

UDC 636.2/3:577.121/126:576.311.344

Galochkina V. P., Agafonova A. V., Ostrenko K. S., Koloskova E. M.

Mitochondrial and peroxisomal processes – a single metabolic system in the body of ruminants. Influence of rumen fermentation processes on productive parameters of highly productive ruminants

Summary. High-concentration feeding of ruminants leads to acidification of the rumen content and tissue fluids. The decrease of rumen content pH by 8.5%, ratio propionate/acetate – by 27.7% ($P < 0.05$) and the increase of propionate content by 34.3% ($P < 0.05$) have caused a decrease in the fat content of milk. The retention of rumen content pH higher than 8% is very important for ruminants because the alkaline environment is an essential condition for optimal work of the glyoxylate cycle that occurs in the peroxisomes. This cycle supports the synthesis of glucose from acetate.

Keywords: rumen content acidification, fat content of milk decrease, enzymes of the Krebs cycle and the glyoxylate cycle.

DOI 10.33952/2542-0720-2020- 5-9-10-128

УДК 633.81: 543.8

Данилова Ирина Львовна, Тимашева Лидия Алексеевна, Пехова Ольга Антоновна

Определение содержания индивидуальных фенольных соединений в эфирных маслах растений семейства Lamiaceae

ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма»
e-mail: isocrimea@gmail.com

Характерной особенностью представителей растительного мира является способность их к синтезу и накоплению огромного количества соединений фенольной природы. Природные фенолы проявляют высокую биологическую активность.

Современные исследования природных фенолов эфиромасличных растений нашли широкое применение в фармации, парфюмерии и ветеринарии. Большой интерес представляют растения семейства Яснотковых: *Thymus vulgaris* L., *Monarda fistulosa* L., *Origanum vulgare* L., *Satureja hortensis* L., *Satureja montana* L. в состав которых входят фенольные соединения (тимол, карвакрол и др.). Эти вещества определяют широкий спектр фармакологического действия эфирных масел, оказывающих противовоспалительный, антибактериальный, фунгицидный, потогонный, спазмолитический и мочегонный эффекты.

В настоящее время большое внимание уделяется оценке качества лекарственных растений и эфирных масел из них по уровню содержания простых фенольных соединений – тимола и карвакрола, т.к. эти индивидуальные вещества определяют эффективность их применения.

Существующие методы количественного определения фенольных соединений можно разделить на химические, спектрофотометрические, электрохимические и хроматографические.

В соответствии с химическим методом содержание фенолов определяют в объемных процентах по убыли объема эфирного масла, взятого для исследования, после удаления из него фенолов (в форме растворимых в воде фенолятов при встряхивании эфирного масла с 5 % раствором натрия гидроксида). Определение проводится в колбе Кассиа и основано на образовании щелочных сложных эфиров фенола, растворимых в воде. Содержание фенола рассчитывают с помощью измерения объема неабсорбированного эфирного масла, полученного при взаимодействии фенольных соединений, содержащихся в известном объеме эфирного масла, с раствором гидроксида калия [1]. Для получения информации о содержании фенольных соединений в лекарственных растениях (эфирное масло, экстракт)

используют методы: спектрофотометрические, электрохимические (циклическая вольтамперометрия, катодная инверсионная вольтамперометрия, дифференциальная импульсная вольтамперометрия на стеклоуглеродном электроде), колориметрические, хроматографические методы (тонкослойная, бумажная, ВЭЖХ, газожидкостная хромато-масс-спектрометрия, капиллярный электрофорез).

Однако, с учетом необходимости анализа эфирных масел лекарственных растений на содержание индивидуальных фенольных соединений, химические, спектрофотометрические и электрохимические методы не пригодны к использованию. Они позволяют определять только суммарное содержание фенольных соединений и флавоноидов. Хроматографические методы наиболее полно отвечают поставленной задаче – определению индивидуальных фенольных соединений. Поэтому перспективным направлением является разработка оригинальных методик определения индивидуальных фенольных соединений.

Целью наших исследований являлась разработка методики количественного определения содержания индивидуальных фенольных соединений (тимол, карвакрол) газохроматографическим методом с внутренним стандартом [2].

Разработку ГЖХ методики проводили в отделе переработки и стандартизации эфиромасличного сырья на образцах эфирных масел *T. vulgaris*, *M. fistulosa*, *O. vulgare*, *S. hortensis*, *S. montana*, полученных методом паровой дистилляции из сырья выращенного на плантациях экспериментальной базы ФГБУН «НИИСХ Крыма» в 2018 и 2019 гг.

Суть метода заключается в хроматографическом разделении компонентов эфирного масла и количественном определении индивидуальных фенолов: тимола и карвакрола с применением внутреннего стандарта. В наших исследованиях внутренним стандартом для определения массовой доли карвакрола и тимола был экспериментально подобран кислородсодержащий моноциклический терпеновый спирт ментол с чистотой 98,0 %, определенной газохроматографически в условиях анализа.

Условия проведения измерения массовой доли индивидуальных фенольных соединений в эфирных маслах *T. vulgaris*, *M. fistulosa*, *O. vulgare*, *S. hortensis*, *S. montana* следующие: хроматограф Кристалл 2000М с пламенно-ионизационным детектором, капиллярная колонка длиной 60000 см, внутренний диаметр $3,2 \cdot 10^{-2}$ см, неподвижная фаза: CR-WAXms (полиэтиленгликоль в соль-гель матрице). Газ-носитель – азот. Повторность определения массовой доли эфирного масла – 3-х кратная. Метрологическую обработку результатов проводили согласно рекомендациям [3].

Порядок определения тимола (карвакрола): из анализируемого образца отбирали навеску эфирного масла массой от 0,0500 до 0,1000 г и помещали в стеклянную колбу вместимостью 50 см³ с притертой пробкой, затем добавляли от 0,0100 до 0,0500 г (точная навеска) внутреннего стандарта по массе или объему в виде раствора, содержащего такую же массу стандарта. Массовую долю карвакрола или тимола в эфирных маслах $C_{k,m}$ %, рассчитывали по формуле (1):

$$C_{k,m} = \frac{S_{k,m} \times m_{\text{вн.ст.}} \times \chi_{\text{вн.ст.}}}{S_{\text{вн.ст.}} \times m_{\text{образца}}} \times 100 \quad (1)$$

где $S_{k,m}$ – площадь пика карвакрола или тимола, мм²;

$m_{\text{вн. ст.}}$ – масса навески внутреннего стандарта, г;

$\chi_{\text{вн. ст.}}$ – чистота внутреннего стандарта (не менее 98), %;

$S_{\text{вн.ст.}}$ – площадь пика внутреннего стандарта, мм²;

$m_{\text{образца}}$ – масса навески эфирного масла, г;

100 – коэффициент пересчета в проценты.

Вычисления проводили с точностью до третьего десятичного знака, с последующим округлением результата до второго десятичного знака.

Экспериментально, на основании статистических данных, были определены метрологические характеристики методики измерения массовой доли индивидуальных фенольных соединений: расхождение между среднеарифметическими двух определений (сходимость) не должно превышать 0,3 %. Относительная ошибка измерения при $P=95$ не должна превышать 2,0 %.

Типичные хроматограммы эфирного масла тимьяна обыкновенного и хроматограммы с внутренним стандартом представлены на рисунках 1,2.

Таким образом, разработанная ГЖХ методика позволяет количественно определять содержание индивидуальных фенольных соединений (тимол, карвакрол) в эфирных маслах.

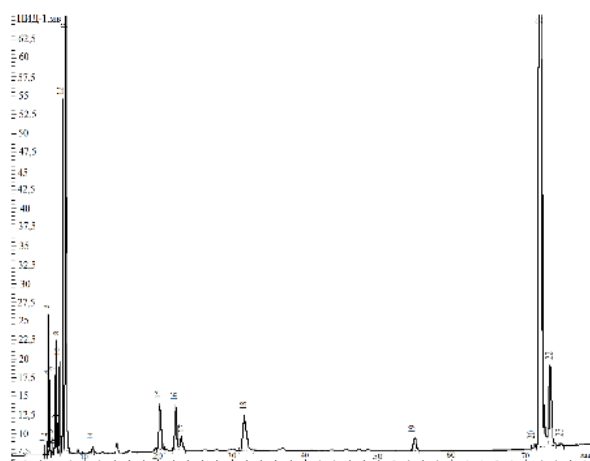


Рисунок 1 – Типичная хроматограмма эфирного масла тимьяна

Примечание. 2 – α -пинен; 4 – камфен; 5 – β -пинен; 7 – β -мирцен; 8 – α -терпинен; 10 – 1,8-цинеол; 11 – 3-октанон; 12 – γ -терпинен; 13 – пара-цимол; 14 – линалоол; 15 – кариофиллен; 16 – борнеол; 17 – геранилацетат; 18 – цис-гераниол; 19 – кариофилленоксид; 21 – тимол; 22 – карвакрол.

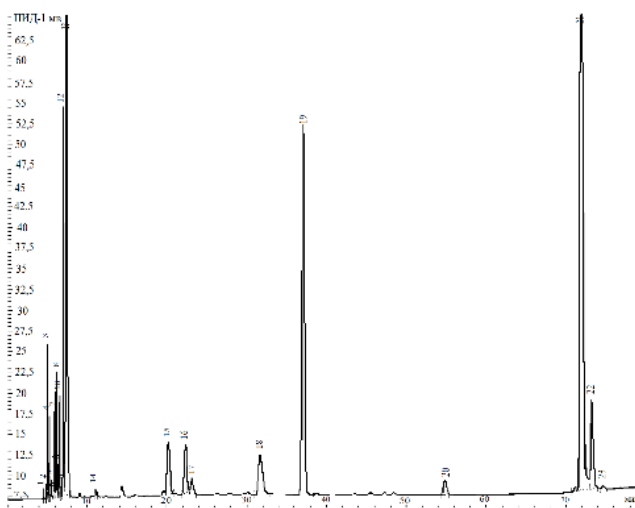


Рисунок 2 – Типичная хроматограмма эфирного масла тимьяна с внутренним стандартом

Примечание. 2 – α -пинен; 4 – камфен; 5 – β -пинен; 7 – β -мирцен; 8 – α -терпинен; 10 – 1,8-цинеол; 11 – 3-октанон; 12 – γ -терпинен; 13 – пара-цимол; 14 – линалоол; 15 – кариофиллен; 16 – борнеол; 17 – геранилацетат; 18 – цис-гераниол; 19 – внутренний стандарт; 20 – кариофилленоксид; 21 – тимол; 22 – карвакрол.

Установлены метрологические характеристики разработанной методики: за окончательный результат принимают среднеарифметическое двух определений, расхождение между которыми (сходимость) не должно превышать 0,3 %. Относительная ошибка измерения при P = 95 не должна превышать 2,0 %.

Литература

1. ГОСТ ISO 7609–2014 Масла эфирные. Анализ методом газовой хроматографии на капиллярных колонках. Общий метод. М.: Стандартинформ, 2015. 16 с.
2. ГОСТ ISO 1272-2016 Масла эфирные. Метод определения содержания фенолов М.: Стандартинформ, 2016. 8 с.
3. ОФС.1.1.0013.15 Статистическая обработка результатов эксперимента. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://pharmacopeia.ru/ofs-1-1-0013-15-statisticheskaya-obrabotka-rezultatov-eksperimenta/> (дата обращения 24.04.2020).

UDC 633.81: 543.8

Danilova I. L., Timasheva L. A., Pekhova O. A.

Determination of the content of individual phenolic compounds in essential oils of plants of the Lamiaceae family

Summary. Based on the conducted research, a method with an internal standard for the quantitative determination of the content of individual phenolic compounds – carvacrol and thymol in essential oils of *Thymus vulgaris* L., *Monarda fistulosa* L., *Origanum vulgare* L., *Satureja hortensis* L., *Satureja montana* L. was developed. The internal standard – oxygen-containing monocyclic terpene alcohol menthol with a purity of 98.0% – was experimentally determined. Metrological characteristics of the developed method: the convergence of the arithmetic mean of two definitions is not more than 0.3 %; the relative measurement error at P= 95 is not more than 2.0 %.

Keywords: essential oil, gas chromatographic technique, internal standard, thymol, carvacrol.

DOI 10.33952/2542-0720-2020- 5-9-10-129

УДК 575.224.46; 575.2.084

Езерский Вадим Аркадьевич, Колоскова Елена Михайловна, Трубицина Татьяна Петровна

Использование гена зеленого флуоресцентного белка для сайт-специфической интеграции в локус гена кислого сывороточного протеина кролика

Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»
e-mail: ez.vadim@yandex.ru

Генно-модифицированные (ГМ) организмы, в том числе животные становятся неотъемлемыми компонентами не только научных и биомедицинских исследований, но и агропромышленного комплекса во всем мире и в России. Применение в генной инженерии эндонуклеазных технологий ZFN, TALEN и особенно CRISPR/Cas9 – эффективный метод изменения состава молока сельскохозяйственных (с./х.) животных замещением генов эндогенных молочных белков с целью улучшения потребительских качеств молока, для использования молочной железы животного как биореактора для продукции рекомбинантных белков [1]. Трансгенные с/х. животные, в том числе кролики, перспективны в качестве биореакторов для продукции рекомбинантных белков фармакологического назначения с молоком или кровью. Кролик, как одно из самых маленьких с/х. животных, не только хорошая модель для испытания и отработки новых геномных технологий, но и легко возобновляемый продуктивный источник таких белков в экспериментальном и промышленном масштабе [2]. Уровень кислого сывороточного протеина (WAP) в молоке кролика достигает 15 г/л [3], что делает ген WAP перспективным кандидатом для замены геном целевого белка для технологии CRISPR/Cas9. К настоящему времени нами не