

Stabile und hochgradig wasserdispersible, hoch ungesättigte Carotinoid-Phospholipide – Oberflächeneigenschaften und Aggregatdimensionen**

Bente Jeanette Foss, Stine Nalum Næss, Hans-Richard Sliwka* und Vassilia Partali

Mehrfach ungesättigte Phospholipide haben wichtige physiologische Eigenschaften, weshalb Konzentrations- und Synthesemethoden zur gezielten Produktion dieser Verbindungen entwickelt wurden.^[1] Das konjugierte Phospholipid mit den meisten bis jetzt nachgewiesenen Doppelbindungen enthält eine Tetraensäure (C18:4).^[2] Ob konjugiert oder nicht konjugiert – mehrfach ungesättigte Phospholipide sind ebenso instabil wie die entsprechenden freien Fettsäuren und können daher nur bei niedrigen Temperaturen, in Schutzgasatmosphäre oder mit Stabilisatoren wie Carotinoiden gehandhabt werden.^[3] Die Synthese beständiger hoch ungesättigter Phospholipide muss folglich auf stabilen ungesättigten Fettsäuren aufbauen. Diese Anforderung erfüllen die Carotinoide. Eine dieser Säuren, die β -Apo-8'-carotinsäure (C30:9), ist als Ethylester (C30-Ester) erhältlich.^[4] Carotinoide werden nur wenig von Mensch und Tier aufgenommen,^[5] wobei vorhergehendes gastrologisches Emulgieren, z. B. mit Lysophosphatidylcholin, die Absorption erleichtert.^[6] Einige der industriell hergestellten Carotinoide werden in großen Mengen zum Färben von Getränken verwendet.^[7] Da die Carotinoide jedoch hydrophob sind, gelingt ihr Einsatz als Lebensmittelfarbstoff für nichtalkoholische Getränke nur über spezielle Formulierungsmethoden. Durch sorgfältige Wahl dispergierender Lösungsmittel, der Tenside, der Schutzkolloide und anderer Zusätze und durch Verkürzung der Hochtemperaturexposition (200 °C) versucht man, die Wasserdispersion der Carotinoide zu erhöhen, wobei mit den angewendeten Formulierungsmethoden Teilchengrößen von 20–1000 nm erreicht werden.^[8]

Die chemischen und physikalischen Eigenschaften molekularer Carotinoidlösungen sowie gelöster und aggregierter Phospholipide sind ausführlich beschrieben.^[9] Die Eigenschaften der Carotinoide in einer natürlichen, wasserbasierten Umgebung oder in den aus Phospholipiden bestehenden Zellmembranen sind jedoch weitaus weniger bekannt und

[*] Dr. H.-R. Sliwka, B. J. Foss, Prof. V. Partali
 Institutt for Kjemi
 Norges Teknisk Naturvitenskapelige Universitet (NTNU)
 7491 Trondheim (Norwegen)
 Fax: (+47) 73-59-6255
 E-mail: hrs@nvg.ntnu.no
 S. N. Næss
 Institutt for Fysikk
 NTNU (Norwegen)

[**] Wir danken H. Ernst (BASF AG, Ludwigshafen) und S. Servi (Politecnico di Milano) für großzügige Spenden des C30-Esters bzw. des Glycerophosphocholins. S.N.N. dankt für finanzielle Unterstützung durch den Norwegischen Forschungsrat.

daher Gegenstand aktueller Untersuchungen. Besonders die photophysikalischen und photochemischen Eigenschaften der Carotinoidaggregate sind wichtig für das Verständnis der Photosynthese, von Energieübertragungs- und von Schutzreaktionen ($^1\text{O}_2$ -Quenching).^[10] Die Synthese eines Carotinoid-Phospholipids sollte die Eigenschaften der Carotinoide mit denen der Phospholipide verbinden.

Lysocarotinophosphatidylcholine wurden aus dem Dichlorphosphat **2** und einer Gleichgewichtsisomerenmischung (9:1) der Carotinoylmonoglyceride **1a** und **1b**^[11] erhalten (Schema 1). Die Zwischenprodukte **3** wurden mit Trimethylamin quaternisiert, was zum Isomergemisch **4a/4b/4c** (49:43:8) in 33% Ausbeute führte.^[12] Die 1D- und 2D- ^1H - sowie ^{13}C -NMR-Spektren der Produktmischung enthielten die charakteristischen Signale der Glycerinisomere und von β -Carotinoiden, das ^{31}P -NMR-Spektrum verweist auf etwa gleiche Anteile von **4a** und **4b**.

Stellungsisomere der Lysophosphatidylcholine, die mit kürzeren oder längeren Fettsäuren als C16 oder C18 verestert sind, verlieren die lytische Aktivität, die zusätzlich durch Doppelbindungen vermindert wird.^[13] Doch auch wenn die Isomere **4a–c** unterschiedlich biologisch reagieren,^[14] ihre Tensid- und Aggregateigenschaften sollten nahezu identisch sein, da sie aus den gleichen hydrophilen und hydrophoben Gruppen bestehen.^[15] Der Kontaktwinkel eines Wassertropfens auf einem trockenen Film aus **4** ($\theta \approx 25^\circ$) und die kurze Lebenszeit des Tropfens vor der vollständigen Benetzung (0.1 s) zeigen Tensideigenschaften an. Die Oberflächenspannung γ an der Wasser-Luft-Grenzfläche und die kritische Micellbildungskonzentration (cmc) von **4** wurden tensio-

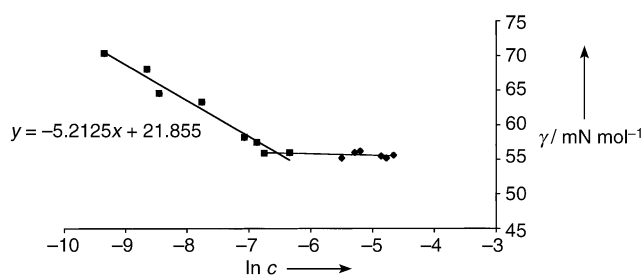


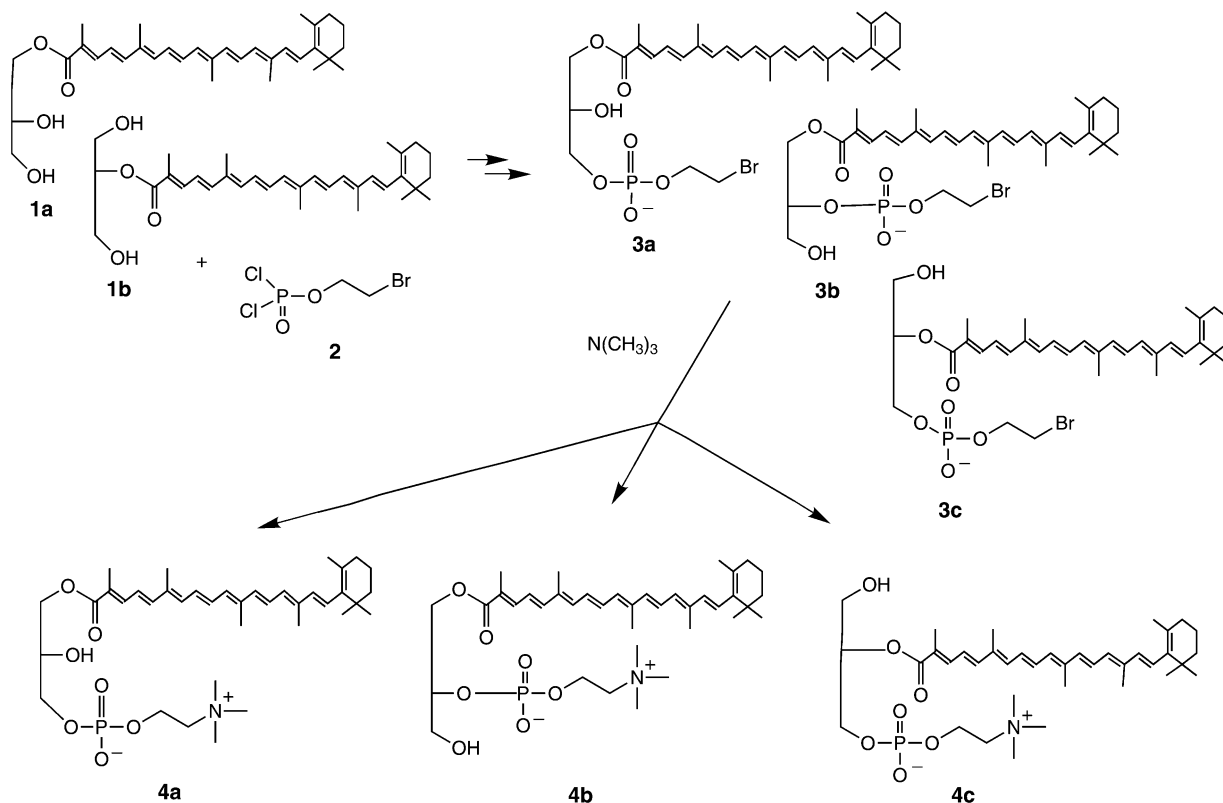
Abbildung 1. Oberflächenspannung γ und cmc von **4** (Schnittstelle der Linien).

metrisch ermittelt: $\gamma_{\text{cmc}} = 56 \text{ mN m}^{-1}$ bei $\text{cmc} = 1.5 \times 10^{-3} \text{ M}$ ($= 1 \text{ mg L}^{-1}$) (Abbildung 1).

Mit den Daten von Abbildung 1 wurden die Oberflächenkonzentration Γ , der Oberflächendruck π_{cmc} , das Molekülareal an der Grenzfläche (A) und die Gibbs-Adsorptions- und -Aggregierungsenergien (ΔG_{ad}^0 bzw. ΔG_{mic}^0) berechnet (Tabelle 1). Die Γ - und A -Werte ähneln denen anderer zwitterionischer Tenside.^[16] Der negative Wert von ΔG_{mic}^0 drückt aus, dass Aggregate aus **4** in Wasser bei Raumtempe-

Tabelle 1: Mit den Daten von Abbildung 1 ermittelte Kenngrößen der Lysophosphatidylcholine **4**.

cmc [$10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$]	1.5	$A [\text{\AA}^2]$	52
$\gamma_{\text{cmc}} [\text{mN m}^{-1}]$	56	$\Delta G_{\text{mic}}^0 [\text{kJ mol}^{-1}]$	-16.0
$\pi_{\text{cmc}} [\text{mN m}^{-1}]$	17	$\Delta G_{\text{ad}}^0 [\text{kJ mol}^{-1}]$	-21.3
$\Gamma [10^6 \text{ mol m}^{-2}]$	3.2	$k_{\text{ad}}/k_{\text{mic}}$	8.7



Schema 1. Synthese der Carotinoid-Phospholipide.

ratur spontan dispergiert werden. Die Gleichgewichtskonstanten $\frac{\text{Moleküle}_{\text{Oberfläche}}}{\text{Moleküle}_{\text{Lösung}}} = k_{\text{ad}} = 6100$ und $\frac{\text{Moleküle}_{\text{Micelle}}}{\text{Moleküle}_{\text{Lösung}}} = k_{\text{mic}} = 700$ belegen die erhöhte Konzentration der Moleküle an der Wasseroberfläche. Das Verhältnis der an der Grenzfläche adsorbierten Moleküle zu dispergierten Aggregaten (9:1) erlaubt dennoch die Bildung klarer, gleichmäßig farbiger Lösungen ohne Zuhilfenahme von Hitze, Tensiden oder anderen Zumischungen. Bei hohen Konzentrationen wurde die Lösung trübe und zähflüssiger. Auch nach Zugabe von mehr als 60 mg mL^{-1} **4** konnte keine Sättigung beobachtet werden.

In Wasser bilden die Carotinoidderivate **4** Aggregate mit einem mittleren hydrodynamischen Radius r_{H} von 8 nm, wobei die r_{H} -Werte in einem engen Größenbereich liegen (6–14 nm). Daneben entstehen auch einige wenige größere Aggregate mit einem Radius r_{H} von 40–600 nm (Abbildung 2). Amphiphile mit einer einzigen hydrophoben Kette

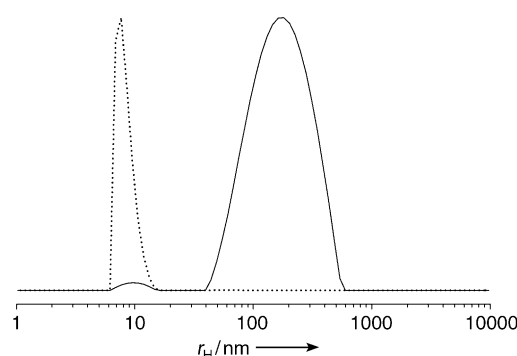


Abbildung 2. Bestimmung der Aggregatgröße von **4** in Wasser mittels dynamischer Lichtstreuung: Mengenverteilung, — Intensitätsverteilung.

aggregieren normalerweise in Micellen.^[17] Der Radius der Aggregate aus **4** spricht jedoch eher für eine andere Aggregatmorphologie.

Während die Absorption λ_{max} von **4** in organischen Lösungsmitteln bei 454 nm liegt, verschiebt sie sich in Wasser nach 400 nm (Abbildung 3). Diese Bande entsteht durch die Excitonenwechselwirkung nebeneinander liegen-

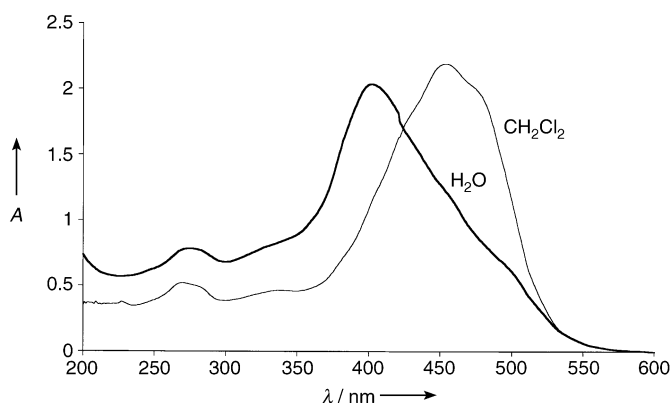


Abbildung 3. Vis-Spektrum von **4** in Dichlormethan und in Wasser.

der Moleküle in H-Aggregaten.^[7,8] In Aggregaten und in monomolekularen Oberflächenfilmen gesättigter und *cis*-ungesättigter Phospholipide wird eine dichte Packung der Moleküle durch die flexible hydrophobe Kette oder durch die Torsion der Kette durch *cis*-Anordnungen beeinträchtigt. Die all-*trans*-Konfiguration der Carotinoidkette zwingt dagegen die Isomere **4** zur Bildung einer starren, ausgestreckten Kette, was eine dichte Anordnung der aggregierten und oberflächenadsorbierten Moleküle zulässt.

Die Lysophosphatide **4a–c** ermöglichen die gleichzeitige Untersuchung konjugierter mehrfach ungesättigter Phospholipide und Carotinoide in wässrigen Lösungen ohne Zusatzstoffe. Über die Bestimmung der photophysikalischen Eigenschaften der Aggregate werden wir in Kürze berichten.

Experimentelles

Zu einer Lösung von 2-Bromethylchlorphosphat (**2**, 0.49 g, 2 mmol)^[18] und Triethylamin (0.78 g, 7.8 mmol) in Benzol (30 mL) wurde in Anlehnung an Lit. [12] tropfenweise eine Mischung der Glycerine **1a** und **1b**^[11] (9:1, 0.66 g, 1.3 mmol), gelöst in Benzol (70 mL), gegeben. Die Reaktionsmischung wurde unter Stickstoff gerührt (20 °C, 24 h). Das ausgefallene Triethylammoniumchlorid wurde abfiltriert und das zurückbleibende Phosphorchloridat und der Überschuss an Dichlorphosphat **2** mit Wasser (20 mL) hydrolysiert (20 °C, 12 h). Die organische Phase wurde abgetrennt, dreimal mit 40 mL Wasser gewaschen und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde in Chloroform/2-Propanol/Dimethylformamid (3:5:5, 120 mL) aufgenommen und mit Trimethylamin (45-proz. in H₂O, 20 mL) umgesetzt (20 °C, 48 h). Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt in Chloroform aufgenommen. Die chromatographische Reinigung (CHCl₃/CH₃OH 4:1, graduelle Zugabe von H₂O und CH₃OH bis zu einem Verhältnis CHCl₃/CH₃OH/H₂O von 4:5:1) ergab eine Mischung der 1,3-, 1,2- und 2,3-(β-Apo-8'-carotinoyl)-glycero-phosphatidylcholinisomere **4a–c** (49:43:8, 290 mg, 33 %).

MS (ESI): m/z : 672 [$M^+ + H$], 579 [$(M^+ + H) - 92$ (Toluol)]. Über die eindeutige Zuordnung der komplexen ¹H-, ¹³C- und ³¹P-NMR-Signale in den Spektren des Isomerengemischs werden wir getrennt berichten. Der Kontaktwinkel θ wurde mit einem Goniometer (Fibro DAT 1122) bestimmt, die Oberflächenspannung γ und die cmc wurden in filtrierten (0.22 μm) Lösungen in destilliertem Wasser mit einem Tensiometer gemessen (Krüss K10 T, Wilhelmy-Plattenmethode). Die γ -Werte wurden unmittelbar nach dem Erreichen des Gleichgewichts notiert.

Oberflächendruck $\pi_{\text{cmc}} = \gamma_0 - \gamma_{\text{cmc}}$, $\gamma_0 = 73 \text{ mN m}^{-1}$ (H₂O); Oberflächenkonzentration $\Gamma = \frac{-1}{RT} \frac{d\gamma}{dc_{\text{cmc}}}$, woraus $\Gamma = \frac{-c_{\text{cmc}}}{RT} \frac{d\gamma}{dc_{\text{cmc}}}$ [mol m^{-2}] mit c in mol m^{-3} folgt; Neigungskonstante aus Abbildung 1: 5.2×10^{-3} , γ in J m^{-2} , $1 \text{ mN m}^{-1} = 0.001 \text{ J m}^{-2}$, $R = 8.31 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, $T = 294^\circ \text{C}$. Molekülareal an der Grenzfläche $A [\text{\AA}^2] = 10^{20}/\Gamma N_A$; Gibbs-Aggregierungsenergie $\Delta G_{\text{mic}}^0 = RT \ln c_{\text{cmc}}$ [J mol^{-1}]; Gibbs-Adsorptionsenergie $\Delta G_{\text{ad}}^0 = (RT \ln c_{\text{cmc}}) - (6.023 \times 10^{-3} \pi_{\text{cmc}} A)$ [J mol^{-1}]. Gleichgewichtskonstanten: $\frac{\text{Moleküle}_{\text{Micelle}}}{\text{Moleküle}_{\text{Lösung}}} = k_{\text{mic}} = e^{-\frac{\Delta G_{\text{mic}}^0}{RT}}$, $\frac{\text{Moleküle}_{\text{Oberfläche}}}{\text{Moleküle}_{\text{Lösung}}} = k_{\text{ad}} = e^{-\frac{\Delta G_{\text{ad}}^0}{RT}}$.

Der hydrodynamische Aggregatradius wurde mit einem Lichtstreuungsinstrument ermittelt: ALV DLS/SLS-5022F-Kompaktgoniometer mit ALV-5000/E-multiple- τ -Digital-Korrelator, Lichtquelle: 22-mW-He-Ne-Laser. Die Proben (23 °C) wurden über ein 5-μm-Filter in die zylindrische Küvette gefüllt, Lichtstreuungswinkel: 90°, Datenanalyse mit CONTIN.^[19] Die Daten von 14 aufeinander folgenden fünfminütigen Messreihen wurden gemittelt.

Eingegangen am 7. Mai 2003 [Z51828]

Stichwörter: Carotinoide · Fettsäuren · Grenzflächenchemie · Nanostrukturen · Phospholipide

- [1] a) G. G. Haraldson, A. Thorarensen, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1999**, 76, 1143–1149; b) D. W. Hopper, J. G. Catalano, T. L. Macdonald, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 7871–7874.
- [2] B. Schmitz, H. Egge, *Chem. Phys. Lipids* **1984**, 43, 139–151.
- [3] A. A. Woodall, G. Britton, M. J. Jackson, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, 1336, 575–576.
- [4] Unter dem Namen Lucantin Yellow bei der BASF, Ludwigshafen, und unter dem Namen Carophyll Yellow bei Hoffmann-La Roche, Basel.
- [5] T. van Vliet, *Eur. J. Clin. Nutr.* **1996**, 50, S32–37.
- [6] a) H. C. Furr, R. M. Clark, *J. Nutr. Biochem.* **1997**, 8, 364–377; b) T. Sugawara, M. Kushiro, H. Zhang, E. Eiichi, H. Ono, A. Nagao, *J. Nutr.* **2001**, 131, 2921–2927.
- [7] E. Lüddecke, A. Auweter, L. Schweikert (BASF AG), EP 930022, **1998**.
- [8] D. Horn, J. Rieger, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 4460–4492; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 4331–4361.
- [9] a) *Carotenoids*, Vol. 1A, 1B, 3 (Hrsg.: G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander), Birkhäuser, Basel, **1995**, **1995** bzw. **1998**; b) *Phospholipids Handbook*, Marcel Dekker, New York, **1993**.
- [10] a) M. Burke, R. Edge, E. J. Land, D. J. McGarvey, T. G. Truscott, *FEBS Lett.* **2001**, 500, 132–136; b) R. K. Naqvi, T. B. Melø, B. Bangar, T. Javorfi, I. Simidjiev, G. Garab, *Spectrochim. Acta Part A* **1997**, 53, 2659–2667; c) A. Cantrell, D. J. McGarvey, T. G. Truscott, F. Rancan, F. Böhm, *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, 412, 47–54; d) A. V. Ruban, P. Horton, A. J. Young, *J. Photochem. Photobiol. B* **1993**, 21, 229–234.
- [11] V. Partali, L. Kvittingen, H. R. Sliwka, T. Anthonsen, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 342–344; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 329–330.
- [12] S. D. Stamatov, *Chem. Phys. Lipids* **1998**, 91, 129–134.
- [13] F. C. Reman, R. A. Demel, K. De Gier, L. L. M. van Deenen, H. Eibl, O. Westphal, *Chem. Phys. Lipids* **1969**, 3, 221–233.
- [14] P. J. A. O'Doherty, *Lipids* **1979**, 14, 84–87.
- [15] a) D. Arnold, H. U. Weltzien, O. Westphal, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1967**, 709, 234–239; b) R. Haftendorn, G. Schwarze, R. Ubrich-Hofmann, *Chem. Phys. Lipids* **2000**, 104, 57–66; c) N. Robinson, L. Saunders, *J. Pharm. Pharmacol.* **1958**, 10 Suppl., 227T–229T.
- [16] M. J. Rosen, *Surfactants and Interfacial Phenomena*, 2. Aufl., Wiley, New York, **1989**, S. 79.
- [17] R. Nagarajan, E. Ruckenstein, *J. Colloid Interface Sci.* **1979**, 71, 580–604.
- [18] W. J. Hansen, R. Murari, Y. Wedmid, W. J. Baumann, *Lipids* **1982**, 17, 453–459.
- [19] S. W. Provencher, CONTIN (Version 2) Users manual, EMBL technical report DA07, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen, **1984**.