

OPPORTUNITIES OF RECEPTION OF ECOLOGICALLY SAFE MILK IN CONDITIONS OF ANTHROPOGENOUS ENVIRONMENTAL CONTAMINATION

N.G. Gabruk, A.A. Shaposhnikov

Belgorod State University, Pobedy St., 85, Belgorod, 308015, Russia

There was conducted an analysis of the milk for quality indices and also for the heavy metals and chloroorganic pesticides (COP) contamination degree in 29 farms at first in the Belgorod region. The seasonal dynamics of the content of these substances in the milk was studied. The experiments, conducted in vitro, helped us to select sorbtion effective mineral additions and to construct the sorbtion isotherm. The «Atocs» compound was first used in the rations of the lactating cows in order to decrease the concentration of the toxic substances in the milk. The optimal dose of the compound was established as 20 g per animal per day. If «Atocs» is regularly used in its optimal dose, it decreases the concentration of the Zn – for 11 %, Cu – for 35%, Cd – for 36%, Pb – 35%, COP – 63% in milk. Discrete using of the compound up on feeding accordingly decreased the concentration of the heavy metals and pesticides for 13, 23, 30, 25 and 31%.

Key words: milk, heavy metals, chloroorganic pesticides, sorbtion isotherms, optimal dose of the lactating cows.

УДК: 543.54:547.973:633.88

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ ПИГМЕНТОВ В ЦВЕТКАХ *TAGETES SP*

В.И. Дейнека, М.Ю. Третьяков, Л.А. Дейнека, В.Н. Сорокопудов

Белгородский государственный университет, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85
E-mail: deineka@bsu.edu.ru

В работе спектрофотометрическим и хроматографическим методами исследовано накопление антоцианов и ксантофиллов в лепестках цветков бархатцев *Tagetes sp.* Найдено, что в лепестках некоторых сортов *T. patula* накопление антоцианов достигает 150 мг на 100 г свежих лепестков (в пересчете на цианидина 3-глюкозид). Установлено, что накопление антоцианов не влияет на накопление ксантофиллов, что позволяет рассматривать бархатцы как источник двух классов природных красителей: каротиноидов и антоцианов. Выявлены особенности подготовки пробы, предшествующие определению антоцианов.

Ключевые слова: антоцианы, ксантофиллы, накопление, цветы *Tagetes*, ВЭЖХ, спектрофотометрия.

Введение

Цветки бархатцев (*Tagetes sp.*) используются для промышленного получения концентратов ксантофиллов [1]. Бархатцы являются декоративными растениями семейства *Compositae*. Известны сорта бархатцев с цветками от желтого до темно-красного цвета. Наиболее популярны бархатцы двух видов – *T. patula* и *T. erecta*, родина которых – Мексика и Гватемала. В качестве декоративных бордюрных растений иногда выращивают низкорослые сорта *T. tenuifolia* [2], мелкие цветки которых вряд ли могут иметь технологическое значение для получения ксантофиллов.

Анализу пигментов цветков бархатцев посвящено значительное число работ [3-7]. Хорошо известно, что основные компоненты пигментного комплекса – диэфиры полностью *транс*-лютеина, а в качестве примесей присутствуют диэфиры некоторых его *цис*-изомеров, диэфиры зеаксантина и ряд других соединений, включая моноэфиры лютеина и неэтерифицированный лютеин. Сложные эфиры образованы ксантофиллом и насыщенными жирными кислотами: от лауриновой до стеариновой с максимумом содержания, обычно приходящимся на радикалы пальмитиновой кислоты.

Хорошо известно, что ряд высокодекоративных сортов бархатцев отклоненных (*T. patula*) имеет цветки с темно-вишневыми пятнами, которые связаны с наличием антоцианов. Однако никаких упоминаний об исследовании этих пигментов и их влиянии на накопление ксантофиллов при совместном присутствии в лепестках антоцианов и каротиноидов в литературе нами не было обнаружено. Важность этого вопроса связана с тем, что антоцианы существуют во флавилиновой форме в кислой среде, теряют окраску при полном переходе в псевдооснование при $pH = 4,5$, окрашиваясь в другие цвета при более высоких pH , в то время как в кислых средах каротиноиды не отличаются устойчивостью, как и другие полиеновые соединения.

Данная работа посвящена исследованию накопления антоцианов и ксантофиллов при их совместном нахождении в лепестках цветков *T. patula*.

Экспериментальная часть

Для исследования каротиноидов и антоцианов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ использовали хроматографическую систему, составленную из насоса Altex 110A, крандозатора Rheodyne 7100 с петлей объемом 20 мкл, детектора LC/9563 Nicolet, длина волны детектирования 440 нм (при определении каротиноидов) и 510 нм (при определении антоцианов). Для регистрации и обработки хроматограмм использовали ПП Мультихром 1.5 (Ampersand Ltd. 2005). Хроматографические условия: колонка 250×4 мм, Кромасил С18, 5 мкм; подвижная фаза ацетонитрил-ацетон (20 : 80 об.), 1 мл/мин (определение каротиноидов); колонка 250×4 мм, Диасфер-110-С18, 7 мкм; подвижная фаза ацетонитрил – муравьиная кислота – вода (12 : 10 : 78 об.), 1 мл/мин (определение антоцианов). Спектрофотометрические исследования выполняли в кварцевых кюветках с использованием спектрофотометра КФК-3-01.

Бархатцы были выращены в ботаническом саду БелГУ прямым посевом семян в грунт (конец мая 2006 года). В работе были использованы семена *T. patula*, собранные в 2005 году там же.

Лепестки цветков растирали с кварцевым песком, экстрагировали пигменты (ксантофиллы – ацетоном, антоцианы – 0,1 М водным раствором соляной кислоты) и определяли содержание пигментов в день сбора цветков.

Результаты и обсуждение

На рис.1 представлены спектры солянокислого экстракта цветков бархатцев светло-вишневой и темно-вишневой окраски. Оба спектра практически идентичны, хотя записаны с интервалом в полмесяца. Но особо обращает внимание на себя тот факт, что, во-первых, виден шлейф от относительно коротковолнового поглощения, во-вторых, сам пик поглощения довольно широк и максимум смещен в длинноволновую область по сравнению со спектральными параметрами экстрактов бузины черной и бузины канадской «Плюмоза». Такой характер спектра может свидетельствовать о возможности копигментации антоцианов плодов бархатцев с сопутствующими экстрактивными веществами, поскольку внутримолекулярные эффекты, которые смещают максимум поглощения для экстрактов бузины канадской относительно экстракта бузины черной, отличающихся ацилированием кумаровыми кислотами гликозидов цианидина для бузины канадской [8], не изменяют ширины спектральной полосы.

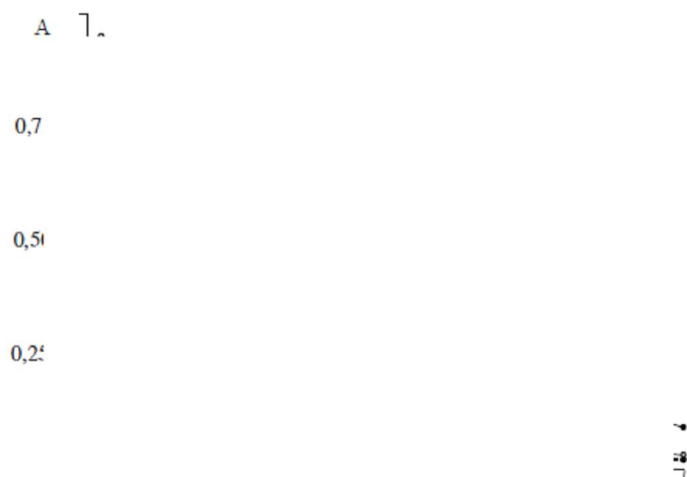


Рис.1. Спектры солянокислых экстрактов лепестков цветков *T. patula*, *Sambucus nigra* и *S. Canadensis*: 1 – экстракт *T. patula* с пятнами светло-вишневой окраски; 2 – экстракт *T. patula* с пятнами темно-вишневой окраски; 3 – экстракт плодов *Sambucus nigra*; 4 – экстракт плодов *S. canadensis*

Сложный состав антоцианового комплекса подтверждают результаты ВЭЖХ исследований (рис. 2). На хроматограмме идентифицируется сравнением с хроматограммой смородины черной цианидина-3-глюкозид. Однако довольно значительно содержание быстрее элюирующихся компонентов, имеющих дигликозидную структуру и более сильно удерживаемых компонентов, возможно, ацилированных производных.

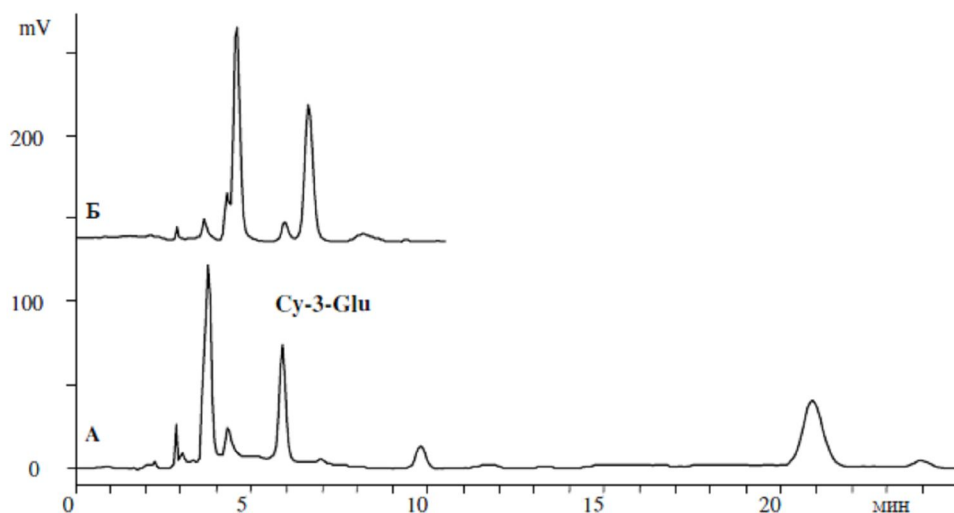


Рис.2. Разделение антоцианов цветков *T. patula*: А – антоцианы *T. patula*; Б – антоцианы *Ribes nigrum*

При пересчете на цианидина-3-глюкозид [9] содержание антоцианов в лепестках цветков с вишнево-красными пятнами различной интенсивности составило в среднем 0,140 г на 100 г лепестков (стандартное отклонение 0,016). При этом результаты анализа показали необычайно высокое накопление каротиноидов (в пересчете на лютеин [10]) – в среднем 5,1 мг на 1 г свежих лепестков (стандартное отклонение 0,79). Важно, что при довольно большом разбросе показателей по содержанию пигментов никакой корреляции между содержанием антоцианов и каротиноидов не обнаружено. В 2005 году для образцов *T. patula* были получены иные результаты – 0,145 г антоцианов на 100 г лепестков и лишь порядка 2 мг лютеина на 1 г свежих лепестков. Вполне возможно, что причина такого различия кроется в погодных условиях – данные этого года получены для образцов, собранных в начале августа, в то время как прошлогодние результаты датируются началом октября. Результаты анализа лепестков *T. patula* чисто оранжевой окраски, выращенных в условиях цветочной клумбы в начале августа 2006 года, показали накопление каротиноидов на уровне лишь 2 мг на 1 г свежих лепестков.

Хроматограммы каротиноидных экстрактов цветков бархатцев представлены на рис. 3. Отнесение пиков подтверждено сопоставлением с хроматограммой физалиса декоративного, содержащего в качестве основных компонентов дипальмитат зеаксантина и пальмитат β -криптоксантина [11], поскольку липофильности зеаксантина и лютеина очень близки (как двух изомерных ксантофиллов). Очевидно, что основные диэфир лютеина включают радикалы пальмитиновой и миристиновой кислот, причем, в отличие от опубликованных данных [1], дипальмитат лютеина оказался основным компонентом пигментного комплекса только цветков *T. erecta*, в то время как среди пигментов цветков *T. patula* содержание мирилата-пальмитата выше, чем дипальмитата. Интересно и то, что соотношение между диэфирами практически не зависит от накопления антоцианов в лепестках (табл.). В таблице отсутствуют данные о дилаурате, который на самом деле присутствует в следовых количествах. Кроме диэфиров лютеина на хроматограмме видны диэфир зеаксантина (с несколько более высокой липофильностью вследствие небольшого смещения двойной связи в одном из циклогексеновых колец молекулы по направлению от насыщенного радикала кислоты). Видны и некоторые *cis*-изомеры ксантофиллов, количество которых постепенно увеличивается при хранении экстракта даже в холодильнике.

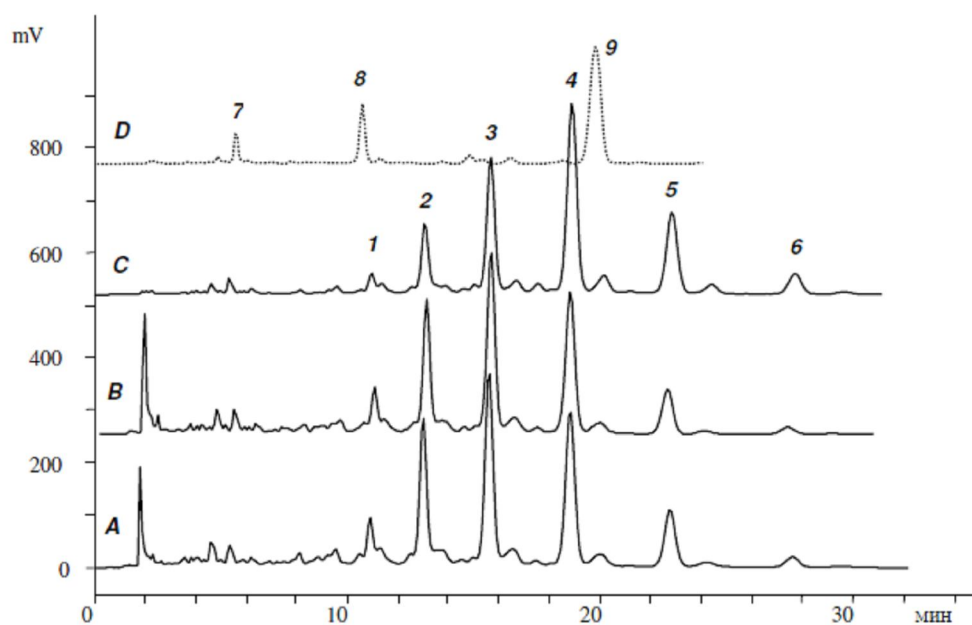


Рис. 3. Разделение каротиноидов экстрактов цветков *Tagetes* sp:
A – *T. patula* с вишнево-красными пятнами на лепестках цветков;
B – *T. patula* с оранжевыми цветками; **C** – *T. erecta* с оранжевыми цветками;
D – плодов *Physalis alkekengi*.
Эфиры лютеина: **1** – лаурат-миристан; **2** – димиристан;
3 – миристан-пальмитат; **4** – дипальмитат; **5** – пальмитат-стеарат; **6** – дистеарат;
7 – монопальмитат зеаксантина; **8** – пальмитат β-криптоксантина;
9 – дипальмитат зеаксантина.

Относительное содержание различных видов диэфиров в диэфирной фракции

№ пика	Радикалы кислот	Относительная доля диэфиров, моль %				
		<i>T. patula</i>				<i>T. erecta</i>
		<i>a</i>	<i>б</i>	<i>в</i>	<i>г</i>	
1	C12 + C14	6.1	5.8	5.8	6.5	2.6
2	C14 + C14	20.6	20.6	19.2	20.5	11.6
3	C14 + C16	30.9	32.7	31.4	31.8	23.2
4	C16 + C16	28.4	28.5	29.9	28.8	38.1
5	C16 + C18	11.5	10.6	11.7	10.3	18.9
6	C18 + C18	2.5	1.9	2.0	2.0	5.6

Примечание. C12 – лауриновая, C14 – миристиновая, C16 – пальмитиновая и C18 – стеариновая кислоты; окраска цветков: *a* – темно вишнево-красная, *б* – вишнево-красная, *в* – бледно вишнево-красная, *г* – оранжевая; *T. erecta* – оранжевая.

Наконец, отметим важную особенность подготовки образцов к анализу. Растирание лепестков с кварцевым песком приводит к возможности быстрой и полной экстракции каротиноидов. Впрочем, по ряду причин (включая необходимость отделения экстракта от мелкодисперсных частиц центрифугированием) предпочтение нужно отдать разминанию лепестков под слоем экстрагента. Для определения антоцианов растирание свежих образцов лепестков бархатцев с кварцевым песком недопустимо. Дело в том, что рН внутриклеточной жидкости лепестков равно примерно 5, а антоцианы уже при рН 4,5 превращаются в неокрашенные псевдооснования [12]. Последние подвержены превращению в *цис*-халконы (далее в *транс*-халконы, обратное превращение которых в антоцианы при подкислении – процесс медленный) и окислению. Вследствие указанных превращений, как было установлено в настоящей работе, выход антоцианов падает до 30 %, а в некоторых случаях антоцианы терялись полностью.

Выводы

Таким образом, в работе приводятся данные о накоплении антоцианов в лепестках цветков некоторых сортов *T. patula* (около 150 мг на 100 г свежих лепестков). Установлено, что антоциановый комплекс сложен и содержит наряду с цианидина-3-глюкозидом как более, так и менее гидрофильные компоненты.

Найдено, что накопление антоцианов не коррелирует с накоплением ксантофиллов, что позволяет рассматривать бархатцы как источники и каротиноидов, и антоцианов.

Показаны особенности подготовки пробы, предшествующие определению антоцианов.

Список литературы

1. Sowbhaya H.B., Sampathu S.R., Krishnamurthy N. Natural colorants from marigold chemistry and technology // Food Rev. Internat. – 2004. – V. 20, № 1. – P. 33-50.
2. Садоводство. Энциклопедия в 3-х томах / Ред. коллегия В.И. Бабук и др. – Кишинев: Гл. ред. Молд. Сов. Энциклопедии, 1990. – Т.1. – 528 с.

3. Leigh Hadden W., Watkins R.H., Levy L.W., Regalado E., Rivadeneira D.M., van Breemen R.B., Schwartz S.J. Carotenoid Composition of Marigold (*Tagetes erecta*) Flower Extract Used as Nutritional Supplement // J. Agric. Food Chem. – 1999. – V. 47. – P. 4189-4194.
4. Gau W., Ploschke H.-J., Wunsche C. Mass spectrometric identification of xanthophyll fatty acid esters from marigold flowers (*Tagetes erecta*) obtained by high-performance liquid chromatography and Craig counter-current distribution // J. Chromatogr. – 1983. – V. 262. – P. 277-284.
5. Gregory G.K., Chen T.-S., Philip T. Quantitative analysis of lutein esters in marigold flowers (*Tagetes erecta*) by high performance liquid chromatography. // J. Food Sci. – 1986. – V. 51. – P. 1093-1094.
6. Quackenbush F.W., Miller S.L. Composition and analysis of the carotenoids in marigold petals // J. Assoc. Off. Anal. Chem. – 1972. – V. 55. – P. 617-621.
7. Rivas J.D. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of lutein and lutein fatty acid esters from marigold flower petal powder. // J. Chromatogr. – 1989. – V. 464. – P. 442-447.
8. Deineka V.I., Sorokopudov V.N., Deineka L.A., Shaposhnik E.I., Koltsov S.V. Anthocyanins from Fruit of Some Plants of the Caprifoliaceae Family // Chem. Nat. Comp. – 2005. – V. 41(2). – P.162-164.
9. Giusti M.M., Wrolstad R.E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy / In: Current Protocols in Food Analytical Chemistry, S. King, M. Gates, and L. Scaletter, eds., John Wiley & Sons, Inc., New York (2000).
10. Rodrigues-Amaya D.B., Kimura M. / HarvestPlus handbook for carotenoid analysis. HarvestPlus Technical Monograph 2. Washington, DC and Cali: IFPRI and CIAT. – 2004. – 48 p.
11. Weller P., Breithaupt D.E. Identification and Quantification of Zeaxanthin Esters in Plants Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry // J. Agric. Food Chem. – 2003. – V. 51. – P. 7044-7049.
12. Goto T. Structure, stability and color variation of natural anthocyanins. // Fortschr. Chem. org. Naturst. – 1987. – V. 52. – P. 113-158.

SOME PARTICULARITIES OF ANTHOCYANIN ACCUMULATION IN *TAGETES* SP. FLOWERS

V.I. Deineka, M.Yu. Tretyakov, L.A. Deineka, V.N. Sorokopudov

Belgorod State University, Pobedy St., 85, Belgorod, 308015, Russia
E-mail: deineka@bsu.edu.ru

Accumulation of anthocyanins as well as xanthophylls in petals of *Tagetes* sp. has been investigated by means of spectrophotometric and chromatographic methods. It is established, that in petals of some *T. patula* varieties accumulation of anthocyanins reaches 150 mg per 100 g of fresh petals (as cyanidine 3-glucoside) and does not influence upon accumulation of xanthophylls that allows to consider marigold as a source of two classes of natural dyes: carotenoids and anthocyanins. Some features of sample preparation for anthocyan assay are revealed.

Key words: anthocyanins, xanthophylls, accumulation, *Tagetes* sp. flowers, HPLC, spectrophotometry.