

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 547.024

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АСТАКСАНТИНА С СОЛЯМИ ЖЕЛЕЗА Fe^{2+} И Fe^{3+} В ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЯХ

Надежда Владимировна Жданова¹, Наталья Юрьевна Лотош², Евгений Александрович Куликов², Светлана Владимировна Лукашевич², Сергей Николаевич Малахов², Юрий Алексеевич Кокшаров³, Алла Анатольевна Селищева^{2,4}

¹ Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, физический факультет, Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

Автор, ответственный за переписку: Наталья Юрьевна Лотош, Lotosh_NY@nrcki.ru

Аннотация. Каротиноид астаксантин обладает биологической активностью и известен как мощный антиоксидант. Ввиду своей липофильной природы астаксантин может использоваться для защиты от перекисного окисления липидов, в котором немаловажную роль играют ионы железа. Ранее было исследовано влияние ионов Fe^{2+} на окислительную деградацию астаксантина в составе липосом из фосфолипидов. В настоящей работе изучалось взаимодействие астаксантина с Fe^{3+} и Fe^{2+} в органических растворителях различной полярности в отсутствие липидов. Показано, что в присутствии Fe^{3+} происходит окисление и деградация астаксантина в метаноле и в дихлорметане. Спектрофотометрически было зарегистрировано образование промежуточного продукта с максимумом поглощения на 876 нм. Методом ЭПР доказана радикальная природа промежуточного продукта, интенсивность сигнала которого снижалась во времени (с сохранением сигнала до трех суток). На основании полученных результатов можно предположить, что радикальный продукт, образующийся в ходе реакции с Fe^{3+} , является катион-радикалом астаксантина. В то же время при инкубации астаксантина с Fe^{2+} изменений не выявлено: спектр поглощения не менялся и продукт радикальной природы не образовывался.

Ключевые слова: астаксантин, ВЭЖХ, ионы двухвалентного железа, ионы трехвалентного железа, окислительная деструкция, радикалы, ЭПР-спектроскопия

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2025-66-5-409-421

Благодарности. В работе использовалось оборудование ресурсных центров: «Оптической микроскопии и спектроскопии», «Молекулярной и клеточной биологии» НИЦ «Курчатовский институт» и физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Финансирование. Все исследования, кроме ЭПР-спектроскопии, проведены в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

ЭПР-спектроскопия проведена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова № 121031600197-5.

Для цитирования: Жданова Н.В., Лотош Н.Ю., Куликов Е.А., Лукашевич С.В., Малахов С.Н., Кокшаров Ю.А., Селищева А.А. Взаимодействие астаксантина с солями железа Fe^{2+} и Fe^{3+} в органических растворителях // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2025. Т. 66. № 5. С. 409–421.

ORIGINAL ARTICLE

INTERACTION OF ASTAXANTHIN WITH IRON SALTS Fe^{2+} AND Fe^{3+} IN ORGANIC SOLVENTS

Nadezhda V. Zhdanova¹, Natalya Yu. Lotosh², Evgeny A. Kulikov², Svetlana V. Lukashevich², Sergey N. Malakhov², Yuriy A. Koksharov³, Alla A. Selishcheva^{2,4}

¹ D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia

² National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

³ Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁴ Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Corresponding author: Natalya Yu. Lotosh, Lotosh_NY@nrcki.ru

Abstract. The carotenoid astaxanthin has a variety of biological activities and antioxidant properties. Due to its lipophilic nature, astaxanthin can be used to protect against lipid peroxidation, in which iron ions play an important role. The effect of Fe^{2+} ions on the oxidative degradation of astaxanthin in phospholipid liposomes was previously studied. In this work, we studied the interaction of astaxanthin with Fe^{3+} and Fe^{2+} in organic solvents of various polarities in the absence of lipids. It has been shown that in the presence of Fe^{3+} , astaxanthin oxidation and degradation occurs in methanol and dichloromethane. The formation of an intermediate product with an absorption maximum at 876 nm was recorded spectrophotometrically. Electron paramagnetic resonance (EPR) proved the radical nature of the intermediate product, the signal intensity of which decreased over time, with the signal remaining for up to three days. Based on the obtained results, it can be assumed that the radical product formed during the reaction with Fe^{3+} is the radical cation of astaxanthin. At the same time, no changes were detected when astaxanthin was incubated with Fe^{2+} : the absorption spectrum did not change and no radical product was formed.

Keywords: astaxanthin, ferric, ferrous, HPLC, oxidative degradation, radicals, EPR

Acknowledgements. The work was carried out using the equipment of the resource centers: “Optical microscopy and spectroscopy” and “Molecular and cellular biology” of the National Research Center “Kurchatov Institute”; Faculty of Physics, Moscow State University M.V. Lomonosov

Financial Support. All studies, except for EPR spectroscopy, were carried out within the state assignment of NRC “Kurchatov Institute”. EPR spectroscopy was carried out within the framework of the Lomonosov Moscow State University state task № 121031600197-5.

For citation: Zhdanova N.V., Lotosh N.Yu., Kulikov E.A., Lukashevich S.V., Malakhov S.N., Koksharov Yu.A., Selishcheva A.A. Interaction of Astaxanthin with Iron Salts Fe^{2+} and Fe^{3+} in Organic Solvents // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Khimiya. 2025. T. 66. № 5. S. 409–421.

Каротиноид астаксантин (3,3'-дигидрокси-β-каротин-4,4'-дион) (рис. 1) обладает широким спектром биологической активности, что может

служить основанием для клинического применения [1–4]. Так, например, астаксантин оказывает противовоспалительное действие при сердечно-

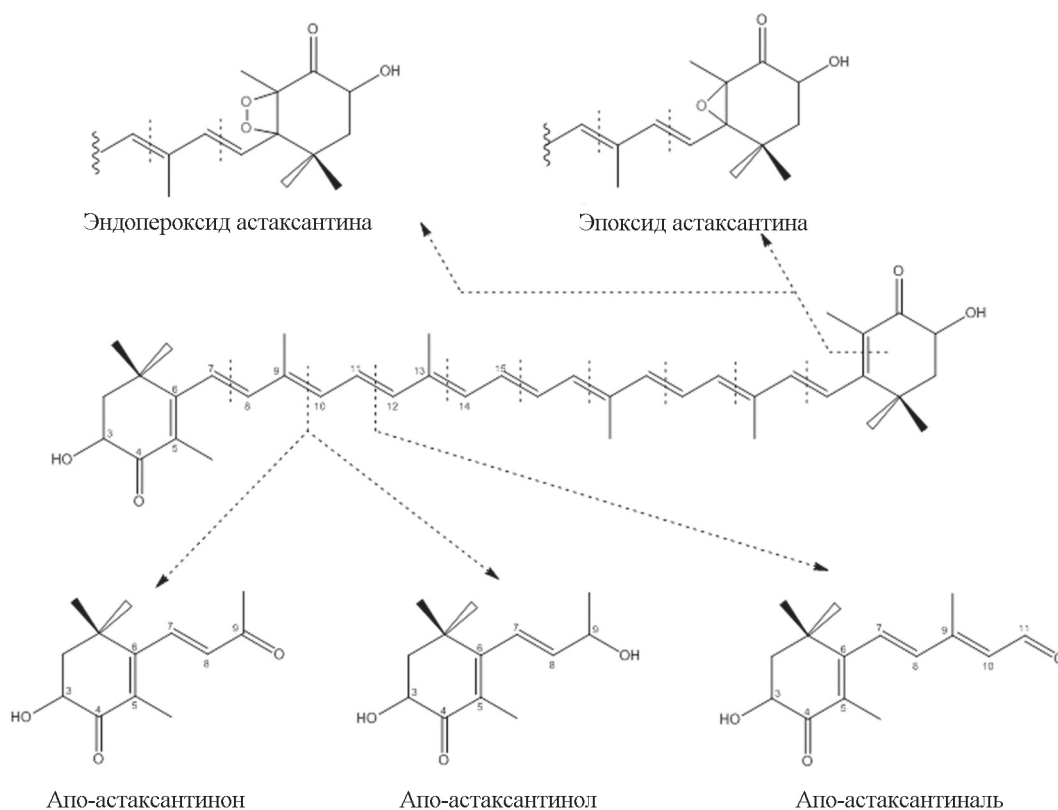


Рис. 1. Схема окислительной деструкции астаксантина и примеры возможных продуктов окисления

сосудистых заболеваниях и нейродегенеративных расстройствах [5–9], влияя на отдельные этапы внутриклеточного переноса сигнала, такие как PI3K/AKT, Nrf2, NF-κB, ERK1/2, JNK, p38 MAPK и JAK-2/STAT-3 [10]. Наряду с этим известна антиоксидантная активность астаксантина по отношению к активным формам кислорода (супероксиданион-радикалу, синглетному кислороду, гидроксил-радикалу) [11–13] и различным пероксильным радикалам [14]. Известны и другие механизмы антиоксидантной активности, при которых астаксантин усиливает активность ферментов антиоксидантной защиты [15] или связывает металлы переменной валентности, например ионы железа [16].

В природе астаксантин синтезируется в микроводорослях и фитопланктоне, а в организм человека и животных поступает с пищей в виде свободной (неэтерифицированной) формы, а также в виде моно- и диэфиров [17–19]. Он способен переходить из *транс*-формы в *цис*-форму [17, 20, 21] и образовывать агрегаты в смесях вода – органический растворитель [22–24]. При воздействии света или повышенной температуры в присутствии кислорода астаксантин подвергается окислительной деструкции и де-

градации полиеновой цепи в разных участках молекулы [25–28].

Расщепление конъюгированных двойных связей в результате окислительных процессов приводит к образованию продуктов с укороченным углеродным скелетом (апо-продуктов), представляющих собой альдегиды, кетоны и спирты (рис. 1), что сопровождается уменьшением оптической плотности в максимуме поглощения астаксантина. А взаимодействие каротиноидов с синглетным кислородом, супероксид анион радикалом и гидроксильным радикалом приводит к образованию эпоксидов и эндопероксидов [28].

Показано, что каротиноиды (Car) при взаимодействии со свободными радикалами [14, 29] или при освещении светом большой интенсивности образуют различные радикальные продукты [30]. Образование катион-радикалов происходит за счет переноса электрона, нейтральный радикал образуется при переносе атома водорода, а радикальный аддукт – при присоединении радикала к молекуле каротиноида (реакции 1–3):



перенос атома водорода
 $\text{Car}(\text{H}) + \text{ROO}\cdot \rightarrow \text{Car}\cdot + \text{ROOH},$ (2)

образование радикального аддукта
 $\text{Car} + \text{ROO}\cdot \rightarrow [\text{Car}-\text{ROO}]\cdot.$ (3)

Нейтральные радикалы $\text{Car}\cdot$ могут образовываться из катион-радикала $\text{Car}\cdot^+$ при потере протона в позициях 5, 9, 13 в молекуле атаксантина (рис. 1), а неспаренный электрон распределяется по всей полиеновой цепи. Дальнейшая потеря протона может приводить к образованию анион-радикала $\text{Car}\cdot^-$. В случае атаксантина отрыв протонов предпочтительно проходит либо в 3-м положении ($-\text{OH}$), либо в 5-м ($-\text{CH}_3$ в циклогексеновом кольце), что способствует резонансной стабилизации радикальной молекулы [16, 31] (схема).

Аналогичные реакции протекают при взаимодействии каротиноидов с ионами металлов переменной валентности [16, 32, 33]. Известно, что перечисленные промежуточные продукты, обнаруженные для ряда каротиноидов, в том числе и для атаксантина, поглощают в красной области спектра [29].

Недавно было показано [34], что инкубация Fe^{2+} с атаксантином, включенным в липосомы из фосфолипидов, в присутствии кислорода приводила к быстрому снижению оптической плотности атаксантина в максимуме его поглощения (480 нм), что свидетельствует о деградации полиеновой цепи. В этом случае в реакционной смеси присутствовали фосфолипиды в виде липосом с включенным в них атаксантином и ионы Fe^{2+} . Последний может взаимодействовать как с липидными и липокси-радикалами, так и с ионами железа [32].

В связи с тем, что двухвалентное железо достаточно быстро окисляется до трехвалентного, целью данного исследования явилось изучение промежуточных и конечных продуктов окисления атаксантина, образующихся в растворах органических растворителей в присутствии кислорода под влиянием ионов Fe^{2+} и Fe^{3+} .

Материалы и методы

Растворители и реактивы

Метанол, ацетонитрил (Lab Scan, Польша). Дихлорметан (Sigma Aldrich, США).

Незамещенный атаксантин $\geq 97\%$ из *Blakeslea trispora* (Sigma Aldrich, США), $\text{FeCl}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ («Химмед», Россия), муравьиная кислота «ч.д.а.» («Мосреактив», Россия).

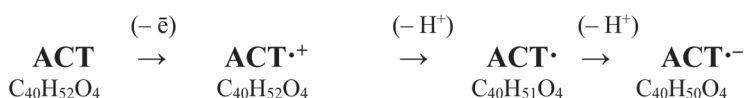
Взаимодействие атаксантина с Fe^{3+} и Fe^{2+} в органических растворителях

Атаксантин растворяли в дихлорметане или метаноле. Для определения концентрации использовали коэффициенты экстинкции $101\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и $123\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для дихлорметана и метанола соответственно. Соли железа растворяли в метаноле. К раствору атаксантина добавляли раствор соли железа и инкубировали при комнатной температуре. В образцах с дихлорметаном содержание метанола составило 0,07%. Конечная концентрация атаксантина в анализируемом образце составляла приблизительно 10–30 мкМ, конечная концентрация ионов железа составляла 100 мкМ. Для определения конечных и промежуточных продуктов взаимодействия атаксантина с Fe^{3+} и Fe^{2+} применяли методы оптической спектрофотометрии, ИК-спектроскопии, ВЭЖХ и ЭПР. Исследования проводили в присутствии растворенного кислорода. Согласно справочным и экспериментальным данным, растворимость кислорода в органических растворителях при комнатной температуре превышает растворимость в воде в 5–8 раз. Растворимость в воде составляет $\sim 0,03\text{ м}^3/\text{м}^3$ [35, 36].

Спектрофотометрические измерения проводили в диапазоне 210–1200 нм на двухлучевом спектрофотометре Shimadzu UV-3600 (Япония), используя кварцевые кюветы Hellma с длиной оптического пути 10 мм. В метаноле и в дихлорметане максимум поглощения атаксантина находился на длине волны 476 и 486 нм соответственно.

Хроматографическое разделение продуктов взаимодействия атаксантина с ионами Fe^{3+} проводили на жидкостном хроматографе (Agilent Technologies 1200 Series, США), с автоматическим пробоотборником, вакуумным дегазатором, бинарным двухканальным градиентным насосом и термостатом (Agilent Technologies 1200 series). Разделение

с х е м а



проводили на обращенно-фазовой колонке HPLC-COLUMN Orbit 100 C1 150 мм × 2.1 мм с размером частиц 5 мкм. Для приготовления подвижной фазы использовали очищенную воду Mili-Q (Merck, Millipore E-POD, Германия) с удельным сопротивлением при 25 °С, равным 18,2 мкОм·см, ацетонитрил (99,9% for HPLC Gradient grade, FisherChemical, Leicestershire, Великобритания) и муравьиную кислоту в качестве добавки. Регистрацию полученных данных осуществляли с помощью спектрофотометрического детектора G1315B с диодной матрицей серии Agilent 1200 с УФ- и видимым диапазоном длин волн от 190 до 950 нм. Для регистрации и обработки хроматограмм и спектральных данных использовали программное обеспечение Agilent OpenLab CDS версии rev.C.01.08(210).

Условия хроматографирования для контрольного образца атаксантина в ацетонитриле были следующие: изократический режим элюирования подвижной фазы вода Mili-Q (A) – ацетонитрил (B) в соотношении 5:95 с добавлением 1%-й муравьиной кислоты, скорость потока 0,3 мл/мин, температура колонки 20 °С, давление 40 бар, длина установленной волны 475 нм, объем вводимой пробы 10 мкл, время анализа 14 мин. Время выхода пика $RT = 5,678$ мин.

После инкубации атаксантина с Fe^{3+} (1 ч в темноте при комнатной температуре) растворитель (метанол или дихлорметан) отгоняли на ротаторном испарителе Eppendorf Concentrator 5301 (Германия). Продукты взаимодействия перерастворяли в ацетонитриле. Условия хроматографирования для испытуемого образца были следующие: градиентный режим элюирования подвижной фазы вода Mili-Q (A) с добавлением 1%-й муравьиной кислоты – ацетонитрил (B) с добавлением 1%-й муравьиной кислоты в соотношении 50:50 (0 мин) со скоростью потока 0,3 мл/мин, 1:99 (10 мин) со скоростью потока 0,3 мл/мин, 0:100 (12 мин) со скоростью потока 0,6 мл/мин, 0:100 (20 мин) со скоростью потока 0,6 мл/мин, температура колонки 20 °С, давление 40 бар, длина волны 280, 365, 350, 440, 475 и 855 нм, объем вводимой пробы 10 мкл. Время анализа 18 мин.

ИК-спектроскопию выполняли на ИК-Фурье-спектрометре Thermo Fisher Scientific Nicolet iS5 (США) с использованием приставки нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) iD5 ATR. Регистрацию спектров проводили в области 4000–550 cm^{-1} , спектральное разрешение 4 cm^{-1} , число сканов 32. Каплю исследуемого раствора наносили непосредственно на

поверхность алмазного НПВО-кристалла, в темноте высушивали до полного испарения растворителя, после чего записывали спектр образца.

Спектры ЭПР регистрировали при комнатной температуре на спектрометре X-диапазона (9,15 ГГц) Varian E-4 (США), сопряженном с персональным компьютером. В качестве стандарта использовали образец strong pitch (Varian, США). К раствору атаксантина (30 мкМ) добавляли раствор железа(III) в метаноле до конечной концентрации 0,05 мкМ (содержание метанола 0,1%). Образцы объемом около 200 мкл помещали в кварцевую ампулу диаметром 4 мм. Измерения проводили при величине микроволновой мощности от 2 до 10 мВт (в зависимости от отношения сигнал/шум) и амплитуде модуляции 10 Гс. Образцы инкубировали в течение трех суток и периодически записывали спектр ЭПР.

Программное обеспечение. Анализ данных, построение графиков, обработку спектров выполняли с помощью пакета программ Origin 2016.

Результаты

Взаимодействие атаксантина с ионами двух- и трехвалентного железа изучали в двух растворителях: в метаноле (полярный протонный, способен образовывать водородные связи) и дихлорметане (слабополярный апротонный, не способен к образованию водородных связей). Для этого незамещенный атаксантин инкубировали с солями двухвалентного или трехвалентного железа при комнатной температуре от 5 до 150 мин и до трех суток. Анализ продуктов инкубации проводили с помощью методов ВЭЖХ, ИК-спектроскопии, УФ-видимой спектрофотометрии и ЭПР.

Определение продуктов взаимодействия атаксантина с Fe^{3+} и Fe^{2+}

Взаимодействие атаксантина с солями двухвалентного железа. После 60 мин инкубации атаксантина с 0,1 мМ семиводным раствором сульфата железа(II) в метаноле и дихлорметане при комнатной температуре в темноте анализировали спектры поглощения реакционной среды в УФ и видимой области (рис. 2, а, б). На спектрах поглощения наблюдается небольшое снижение оптической плотности в максимуме поглощения атаксантина на 475 нм в метаноле и на 485 нм в дихлорметане (менее чем на 5%) по сравнению с контрольными, сдвига максимума не наблюдается.

Взаимодействие атаксантина с солями трехвалентного железа. После инкубации атаксантина с 0,1 мМ пятиводным раствором хлорида железа(III) в метаноле и дихлорметане

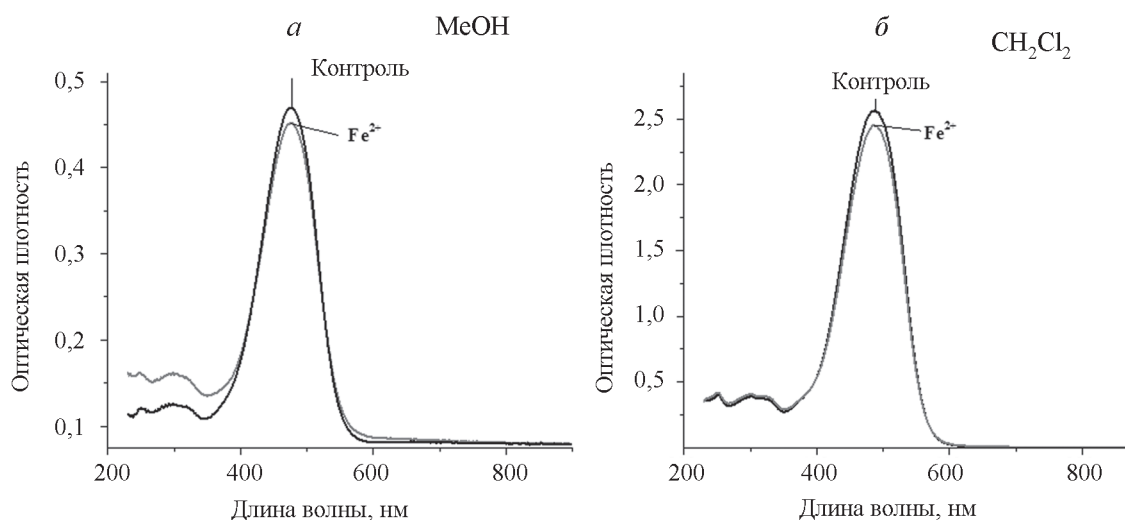


Рис. 2. Спектры поглощения раствора астаксантина: *a* – в метаноле (концентрация астаксантина 3,8 мкМ); *б* – в дихлорметане (концентрация астаксантина 25 мкМ). Образцы инкубировали 60 мин в темноте при комнатной температуре без Fe²⁺ (контроль) и с 100 мкМ Fe²⁺

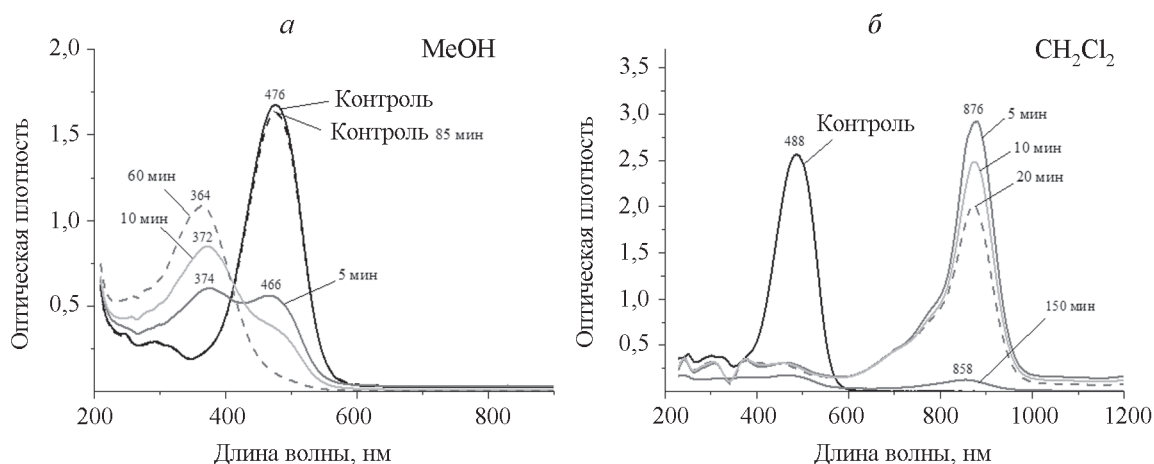


Рис. 3. Спектры поглощения раствора астаксантина: *a* – в метаноле (концентрация астаксантина 13,6 мкМ); *б* – в дихлорметане (концентрация астаксантина 25,3 мкМ). Доля метанола в дихлорметане ~0,07%. Астаксантин инкубировали со 100 мкМ Fe³⁺ при комнатной температуре в течение 5–150 мин. Контрольный образец не содержит соли железа. В кювете сравнения находится 100 мкМ раствор FeCl₃ в соответствующем растворителе

при комнатной температуре в темноте спектр поглощения астаксантина изменялся различным образом в зависимости от растворителя (рис. 3).

В метаноле при добавлении Fe³⁺ происходит быстрое снижение оптической плотности основной полосы поглощения с максимумом на 476 нм со смещением на 466 нм, и в течение последующих 60 мин пик полностью исчезает. При этом наблюдается образование новых полос с максимумом поглощения на 364–374 нм (рис. 3, *a*). Чтобы подтвердить, что регистрируемое смещение не обусловлено образованием Н-агрегатов астаксантина, поглощающих в аналогичном диапазоне

длин волн, использовали раствор NaCl (0,1 мМ), который усиливает образование агрегатов астаксантина [24]. При этом не происходило появления Н-агрегатов (рис. 4). На основании этих данных можно сделать вывод о том, что изменение спектра поглощения астаксантина обусловлено не образованием агрегатов, а деградацией полиеновой цепи и образованием новых продуктов.

В дихлорметане наблюдается совсем другая картина: в ходе взаимодействия астаксантина с Fe³⁺ происходит быстрое уменьшение оптической плотности в максимуме поглощения, что говорит об исчезновении астаксантина при инкубации с

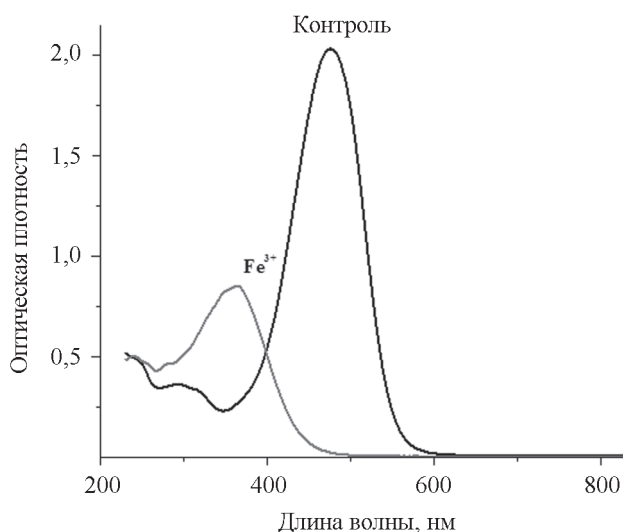


Рис. 4. Спектры поглощения раствора астаксантина (16 мкМ) в метаноле: в присутствии 100 мкМ хлорида натрия (контроль), а также в присутствии 100 мкМ хлорида натрия и 100 мкМ Fe^{3+} (после инкубации 60 мин, в темноте, при комнатной температуре)

Fe^{3+} , и появление нового максимума на 876 нм с плечом на 750–800 нм. Интенсивность нового максимума поглощения уменьшалась в течение 150 мин со смещением в область меньших длин волн (до 858 нм) (рис. 3, б). Таким образом, характер взаимодействия астаксантина с ионами трехвалентного железа и природа образующихся продуктов зависят от полярности растворителя. Стоит отметить, что содержание метанола в дихлорметане в этом эксперименте составило около 0,1%. Но уже при увеличении метанола до 6% полоса в красной области спектра не обнаруживалась. Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что астаксантин разрушается в присутствии сильных окислителей (Fe^{3+}), а в присутствии Fe^{2+} , который в основном проявляет восстановительные свойства ($\text{Fe}^{2+} - 1\text{e}^- \rightarrow \text{Fe}^{3+}$), существенных превращений астаксантина не наблюдается.

Электронный парамагнитный резонанс

Для подтверждения радикальной природы продукта взаимодействия астаксантина с Fe^{3+} в дихлорметане использовали метод ЭПР. Концентрация астаксантина составила 30 мкМ, железа – 50 мкМ. Образец инкубировали до трех суток при комнатной температуре в темноте. На рис. 5 показана зависимость амплитуды сигнала ЭПР от времени для образца. На вставке приведен синглетный спектр ЭПР и его подгонка функцией Тцаллиса, позволяющей симулировать спектральные линии различной формы [37].

Ширина линии ЭПР, обнаруженная в работе, составляет 15 ± 1 Гс, что типично для сигналов свободных радикалов каротиноидов [38]. Значение g-фактора $2,003 \pm 0,001$ также характерно для органических π -радикалов [39]. Форма линии близка к гауссовой (параметр тцаллиана $q = 1,06 \pm 0,01$), что может свидетельствовать о неразрешенной сверхтонкой структуре. Штриховая линия на вставке к рисунку относится к широкому (~ 250 Гс) нерадикальному сигналу ЭПР с $g = 1,98$, который может быть обусловлен анионным комплексом $(\text{FeCl}_4)^-$, характерным для FeCl_3 в неорганических растворителях [40]. Амплитуда сигнала уменьшалась со временем (примерно в 4 раза за 24 ч). Ширина сигнала от времени не зависела.

Полученные методом спектроскопии ЭПР данные подтверждают радикальную природу промежуточного продукта взаимодействия астаксантина с ионами железа(III), выявленного методом спектрофотометрии (поглощение на 876 нм). Что касается ионов Fe^{2+} , то инкубация с астаксантином в тех же условиях, что и для Fe^{3+} , не приводила к появлению спектров ЭПР, характерных для радикальных продуктов (данные не приводятся).

ИК-спектроскопия

Продукты взаимодействия астаксантина (15 мкМ) с Fe^{3+} (0,1 мМ) или с Fe^{2+} (0,1 мМ) в дихлорметане и метаноле (инкубировали при комнатной температуре в темноте до 80 мин) изучали с помощью ИК-спектроскопии (рис. 6). Полученный ИК-спектр сравнивали со спектром

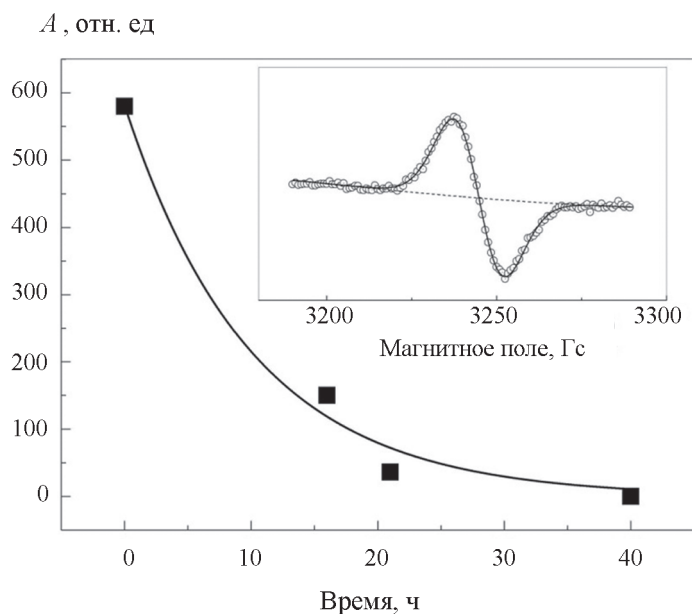


Рис. 5. Временная зависимость амплитуды A сигнала ЭПР свободного радикала (символы). Сплошная линия – результат теоретической подгонки функцией $A(t) = A_0 \exp(-t/\tau)$, $A_0 = 580 \pm 35$; $\tau = 10 \pm 2$ (ч). Вставка: экспериментальный спектр ЭПР радикала (символы). Сплошная линия – результат подгонки экспериментального спектра функцией Тцаллиса. Параметр формы $q = 1,06 \pm 0,01$. Полуширина $9,2 \pm 0,1$ Гс. Штриховая линия – паразитная широкая (полуширина ~ 160 Гс) линия гауссовой формы, характерная для анионного комплекса $(\text{FeCl}_4)^-$

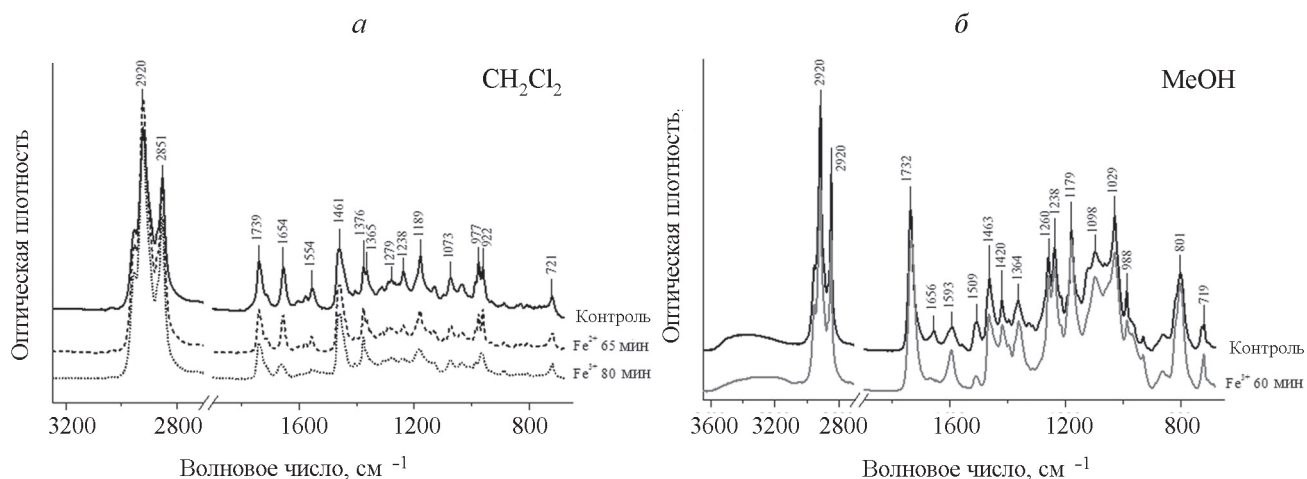


Рис. 6. ИК-спектры исходного астаксантина и астаксантина, инкубированного с Fe^{3+} и Fe^{2+} : a – в дихлорметане; b – в метаноле после высушивания и перерастворения в дихлорметане. Условия инкубации: 15 мкМ астаксантина, 100 мкМ железа, комнатная температура, в темноте

контроля – раствора незамещенного астаксантина в дихлорметане.

Для астаксантина характерны [41–45] полосы поглощения при 2920 и 2851 см^{-1} с плечами в области больших волновых чисел, соответствующими валентным колебаниям связей С–Н в группах CH_2 (антисимметричным и симметричным соответственно) и CH_3 , слабая полоса

при 3035 см^{-1} – валентным колебаниям С–Н в звене $\text{CH}=\text{CH}$ каротиноидов. Слабая полоса поглощения с максимумом при 3497 см^{-1} относится к валентным колебаниям свободных ОН-групп. Полоса поглощения при 1739 см^{-1} соответствует валентным колебаниям карбонильной группы, при 1654 и 1554 см^{-1} – колебаниям $\text{C}=\text{C}$ в алкеновых звеньях. Однако авторы [42, 43] отмечают,

что полоса поглощения в области 1650 см^{-1} также может быть ассоциирована с колебаниями карбонильной группы, смещающимися за счет сопряжений и образования водородных связей в димерах. Полосы поглощения при 1461 и 1375 см^{-1} соответствуют деформационным (антисимметричным и симметричным соответственно) колебаниям C–H, при 977 см^{-1} – внеплоскостным деформационным колебаниям полиеновой цепи *транс*-алекенов. Достаточно интенсивная полоса при 721 см^{-1} является результатом наложения внеплоскостного деформационного колебания связи C–H в алкеновом звене (C=C–H) и маятниковых колебаний метиленовой группы в длинных линейных углеводородных цепочках.

Инкубирование астаксантина с Fe^{2+} не привело к значимым изменениям в ИК-спектрах по сравнению с контролем (рис. 6, а). Это хорошо согласуется с результатами спектрофотометрии для астаксантина с Fe^{2+} в дихлорметане, где также не наблюдали каких-либо изменений – не было ни уменьшения оптической плотности, ни смещения максимума поглощения (рис. 2, б).

При инкубации астаксантина с Fe^{3+} в дихлорметане происходило снижение интенсивности полос поглощения, соответствующих колебаниям связей C=C (1654 , 1554 см^{-1} , причем интенсивность последней снижается практически до нуля) и C–H при кратных связях (3035 , 977 см^{-1}), при этом увеличивается интенсивность полос поглощения, относящихся к колебаниям C–H в метильных/метиленовых группах. Это может свидетельствовать о нарушении сопряженных двойных связей полиеновой цепи и образовании углерод-центрированных радикалов на атомах C9 и C13.

Сходная картина – снижение интенсивности полос поглощения, соответствующих колебаниям C=C-связей (1656 см^{-1}) – наблюдалось после инкубации астаксантина с Fe^{3+} в метаноле с последующей отгонкой растворителя и перерастворением в дихлорметане (рис. 6, б).

ВЭЖХ

Продукты взаимодействия астаксантина с ионами Fe^{3+} изучали с помощью ВЭЖХ. Инкубацию каротиноида (30 мкМ) с железом (100 мкМ) проводили в метаноле или дихлорметане в течение 60 мин при комнатной температуре в темноте. Затем растворитель замещали на ацетонитрил и детектировали продукты при 6 значениях длины волны: 280, 350, 365, 440, 475 и 855 нм. В качестве контрольного образца использовали раствор коммерческого астаксантина в ацетонитриле. На рис. 7 приведена хроматограмма контрольного образца, на которой детектируется пик с максимумом поглощения 475 нм, соответствующий незамещенному астаксантину.

Дихлорметан

Продукты взаимодействия астаксантина с Fe^{3+} в дихлорметане удалось детектировать только на длине волны 440 нм (из шести установленных). При этом наблюдался единственный пик с максимумом поглощения на длине волны 425 нм (рис. 8), который был идентифицирован как апо-12'-астаксантиналь [25]. Основной пик астаксантина после окисления на хроматограмме не присутствует, что свидетельствует о полном разрушении каротиноида в этих условиях инкубации. Пик, обнаруженный спектрофотометрически при тех же

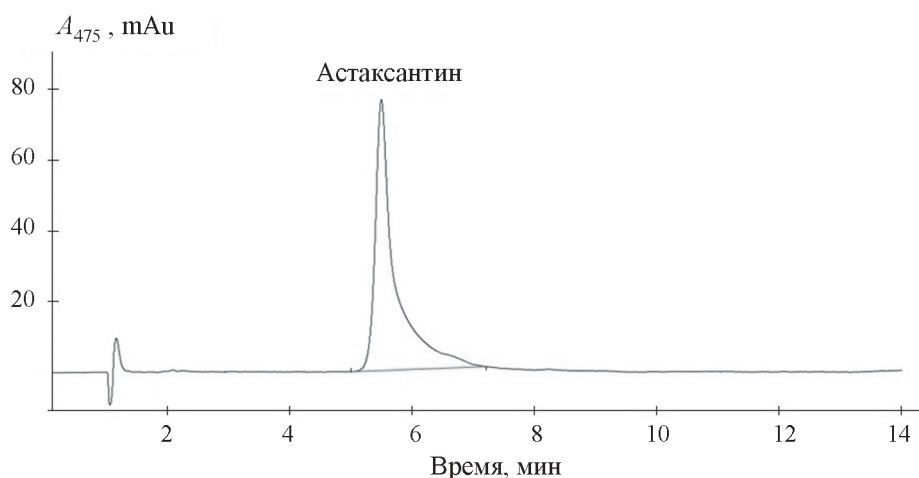


Рис. 7. Хроматограмма незамещенного астаксантина, $RT = 5,68\text{ мин}$

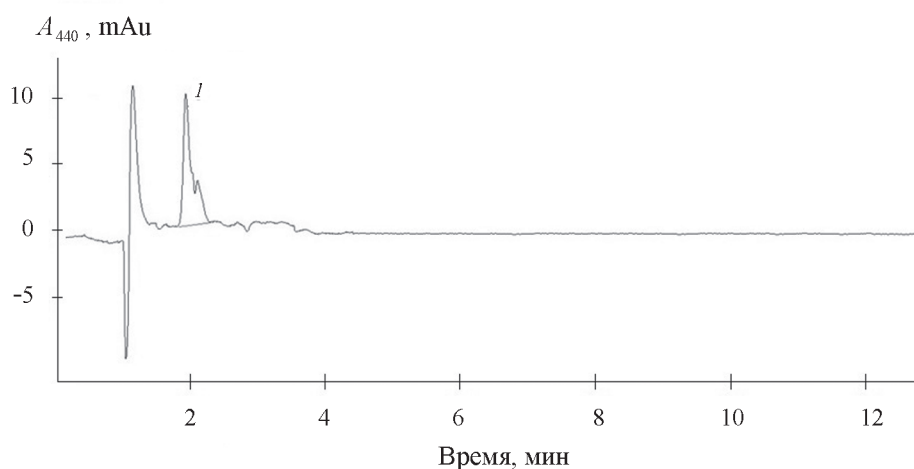


Рис. 8. Хроматограмма продуктов взаимодействия астаксантина с ионами Fe^3 в дихлорметане. Детекция на 440 нм. RT (пик 1) = 1,94 мин

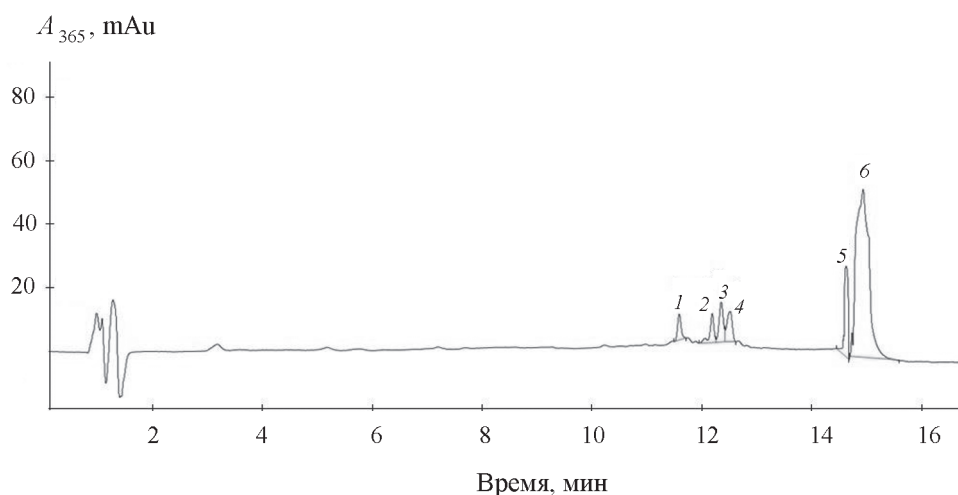


Рис. 9. Хроматограмма продуктов взаимодействия астаксантина с ионами Fe^3 в метаноле. Детекция на 365 нм. RT (пик 1) = 11,57 мин; RT (пик 2) = 12,17 мин; RT (пик 3) = 12,33 мин; RT (пик 4) = 12,49 мин; RT (пик 5) = 14,61 мин; RT (пик 6) = 14,92 мин

условиях инкубации (см. выше) с поглощением в красной области методом ВЭЖХ так же не удалось выявить. Важно отметить, что этот продукт после его перерастворения из слабополярного дихлорметана в полярные метанол и ацетонитрил не сохранялся (показано спектрофотометрически, данные не представлены).

Метанол

В ходе анализа продуктов окисления астаксантина, инкубированного железом(III) в метаноле были выделены 6 основных продуктов (рис. 9), которые идентифицировали как апо-продукты (смесь астаксантиналей и астаксантинонов) [25]. Пик исходного астаксантина также не обнаружи-

вался (хроматограмма не приведена), так как и в этих условиях полиеновая цепь астаксантина полностью деградирует.

Таким образом, в результате проведенных исследований методами спектрофотометрии и ЭПР установлено, что при взаимодействии астаксантина в ДХМ с Fe^{3+} образуется промежуточный нестабильный продукт, имеющий радикальную природу. При длительной инкубации астаксантина с Fe^{3+} в растворителях с разной полярностью (дихлорметане и метаноле) образуются стабильные продукты окислительной деградации каротиноида. Методом ВЭЖХ удалось идентифицировать эти продукты как апо-астаксантиналы с укороченной длиной изопреновой цепи. Методом ИК-Фурье-

спектроскопии подтвердили этот вывод, показав, что при взаимодействии астаксантина с ионами трехвалентного железа происходит разрушение полиеновой цепи каротиноида. Природа образуемых продуктов зависит от полярности растворителя, в котором протекают реакции.

Обсуждение

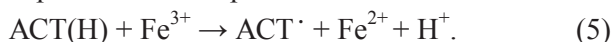
При исследовании взаимодействия астаксантина с ионами Fe^{3+} и Fe^{2+} в органических растворителях было показано, что, во-первых, природа конечных продуктов реакции зависит от полярности среды и, во-вторых, реакция окисления астаксантина под действием Fe^{3+} протекает через образование промежуточных нестабильных продуктов. На основании литературных данных предположили, что основной максимум на 874 нм принадлежит катион-радикалу, радикальную природу этого промежуточного продукта подтвердили методом ЭПР. Наличие плеча на спектре может быть обусловлено образованием дикатиона, т.е. продукта нерадикальной природы. Оба промежуточных продукта нестабильны и, в конце концов, превращаются в апо-продукты в результате окисления укороченной изопреновой цепи до альдегидов.

Во введении приведены три возможных механизма взаимодействия каротиноидов с радикалами разной природы [29]. Для астаксантина методом лазерного фотолиза было показано образование промежуточного нестабильного продукта (катион-радикала) с максимумом поглощения 800–900 нм. Положение максимума поглощения зависело от аполлярного растворителя [29]. Аналогичные реакции могут протекать с ионами железа (реакции 4, 5):

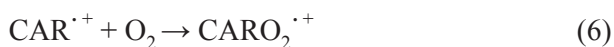
перенос электрона



отрыв атома водорода

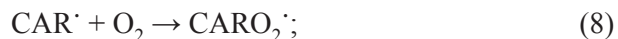


Важно отметить, что в присутствии кислорода в окружающей среде образовавшиеся радикалы каротиноидов могут с ним взаимодействовать. Так, в [46] предположили механизм формирования 5,8-пероксида исходного каротиноида (CARO_2) (для β -каротина) в присутствии кислорода и при участии Fe^{3+} :



Нейтральный радикал каротиноидов также обратимо взаимодействует с кислородом с образованием каротиноидных пероксильных радикалов, чем объясняется зависимость антиоксидантного/

прооксидантного поведения каротиноидов от концентрации кислорода [14]:



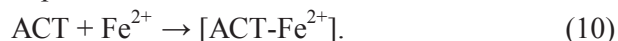
при взаимодействии с железом также возможно образование аддукта радикальной природы:

образование радикального аддукта



кроме того, возможно образование комплекса астаксантина с ионами Fe^{2+} , т.е. соединения нерадикальной природы:

образование комплекса с железом



В работе [16] наблюдали изменение спектра поглощения астаксантина при взаимодействии с ионами Cu^{2+} , при котором уменьшалась оптическая плотность в максимуме поглощения астаксантина (478 нм), появлялись максимум поглощения на 878 нм и плечо на спектре в области меньших значений длины волны. Авторы считают, что поглощение на 878 нм связано с образованием катион-радикала $\text{ACT}^{\cdot+}$, а появление плеча обусловлено образованием дикатиона (ACT^{2+}) – продукта нерадикальной природы:

образование дикатиона



Другой тип реакции взаимодействия астаксантина в ДХМ с ионами Fe^{2+} (реакция образования незаряженного комплекса) был обнаружен спектрофотометрически по сдвигу спектра поглощения астаксантина в сторону больших длин волн в присутствии очень высоких концентраций солей железа [16].

Наиболее подробно вопрос образования промежуточных радикальных и нерадикальных продуктов каротиноидов изучали на примере β -каротина методом лазерного фотолиза в аполлярных растворителях (хлороформе, тетрахлорметане), в результате чего было установлено образование различных радикалов каротина и дикатиона нерадикальной природы. Именно в этих условиях при освещении лазером раствора астаксантина в хлороформе было обнаружено образование нестабильного промежуточного продукта, который имел максимум поглощения в короткой инфракрасной области (870 нм) и интенсивность которого уменьшалась во времени, при этом отсутствовал сдвиг максимума спектра [47]. Но в этом случае не была подтверждена радикальная природа образовавшегося промежуточного соединения, а также наличие или отсутствие заряда в его молекуле.

Было показано, что каротиноиды (β -каротин, кантаксантин и др. [48]) при взаимодействии с ионами железа(III) способны образовывать радикальные продукты, которые в зависимости от природы (катион-радикал или нейтральный радикал) имеют максимумы поглощения в области 550–1000 нм [14]. Интересно отметить, что соотношение между значениями концентрации ионов железа и каротиноида определяет природу промежуточных продуктов. Так, при инкубации β -каротина с эквивалентными концентрациями хлорида железа(III) образуется катион-радикал (максимум поглощения 935 нм), а при избытке железа – дикатион (Car^{2+}) (максимум поглощения 889 нм) [32].

В настоящем исследовании получены прямые доказательства того, что при инкубации астаксантина в ДХМ с ионами Fe^{3+} происходит образование нескольких промежуточных продуктов, причем один из них имеет радикальную природу. Образование этих нестабильных продуктов зависит от полярности среды и происходит в ДХМ ($\epsilon = 8,9$) и не наблюдается в метаноле ($\epsilon = 33,1$).

Полученные результаты в совокупности с литературными данными позволяют утверждать наличие нескольких типов превращений астаксантина в присутствии ионов Fe^{3+} , зависимость природы конечных продуктов окисления и деструкции астаксантина от полярности среды, отсутствие взаимодействия астаксантина с ионами Fe^{2+} .

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kim S.H., Kim H. // *Nutrients*. 2018. Vol. 10. N 9. P. 1137.
- Fakhri S., Abbaszadeh F., Dargahi L., Jorjani M. // *Pharmacol. Res. Elsevier Ltd*. 2018. Vol. 136. P. 1.
- Wang X. jun, Chen W., Fu X. ting, et al. // *Cell Death Discov.* Springer US, 2018. Vol. 4. N 1. P. 1.
- Kohandel Z., Farkhondeh T., Aschner M., et al. // *Biomed. Pharmacother. Elsevier Masson SAS*. 2022. Vol. 145. P. 112179.
- Galasso C., Orefice I., Pellone P., et al. // *Mar. Drugs*. 2018. Vol. 16. N 8. P. 1.
- Pashkow F.J., Watumull D.G., Campbell C.L. // *Am. J. Cardiol*. 2008. Vol. 101. N 10 SUPPL. P. 558.
- Kishimoto Y., Yoshida H., Kondo K. // *Mar. Drugs*. 2016. Vol. 14. N 2. P. 1.
- Wu H., Niu H., Shao A., et al. // *Mar. Drugs*. 2015. Vol. 13. N 9. P. 5750.
- Fassett R.G., Coombes J.S. // *Molecules*. 2012. Vol. 17. N 2. P. 2030.
- Chang M.X., Xiong F. // *Molecules*. 2020. Vol. 25. N 22. P. 5342.
- Kobayashi M., Sakamoto Y. // *Biotechnol. Lett.* 1999. Vol. 21. N 4. P. 265.
- Sy C., Caris-Veyrat C., Dufour C., et al. // *Food Funct.* 2013. Vol. 4. N 5. P. 698.
- Nishino A., Yasui H., Maoka T. // *J. Oleo Sci.* 2017. Vol. 66. N 1. P. 77.
- El-Agamey A., Lowe G.M., McGarvey D.J., et al. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2004. Vol. 430. N 1. P. 37.
- Al-Amin M.M., Akhter S., Hasan A.T., et al. // *Metab. Brain Dis.* 2015. Vol. 30. N 5. P. 1237.
- Polyakov N.E., Focsan A.L., Bowman M.K., Kispert L.D. // *J. Phys. Chem. B*. 2010. Vol. 114. N 50. P. 16968.
- Viazau Y. V., Goncharik R.G., Kulikova I.S., et al. // *Bioresour. Bioprocess. Springer Singapore*, 2021. Vol. 8. N 1.
- Shah M.M.R., Liang Y., Cheng J.J., Daroch M. // *Front. Plant Sci.* 2016. Vol. 7. P. 531.
- Miao F., Lu D., Li Y., Zeng M. // *Anal. Biochem.* 2006. Vol. 352. N 2. P. 176.
- Yang C., Zhang L., Zhang H., et al. // *J. Agric. Food Chem.* 2017. Vol. 65. N 4. P. 818.
- Honda M., Sowa T., Kawashima Y. // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2020. Vol. 122. N 5. P. 1.
- Giovannetti R., Alibabaei L., Pucciarelli F. // *Spectrochim. Acta – Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2009. Vol. 73. N 1. P. 157.
- Olsina J., Durchan M., Minofar B., et al. // *arXiv Prepr. arXiv1208.4958*. 2012. P. 1.
- Kulikov E.A., Turanova V.A., Aleshin S. V., et al. // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2021. Vol. 76. N 1. P. 27.
- Weesepeel Y., Gruppen H., De Bruijn W., Vincken J.P. // *J. Agric. Food Chem.* 2014. Vol. 62. N 42. P. 10254.
- Gómez-Estaca J., Calvo M.M., Álvarez-Acero I., et al. // *Food Chem.* 2017. Vol. 216. P. 37.
- Yang S., Zhou Q., Yang L., et al. // *J. Oleo Sci.* 2015. Vol. 64. N 3. P. 243.
- Maoka T. // *Glob. Perspect. Astaxanthin From Ind. Prod. to Food, Heal. Pharm. Appl.* 2021. P. 411.
- El-Agamey A., McGarvey D.J. // *Carotenoids Vol. 4 Nat. Funct.* 2008. Vol. 4. P. 119.
- Han R.M., Zhang J.P., Skibsted L.H. // *Molecules*. 2012. Vol. 17. N 2. P. 2140.
- Focsan A.L., Bowman M.K., Shamshina J., et al. // *J. Phys. Chem. B*. 2012. Vol. 116. N 44. P. 13200.
- Polyakov N.E., Leshina T. V., Salakhutdinov N.F., Kispert L.D. // *J. Phys. Chem. B*. 2006. Vol. 110. N 13. P. 6991.
- Jeevarajan J.A., Wei C.C., Jeevarajan A.S., Kispert L.D. // *J. Phys. Chem.* 1996. Vol. 100. N 14. P. 5637.
- Дудник А.Г., Лотош Н.Ю., Куликов Е.А., Леванов А.В., Селищева А.А. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*. 2025. Т. 66. № 3. С. 2490.
- Ota M. // *Chem. Pharm. Bull.* 1970. N 43. P. 2091.
- Quaranta M., Murkovic M., Klimant I. // *Analyst*. 2013. Vol. 138. N 21. P. 6243.
- Howarth D.F., Weil J.A., Zimpel Z. // *J. Magn. Reson. Academic Press*, 2003. Vol. 161. N 2. P. 215.

38. Gao G., Deng Y., Kispert L.D. // J. Phys. Chem. B. 1998. Vol. 102. N 20. P. 3897.
39. Wertz J.E., Bolton J.R. McGraw-Hil. N.Y., 1972. 497 p.
40. Swanson T.B., Laurie V. // J. Phys. Chem. 1965. Vol. 69. N 1. P. 244.
41. Moh M.H., Man Y.B.C., Badlishah B.S., et al. // J. Am. Oil Chem. Soc. 1999. Vol. 76. N 2. P. 249.
42. Berezin K. V., Nechaev V. V. // J. Appl. Spectrosc. 2005. Vol. 72. N 2. P. 164.
43. Martin D., Amado A.M., González A.G., et al. // J. Phys. Chem. A. 2019. Vol. 123. N 25. P. 5266.
44. Liu J., Chen X., Yang X., et al. // J. Mol. Struct. Elsevier B.V, 2019. Vol. 1182. P. 119.
45. Subramanian B., Thibault M.H., Djaoued Y., et al. // Analyst. Royal Society of Chemistry, 2015. Vol. 140. N 21. P. 7423.
46. Gao Y., Kispert L.D. // J. Phys. Chem. B. 2003. Vol. 107. N 22. P. 5333.
47. Mortensen A., Skibsted L.H. // Free Radic. Res. 1997. Vol. 26. N 6. P. 549.
48. Polyakov N.E., Kruppa A.I., Leshina T. V., et al. // Free Radic. Biol. Med. 2001. Vol. 31. N 1. P. 43.

Информация об авторах

Надежда Владимировна Жданова – студентка РХТУ им. Д.И. Менделеева (dina1576@yandex.ru);

Наталья Юрьевна Лотош – ст. науч. сотр. НИЦ «Курчатовский институт», канд. хим. наук (Lotosh_NY@nrcki.ru);

Евгений Александрович Куликов – науч. сотр. НИЦ «Курчатовский институт», канд. биол. наук (www.kulikov.e.a.93@mail.ru);

Светлана Владимировна Лукашевич – инженер-исследователь НИЦ «Курчатовский институт» (lukashevich_sv@nrcki.ru);

Сергей Николаевич Малахов – ст. науч. сотр. НИЦ «Курчатовский институт», канд. хим. наук (Malakhov_SN@nrcki.ru);

Юрий Алексеевич Кокшаров – профессор физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. физ.-матем. наук (yua_koksharov@rambler.ru);

Алла Анатольевна Селищева – вед. науч. сотр. биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; инженер-исследователь НИЦ, докт. хим. наук «Курчатовский институт» (aselo@yandex.ru).

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических стандартов

В данной работе отсутствуют исследования человека и животных.

Статья поступила в редакцию 20.09.2024;
одобрена после рецензирования 16.11.2024;
принята к публикации 17.03.2025.