



УДК 543.544:637.414

## КАРОТИНОИДЫ ЖЕЛТКОВ ЯИЦ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ

**С.М. Вострикова**  
**М.Ю. Третьяков**  
**В.И. Дейнека**  
**Л.А. Дейнека**  
**А.А. Шапошников**

Белгородский государственный  
национальный исследовательский  
университет

e-mail: deineka@bsu.edu.ru

В работе методом нормально-фазовой ВЭЖХ и спектрофотометрическим методом исследован каротиноидный комплекс желтков яиц некоторых птиц (*Gallus gallus*, *Pavo cristatus*, *Phasianus colchicus*, *Meleagris gallopavo*, *Coturnix coturnix*, *Anser anser*, *Cairina moschata*, *Columba livia* и *Numida meleagris*). Установлено, что во всех исследованных образцах накапливаются в основном лютеин и зеаксантин – важнейшие липофильные антиоксиданты, необходимые для нормального развития зародыша и птенцов. В случае желтка яиц гусей обнаружена большая доля продукта окисления лютеина – 3-гидрокси- $\beta$ , $\epsilon$ -каротин-3'-она.

Ключевые слова: ВЭЖХ, каротиноиды, анализ, желток яиц, сельскохозяйственная птица.

### Введение

Желток куриных яиц привлекает особое внимание тем, что в нем накапливаются два важнейшие для предотвращения возрастной макулярной дистрофии ксантофилла – лютеин и зеаксантин, причем желток, как матрица, является эффективным носителем этих ксантофиллов с высокой биодоступностью для человека [1]. Каротиноиды не синтезируются в организме животных, поэтому естественным следствием стала идея одного из вариантов пищевого дизайна в птицеводстве – введение специализированных кормовых добавок для получения продукции, обогащенной лютеином и зеаксантином [2]. Однако эта идея не всегда рассматривается как принципиально важная. Дело в том, что к показателям, характеризующим биологическую полноценность продукции и подлежащим контролю, в России относят содержание в желтке витаминов А, В<sub>2</sub> и каротиноидов; их недостаток приводит к ухудшению инкубационных качеств яиц, снижению выводимости молодняка и увеличению его отхода [3]. При этом уровень каротиноидов ни в кормах [4], ни в яйцах (пищевых) [5] не регламентируется.

В некоторой отечественной рекламной информации можно найти довольно странные утверждения о роли и значении ксантофиллов для самой птицы. Так, на сайте компании РОСКАРФАРМ в одной из публикаций [6] отмечается, что «...чем менее активен каротиноид, тем в больших количествах он депонируется в жировых тканях или желтке яйца. Если птицефабрика, например, сориентирована на производство яиц, то ей необходимо помимо бета-каротина, обеспечивающего увеличение яйценоскости, вводить в рацион источники лютеина, который, не обладая биологической активностью, а значит, не расходуясь на поддержание жизненноважных функций, полностью депонируется в желтке, окрашивая его в интенсивный оранжевый цвет...». В то же самое время на сайте другой компании, «Кемин»-Украина [7] приводится информация о ОРО ГЛО – препарате, предназначенном для увеличения уровня накопления ксантофиллов в желтке яиц, кроме традиционного заблуждения об источнике ксантофилла – они накапливаются в лепестках цветков бархатцев, а не календулы [8], – утверждается, что «... Восполнение недостатка каротиноидов с помощью ОРО ГЛО способствует повышению биологической полноценности инкубационных яиц. Контроль инкубационных качеств яиц кур, получавших ОРО ГЛО, показывает, что выводимость и жизнеспособность молодняка достоверно выше, чем у не получавших препарата».

Не подвергая сомнению значимость  $\beta$ -каротина для птицеводства, а также понимая, что на самом деле биологической активностью могут обладать любые кароти-



ноиды (в том числе лютеин и зеаксантин) благодаря их антиоксидантным свойствам, трудно согласиться с утверждением об усилении накопления ксантофиллов в жировых тканях и в желтке при снижении их активности – удаление наименее ценного вещества путем его отложения в желток представляется абсурдной идеей. Для избавления от ненужных веществ у живого организма существуют более эффективные и поддающиеся пониманию механизмы.

И все-таки, найти в научной литературе информацию о назначении ксантофиллов в желтке яиц птиц весьма не просто. В недавнем обзоре [9] отмечается, что ксантофиллы накапливаются первоначально в печени кур-несушек, затем депонируются в растущих фолликулах и в семенном материале у петухов, выполняя защитную функцию, связанную с антиоксидантными свойствами этих соединений. При этом лютеин, встраиваясь в фосфолипидную мембрану клеток, выполняет функцию защитного экрана, предотвращающего УФ-иницированное окислительное повреждение биомембраны, тем самым защищая зародыш, развивающийся исключительно в желтке. Это мнение согласуется с выводами другой работы [10], в которой отмечено, что использование добавок содержащих лютеин повышает жизнеспособность птенцов на 2-6%.

Вряд ли следует ожидать прямых корреляций между липофильностью (или гидрофильностью) каротиноидов и их уровнем накопления в желтке вследствие сложного пути каротиноидов от стенок кишечника кур-несушек до желтка. Так, например, исследуя влияние полярности каротиноидов на их накопление в желтке яиц, было установлено, что наименее полярный  $\beta$ -каротин усваивается лишь на 1%, и этот показатель растет при увеличении полярности при переходе от  $\beta$ -каротина к зеаксантину (7%) и этиловому эфиру  $\beta$ -апо-8-каротиновой кислоты (34%). При этом апоэфир абсорбируется в кровь в 9-11 раз (а кантоксантин – в 3-5 раз) сильнее по сравнению с  $\beta$ -каротином, то есть наблюдается прямая зависимость между этим параметром и гидрофильностью каротиноидов. Но, для переноса каротиноидов в кожу получена обратная зависимость. То, что полярность каротиноида не является свойством, определяющим его накопление в желтке подтверждается, например, в случае камышницы (*Gallinula chloropus*), американской лысухи (*Fulica Americana*) и клуши (*Larus fuscus*), в желтке яиц которых при высоком суммарном уровне накопления каротиноидов (47.5, 131.0 и 71.6 мкг на 1 г, соответственно) необычайно большая доля суммы каротиноидов приходится на  $\beta$ -каротин (25-29%, [11]). В работе [12] был установлен высокий уровень накопления не только самых гидрофильных лютеина и зеаксантина, но и кантоксантина и этилового эфира  $\beta$ -апо-8-каротиновой кислоты (при сопоставимом с предыдущими ксантофиллами уровнем накопления в желтке куриных яиц), хотя полярность последних заметно ниже, чем лютеина и его изомера – зеаксантина. Впрочем, соотношение между перечисленными каротиноидами (а также цитраноксантином и  $\beta$ -криптоксантином) было различным для яиц различных производителей США; следовательно, каротиноидный состав зависит и от каротиноидного состава пищи. При этом известны работы, в которых было показано включение в желток капсантина и капсорубина из экстракта красного перца [13], но было показано, что виолаксантин (более полярный по сравнению с зеаксантином) в желтке не накапливается вовсе [14].

Целью настоящей работы было провести качественную и количественную оценку каротиноидного комплекса желтка яиц доступных для нас сельскохозяйственных птиц.

### Материалы и методы исследования

Для обобщенного количественного определения каротиноидов использовали спектрофотометрический метод, а для качественного анализа – метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).



При определении каротиноидов желток отделяли от белка и тщательно гомогенизировали. Навеску  $0.50-1.00 \pm 0.250$  г заливали 10 мл растворителя – ацетона и выдерживали несколько минут при постоянном перемешивании. Полученную смесь фильтровали через фильтр Шотта.

Полученный фильтрат фотометрировали относительно растворителя в кварцевых кюветах ( $l = 1$  см) при  $\lambda_{max} = 440 - 445$  нм (спектрофотометр КФК-3-01). Суммарное содержание каротиноидов (в пересчете на лютеин) определяли, используя  $E_{1cm}^{1\%} = 2550$  по формуле:

$$\alpha^* = \frac{A_{max}}{E_{1cm}^{1\%}} \cdot \frac{V \cdot P \cdot 1000}{100 \cdot m \cdot l}, \text{ мг/г}$$

где:  $A_{max}$  – оптическая плотность раствора в максимуме абсорбции,

$E_{1cm}^{1\%}$  – коэффициент экстинкции,

$V$  – объём экстракта, мл,

$P$  – степень разбавления экстракта перед спектрофотометрированием,

$m$  – масса навески, г,

$l$  – длина оптического пути, см.

В работе использовали две хроматографические системы:

1) составленную из насоса Beckman 110В, крана дозатора Rheodyne 7215 с петлей объемом 20 мкл, и детекторов: спектрофотометрического детектора LC/9563 с изменяемой длиной волны (для определения каротиноидов). Для регистрации и обработки хроматограмм использовали ПО Мультихром 1.5).

2) систему Agilent 1200 Infinity с диодно-матричным детектором; хроматограммы обрабатывали в среде ChemStation 32.

### Результаты исследования и обсуждение

Лютеин и зеаксантин, как изомеры с небольшим структурным изменением – перемещением двойной С=С-связи по одному из конечных кольцевых фрагментов внутрь кольца вследствие потери неполного из-за стерических причин сопряжения с линейной полиеновой центральной частью имеют спектры с несколько различающимися положениями максимумов абсорбции: при переходе от зеаксантина к лютеину наблюдается гипсохромный сдвиг на ~5 нм. Однако этого смещения недостаточно для отдельного определения этих ксантофиллов в их смеси, какой и является каротиноидный комплекс желтка куриных яиц [12]. Поэтому спектр экстракта может быть использован для обобщенного метода определения содержания ксантофиллов на предположительно доминирующий компонент [15, 16]. Неудивительно, что спектры ацетоновых экстрактов желтка яиц ряда птиц с характеристической для каротиноидов области оказались практически неразличимыми, рис.1.

Разумеется, мало информативным в этом отношении являются результаты определения каротиноидов по шкале Рош [17]. В таком случае необходимо использование высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Именно этот метод даже при небольшом изменении строения веществ (при переходе от лютеина к зеаксантину) позволят разделить эти вещества при их совместном присутствии. При этом возможно использованием двух ортогональных методов – обращенно-фазового и нормально-фазового вариантов. Выбор в пользу второго обусловлен тем, что оба ксантофилла являются наиболее полярными соединениями в обычных каротиноидных комплексах, поэтому желателен использовать метод, при котором они элюируются последними. Метод удобен и быстр, поскольку для определения каротиноидов в желтке необходимо лишь экстрагировать каротиноиды из желтка ацетоном, разбавить экстракт *n*-гексаном и сразу ввести пробу в хроматографическую систему (после фильтрования через насадку на шприц с порами 0.45 мкм). Сопутствующие экстрактивные вещества, которых количественно очень много – триглицериды и холестерин липидной матрицы, - не мешают определению, как не поглощающие излучение при



рабочей длине волны детектора и элюирующиеся намного быстрее лютеина и зеаксантина.

Хроматограммы некоторых экстрактов представлены на рис.2 и рис.3.

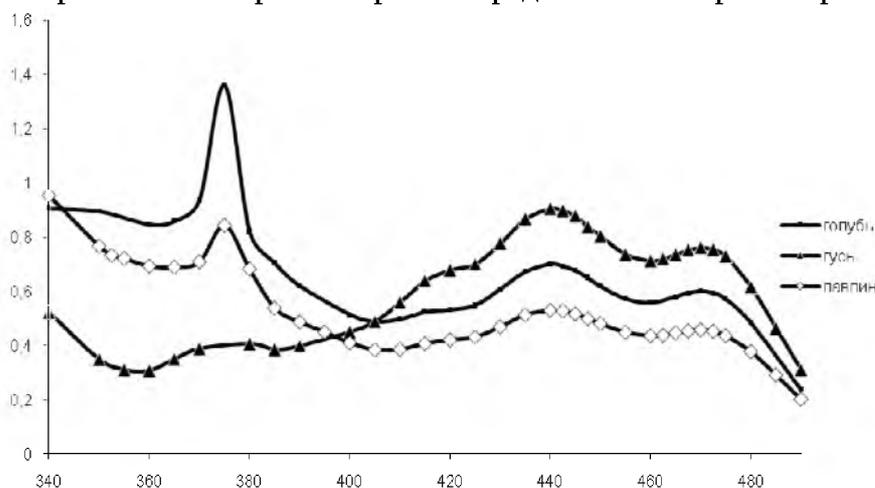


Рис. 1. Спектры ацетоновых экстрактов желтков яиц некоторых птиц



Рис. 2. Ксантофиллы желтков яиц некоторых птиц, имеющих хозяйственное значение  
Колонка 250×4.6 мм Силасорб 600 (5 мкм); подвижная фаза: 30 об.% ацетона в *n*-гексане;  
детектор: 445 нм.

Как видно на рис.2 все исследованные каротиноидные комплексы желтков оказываются качественно одинаковыми. Для отнесения пиков к лютеину и к зеаксантину мы использовали простой подход. Следует помнить, что использование стандартных веществ авторитетных производителей не всегда позволяет решить проблемы идентификации, поскольку кроме труднодоступности все стандарты каротиноидов имеют ограниченный срок годности, в то время как в ряде случаев существуют легкодоступные и достаточно стандартные образцы природного происхождения, в которых сохранность каротиноидов может быть несопоставимо более высокой. Наши многолетние исследования показали, что желток куриных яиц, которые могут быть приобретены на рынке г. Белгорода, практически всегда содержит только два ксан-



тофилла (лютеин и зеаксантин) в качестве основных компонентов. Способность иных каротиноидов накапливаться в желтке нами отмечена не была, что связано с тем, что местные производители практически не используют кормовые добавки. За 7 лет исследований лишь дважды была приобретена продукция с явными следами использования при кормлении птиц соответствующих кормовых добавок, но такой желток легко определяется по специфичной красноватой, нехарактерной для обычного желтка, окраске. Наконец, решающим критерием при идентификации могут служить спектры, записанные в ячейке диодно-матричного детектора, рис.3.

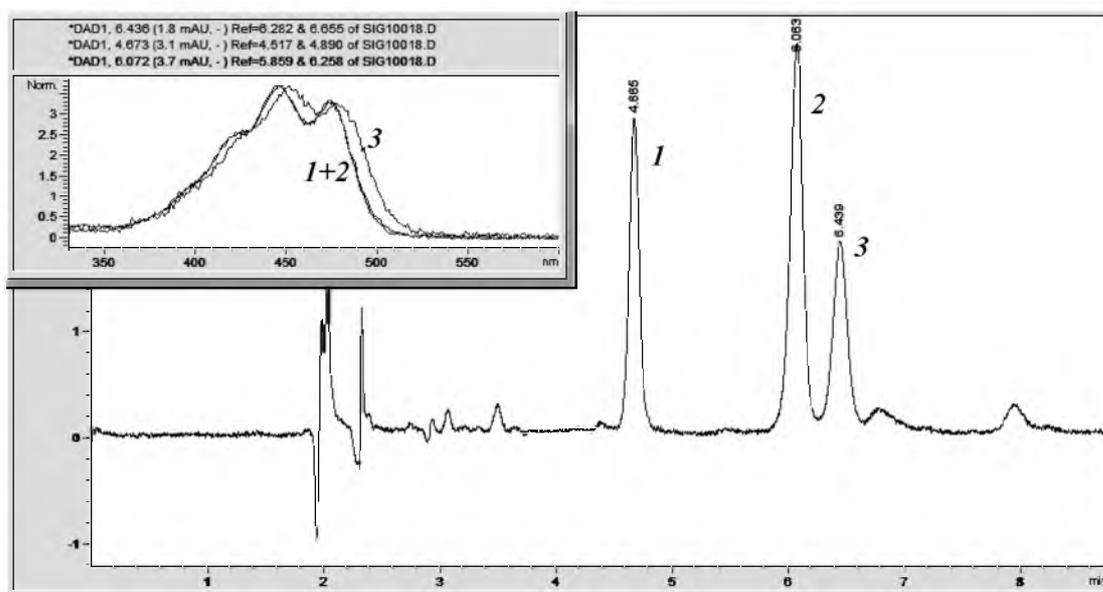


Рис. 3. Ксантофиллы желтков яиц гуся со спектрами

Полученные в работе результаты представлены в таблице.

Таблица

**Ксантофиллы желтков яиц некоторых представителей класса Aves**

Семейство	Подсемейство	Род	Вид	Lu/Ze*	$\Sigma^{**}$ , мг/г
Фазановые, Phasianidae	Фазановые, Phasianinae	Курица, <i>Gallus</i>	К. домашняя, <i>G. gallus</i>	1.6:1	0.012
		Павлин, <i>Pavo</i>	П. обыкновенный, <i>P. cristatus</i>	2:1	0.025
		Фазан, <i>Phasianus</i>	Ф. обыкновенный, <i>P. colchicus</i>	5.5:1	0.005
	Индийские, <i>Meleagridinae</i>	Индийка, <i>Meleagris</i>	И. обыкновенная, <i>M. gallopavo</i>	5.8:1	0.024
	Куропатковые, <i>Perdicinae</i>	Перепел, <i>Coturnix</i>	Перепел, <i>C. coturnix</i>	1.7:1	0.011
Утиные, Anatidae	Гусиные, <i>Anserinae</i>	Гусь, <i>Anser</i>	Г. серый и белый, <i>A. anser</i> и <i>A. caerulescens</i>	2:1	0.047
	Настоящие утки, <i>Anatinae</i>	Утка, <i>Cairina</i>	Индютка, <i>C. moschata</i>	3:1	
		<i>Anas</i>	У. обыкновенная, <i>A. platyryncha</i>	3.5:1	
Голубиные, <i>Columbidae</i>	Настоящие голуби, <i>Columbinae</i>	Голубь, <i>Columba</i>	Г. сизый, <i>C. livia</i>	3.7:1	0.022
Цесарковые, <i>Numididae</i>	—	Цесарка, <i>Numida</i>	Ц. обыкновенная, <i>N. meleagris</i>	6.1:1	0.013

Lu/Ze\* – соотношение содержания лютеина и зеаксантина,  $\Sigma^{**}$  – обобщенное содержание каротиноидов в пересчете на лютеин.

Во всех исследованных образцах желтков на сумму лютеина и зеаксантина приходилось (кроме гусей) более 70% суммы каротиноидов, и хотя соотношения между уровнем накопления этих каротиноидов различаются, очевидно, что они необходимы для развития потомства, хотя их точное назначение в развитии птенцов еще предстоит выяснить.

Единственная особенность каротиноидного комплекса обнаружена в случае желтка яиц гусей, рис.3. На хроматограммах для этих птиц значительным оказываются не только пики лютеина и зеаксантина, но и пик еще одного соединения, присутствующего в желтке яиц других птиц в небольшом количестве. Спектр этого пика не отличается от спектра лютеина, поэтому все изменения должны происходить в структуре вне хромофорной группировки. Несколько уменьшенное время удерживания по сравнению с лютеином может свидетельствовать о понижении сорбционной активности в одном из колец, например, за счет окисления ОН-группы до кетогруппы с образованием 3-гидрокси- $\beta,\epsilon$ -каротин-3'-он. Известно, что это соединение является продуктом окисления лютеина, обнаруженном, например, в сетчатке глаз [18], и в желтке куриных яиц [19].

### Выводы

Результаты выполненного исследования показывают, что во всех исследованных желтках различных птиц накапливаются в основном одни и те же ксантофиллы – лютеин и зеаксантин. Особенность желтка яиц гуся – высокая доля продукта окисления лютеина – 3-гидрокси- $\beta,\epsilon$ -каротин-3'-она. И, хотя роль этих ксантофиллов, обладающих антиоксидантной активностью, в развитии птенцов неизвестна, их необходимость не вызывает сомнения.

### Список литературы

1. Handelman G.J., Nightingale Z.D., Lichtenstein A.H., Schaefer E.J., Blumberg J.B. Lutein and zeaxanthin concentrations in plasma after dietary supplementation with egg yolk // *Am. J. Clin. Nutr.* – 1999. – V.70. – P. 247–251.
2. Дейнека Л.А., Шапошников А.А., Шаркунова Н.А., Гусева Т.С., Дейнека В.И. Пищевой дизайн: целенаправленное изменение накопления ксантофиллов в желтке куриных яиц. // *Белгородский агромир.* - 2006. - №6. - С. 18-19.
3. Бессарабов Б.Ф. Инкубация яиц сельскохозяйственной птицы. Справочник М.: Зоо-МедВет. 2001. - 88 с.
4. ГОСТ 18221-99 «Комбикорма полнорационные для сельскохозяйственной птицы». Технические условия.
5. ГОСТ Р 52121-2003 «Яйца куриные пищевые». Технические условия.
6. Каротиноиды. Цель и методы применения в животноводстве. Цель и методы применения в животноводстве. Препараты бета-каротина Каролин, Карток, Карсел. <http://www.roskarfarm.ru/preparations4>.
7. <http://kemin.biosgroup.com.ua/>
8. Гостищев И.А., Третьяков М.Ю., Анисимович И.П., Дейнека Л.А., Дейнека В.И. Оценка высушенных цветков бархатцев в качестве доступного источника диэфиров лютеина для целей хроматографической идентификации ксантофиллов // *Научные ведомости БелГУ. Серия: Естественные науки.* - 2010. - №15(86), Вып.12. - С. 140-144.
9. Дадали В.А., Тутельян В.А., Дадали Ю.В., Кравченко Л.В. Каротиноиды. Биодоступность, биотрансформация, антиоксидантные свойства / *Вопросы питания.* – 2010. – Т.79, №2. - С. 4-18.
10. Pizzey H., Bredrecarrats G.Y. Study of the effects of dietary lutein on reproductive performances in chickens // *J. Poult. Sci.* – 2007. – V.44. - P. 409-415.
11. Surai P.F., Speak B.K., Wood N.A.R., Blount G.R., Spark N.H.C. Carotenoid discrimination by the avian embryo: a lesson from wild birds // *Comp. Biochem. B.* – 2001. – V.128. - P. 743-750.
12. Schalatterer J., Breithaupt D.E. Xanthophylls in Commercial Egg Yolks: Quantification and Identification by HPLC and LC-(APCI)MS Using a C30 Phase // *J. Agric. Food Sci.* – 2006. – V.54. – P. 2267-73.



13. Lai S.-M., Gray J.I., Flegal C.J. Deposition of carotenoids in eggs from hens fed diet containing saponified and unsaponified oleoresin paprika // J. Sci. Food Agric. – 1996. – V.72. – P. 166-170.
14. Nys Y. Dietary carotenoids and egg yolk coloration – a review // Arch. Geflügelk. – 200. – V.64. – P. 45-54.
15. Scott K.J. Detection and measurement of carotenoids by UV/Vis spectrophotometry / Current Protocol in Analytical Chemistry. – 2001. – F2.2.1 – F2.2.10.
16. Biehler E., Mayer F., Hoffmann L., Krause E., Bohn T. Comparison of 3 Spectrophotometric Methods for Carotenoid Determination in Frequently Consumed Fruits and Vegetables // J. Food Sci. – 2010. – V.75. – P. C55-C61.
17. Lee C.-Y., Lee B.-D., Na J.-C., An G. Carotenoid Accumulation and Their Antioxidant Activity in Spent Laying Hens as Affected by Polarity and Feeding Period // Asian-Aust. J. Anim. Sci. – 2010. – V.23. – P.799-805.
18. Khachik F., Bernstein P.S., Garland D.L. Identification of Lutein and Zeaxanthin Oxidation Products in Human and Monkey Retinas // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 1997. – V.38. – P. 1802-1811.
19. Tyczkowski J.K., Schaeffer J.L., Parkhurst C., Hamilton P.B. 3'-Oxolutein, a metabolite of lutein in chickens. // Poult. Sci. – 1986. – V.65. – P. 2135-2141.

## CAROTENOIDS OF POULTRY EGGS YOLK

**S.M. Vostrikova**  
**M.Yu. Trit'jakov**  
**V.I. Deineka**  
**LA. Deineka**  
**AA. Shaposhnikov**

*Belgorod State National  
Research University*

*e-mail: deineka@bsu.edu.ru*

Carotenoid complexes of some poultry (*Gallus gallus*, *Pavo cristatus*, *Phasianus colchicus*, *Meleagris gallopavo*, *Coturnix coturnix*, *Anser anser*, *Cairina moschata*, *Columba livia* and *Numida meleagris*) have been investigated by normal-phase HPLC and spectrophotometry. It has been established that all samples under investigation were enriched by mainly lutein and zeaxanthin being lypophilic antioxidants for embryo and chicken development. That of goose has an increased concentrations of lutein oxidation product - 3-hydroxy- $\beta,\epsilon$ -carotene-3'-on.

Key words: HPLC, carotenoids, analysis, egg yolk, poultry.