спектры растворов каротиноидов в ацетоне
1 – экстракт момордики *M. charantia*, 2 – β -каротин

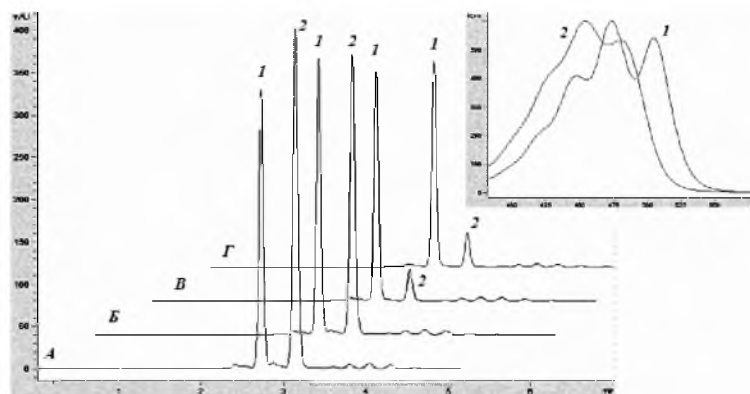


Рис.3. Разделение ликопина (1) и β -каротина в осадках
Реэкстракты получены после выдержки в течение: А – 5, Б – 15, В – 30, Г – 45 мин.
В правом верхнем углу – спектры каротиноидов, записанные в кювете детектора.

Для получения комплексов включения каротиноидов с β -циклодекстрином удобно использование растворов каротиноидов в ацетоне и β -циклодекстрина в воде. При их смешивании уменьшается растворимость и каротиноидов и β -циклодекстрина, создавая условия для получения гетерофазы. Однако из-за не слишком высокой растворимости β -циклодекстрина в воде такой метод не очень удобен, поскольку трудно создать большой избыток молекул «хозяина», что необходимо для получения стабильных комплексов включения. По альтернативному методу можно использовать тонкоизмельченный β -циклодекстрин, внесенный в раствор каротиноидов в ацетоне, к которому добавлена вода для уменьшения растворимости молекул «гостей». В таком методе в начальный момент может выделиться гетерофаза каротиноидов, которая может быть захвачена в осадок мелкодисперсным β -циклодекстрином. Для преобразования такого осадка в комплекс включения потребуется некоторое время. Контроль течения процесса в этом случае практически неосуществим при исследовании комплексообразования одного каротиноида с β -циклодекстрином, но и может быть выполнен, если каротиноиды представлены комплексом индивидуальных соединений с различной афинностью по отношению к циклодекстрину.

Исследование комплексообразования β -циклодекстрина с производными коричневой кислоты [11] показало, что введение двух заместителей в мета-положение по отношению к основному радикалу приводит к резкому уменьшению констант комплексообразования, хотя введение в пара-положение гидроксильной группы, наоборот существенно увеличивает такие константы. Это объясняется стабилизацией комплексов при гидратации ОН-группы по ротаксановому типу (во втором случае) и дестабилизацией в первом случае за счет (в основном) стерических затруднений (эффект тот же и для CH_3O - и для ОН-групп). Очевидно, что такие затруднения могут возникнуть при внедрении β -каротина (имеющего три CH_3 -группы в орто-положении) в полость β -циклодекстрина, тогда как для не имеющего концевых циклов ликопина очевидных препятствий для образования комплексов нет.



Действительно, состав осадка оказывается нестабильным во времени, что следует из хроматограмм, приведенных на рис.2. При добавлении воды к ацетоновому раствору смеси каротиноидов (при соотношении вода : ацетон 1:4 по объёму), к которому добавили растертый β -циклодекстрин в мольном соотношении к сумме каротиноидов 5:1 сразу образуется осадок. При выдерживании такой смеси в ультразвуковой бане в течение 5 мин с последующим центрифугированием удается отделить осадок и реэкстрагировать из него (до полного обесцвечивания) порядка 75% (от исходного количества) смеси ликопина и β -каротина с соотношением между каротиноидами, не отличающимся от исходного. При этом дальнейшее выдерживание в ультразвуковой бане приводит к небольшому уменьшению количества захваченного в осадок ликопина и к резкому уменьшению доли β -каротина, рис.4, что указывает на дифференциацию ликопина и β -каротина при комплексообразовании.

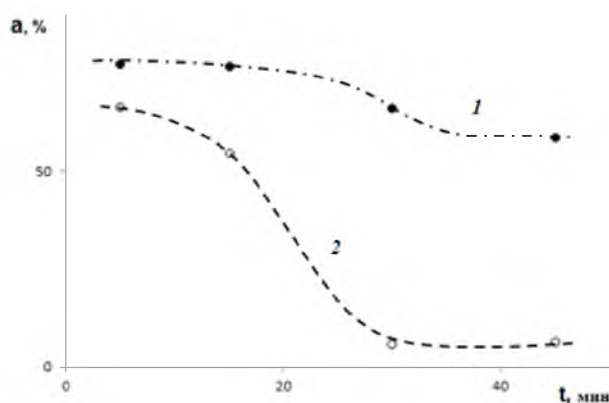


Рис.4. Зависимость содержания ликопина (1) и β -каротина (2) в осадках от времени выдержки смеси каротиноидов с β -циклодекстрином

Состав каротиноидов в образовавшихся осадках может быть охарактеризован как кинетически контролируемый продукт на начальном временном участке и как термодинамически контролируемый продукт – при увеличении времени выдержки.

Найденная особенность достаточно любопытна, поскольку, с одной стороны, может быть использована в качестве альтернативного известным методам способа разделения каротиноидов с различной афинностью к β -циклодекстрину. С другой стороны, термодинамический аспект будет определяться многими параметрами, такими как

- 1) соотношение вода : ацетон (определяющее растворимость в общем случае различных по свойствам каротиноидов); очевидно, что при слишком большом снижении растворимости всех компонентов их афинность по отношению к β -циклодекстрину будет нивелирована;
- 2) соотношение циклодекстрин : каротиноид, поскольку даже состав комплексов включения может быть неодинаковым (например, по тем же стерическим причинам).

Для подтверждения такого предположения в настоящей работе нами были выполнены исследования по изменению соотношения вода : ацетон при фиксированном соотношении β -циклодекстрин : сумма каротиноидов (5:1 по моль), рис.5, и при одинаковом времени выдержки смеси (30 мин).

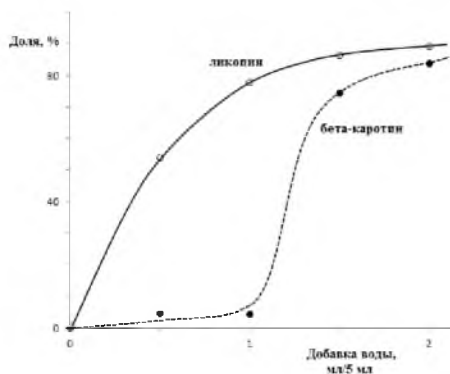


Рис.5. Зависимость состава осадка комплекса включения от добавки воды к смеси раствора каротиноидов и β -циклодекстрина



Как следует из приведенных на Рис.5 данных, при относительно небольшой добавке воды удается отделить ликопин от смеси с β -каротином с чистотой порядка 85% при начальном его соотношении к β -каротину 1.0 : 1.4 (т.е. при доле ликопина порядка 40%). Большие добавки воды приводят к потере различия в афинности ликопина и β -каротина по отношению к β -циклодекстрину.

Выводы. Добавление β -циклодекстрина к водно-органическому раствору смеси каротиноидов может быть использовано для разделения каротиноидов за счет различной устойчивости комплексов включения; при этом результат зависит от ряда параметров, включая кинетические и термодинамические.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ «Государственное задание вузу на 2013 г, проект № 3.1785.2011».

Литература

1. Agarwal // J. Am. Coll. Nutr. – 2000. – V.19. – P. 563–569.
2. Момордика – уникальный источник ликопина / В.И. Дейнека, М.Ю. Третьяков, Доан Хоанг Жанг, В.К. Тохтарь, Л.А. Дейнека, И.А. Гостищев // Масложировая промышленность. 2011. №.3. С.12-13.
3. Collins J.K. Lycopene: From Plants to Humans / J.K. Collins, P. Perkins-Veazie // HortSci. – 2006. – V.41. – P. 1135-1144.
4. Venket Rao A. Role of Antioxidant Lycopene in Cancer and Heart Disease / A. Venket Rao, S. Matioli G. Microencapsulação do licopeno com ciclodextrinas / G. Matioli, D.B. Rodriguez-Amaya // Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas. – 2003. – V.23(Supl). – P. 102-105.
5. Leuenberger B. Cyclodextrin-polyene inclusion complexes. / B. Leuenberger, H. Stoller // Patent USA 5,221,735. 1993.
6. UV-Vis spectroscopic characterization of inclusion compounds of β -cyclodextrin with lycopene / L. Wang, J. La, Z. Du, D. Wu // Spectroscopy Spectral Anal. – 2004. – V.24. – P.183-186.
7. Stabilization of all-trans-lycopene from tomato by encapsulation using cyclodextrins / G.P. Blanch, M.L.R. del Castillo, M. del Mar Caja, M. Pérez-Méndez, S. Sánchez-Cortés // Food Chem. – 2007. – V.105. – P. 1335-1341.
8. Phytoene, Phytofluene, and Lycopene from Tomato Powder Differentially Accumulate in Tissues of Male Fisher 344 Rats / J.K. Campbell, N.J. Engelmann, M.A. Lila, J.W. Erdman // Nutr Res. – 2007. – V.27. – P. 794–801.
9. Variability of lutein content in peas (*Pisum sativum* L.) in relation to the variety, season and chlorophyll content / M. Holasová, R. Dostálova, V. Fiedlerová, J. Horáček // Czech. J. Food Sci. – 2009. – V.27. – P. S188-S191.
10. Rodriguez-Amaya D.B. A guide to carotenoid analysis in food. Washington / D.B. Rodriguez-Amaya // DC.: Ed. ILSI-International Life Sciences Institute.2001. – 64 p.
11. Модулирование селективности разделения сорбатов за счет образования супрамолекулярных комплексов в подвижной фазе / И.П. Анисимович, В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека, В.Ф. Селеменев // Сорбц. и хроматогр. процессы. – 2010. – Т.10, Вып.3. – С. 401-408.

PARTICULARITIES OF INCLUSION COMPLEXES FORMATION OF LYCOPENE AND β -CAROTENE WITH β -CYCLODEXTRIN

**E.V. ZAKCHARENKO, M.S. LAPSHOVA
V.I. DEINEKA, L.A. DEINEKA
A.G. DORONIN**

*Belgorod National
Research University*

e-mail: deyneka@bsu.edu.ru

The method for partial resolution of lycopene from β -carotene due to inclusion complexes formation of the carotenoids with β -cyclodextrin has been proposed. The method may be utilized for lycopene preparations manufacture. For the manufacture it has been proposed to add powdered β -cyclodextrin to the acetone solution of carotenoids with lowered solubility due to some water admixture. The first stage of processes was found to be a coprecipitation of carotenoids with β -cyclodextrin, while under reflux the complexes with carotene inclusion (into cyclodextrin cavity) ability differentiation may be prepared.

Keywords: lycopene, β -carotene, β -cyclodextrin, inclusion complexes.