



## КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ПИГМЕНТАЦИИ СКОРЛУПЫ ЯИЦ У ПТИЦ: ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ПРОТОПОРФИРИНА

**С.А. Родионова,  
П.Д. Венгеров**

*Воронежский государствен-  
ный природный биосферный  
заповедник*

*Россия, 394080, г. Воронеж,  
ст. Графская, госзаповедник,  
центральная усадьба*

*E-mail:  
pvengerov@yandex.ru*

Изложена методика исследования пигментации птичьих яиц с помощью спектроскопического анализа. Из измельченной скорлупы получали солянокислые вытяжки пигментов – биливердина и протопорфирина, обуславливающих разнообразие окраски яиц. Далее определяли оптическую плотность растворов на спектрофотометре СФ-46 при различном монохроматическом свете. Эта плотность в пиках поглощения протопорфирина (411, 557 и 602 нм) и биливердина (377 и 680 нм) прямо пропорциональна концентрации данных пигментов в растворе. Для получения абсолютных значений концентрации протопорфирина строили калибровочные графики по эталонным образцам в характерных пиках поглощения. По ним находили коэффициент для расчета зависимости между оптической плотностью и концентрацией вещества в исследуемых образцах. Концентрация протопорфирина измеряется в микрограммах на 1 кв. см. скорлупы. Полученные данные подвернуты статистической обработке. Количественная оценка уровня пигментации скорлупы яиц перспективна для изучения различных сторон экологии и эволюции птиц.

Ключевые слова: окраска яиц у птиц, пигментация скорлупы, спектроскопический анализ, биливердин и протопорфирин.

Изучение биологии птиц тесным образом связано с исследованием оологического материала, в том числе окраски яиц. В понятие окраска яйца обычно вкладывают цвет основного фона и рисунок, то есть наличие пятен различной величины и формы, густоты и характера их размещения на поверхности и в толщине скорлупы, цвет этих пятен. Чаще всего описания окраски являются результатом визуальных наблюдений, и в разных литературных источниках они сильно расходятся или даже бывают противоречивы. В отношении рисунка предпринимались попытки относительной количественной оценки его густоты и особенностей размещения [1, 2], но они оказались малопригодными для статистического анализа.

Вместе с тем при характеристике окраски яиц еще возможно использование показателей пигментации, то есть состава и количества пигментов, находящихся в скорлупе. Известно, что в формировании окраски скорлупы яиц у птиц принимают участие в основном два пигмента – биливердин, обуславливающий цвета от синего до зеленого, и протопорфирин, цвет которого изменяется от желтого до красного [3]. Биливердин, самостоятельно или в сочетании с протопорфирином, создает фоновую окраску яиц, а протопорфирин обычно формирует рисунок в виде различных пятен, точек, штрихов и пр. Попытка определения уровня пигментации предпринималась и ранее [4], но она также носила относительный количественный характер.

Целью предлагаемой методики является точная оценка уровня пигментации скорлупы яйца, ее количественное выражение. Полученные данные могут быть статистически обработаны и использованы при изучении внутрикладковой, внутривидовой изменчивости окраски яиц, а также при сравнительном анализе пигментации скорлупы яиц более крупных таксонов. Методика основана на хорошо известном в химических исследованиях спектрофотометрическом анализе, который мы адаптировали к своим задачам.

Для получения результатов высокой точности желательно анализировать скорлупу целого яйца. Использование небольших участков скорлупы не может дать точного представления о количественном содержании пигментов, поскольку они часто распределяются по поверхности скорлупы неравномерно. Выбранный участок может характеризоваться либо почти полным отсутствием пигментов, либо завышенным (по сравнению с реальным) его содержанием.



В любом случае для проведения анализа пигментации необходимо знать размеры яйца (длину ( $L$ ) и диаметр ( $D$ )), которые можно снять с яйца при помощи штангенциркуля (с точностью до 0.1 мм). Используя эти исходные величины, по известным формулам вычисляют объем яйца ( $V = 0,51LD^2$ ) и площадь поверхности яйца ( $S_{\text{я}} = 4.83V_{\text{я}} 0.67$ ). Полученные параметры необходимы для определения объема экстрагирующей смеси для данного образца, а также при последующей математической обработке исследуемого материала.

В спектроскопических исследованиях пигментов яиц в качестве экстрагирующего реагента применяют смесь, состоящую из растворителя и концентрированной соляной кислоты в соотношении 1:2 [5]. В качестве растворителя удобнее всего использовать этиловый спирт ( $C_2H_5OH$ ), хотя возможно применение других веществ, способных растворять органические вещества билирубин – биливердинового ряда. Проведенные исследования с применением различных растворителей в экстрагирующей смеси показали идентичные результаты в выбранных образцах. Это дает возможность сравнения результатов спектроскопических измерений вытяжек пигментов, полученных различными растворителями.

Экстрагирующая смесь готовится непосредственно перед анализом, т.к. ее длительное хранение может привести к образованию различных перекислых и галогенсодержащих органических соединений, и хранится в емкости с притертой крышкой во избежание изменения концентрации спирта при испарении [6].

Подготовленная скорлупа (предварительно очищенная от возможных загрязнений и подскорлуповых оболочек) помещается в пробирку или стаканчик (в зависимости от количества скорлупы), измельчается стеклянной палочкой (чем меньше будет осколки скорлупы, тем быстрее будет проходить реакция экстракции пигментов).

Экстрагирующая смесь приливается из расчета 0.6 мл смеси на 1 см<sup>2</sup> скорлупы (при пересчете на каждую пробу). Реакция, как правило, протекает бурно с выделением пузырьков газа (что следует учесть при выборе емкости для экстракции). После прекращения реакции раствор центрифугируют в течение 5 мин при 1000 об./мин. Полученная надосадочная жидкость используется для дальнейшего анализа. Можно также вместо центрифугирования применять фильтрацию раствора через ватный фильтр. Оба способа позволяют получить прозрачный экстракт (мутность может быть следствием остатка в исследуемом образце подскорлуповой оболочки и белка) – необходимое условие при спектроскопических измерениях.

Спектроскопические методы анализа основаны на способности атомов и молекул вещества испускать, поглощать или рассеивать электромагнитные излучения [6]. Для предлагаемой методики возможно использование спектроскопических приборов различных типов и марок. Мы проводили анализ на спектрофотометре СФ-46 (ЛОМО), предназначенном для измерения коэффициентов пропускания жидких и твердых прозрачных веществ в области спектра от 190 до 1100 нм.

Все приготовленные по вышеописанной методике солянокислые вытяжки были прозрачны, но имели различную интенсивность окраски. Насыщенные растворы разводили (в зависимости от степени окрашенности) экстрагирующей смесью в 2–20 раз для получения наиболее точных результатов при снятии спектра поглощения. В дальнейшем степень разведения учитывали при пересчете оптической плотности на 1 см<sup>2</sup> скорлупы яйца.

Для приготовленных солянокислых вытяжек производили измерения оптической плотности ( $A$ ) на описанном выше спектрофотометре СФ-46 при различном монохроматическом свете (лампа накаливания ОП-33-0.3) в интервале от 290 до 710 нм с шагом 10 нм. В качестве контроля использовали экстрагирующую смесь, которую настраивали на 0 при 290 нм с использованием сурьмяно-цезиевого фотоэлемента, щелью 1.0.

Для проведения измерений по пигментации яиц наиболее приемлемы кюветы с толщиной оптического слоя 1.5–3.0 мм, в противном случае необходимо произвести перерасчет объема вытяжки с тем, чтобы полученного раствора хватило для заполне-



ния кюветы. Кроме этого, кюветы, используемые при сравнительном анализе пигментации яиц, также должны быть равномерного объема. Нами использовались кварцевые кюветы с толщиной оптического слоя 2.0 мм.

Дополнительно для каждого образца (без разведения) были измерены показатели оптической плотности в точках максимумов поглощения пигментов: 377, 411, 557, 602 нм – сурьмяно-цезиевый элемент, щель 1.0; для 680 нм – кислородно-цезиевый элемент, щель 0.5. Максимум поглощения у протопорфирина приходится на 411, 557 и 602 нм, а у биливердина – 377 и 680 нм [5].

Также для более точного сравнения распределения оптической плотности пигментов у различных видов были сняты спектры наиболее характерных пиков максимумов поглощения (557 нм – протопорфирин, 680 нм – биливердин). Для пика 557 нм – интервал – 530-590 нм, шаг – 10 нм, сурьмяно-цезиевый элемент, щель 1.0; для пика 680 нм – интервал – 650-710 нм, шаг – 10 нм, кислородно-цезиевый элемент, щель 0.5.

По полученным данным строили графики распределения оптической плотности ( $A \text{ см}^2$ ) в зависимости от длины волны ( $\lambda$ ), предварительно произведя расчет на 1  $\text{см}^2$  скорлупы:  $A \text{ см}^2 = AV/S$ , где  $A$  – оптическая плотность образца,  $V$  – количество мл экстрагирующей смеси для данного образца и  $S$  – площадь поверхности исследуемой скорлупы яйца.

Так как оптическая плотность пигментов прямо пропорциональна их концентрации в растворе, то полученные данные дают возможность относительного количественного сравнения содержания пигментов в скорлупе яиц у различных видов. Чем выше пик в точках максимумов поглощения на графике, тем больше концентрация пигмента в образце.

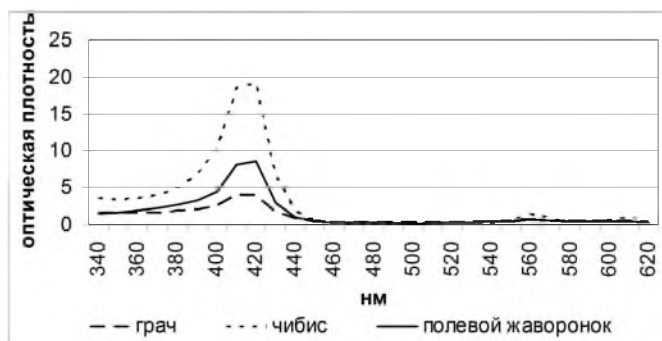
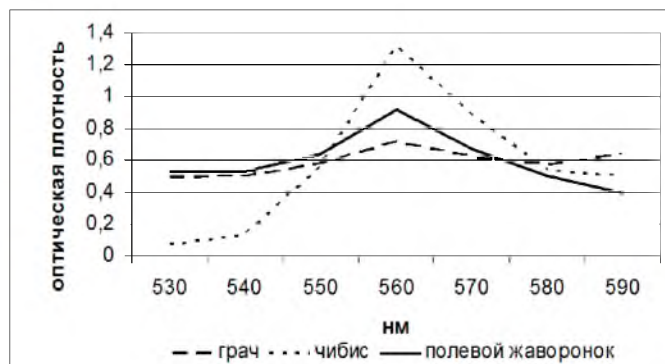


Рис. 1. Распределение оптической плотности вытяжек пигментов в растворе на примере скорлупы яиц некоторых видов

Например, на графике распределения оптической плотности вытяжек пигментов из скорлупы яиц грача (*Corvus frugilegus* L.), полевого жаворонка (*Alauda arvensis* L.) и чибиса (*Vanellus vanellus* L.) в области 411 нм наблюдается увеличение оптической плотности у всех видов. Особенно оно велико у чибиса, относительно слабое у грача, а у полевого жаворонка занимает промежуточное значение. Данный пик (411 нм) характерен для пигмента протопорфирина и свидетельствует о его наличии у всех видов, но не в равном количестве (рисунок). Небольшие пики видны также в области 557 нм, свойственные тому же протопорфиру.



Лучше они просматриваются при снятии дополнительного спектра поглощения раствора при данной длине волны (рис.2), о чем было сказано выше.

Рис. 2. Распределение оптической плотности вытяжек пигментов в области 557 нм



Для расчета абсолютных значений концентрации протопорфирина в исследуемом материале вычислен коэффициент по градуировочному графику по стандартной методике [7]. Для построения градуировочного графика были сняты спектры поглощения чистого протопорфирина (*Protoporphyrin IX disodium salt, BioChemika, for fluorescence, ≥ 90% (HPLC) 82512 Fluka 50865-01-5 C<sub>34</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 606,62 2-80C*). Для этого приготовили ряд эталонных растворов данного вещества с известными концентрациями (5, 10, 20, 30, 40, 50 мкг) из 1 мг сухого протопорфирина растворенного в 1 мл экстрагирующей смеси. Оптическую плотность всех растворов измеряли в точках максимумов поглощения: 557, 411, 602 нм.

С помощью коэффициента, отражающего зависимость между концентрацией эталонного протопорфирина и его оптической плотностью, определены абсолютные значения концентрации протопорфирина для каждого образца при пиках поглощения 411 и 557 нм (табл.). Видно, что вычисленные средние значения концентрации по указанным пикам практически совпадают, так что не имеет смысла проводить дублирующие измерения, а можно ограничиться проведением анализа по одному из указанных выше пиков поглощения. Единицей измерения концентрации протопорфирина является мкг (микрограмм) на 1 см<sup>2</sup> скорлупы.

Таблица

**Количественное содержание протопорфирина в скорлупе яиц некоторых видов птиц (мкг/см<sup>2</sup>)**

Вид	Размер выборки	Среднее значение при λ=411 нм	Ошибка среднего	Среднее значение при λ=557 нм	Ошибка среднего
Грач	10	58.13	0.126	58.13	0.263
Чибис	8	218.9	0.942	218.9	1.515
Полевой жаворонок	12	117.4	0.438	117.9	0.222

Предложенная методика исследования пигментов яиц открывает достаточно широкие возможности для исследования различных сторон биологии птиц. Протопорфирин, например, выполняет ведущую роль в создании покровительственной окраски яиц. Поэтому между его концентрацией в скорлупе и маскирующей функцией окраски должна наблюдаться положительная связь. Это хорошо иллюстрируют данные, приведенные в таблице. Чибис строит совершенно открытые гнезда на земле, в случае опасности его заранее покидает, покровительственная окраска яиц для него очень важна; концентрация протопорфирина наибольшая. У полевого жаворонка гнезда также располагаются на земле, но они обычно скрыты в траве, самка насиживает очень плотно, необходимость в покровительственной окраске несколько ослабевает; концентрация протопорфирина снижается. Грачи гнездятся на деревьях, кладки во многом недоступны для наземных хищников, защищены большой колонией птиц; концентрация протопорфирина заметно меньше. Аналогичные сравнения в пределах семейства, рода или вида могут способствовать вскрытию механизмов гнездовых адаптаций птиц, важных для решения проблем экологии и эволюции.

Следует также отметить, что в последнее время исследователи стали отмечать взаимосвязь между интенсивностью окраски (фоновой и рисунка) и физиологическим состоянием самок [8, 9]. Кроме того, на интенсивность пигментации могут влиять негативные факторы внешней среды, связанные с химическим загрязнением. Точные оценки уровня пигментов для исследования данных феноменов совершенно необходимы.

### Список литературы

1. Костин Ю.В. О методике ооморфологических исследований и унификации описаний оологических материалов // Методики исследования продуктивности и структуры видов птиц в пределах их ареалов. – Вильнюс, 1977. – С. 14-22.
2. Климов С.М. Эколого-эволюционные аспекты изменчивости ооморфологических показателей птиц. – Липецк.: изд-во Липецкого пед. университета, 2003. – 208 с.
3. Tammes P.M.L. Bird's egg shells, colour prints of nature // *Ardea*. – 1964. – Vol. 52, № 1-2. – P. 99-110.



4. Титов С.В., Муравьев И.В., Логунова И.Ю. К вопросу изучения пигментации скорлупы яиц птиц // Зоол. журн. – 1997. – Т.76, вып. 10. – С. 1185-1192.
5. Калинин Ф.Л., Лобов В.П., Жидков В.А. Справочник по биохимии. – Киев: Изд-во «Наукова думка», 1971. – 739 с.
6. Большова Т.А, Брыкина Г.Д., Гармаш А.В. и др. Основы аналитической химии. – М.: «Высш. шк.», 2004. – 504 с.
7. Алимарина И.П., Иванова В.М. (ред.). Практическое руководство по физико-химическим методам анализа. – М.: Изд-во Московск. ун-та, 1987. – 208 с.
8. Experimental evidence that egg color indicates female condition at laying in a songbird / Moreno J., Lobato E., Morales J., Merino S., Tomas G., Martinez-de la P.J., Sanz J.J., Mateo R., Soler J.J. // Behav. Ecol. – 2006. – Vol. 17, № 4. – P. 651-655.
9. Are eggshell spottiness and colour indicators of health and condition in blue tits *Cyanistes caeruleus*? / Martinez-de la P.J., Merino S., Moreno J., Tomas G., Morales J., Lobato E., Garcia-Fraile S., Martinez J. // J. Avian Biol. – 2007. – Vol. 38, № 3. – P. 377-384.

### QUANTIFICATION OF THE THE BIRD EGGSHELL PIGMENTATION: DETERMINATION OF THE PROTOPORPHYRIN CONCENTRATION

**S.A. Rodionova,  
P.D. Vengerov**

*Voronezh State Nature  
Biosphere Reserve  
Voronezh reserve, Voronezh,  
394080, Russia*

*E-mail:  
pvengerov@yandex.ru*

The technique of studying of the bird eggs pigmentation using spectroscopic analysis is expounded. Hydrochloride extracts of pigments - dehydrobilirubin and protoporphyrin which determine the diversity of eggs coloring were received from the crushed eggshell. Then the optical density of solutions was determined with the help of spectrophotometer SF-46 at different monochromatic light. This density in the peak of absorption of protoporphyrin (411, 557 and 602 nm) and dehydrobilirubin (377 and 680 nm) is directly proportional to the concentration of these pigments in the solution. In order to obtain the absolute values of the protoporphyrin concentration, calibration graphs were built to the reference patterns in the characteristic peaks of absorption. We have found the coefficients to calculate the relationship between optical density and concentration of the substance in the test samples. Protoporphyrin concentration is measured in micrograms per 1 square centimeter of the eggshell. These data have undergone statistical treatment. Quantification of the level of eggshell pigmentation can be promising for studying various aspects of ecology and birds evolution.

Keywords: coloring of the bird eggs, pigmentation of the eggshell, spectroscopic analysis, dehydrobilirubin and protoporphyrin.