



УДК 579.912:636.52/ 58.084.542

СПЕКТРАЛЬНЫЙ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КСАНТОФИЛЛОВ В РАЗЛИЧНЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ДОБАВКАХ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА НАКОПЛЕНИЕ ЛЮТЕИНА И ЗЕАКСАНТИНА В ЖЕЛТКЕ ПЕРЕПЕЛИНЫХ ЯИЦ

**В. И. Дейнека, А. А. Шапошников
Л. А. Дейнека, С. М. Вострикова
Л. Р. Закирова, И. Е. Олейникова**

*Белгородский государственный
университет,
Россия, 308015, г. Белгород,
ул. Победы, 85*

E-mail: Shaposhnikov@bsu.edu.ru

Приведены результаты спектрального и хроматографического анализа различных растительных ксантофиллов. Обсуждены экспериментальные данные накопления ксантофиллов в желтке перепелиных яиц под влиянием растительных добавок.

Ключевые слова: ксантофиллы, лютеин, зеаксантин, кормовые добавки, желток перепелиных яиц.

Введение

Человек и животные не могут синтезировать каротиноиды, их поступление зависит только от источников питания. Человек усваивает каротиноиды не избирательно, они откладываются в тканях и органах примерно в том же соотношении, в каком содержатся в пище. Необходимая норма ежедневного потребления лютеина составляет 800-1000 мкг, а зеаксантина – около 200 мкг. При этом в лечебных и профилактических целях необходимо чтобы соотношение лютеина и зеаксантина в продуктах питания, было близким к 4:1, поскольку совместное действие этих двух пигментов при таком соотношении наиболее эффективно. Для человека биодоступность лютеина и зеаксантина, содержащихся в желтке яиц, значительно выше их биодоступности из растительных источников, благодаря ассоциации с липидным матриксом желтка. Т.к. ксантофиллы липофильны их биодоступность выше в присутствии жиров (липидов). Отметим, что по последним данным [1] необходимо выделить не два, а три ксантофилла:

- 1) лютеин, который в природе встречается главным образом в виде изомера: $3R,3'R,6'R$ - β,ϵ -каротин-3,3'-диола;
- 2) зеаксантин, под которым понимают один из возможных стереоизомеров - $3R,3'R$ - β,β -каротин-3,3'-диол;
- 3) еще один, особо выделяемый из изомеров, – мезо-зеаксантин – $3R,3'R$ - β,β -каротин-3,3'-диол.

В последнее время в развитых странах мира ведутся интенсивные исследования по разработке способов получения продуктов питания с заданными свойствами. Это направление получило название «Food Design» («пищевой дизайн») и полученные по нему продукты пользуются повышенным спросом у населения. Ведь необходимые человеку биологически активные вещества – провитамины, витамины, микроэлементы и т.д., находясь в составе мясных и молочных продуктов, а также яиц птицы, имеют неоспоримые преимущества перед препаратами химического и биотехнологического синтеза.

Яйцо является одним из доминантных продуктов в питании населения, поэтому производители уделяют большое внимание качеству данной продукции. Но такой показатель, как окраска желтка яиц, оставляет желать лучшего. Это связано с недостатком в кормовом рационе каротиноидов, обеспечивающих желаемый цвет желтка (лютеина и зеаксантина). Наличие каротиноидов в корме определяет их уровень в яйце.

В странах Западной Европы и США выпускается несколько кормовых добавок, предназначенных для улучшения цвета желтка. Некоторые из них содержат ксанто-



филлы растительного происхождения, так как известно, что эти вещества в организме птицы не синтезируются.

В России собственные кормовые добавки аналогичного типа не производятся, поэтому разработки с целью создания собственных технологий актуальны, особенно в свете современных установок на замену импортных медицинских препаратов и на возрождение отечественной медицинской и фармацевтической промышленности.

Разработанная нами добавка отличается от известных импортных кормовых добавок сбалансированностью по соотношению лютеина и зеаксантина (оно составляет 4:1). Известные импортные добавки, полученные из лепестков цветков бархатцев, содержат зеаксантин в значительно меньшем количестве по сравнению с оптимальным.

По последним литературным данным лютеин является источником зеаксантина и может превращаться в него в организме животных [2]. Это удивительно, поскольку в США для преодоления этого дисбаланса проведены работы по получению мутантов бархатцев с увеличенным содержанием зеаксантина, но дальше патента [3, 4] дело не пошло. Возможно, что причиной этого является появление в печати сведений о том, что зеаксантин в организме животных и человека может быть получен изомеризацией лютеина. Эта информация также ставит под сомнение целесообразность применения нашей добавки в качестве источника лютеина и зеаксантина.

Для проверки этой информации мы провели исследование на перепелках-несушках породы «Фараон». Исследования выполняли в частном фермерском хозяйстве Белгородской области в с. Нижний Ольшанец Шебекинского района.

Добавки ксантофиллов в корм перепелок. Для проверки усвояемости ксантофиллов из растительных материалов нами были подготовлены индивидуализированные биологически активные добавки.

Добавка А (размолотые высушенные лепестки цветков бархатцев), по спектрофотометрическим данным содержавшие 12.5 ± 1.5 мг ксантофиллов на 1 г добавки (в пересчете на неэтерифицированный лютеин).

Для приготовления добавок были использованы цветки бархатцев, выращенные в 2009 году и высушенные при комнатной температуре в течение 7 дней без доступа света. Полученный материал измельчали в кофемолке.

Спектр экстракта представлен на рис.1 и соответствует литературным данным по положению максимумов абсорбции при записи в растворе в ацетоне.

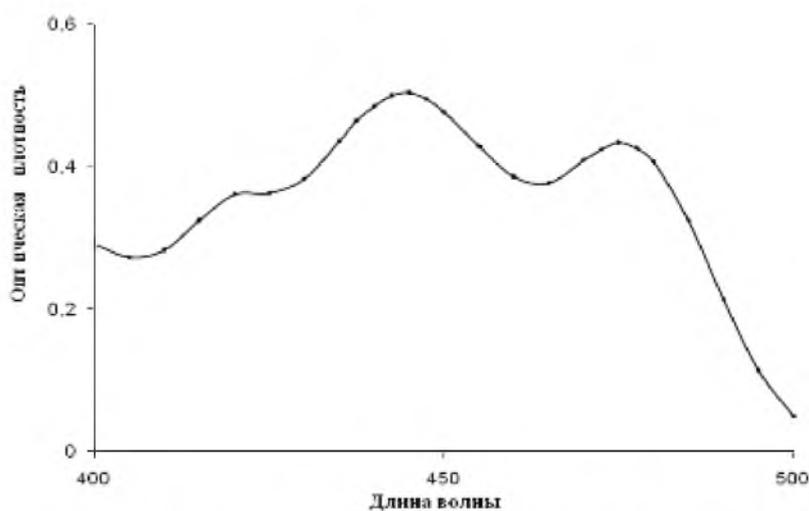


Рис. 1. Спектр ацетонового экстракта лепестков цветков бархатцев

На хроматограмме в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ, рис.2, обнаруживаются 7 основных пиков, соответствующих диэфирам полностью *транс*-лютеина: дистеарата (время удерживания порядка 12.5 мин.), стеарат-пальмитата (10.8 мин.), дипальмитата (9.2 мин.), пальмитатамиристора (8 мин.), диимиристора (7 мин.), миристора-лаурата (6.2 мин) и дилаурата (5.5 мин.). Кроме того, на хроматограмме видны в не-

большом количестве моноэфир (3.5–4.5 мин.) лютеина, эфиры геометрических изомеров лютеина, не разделяемые с небольшим количеством примесей эфиров зеаксантина (в сумме не более 8%).

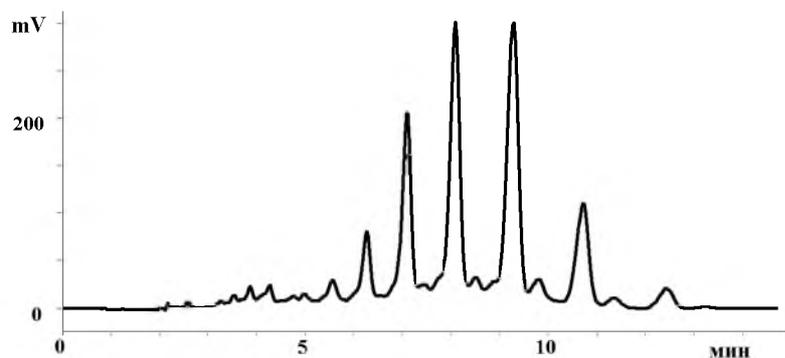


Рис. 2. Разделение ксантофиллов экстракта цветков бархатцев

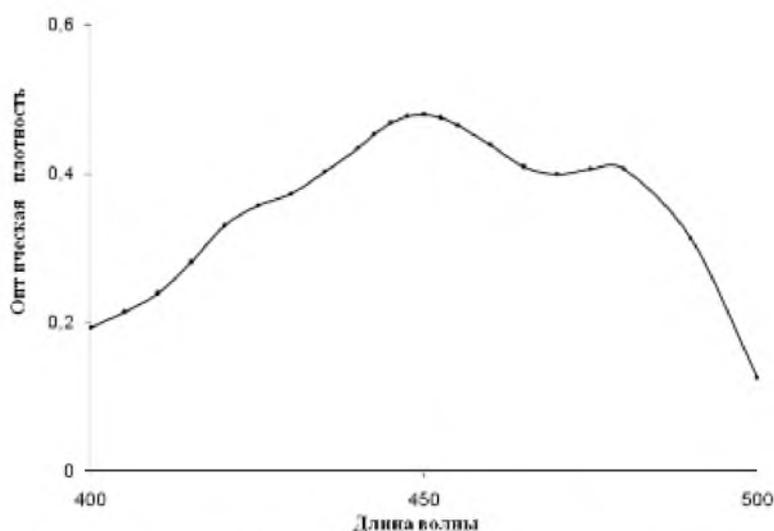


Рис. 3. Спектр ацетонового экстракта лепестков цветков бархатцев

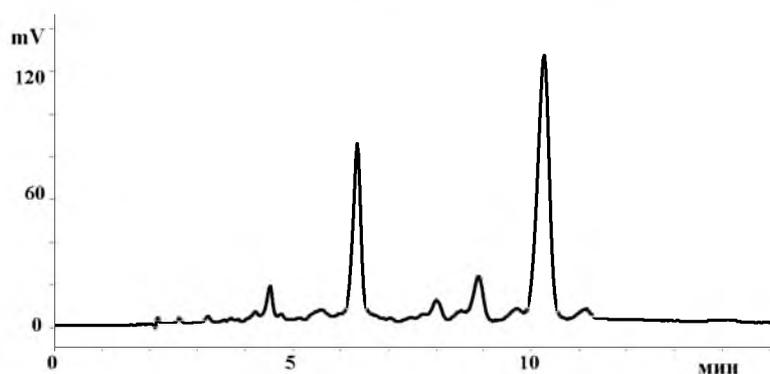


Рис. 4. Разделение ксантофиллов экстракта чашечек физалиса

филлов на 1 г добавки.

Добавка Г – препарат ОРО ГЛО (Кемин Европа) [5]. По спектральным данным (рис. 6) и по хроматографическим данным этот препарат содержит в основном неэтерифицированный полностью *транс*-лютеин.

Колонка: 250?4 мм Диасфер-110-С18, 5 мкм. Подвижная фаза: 8 % ацетонитрила в ацетоне, 1 мл/мин. Детектор: УФ-вид: 445 нм.

Добавка Б (размолотые высушенные чашечки физалиса декоративного), по спектрофотометрическим данным (спектр представлен на рис. 3) содержавшие 9.0 ± 0.3 мг ксантофиллов на 1 г добавки (в пересчете на неэтерифицированный зеаксантин).

Спектр экстракта, представленный на рис. 4, соответствует литературным данным для зеаксантина по положению максимумов абсорбции при записи в растворе в ацетоне.

Колонка: 250?4 мм Диасфер-110-С18, 5 мкм. Подвижная фаза: 8 % ацетонитрила в ацетоне, 1 мл/мин. Детектор: УФ-вид: 445 нм.

Добавка В (размолотые высушенные лепестки подсолнечника), по спектрофотометрическим и хроматографическим данным содержавшие эпокси ксантофиллы, которые обнаруживаются по посинению желтых пятен на ТСХ-пластине в атмосфере *HCl*. Спектр экстракта подтверждает наличие эпокси соединений – по смещению максимумов абсорбции на рис. 5 в коротковолновую область вследствие сокращения цепи сопряжения. Содержание ксантофиллов в пересчете на лютеин составили 2.1 ± 0.3 мг ксанто-

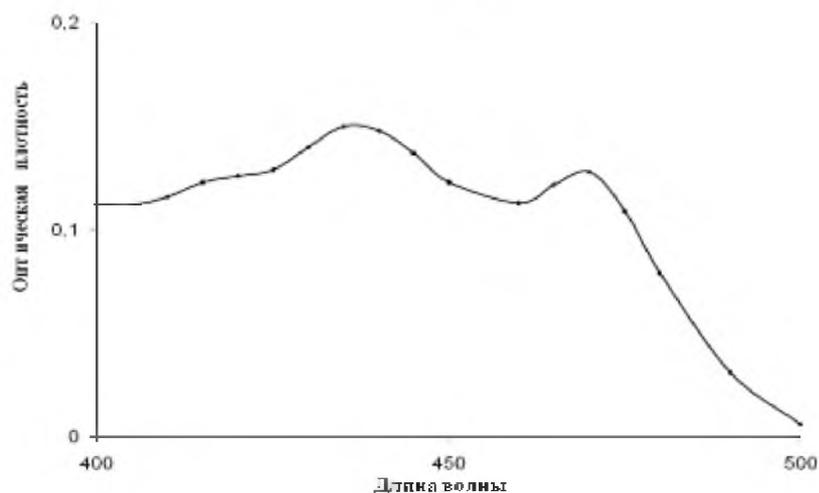


Рис. 5. Спектр ацетонового экстракта лепестков подсолнечника

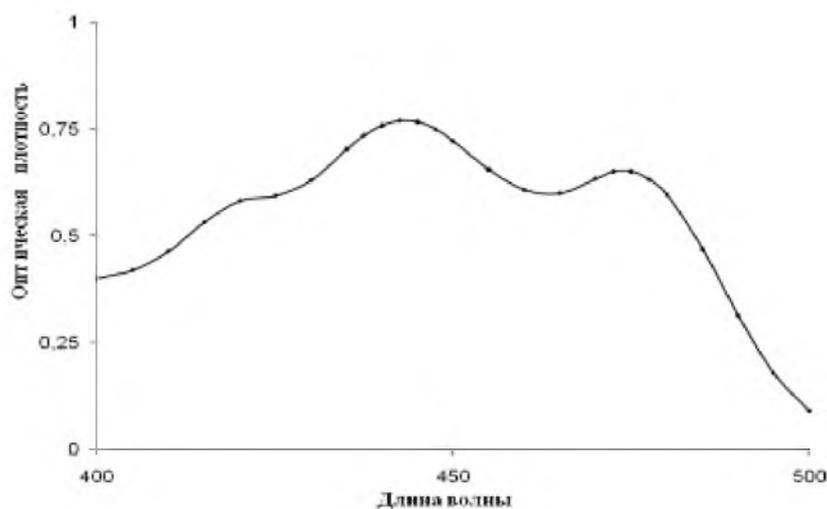


Рис. 6. Спектр ацетонового экстракта препарата ОРО ГЛО

ских весах (с точностью до 0.0001 г) в диапазоне 0.50-1.00±0.250 г, заливали 10 мл растворителя – ацетона (так как он позволяет быстро и количественно извлекать пигменты из желтка) и выдерживали несколько минут при постоянном перемешивании. Полученную смесь фильтровали через фильтр Шотта.

Спектрофотометрические измерения проводили относительно растворителя в кварцевых кюветах ($l = 1$ см) при $\lambda_{\max} = 440-445$ нм. Суммарное содержание каротиноидов (в пересчете на лютеин) определяли, используя $E_{1\text{см}}^{1\%} = 2550$ [6].

Для исследования соотношения лютеина и зеаксантина использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Присутствие высоко липофильных соединений контролировали записью хроматограмм образцов, использованных для спектрофотометрического определения в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ: колонка 250×4 мм Диасфер-110-С18 (или аналогичная фаза), элюент 100% ацетон, детектор 450 нм. Неэтерифицированные ксантофиллы удобно определять в условиях нормально-фазовой ВЭЖХ – колонка 250×4 мм Силасорб 600, элюент 30 об. % ацетона в *n*-гексане, детектор 450 нм.

Результаты и обсуждение

В эксперименте в качестве отправной точки для контроля влияния подкормок использовали данные по содержанию ксантофиллов в желтке яиц в течение адапта-

Материалы и методы

Перепелки были разделены на 5 групп по 28 особей: по 21 самке и по 7 самцов.

Все пять групп получали один и тот же тот же корм в течение адаптационного периода (10 дней). Затем первую группу оставили в качестве контрольной, вторая получала корм с добавлением добавки А, третья – с добавкой Б, третья с добавкой В, четвертая – с добавкой Г и пятая – с добавкой Д. Добавки вводили в количестве, обеспечивавшем поступление 0.1 мг ксантофиллов в сутки на 1 перепелку.

Каротиноиды желтка яиц определяли спектрофотометрическим методом (спектрофотометр КФК-3-01), и хроматографическими методами. В налале желток отделяли от белка и тщательно гомогенизировали. Брали навеску желтка на аналитиче-

ционного периода. Количественное определение ксантофиллов проводили в пересчете на лютеин для оценки суммарного уровня накопления. Спектры, представленные на рис. 7, свидетельствуют о том, что во всех четырех случаях – с добавками А, В и Г (последний не указан на рисунке) основной компонент – лютеин. Небольшое смещение максимума для образцов с подкормкой Б не удивительно – зеаксантин имеет большую цепь сопряжения с большей длиной волны максимума поглощения. Однако определение соотношения зеаксантин – лютеин в данном случае практически невозможно только по спектрофотометрическим данным.

В целом накопление ксантофиллов, как и при кормлении кур [5, 7, 8], увеличивается при использовании подкормок А, Б и Г и практически не изменяется в случае подкормки В. Следовательно, в организме ферментов, отвечающих за деэпокси-

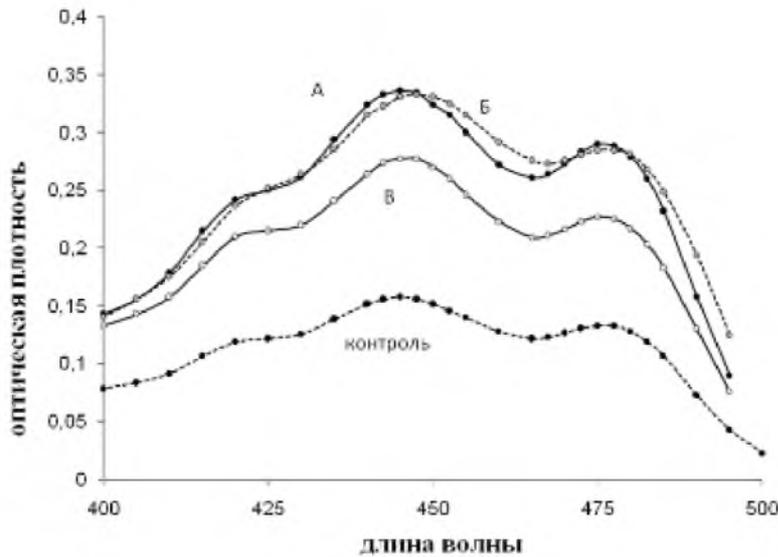


Рис. 7. Спектр ацетонового экстракта желтков перепелиных яиц

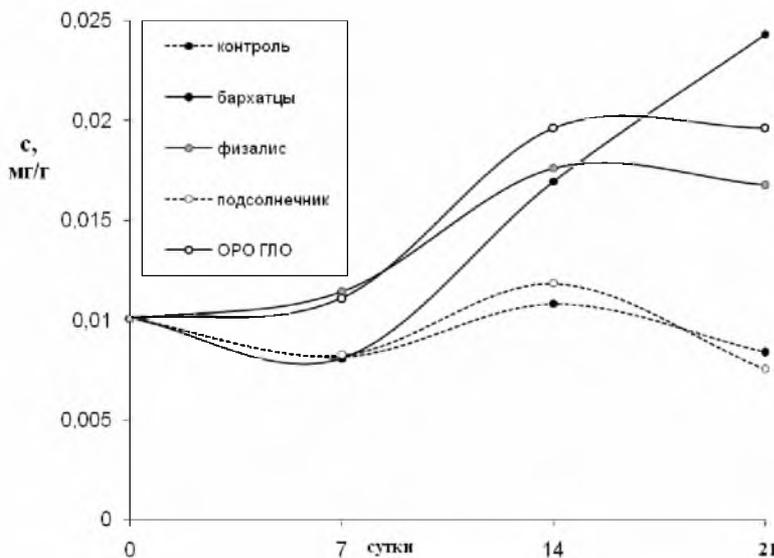


Рис. 8. Изменение накопления ксантофиллов в желтке при использовании индивидуализированных добавок использованных материалах при хранении.

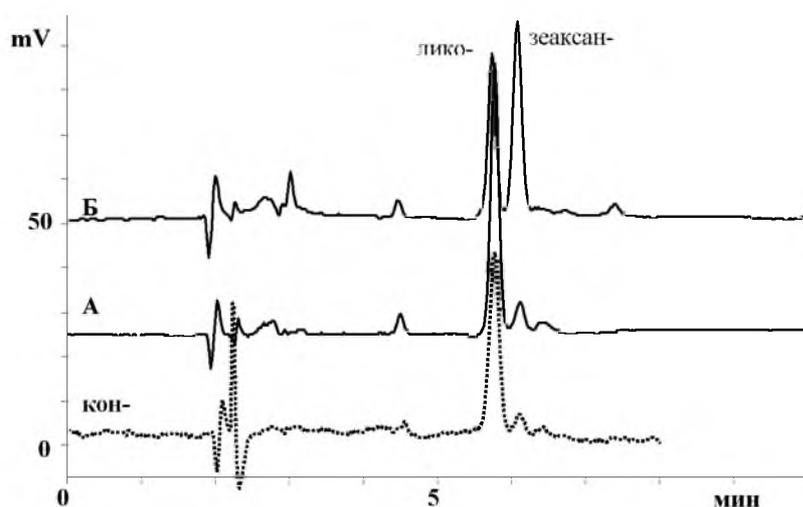
вание, нет. Поэтому, к сожалению, растения, накапливающие эпокси-каротиноиды не эффективны в кормлении животных для увеличения накопления ксантофиллов. С другой стороны, добавки и диэфиров и неэтерифицированных ксантофиллов примерно одинаково эффективны, т.е. этерификация не сказывается на биодоступности ксантофиллов, что соответствует литературным данным. Некоторый относительно большой рост усвоения ксантофиллов бархатцев может свидетельствовать об особенностях целлюлозной матрицы, в которой оказываются заключенными каротиноиды хромoplastов после высушивания материала.

Действительно, при определении ксантофиллов в высушенных исходных материалах для полной экстракции необходимо дополнительное тщательное измельчение уже размолотых лепестков с кварцевым песком до оптической гомогенности порошка. Впрочем, эта прочность связывания и отвечает за неожиданно высокую сохранность каротиноидов в

Дополнительная необходимая информация была получена при хроматографическом исследовании тех же образцов желтка, рис. 9.

Метод нормально-фазовой хроматографии с использованием колонки 250×4.6 мм Силасорб 600, 5 мкм и подвижной фазы, содержащей 30 об.% ацетона в *n*-гексане. Анализ хроматограмм показал, что в случаях А, В и Г а также в контрольном опыте хроматограммы различались только интенсивность (площадью) пиков при неизменном соотношении между лютеином и зеаксантином (в диапазоне 1 : (5?7)), но ко второй неделе получено очень большое различие для образцов, полученных с использованием добавки Б: доля зеаксантина в желтке таких яиц даже немногим превышает долю лютеина (46 против 36 %, соответственно).

Полученные нами данные говорят о том, что если превращение лютеина в зеаксантин и происходит, то очень медленно и в незначительных количествах. Т.о. создание сбалансированной по содержанию лютеина и зеаксантина добавки является оправданным направлением пищевого дизайна.



Выводы

1. Накопление ксантофиллов не зависит от формы ксантофилла – эфирной или нативной.
2. Индивидуализированные добавки в корм птицы приводят к увеличению накопления лютеина и зеаксантина, но не эпокси-ксантофиллов.

Рис. 9. Разделение ксантофиллов желтка яиц перепелок

Список литературы

1. Thurnham D.I. Macular zeaxanthins and lutein – a review of dietary sources and bioavailability and some relationships with macular pigment optical density and age-related macular disease // *Nutr. Res. Rev.* – 2007. – Vol.20. – P. 163-179.
2. Bone R.A., Landrum J.T., Friedes L.M., Gomez C.M., Kilburn M.D., Menezes E., Vidal I., Wang W. Distribution of Lutein and Zeaxanthin Stereoisomers in the Human Retina // *Exper. Eye Res.* – 1997. – Vol. 64. – P. 211-218.
3. European Patent Application EP1408737 – *Tagetes erecta* marigold with altered carotenoids compositions and ratios.
4. US Patent 7033622 – *Tagetes erecta* marigolds with altered carotenoid compositions and ratios.
5. Владимиров В.Л., Шапошников А.А., Дейнека Д.В., Вострикова С.И., Дейнека В.И. Исследование каротиноидного состава желтка куриных яиц. // Доклады РАСХН. – 2005. – №6. – С. 46-48.
6. Rodrigues-Amaya D.B./ A Guide to Carotenoid Analysis in Foods. ILSI Press, Washington, D.C. 63 p.
7. Дейнека Л.А., Шапошников А.А., Шаркунова Н.А., Гусева Т.С., Дейнека В.И., Гай И.Е. Пищевой дизайн: целенаправленное изменение накопления ксантофиллов в желтке куриных яиц. // Белгородский агромир. – 2006. – № 6. – С. 18-19.
8. Дейнека Л.А., Шапошников А.А., Вострикова С.М., Дейнека В.И. Пищевой дизайн: Исследование накопления ксантофиллов в желтке куриных яиц // Научные ведомости БелГУ. Серия Естественные науки. – 2007. - №5 (36), вып.5. – С. 133-138.



SPECTRAL AND CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF XANTHOPHYLLS IN VARIOUS PLANT ADDITIONS AND THEIR INFLUENCE ON LUTEIN AND ZEAXANTHIN ACCUMULATION IN A QUAILS YOLKS

V. I. Deineka, A. A. Shaposhnikov

L. A. Deineka, S. M. Vostrikova

L. R. Zakirova, I. Y. Oleynikova

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

E-mail: Shaposhnikov@bsu.edu.ru

E-mail: Pisarev@bsu.edu.ru

The results of spectral and chromatographic analysis of various plant xanthophylls are presented in this article. There have been discussed experimental data of xanthophylls accumulation in a quail's vitellus under the influence of plant additions.

Key words: xanthophylls, lutein, zeaxanthin, food additions, a quail's eggs.