

УДК 543.424.2

## СПЕКТРОСКОПИЯ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА В-КАРОТИНА: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ И ЧИСЛЕННОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ



### RAMAN SPECTROSCOPY OF $\beta$ -CAROTENE: EXPERIMENT AND COMPUTATIONAL MODELING

**Васимов Дмитрий Денисович**

Институт общей физики им. А.М. Прохорова  
Российской академии наук, Москва  
vasdim1612@yandex.ru

**Новиков Василий Сергеевич**

Институт общей физики им. А.М. Прохорова  
Российской академии наук, Москва  
vasiliy1992@gmail.com

**Аннотация.** Целью исследований является определение ключевых особенностей спектров КР  $\beta$ -каротина на основе эксперимента и расчётов с использованием метода ТФП. Для этого был проведен расчёт спектров КР транс-изомера молекулы  $\beta$ -каротина, выполнено сравнение рассчитанных спектров с экспериментальными нерезонансными и резонансными спектрами КР поликристаллического порошка  $\beta$ -каротина, содержащего только транс-изомеры молекул, а также сравнение с литературными данными о спектрах КР цис-изомеров.

**Ключевые слова:** каротиноиды,  $\beta$ -каротин, спектроскопия комбинационного рассеяния, теория функционала плотности.

**Vasimov Dmitry Denisovich**

Prokhorov General Physics Institute  
of the Russian Academy of Sciences,  
Moscow  
vasdim1612@yandex.ru

**Novikov Vasily Sergeevich**

Prokhorov General Physics Institute  
of the Russian Academy of Sciences,  
Moscow  
vasiliy1992@gmail.com

**Annotation.** The study is aimed to determine the key features of the  $\beta$ -carotene Raman spectra using the experiment and DFT calculations. For this purpose, the Raman spectra of the  $\beta$ -carotene molecule all-trans-isomer were calculated, the calculated spectra were compared with the experimental non-resonance and resonance Raman spectra of the  $\beta$ -carotene polycrystalline powder, which contains only all-trans-isomers of the molecules, as well as with the literature data on the Raman spectra of cis-isomers.

**Keywords:** carotenoids,  $\beta$ -carotene, Raman spectroscopy, density functional theory.

## Введение

Синтезируемые растениями, водорослями, некоторыми бактериями и грибами, каротиноиды представляют собой чрезвычайно важные вещества, распространённые в живой природе. Человеческий организм не может самостоятельно синтезировать каротиноиды. По этой причине каротиноиды могут попадать в организм человека только извне: с пищей (преимущественно с фруктами и овощами), специальными пищевыми добавками или содержащими каротиноиды косметическими средствами для местного применения [1–4]. Каротиноиды участвуют в ряде сложных биохимических процессов в организме человека и обладают провитаминами, антиоксидантными, иммуностимулирующими, герпротекторными и лечебными свойствами [5–7]. В частности, они известны как мощные антиоксиданты, играющие основную роль в реакциях нейтрализации свободных радикалов и, как следствие, обеспечивающими защиту клеток и биологических структур от окисления [8]. Недостаток каротиноидов в организме человека может свидетельствовать о развитии ряда заболеваний или патологических состояний [1, 9].

Каротиноиды, и особенно  $\beta$ -каротин, находят широкое применение в пищевой промышленности, медицине и ветеринарии, фармации и косметологии в качестве профилактических и лечебных средств [1], в том числе, в применениях, где важна концентрация и состав различных антиоксидантных компонентов для исключения возможных прооксидантных реакций [10–12]. Чтобы уменьшить окисление и увеличить время хранения каротиноидов, их часто стабилизируют другими антиоксидантами, такими как витамины [13, 14]. Также каротиноиды имеют потенциал для применений в органической электронике [15].

Для молекул каротиноидов наиболее важными структурными параметрами являются длина сопряжения, выражающаяся в числе сопряженных С=С связей, структура боковых и концевых групп, тип изомера.

Полиеновая цепь является основным элементом структуры молекул каротиноидов. Молекулы каротиноидов с более чем 10 сопряженными связями С=С обладают самыми высокими антиоксидантными свойствами в отношении нейтрализации активных форм кислорода. Это объясняется близостью энергий триплетного состояния каротиноидов и синглетного кислорода [3] и преимущественным химическим взаимодействием активных форм кислорода с такими каротиноидами.

Наряду с *транс*-изомером существуют множество *цис*-изомеров молекул каротиноидов, отличающихся числом и положением в молекуле *цис*-связей. Каротиноиды могут изменять свое изомерное состояние под воздействием внешних факторов, такими как нагревание и УФ-облучение, и даже просто при длительном хранении [5, 16, 17]. Изомерный состав каротиноидов сильно влияет на их свойства, включая биодоступность, провитаминную активность и антиоксидантные свойства [5, 7, 16–18]. Таким образом, большое значение имеет анализ содержания и изомерного состава каротиноидов в биологических тканях, продуктах питания, лекарствах и косметике.

Выбор спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) в качестве метода исследования обусловлен тем, что спектроскопия КР является высокоинформативным и неразрушающим методом анализа молекулярных веществ [19], позволяющим определить химический состав вещества (или смеси веществ), конфигурационный и конформационный состав молекул, фазовый состав, содержание различных химических групп, и другие важные структурные характеристики, от которых зависят физико-химические свойства веществ.

В настоящее время важными и перспективными областями практического использования спектроскопии КР являются исследование биотканей и анализ состава и качества пищевых продуктов, лекарственных и косметических препаратов [20–23]. В частности, спектроскопия резонансного КР позволяет быстро и неразрушающим способом анализировать каротиноиды как в чистом виде, так и в биотканях и в различных смесях и растворах [24–26], в том числе, обеспечивает высокочувствительный и информативный *in vivo* анализ каротиноидов в коже человека [27].  $\beta$ -каротин является одним из основных каротиноидов в коже, поглощающим свет в синей области спектра [28], что делает возможным анализ этих соединений при резонансном возбуждении спектров КР излучением видимого диапазона. Резонансное усиление интенсивности линий КР каротиноидов при возбуждении в сине-зеленой области спектра [1] позволяет анализировать эти соединения на пределе обнаружения 0,03 нмоль/г ( $\beta$ -каротин на грамм кожи/биоткани), что более чем на порядок ниже средней концентрации  $\beta$ -каротина в коже человека [29, 30].

Спектры КР всех каротиноидов содержат две интенсивные полосы около 1150 и 1520  $\text{см}^{-1}$ , которые соответствуют валентным колебаниям С-С и С=С связей в полиеновых цепях соответственно [15].

Благодаря интенсивному спектру КР, большей доступности и более высокой стабильности по сравнению с другими каротиноидами,  $\beta$ -каротин наиболее хорошо изучен среди каротиноидов как методом спектроскопии КР, так и другими методами. Однако из-за низкой фото-стабильности чистого  $\beta$ -каротина большая часть исследований методом спектроскопии КР проводилась для растворов  $\beta$ -каротина [31–33].

Сложности с приготовлением образцов чистых изомеров каротиноидов, отсутствие необходимого набора образцов с различными заместителями в положениях боковых и концевых групп для экспериментальных исследований, а также низкая фото-, термо- и окислительная стабильность каротиноидов значительно повышают значимость теоретических исследований спектров КР.

В ряде работ расчёты методом теории функционала плотности (ТФП) применялись для изучения структуры изомеров  $\beta$ -каротина и полиенов [16, 34]. Нерезонансный

спектр КР *транс*-изомера молекулы  $\beta$ -каротина, рассчитанный методом ТФП, был описан в статье [34]. В работе [17] были рассчитаны оптимизированные геометрии и спектры КР изомеров  $\beta$ -каротина с использованием метода ТФП, функционала B3LYP и базиса 6-31G(d).

Таким образом, для анализа спектров КР природных и синтетических веществ, содержащих полиены, необходимы знания о влиянии длины сопряжения, структуры концевых и боковых групп и типа изомера на спектры КР. Эта информация важна при анализе смесей каротиноидов или идентификации разных изомеров каротиноидов.

#### **Образцы и методы**

В данной работе исследовались коммерческие образцы синтетического  $\beta$ -каротина (Sigma, степень чистоты 93 %). Спектры КР  $\beta$ -каротина регистрировались при следующих длинах волн возбуждающего излучения: 473, 532, 633 и 785 нм. Длина волны возбуждающего излучения 473 нм соответствует резонансному режиму, 532 нм – предрезонансному режиму, а остальные длины волн – нерезонансному режиму возбуждения спектров КР  $\beta$ -каротина.

Первая серия спектров КР  $\beta$ -каротина была получена с использованием конфокального КР микроскопа модели 3510 SCA (River Diagnostics, Роттердам, Нидерланды) [35]. Спектры записывались при использовании возбуждающего излучения с длиной волны 785 нм. Мощность лазера на поверхности образца составляла около 20 мВт, спектральное разрешение  $4 \text{ см}^{-1}$ .

Вторая серия спектров КР  $\beta$ -каротина регистрировалась с помощью КР-микроскопа LabRAM HR Evolution (HORIBA Jobin Yvon, Франция), оснащенного микроскопом BX41 (Olympus, Япония), при возбуждении спектров излучением с длинами волн 633 нм (He-Ne лазер, Melles Griot, США) и 473 нм (диодный лазер Cobolt Blues, Cobolt AB, Швеция). Эта экспериментальная установка подробно описана в публикации [36]. Мощность лазера на поверхности образца составляла около 0,5 мВт для излучения с длиной волны 473 нм и около 0,1 мВт для излучения с длиной волны 633 нм. Спектральное разрешение составляло  $4 \text{ см}^{-1}$ . Измерения спектров КР всех исследуемых в работе образцов проводились при комнатной температуре.

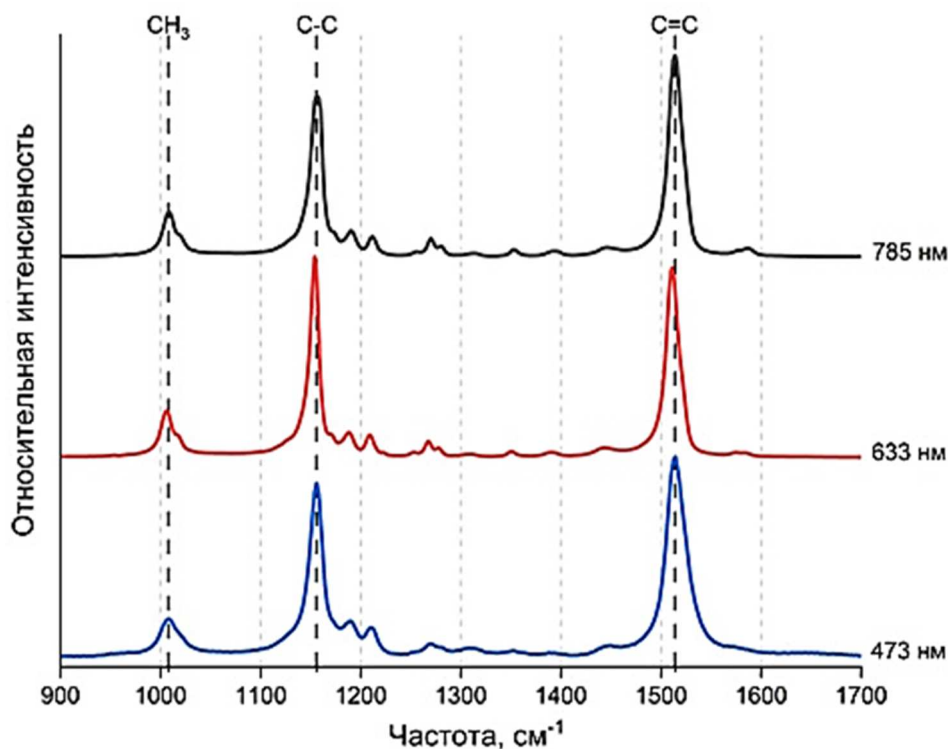
Для моделирования структур и спектров КР использовали теорию функционала плотности (ТФП). Расчеты проводили в некоммерческой программе «Природа» с использованием функционала OLYP и расширенного базиса гауссова типа (4z) [37, 38].

#### **Результаты**

Были зарегистрированы экспериментальные спектры КР порошка  $\beta$ -каротина при длинах волн возбуждающего излучения 473, 633 и 785 нм в области  $900\text{--}1700 \text{ см}^{-1}$  (рис. 1). Видно, что в этой области нормированный спектр резонансного КР, зарегистрированный при длине волны возбуждающего излучения 473 нм, существенно не отличается от нормированных нерезонансных спектров КР, зарегистрированных при длинах волн возбуждающего излучения 633 и 785 нм.

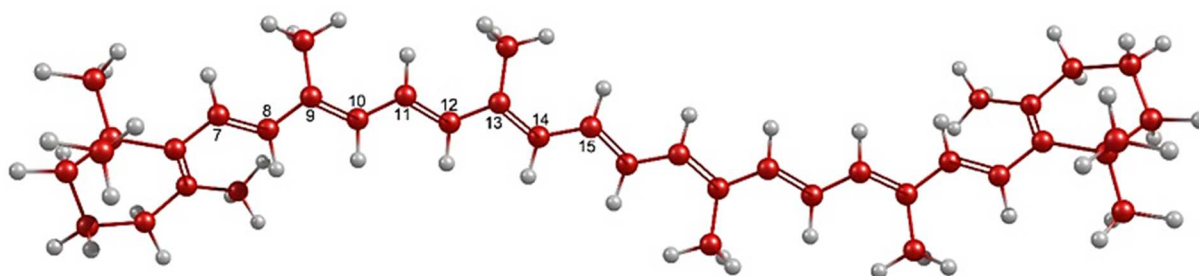
В спектрах КР порошка  $\beta$ -каротина в области  $900\text{--}1700 \text{ см}^{-1}$  наблюдаются три интенсивные полосы. Основной вклад в полосы около  $1150$  и  $1520 \text{ см}^{-1}$  вносят валентные колебания C-C и C=C связей, соответственно. Полоса около  $1000 \text{ см}^{-1}$  связана с более сложным колебанием молекулы  $\beta$ -каротина, но в основном соответствует деформационным колебаниям боковых СН<sub>3</sub> групп. Такое же отнесение этих полос дано в работе [15].

Положения пиков этих трёх полос совпадают в спектрах, полученных при длинах волн возбуждающего излучения 473, 633 и 785 нм, в пределах ошибки измерений. В спектре резонансного КР  $\beta$ -каротина, зарегистрированном при длине волны возбуждающего излучения 473 нм, полосы шире примерно на 25 % по сравнению со спектрами нерезонансного КР, записанными при длинах волн возбуждающего излучения 633 и 785 нм. Совпадение положений пиков данных полос для длин волн возбуждающего излучения в области 514–1064 нм также наблюдалось в работе [39].



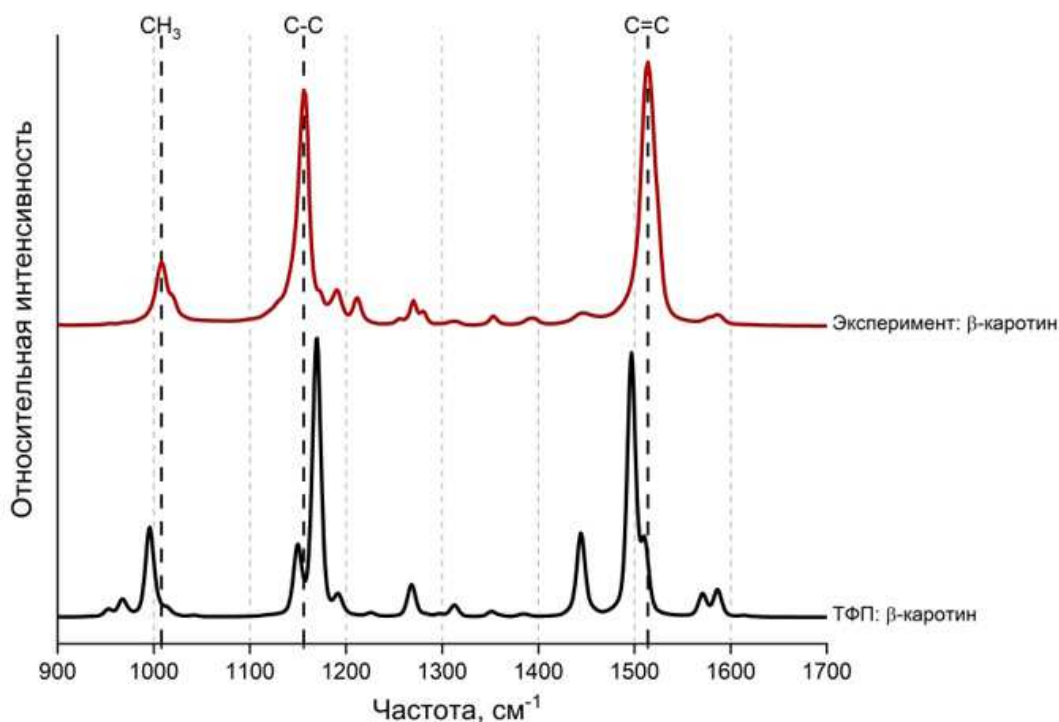
**Рисунок 1** – Экспериментальные спектры КР порошка  $\beta$ -каротина, записанные при разных длинах волн возбуждающего излучения в диапазоне 900–1700  $\text{см}^{-1}$

На рисунке 2 представлена оптимизированная структура молекулы транс- $\beta$ -каротина. Номерами на рисунке обозначены атомы углерода.



**Рисунок 2** – Оптимизированная с использованием метода ТФП структура транс- $\beta$ -каротина. Красным обозначены атомы углерода, серым – атомы водорода

Рисунок 3 демонстрирует сравнение экспериментального спектра КР порошка  $\beta$ -каротина, записанного при длине волны возбуждающего излучения 785 нм, и рассчитанного методом ТФП спектра *транс*-изомера молекулы  $\beta$ -каротина. Расчёт спектра выполнен для длины волны возбуждающего излучения 785 нм. Из рисунка видно, что расчёт хорошо описывает основные особенности экспериментального спектра КР порошка  $\beta$ -каротина. Максимумы интенсивности валентных колебаний C-C и C = C связей наблюдаются в экспериментальных спектрах соответственно на частотах 1156 и 1514  $\text{см}^{-1}$  и в рассчитанных спектрах на частотах 1170 и 1497  $\text{см}^{-1}$ . С учётом того, что при расчётах не применялась процедура масштабирования частот, соответствие между экспериментальными и рассчитанными значениями частот колебаний является очень хорошим.



**Рисунок 3** – Сравнение экспериментального спектра КР порошка  $\beta$ -каротина, записанного при длине волны возбуждающего излучения 785 нм, и рассчитанного методом ТФП спектра *транс*-изомера молекулы  $\beta$ -каротина (расчёт спектра выполнен для длины волны возбуждающего излучения 785 нм)

Наиболее сильным отличием экспериментального и рассчитанного спектров является то, что полоса около  $1450\text{ см}^{-1}$  имеет заметную интенсивность в рассчитанном спектре и малую интенсивность в экспериментальном спектре. Эта полоса соответствует деформационным колебаниям  $\text{CH}_3$  групп: как боковых  $\text{CH}_3$  групп, так и  $\text{CH}_3$  групп в иононовых кольцах. Возможно, это отличие связано с тем, что расчёт проводился для одной молекулы, а экспериментальные спектры были зарегистрированы для кристаллического  $\beta$ -каротина, для которого элементарная ячейка содержит две молекулы.

Экспериментальный нерезонансный спектр КР поликристаллического порошка  $\beta$ -каротина хорошо согласуется с рассчитанным спектром нерезонансного КР *транс*-изомера молекулы  $\beta$ -каротина.

#### **Выводы и результаты**

В работе было продемонстрировано, что положения основных линий в спектрах КР  $\beta$ -каротина не отличается при регистрации спектров при разных длинах волн возбуждающего излучения. Расчёты методом ТФП показали, что экспериментальные спектры КР хорошо описываются рассчитанными спектрами *транс*-изомеров  $\beta$ -каротина. Это указывает на то, что в экспериментальном образце молекулы  $\beta$ -каротина преимущественно находятся в *транс*-конфигурации.

#### **Литература / References**

1. Meléndez-Martínez A.J. Skin Carotenoids in Public Health and Nutricosmetics: The Emerging Roles and Applications of the UV Radiation-Absorbing Colourless Carotenoids Phytoene and Phytofluene / A.J. Meléndez-Martínez, C.M. Stinco, P. Mapelli-Brahm // *Nutrients*. – 2019. – Vol. 11. – № 5. – P. 1093.
2. Jomova K. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants / K. Jomova, M. Valko // *Eur. J. Med. Chem.* – 2013. – Vol. 70. – P. 102–110.
3. Fiedor J., Burda K. Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease / J. Fiedor, K. Burda // *Nutrients*. – 2014. – Vol. 6. – № 2. – P. 466–488.
4. Carotenoids in human skin / J. Lademann [et al.] // *Exp. Dermatol.* – 2011. – Vol. 20. – № 5. – P. 377–382.

5. Carotenoids and Their Isomers: Color Pigments in Fruits and Vegetables / H.-E. Khoo [et al.] // *Molecules*. – 2011. – Vol. 16. – № 2. – P. 1710–1738.
6. Trans–cis isomerisation of the carotenoid lycopene upon complexation with cholesteric polyester carriers investigated by Raman spectroscopy and density functional theory / M.R. López-Ramírez, [et al.] // *J. Raman Spectrosc.* – 2010. – Vol. 41. – № 10. – P. 1170–1177.
7. Elvira-Torales L.I. Nutritional Importance of Carotenoids and Their Effect on Liver Health: A Review / L.I. Elvira-Torales, J. García-Alonso, M.J. Periago-Castón // *Antioxidants*. – 2019. – Vol. 8. – № 7. – P. 229.
8. Stahl W. Antioxidant activity of carotenoids / W. Stahl, H. Sies // *Mol. Aspects Med.* – 2003. – Vol. 24. – № 6. – P. 345–351.
9. Bhatt T. Carotenoids: Potent to Prevent Diseases Review / T. Bhatt, K. Patel // *Nat. Products Bioprospect.* – 2020. – Vol. 10. – № 3. – P. 109–117.
10. Uptake of Antioxidants by Natural Nutrition and Supplementation: Pros and Cons from the Dermatological Point of View / J. Lademann [et al.] // *Skin Pharmacol. Physiol.* – 2011. – Vol. 24. – № 5. – P. 269–273.
11. Balić A. Do We Utilize Our Knowledge of the Skin Protective Effects of Carotenoids Enough? / A. Balić, M. Mokos // *Antioxidants*. – 2019. – Vol. 8. – № 8. – P. 259.
12. Pro-oxidant Actions of Carotenoids in Triggering Apoptosis of Cancer Cells: A Review of Emerging Evidence / J. Shin [et al.] // *Antioxidants*. – 2020. – Vol. 9. – № 6. – P. 532.
13. Darvin M.E. Resonance Raman spectroscopy as an effective tool for the determination of antioxidative stability of cosmetic formulations / M.E. Darvin, W. Sterry, J. Lademann // *J. Biophotonics*. – 2010. – Vol. 3. – № 1–2. P. 82–88.
14. Stabilization of Crystalline Carotenoids in Carrot Concentrate Powders: Effects of Drying Technology, Carrier Material, and Antioxidants / K. Haas [et al.] // *Foods*. – 2019. – Vol. 8. – № 8. – P. 285.
15. Phase Transition in all-trans- $\beta$ -Carotene Crystal: Temperature-Dependent Raman Spectra / da Silva K.J.R. [et al.] // *J. Phys. Chem. A*. – 2015. – Vol. 119. – № 38. – P. 9778–9784.
16. Guo W.-H.H. Cis-Trans Isomerizations of  $\beta$ -Carotene and Lycopene: A Theoretical Study / W.-H.H. Guo, C.-Y.Y. Tu, C.-H.H. Hu // *J. Phys. Chem. B*. – 2008. – Vol. 112. – № 38. – P. 12158–12167.
17. Density Functional Theory Study of the Stability and Vibrational Spectra of the  $\beta$ -Carotene Isomers / J.P. Cerón-Carrasco [et al.] // *J. Phys. Chem. A*. – 2009. – Vol. 113. – № 36. – P. 9899–9907.
18. von Doering W. Thermal interconversions among 15-cis-, 13-cis-, and all-trans- $\beta$ -carotene: kinetics, Arrhenius parameters, thermochemistry, and potential relevance to anticarcinogenicity of all-trans- $\beta$ -carotene / von Doering W., Sotiriou-Leventis C., W.R. Roth // *J. Am. Chem. Soc.* – 1995. – Vol. 117. – № 10. – P. 2747–2757.
19. Smith E. Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach / E. Smith, G. Dent // *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*. – Chichester, UK : John Wiley & Sons, Ltd, – 2004. – P. 1–210.
20. Reference database of Raman spectra of pharmaceutical excipients / de Veij M. [et al.] // *J. Raman Spectrosc.* – 2009. – Vol. 40. – № 3. – P. 297–307.
21. Quantitative Evaluation of the Sensitivity of Library-Based Raman Spectral Correlation Methods / J.D. Rodriguez [et al.] // *Anal. Chem.* – 2011. – Vol. 83. – № 11. – P. 4061–4067.
22. The Role of Carotenoids in Human Skin / M.E. Darvin [et al.] // *Molecules*. – 2011. – Vol. 16. – № 12. – P. 10491–10506.
23. In vivo confocal Raman microscopic determination of depth profiles of the stratum corneum lipid organization influenced by application of various oils / C. Choe [et al.] // *J. Dermatol. Sci.* – 2017. – Vol. 87. – № 2. – P. 183–191.
24. Analyzing carotenoids of snow algae by Raman microspectroscopy and high-performance liquid chromatography / K. Osterrothová [et al.] // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2019. – Vol. 212. – P. 262–271.
25. Raman, AFM and SNOM high resolution imaging of carotene crystals in a model carrot cell system / A. Rygula [et al.] // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2018. – Vol. 197. – P. 47–55.
26. Fluorescence-enhanced second harmonic normal Raman scattering in  $\beta$ -carotene / M. Zheng [et al.] // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2020. – Vol. 239. – P. 118494.
27. Noninvasive selective detection of lycopene and  $\beta$ -carotene in human skin using Raman spectroscopy / M.E. Darvin, I. Gersonde, S. Ey, N.N. Brandt, H. Albrecht, S.A. Gonchukov, W. Sterry and J.L. // *Laser Phys.* – 2004. – Vol. 14. – № 2. – P. 231–233.

28. Non-Invasive Raman Spectroscopic Detection of Carotenoids in Human Skin / T.R. Hata [et al.] // *J. Invest. Dermatol.* – 2000. – Vol. 115. – № 3. – P. 441–448.
29. Darwin M.E. Photobleaching as a method of increasing the accuracy in measuring carotenoid concentration in human skin by Raman spectroscopy / M.E. Darwin, N.N. Brandt, J. Lademann // *Opt. Spectrosc.* – 2010. – Vol. 109. – № 2. – P. 205–210.
30. Shifted excitation resonance Raman difference spectroscopy system suitable for the quantitative in vivo detection of carotenoids in human skin / M. Braune [et al.] // *Laser Phys. Lett.* – 2018. – Vol. 15. – № 11. – P. 115601.
31. Temperature induced changes in resonance Raman spectra intensity of all-trans- $\beta$ -carotene: Changes in the fundamental, combination and overtone modes / T. Liu [et al.] // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2014. – Vol. 131. – P. 153–157.
32. Temperature effect on the resonance Raman spectra of all-trans- $\beta$ -carotene in iodine solution / S. Li [et al.] // *Optik (Stuttg.)* – 2017. – Vol. 139. – P. 202–206.
33. Resonance Raman scattering of  $\beta$ -carotene solution excited by visible laser beams into second singlet state / L. Lu [et al.] // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* – 2018. – Vol. 179. – P. 18–22.
34. Density Functional Theoretical Analysis of the Molecular Structural Effects on Raman Spectra of  $\beta$ -Carotene and Lycopene / W. Liu [et al.] // *Chinese J. Chem.* – 2012. – Vol. 30. – № 10. – P. 2573–2580.
35. Optical methods for noninvasive determination of carotenoids in human and animal skin / M.E. Darwin [et al.] // *J. Biomed. Opt.* – 2013. – Vol. 18. – № 6. – P. 061230.
36. Schleusener J. Depth-dependent autofluorescence photobleaching using 325, 473, 633, and 785 nm of porcine ear skin ex vivo / J. Schleusener, J. Lademann, M.E. Darwin // *J. Biomed. Opt.* – 2017. – Vol. 22. – № 9. – P. 091503.
37. DFT study of Raman spectra of polyenes and  $\beta$ -carotene: Dependence on length of polyene chain and isomer type / V.S. Novikov [et al.] // *Spectrochim. Acta – Part A Mol. Biomol. Spectrosc. Elsevier B.V.* – 2021. – Vol. 255. – P. 119668.
38. Laikov D.N. PRIRODA-04: a quantum-chemical program suite. New possibilities in the study of molecular systems with the application of parallel computing / D.N. Laikov, Y.A. Ustynyuk // *Russ. Chem. Bull.* – 2005. – Vol. 54. – № 3. – P. 820–826.
39. Raman Spectrum of  $\beta$ -Carotene Using Laser Lines from Green (514.5 nm) to Near-Infrared (1064 nm): Implications for the Characterization of Conjugated Polyenes / S.F. Parker [et al.] // *Appl. Spectrosc.* – 1999. – Vol. 53. – № 1. – P. 86–91.