

УДК 665.383, 664.3

EXPERIMENTAL EVALUATION OF THE POSSIBLE TOXICITY OF ETHYL STEARATE UNDER CONDITIONS OF ITS USE AS A FOOD PRODUCT

K. Havriushenko, F. Gladkiy

National Technical University "Kharkiv Polytechnic Institute"

T. Gorbach

Kharkiv National Medical University

Key words:

Ethyl esters of fatty acids

Stearic acid

Ethanol

Rats

Low-density lipoproteins

TBA-active products

Article history:

Received 05.11.2020

Received in revised form
18.11.2020

Accepted 03.12.2020

Corresponding author:

K. Havriushenko

E-mail:

katealefarova@gmail.com

ABSTRACT

The article shows the fundamental possibility of using in the manufacture of food fatty acids, "carrier" of which is a monohydric alcohol — ethanol. Stearic acid in the form of ethyl esters has a number of unique physicochemical properties (high hardness, low melting point, etc.), which is extremely valuable in the field of food technologies, and from a physiological point of view, according to the World Health Organization, it has advantages among other saturated acids (lauric, palmitic, myristic) in terms of the level of formation of low-density lipoproteins in human blood plasma.

The aim of the study was to experimentally evaluate the effect of ethyl stearate on lipid metabolism and the level of intoxication in the body when used as a food product. The study was performed on the basis of Kharkiv National Medical University. 3-month-old male WAG rats were used in the experiment. They were divided into two groups (experimental and control), each group included 10 animals. To test the effect of ethyl stearate on lipid metabolism and the level of intoxication in the organism, the experimental group of animals was fed for a month providing a diet in which 30% of the daily requirement of lipids was replaced by the test product, and the control group was fed providing a standard diet. At the end of the experiment, the animals were decapitated and biological material (blood and liver) was selected to determine the fractional composition of lipids in liver homogenates, serum lipid spectrum, integrated intoxication index and lipid peroxidation — antioxidant system (POL-AO). The main results of the experiment indicated the absence of toxic load and disorders of lipid metabolism in case when fatty acids, "carrier" of which was ethanol, were used as a food product.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ОЦІНКА МОЖЛИВОЇ ТОКСИЧНОСТІ ЕТИЛСТЕАРАТУ ЗА УМОВ ВИКОРИСТАННЯ ЙОГО ЯК ХАРЧОВОГО ПРОДУКТУ

К. О. Гаврюшенко, Ф. Ф. Гладкий

Національний технічний університет

«Харківський політехнічний інститут»

Т. В. Горбач

Харківський національний медичний університет

У статті показана принципова можливість використання при виготовленні продуктів харчування жирних кислот, «носієм» яких є одноатомний спирт етанол. Стеаринова кислота у формі етилових ефірів має ряд унікальних фізико-хімічних властивостей (висока твердість, низька температура плавлення тощо), що є надзвичайно цінним у галузі харчових технологій, а з фізіологічної точки зору, за даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, вона має переваги перед іншими насиченими кислотами (лауриноюю, пальмітиноюю, міристиноюю), зважаючи на рівень утворення ліпопротеїнів низької щільності в плазмі крові людини.

Проведено експериментальну оцінку впливу етилстеарату на ліпідний обмін і рівень інтоксикації в організмі за умов використання його як харчового продукту. Дослідження виконано на базі Харківського національного медичного університету. В експерименті використовували 3-місячних щурів-самців популяції WAG, що були розділені на дві групи (експериментальна та контрольна), чисельністю по 10 особин у кожній. Для перевірки впливу етилстеарату на ліпідний обмін і рівень інтоксикації в організмі експериментальна група тварин харчувалась протягом місяця за раціоном, у якому 30% від добової потреби в ліпідах було замінено на досліджуваний продукт, а контрольна — за стандартним раціоном. Після закінчення експерименту тварин було декапітовано та виділено біологічний матеріал (кров та печінка) для визначення фракційного складу ліпідів у гомогенатах печінки, ліпідного спектра сироватки крові, інтегрального індексу інтоксикації та показників пероксидного окиснення ліпідів-антиоксидантної системи (ПОЛ-АОС). Основні результати експерименту свідчать про відсутність токсичного навантаження та порушень у ліпідному обміні при застосуванні як харчового продукту жирних кислот, «носієм» яких є етанол.

Ключові слова: етилові ефіри жирних кислот, стеаринова кислота, етанол, щури, ліпопротеїни низької щільності, ТБК-активні продукти.

Постановка проблеми. Вперше запропоновано використовувати як альтернативу природних і модифікованих жирів етилові ефіри жирних кислот. Часткова або повна заміна триацилгліцеринів на етилові ефіри дасть змогу спростити багато технологічних завдань харчової промисловості, зокрема уникнути жирового посивіння кондитерських виробів, виготовлених на основі масла какао, створити нові види корисних і безпечних харчових продуктів, а також вирішити проблему

одержання твердих модифікованих жирів без утворення трансізомерів жирних кислот і без використання тропічних олій [1; 2].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Природні та модифіковані жири являють собою жирні кислоти (ЖК), з'єднані складноефірним зв'язком з гліце-риноном — триацилгліцерини (ТАГ). Вони є джерелом енергії та води в організмі людини. [3]

З огляду на будову цих молекул, своєрідним «носієм» цінних для людини жирних кислот є триатомний спирт гліцерин. Широкого розповсюдження як медичний препарат набули поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК), які етерифіковані етиловим спиртом. У формі етилових ефірів такі кислоти значно простіше концентрувати та виділяти найбільш необхідні для фізіологічних потреб людини, наприклад ейкозапентаєнову, докозапентаєнову та докозагексаєнову з риб'ячого жиру [4]. Аналіз наукової літератури показує, що вживання етилових ефірів ПНЖК, порівняно з гліцериновими ефірами жирних кислот, є ідентичним за параметрами біодоступності, безпечності та засвоюваності [5]. Проте механізм гідролізу триацилгліцеринів та етилових ефірів в організмі дещо відрізняється. За даними досліджень [6] метилові й етилові ефіри жирних кислот рапсової та менхаденової олій гідролізуються в організмі щурів приблизно в 4 рази повільніше, ніж відповідні гліцеринові ефіри. Як пояснюється в [7], імовірно, це пов'язано з відмінністю дії панкреатичної ліпази на етилові на гліцеринові ефіри жирних кислот. Під дією ліпази триацилгліцерин у тонкому кишківнику відразу піддається гідролізу з утворення 2-моноацилгліцерину (2-МАГ) та жирних кислот, натомість етилові ефіри гідролізуються до жирних кислот після поглинання ендотеліальними клітинами кишкової оболонки. При цьому зазначено, що жирні кислоти з гліцеринових та етилових ефірів повністю абсорбуються.

Іншою причиною повільнішого гідролізу етилових ефірів жирних кислот є те, що складноефірний зв'язок розщеплюються ліпазами на основі складних карбоксильних ефірів, які, мабуть, менш активні, ніж ліпази [8]. Процеси після абсорбційної переетерифікації жирних кислот, отриманих з етилових і гліцеринових ефірів, теж відрізняються. Передумовою для подальшого транспорту абсорбованих жирних кислот у крові є їхня повторна етерифікація з утворенням триацилгліцеринів, для чого необхідні молекули гліцерину і 2-МАГ. У разі гідролізу ТАГ необхідний гліцерин, а також 2-МАГ вже поставляються як субстрат. Однак гліцерин відсутній при гідролізі етилових ефірів жирних кислот. Імовірно, процес забезпечення відсутнього гліцерину неефективний, що також затримує доставку ЖК з еритроцитів [8].

Сучасні дослідження вказують на те, що прискорити біодоступність (абсорбцію) етилових ефірів ПНЖК можна за рахунок вживання їх разом з емульсійними системами, що сприяють природному вивільненню жирів і солей жовчних кислот. У водному середовищі така система утворює міцели, які забезпечують постійне всмоктування ПНЖК навіть в умовах раціону з низьким вмістом жиру, а також забезпечує швидке емульгування й утворення мікрокрапель при потрапленні у водне середовище кишківника, таким чином збільшуючи абсорбцію ПНЖК [9].

Більшість наукових праць спрямована на дослідження метаболізму незамінних ПНЖК з етилових ефірів порівняно з природною формою (триацилгліцерину). Це пояснюється тим, що вживання ПНЖК дуже важливе для багатьох фізіологічних процесів в організмі, а їхня нестача призводить до ризиків розвитку серцево-судинних та онкологічних хвороб [10].

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) енергетичний баланс має вирішальне значення для підтримки здорової маси тіла та забезпечення оптимального споживання поживних речовин [11].

Рекомендації щодо вмісту жиру та різних груп жирних кислот від загальної калорійності раціону, виражене у відсотках енергії (%E), наведено в табл. 1 [11].

Таблиця 1. Вміст жирів і жирних кислот від загальної калорійності раціону

Показник	Вміст, %E
Усього жирів, з них жирних кислот:	20—35
насичених	10
мононенасичених	15—20
поліненасичених ряду ω -6	2,5—9
поліненасичених ряду ω -3	0,5—2
трансізомерів	менше 1

За даними табл. 1, десять відсотків енергії від загальної калорійності раціону людини повинна забезпечуватись за рахунок насичених жирних кислот, які мають різний вплив на концентрацію фракцій ліпопротеїнів у плазмі крові. Наприклад, лауринова (C12:0), міристинова (C14:0) і пальмітинова (C16:0) кислоти збільшують ліпопротеїни низької щільності (ЛПНЩ), тоді як стеаринова (C18:0) не має такого ефекту [11].

З огляду на вищезазначену інформацію дослідження впливу на організм етилових ефірів насичених жирних кислот, зокрема стеаринової, є надзвичайно актуальним, оскільки раніше розроблена технологія альтернативних модифікованих жирів — етилових ефірів жирних кислот [2], може не тільки повністю задовольнити потреби харчової промисловості в жирах спеціального призначення [2], а дасть змогу вибірково контролювати надходження до раціону тих груп жирних кислот у потрібній кількості, що не мають негативного впливу на організм людини.

Метою статті є експериментальні дослідження впливу етилових ефірів стеаринової кислоти на ліпідний обмін і рівень інтоксикації в живому організмі.

Матеріали і методи. Дослідження виконано на базі Харківського національного медичного університету. В експерименті використовували 3-місячних щурів-самців популяції WAG масою 130—150 г. Щурів утримували в стандартних умовах віварію. Вони мали збалансоване харчування та вільний доступ до води.

Для оцінки впливу етилових ефірів стеаринової кислоти на ліпідний обмін тварини щодня отримували частину добової норми ліпідів (30%, тобто 0,5 г на тварину) у вигляді досліджуваного продукту, протягом одного місяця. За період досліджень у щурів не виявлено порушень уринації, дефекації та поведінкових реакцій.

Тварини були розділені на дві групи: 1) контрольна група — 10 самців, які перебували на стандартному раціоні віварію, 2) досліджувана — 10 самців, які щодня протягом місяця в харчовому раціоні отримували 30% від добової потреби в ліпідах у вигляді експериментального ліпиду.

Через місяць після початку досліджень шурів було виведено з експерименту шляхом декапітації, натще (після 15 год голоду). Усі маніпуляції з тваринами проведено згідно з Європейською конвенцією захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей [12].

Після декапітації збирали кров, виділяли печінку. Із зібраної крові за допомогою стандартних процедур отримували сироватку. Печінку відмивали від крові охолодженим фізіологічним розчином (на льоду) та готували гомогенати.

Приготування гомогенату печінки проводили таким чином: виділену печінку відмивали від крові в порцеляновій ступці (на льоду) охолодженим фізіологічним розчином, подрібнювали ножицями в ступках. На торсійних вагах зважували подрібнену тканину (0,5 г навіски), поміщали її в скляний гомогенізатор Поттера з тефлоновим товчачиком. Гомогенізували з 5 мл середовища виділення на холоді в гомогенізаторі 30 с (швидкість обертання 1000 обертів за хвилину, зазор скло-тефлон 0,2 мм). Середовище виділення містило 0,32 М сахарозу в 0,025 трис-НСІ буфері, що містить 0,2 мМ трилон Б (рН 7,4). Отриману суспензію центрифугували 15 хв при 1500 об/хв, частину над осадом використовували для біохімічних досліджень.

У сироватці крові визначались такі біохімічні показники:

- ТБК — активні продукти (ТБК-акт.) за спектрофотометричним методом [13], вимірювання оптичної щільності проб проводились на спектрофотометрі Sclar-PV (Білорусь);

- дієнові кон'югати (ДК) за спектрофотометричним методом [14], вимірювання оптичної щільності проводилося на спектрофотометрі Sclar-PV;

- загальна антиоксидантна активність (ЗАО) за спектрофотометричним методом [15];

- молекули середньої маси за (МСМ) за спектрофотометричним методом [16];

- ліпопротеїни високої щільності (ЛПВЩ), ліпопротеїни низької щільності (ЛПНЩ), загальний холестерол, загальні триацилгліцерини визначали за допомогою стандартних наборів реагентів фірми «Філісіт-Діагностика» (Дніпро, Україна), згідно з інструкціями, що додаються;

- ліпопротеїни дуже низької щільності (ЛПДНЩ) визначали розрахунковим методом (за Клімовим) [17].

У гомогенатах печінки екстракцію ліпідів мембран проводили за методом Bligh and Dyer [18]. Ліпіди фракціонували методом тонкошарової хроматографії на пластинках Silufol у суміші гексан:діетиловий ефір:метанол:оцтова кислота (45:10:1:1,5) [19]. Фосфоліпіди поділяли на фракції в суміші хлороформ:метанол:вода (65:25:4). Кількісне визначення фракцій проводили спектрофотометричними методами вимірювання оптичної щільності проб на спектрофотометрі Sclar-PV.

Для аналізу даних, отриманих у ході досліджень, різниця між двома групами незалежних спостережень за порядковим або кількісним показником, що має

розподіл відмінний від нормального, оцінювали за U-критерієм Манна-Уїтні. При проведенні розрахунків використовували програми «Microsoft Excel 2007» та «SPSS for Windows 11.0».

Результати і обговорення. Результати ліпідного спектра сироватки крові щурів, фракційного складу ліпідів в гомогенатах печінки, інтегрального індекс інтоксикації та показників перикисного окиснення ліпідів-антиоксидантної системи (ПОЛ-АОС) наведені в табл. 2, 3 та 4 відповідно.

Таблиця 2. Ліпідний спектр сироватки крові щурів (Ме [25-й перцентиль, 75-й перцентиль])

Фракції ліпідів	Контрольна група, <i>n</i> = 10	Експериментальна група <i>n</i> = 10
Холестерин загальний, ммоль/л	3,95 [3,79; 4,05]	4,03 [3,88; 4,06] <i>p</i> = 0,0748
Триацилгліцерини, ммоль/л	0,59 [0,55; 0,62]	0,65 [0,60; 0,69]" <i>p</i> = 0,0486
ЛПНЩ, ммоль/л	1,09 [1,00; 1,14]	1,14 [1,08; 1,17] <i>p</i> = 0,0523
ЛПДНЩ, ммоль/л	0,27 [0,23; 0,28]	0,32 [0,28; 0,34]" <i>p</i> = 0,0449
ЛПВЩ, ммоль/л	2,77 [2,45; 2,68]	2,72 [2,53; 2,78] <i>p</i> = 0,562

Примітка: " — достовірні відмінності між групами.

Таблиця 3. Фракційний склад ліпідів в гомогенатах печінки (Ме [25-й перцентиль, 75-й перцентиль])

Фракції ліпідів	Контрольна група, <i>n</i> = 10	Експериментальна група, <i>n</i> = 10
Холестерин загальний, мг/г	0,25 [0,19; 0,29]	0,22 [0,16; 0,27] <i>p</i> = 0,0586
Фосфоліпіди, мг /г	18,21 [17,11; 19,22]	16,81 [16,42; 17,15]" <i>p</i> = 0,0377
Триацилгліцерини, мг/г	3,84 [3,66; 3,95]	4,18 [4,13; 4,23]' <i>p</i> = 0,0417
НЕЖК, мг /г	6,89 [6,61; 6,94]	7,00 [6,92; 7,08]

Примітка: " — достовірні відмінності між групами.

Таблиця 4. Інтегральний індекс інтоксикації (МСМ) та показники (ТБК-акт., ДК)-антиоксидантної (ЗАО) системи сироватки крові щурів (Ме [25-й перцентиль, 75-й перцентиль])

Показники	Контрольна група	Експериментальна група
ТБК-акт., мкмоль/л	1,88 [1,72; 1,93]	1,82 [1,77; 1,89] <i>p</i> = 0,0509
ДК, мкмоль/л	29,77 [29,08; 30,14]	29,89 [29,66; 29,95] <i>p</i> = 0,0608
ЗАО, %	58,66 [57,83; 58,97]	58,75 [57,99; 59,00] <i>p</i> = 0,0556
МСМ, у. о.	0,086 [0,079; 0,091]	0,079 [0,072; 0,089]

Проведені дослідження показали, що в печінці знижений синтез фосфоліпідів, підвищений — триацилгліцеринів. Це пояснюється тим, що для синтезу фосфоліпідів потрібні ненасичені жирні кислоти, яких, мабуть, недостатньо. Підвищений синтез триацилгліцеринів — результат надлишку насичених жирних кислот. Особливості синтезу ліпідів у печінці пояснюють специфіку ліпідного спектра крові — підвищення ЛПДНЩ (містять найвищий відсоток ТАГ) і незначне зниження ЛПВЩ (містять високий відсоток фосфоліпідів). ЛПДНЩ і ЛПВЩ — це транспортні форми ліпідів з печінки в тканини.

Висновки

Відсутність достовірних змін у вмісті МСМ (інтегральний індекс інтоксикації) і стан системи ПОЛ-АОС (індикатор наявності ендогенних або екзогенних токсинів) свідчать про відсутність токсичного навантаження при застосуванні жирних кислот, «носієм» яких є одноатомні спирти.

Аналіз ліпідного спектра у гомогенатах печінки експериментальних щурів довів, що суттєвих змін у складі транспортних форм ліпідів та їх співвідношенні немає, тобто порушень у ліпідному обміні не існує.

Дані експериментального дослідження свідчать про можливість використання етилстеарату при виготовленні продуктів харчування.

Література

1. Гаврюшенко К. О., Гладкий Ф. Ф. Нова альтернатива маслу-какао — етилові ефіри стеаринової кислоти. Матеріали міжнародних науково-практичних конференцій «Інноваційні технології у хлібопекарському виробництві» та «Здобутки та перспективи розвитку кондитерської галузі». К.: НУХТ, 2019. С. 99—103.
2. Havriushenko K. O., Udovenko O. O., Gladkiy F. F. The technology of modification of fats (acylglycerols) by changing the composition of the alkyl. *Nauka i studia*. 2020. Vol. 209. N. 7. P. 44—58.
3. Давидов В. В., Божков А. І. Основи біохімії: Посібник для Вузів. вид. 2-ге, перероб. та доп. Видавн. Федорко. 2012. 349 с.
4. Rubio-Rodríguez N., Beltrán S., Jaime I., et al. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2010. Vol. 11, N. 1. P. 1—12. DOI: 10.1016/j.ifset.2009.10.006.
5. West A., Burdge G., Calder P. Lipid structure does not modify incorporation of EPA and DHA into blood lipids in healthy adults: a randomised-controlled trial. *British Journal of Nutrition*. 2016. Vol. 116. N. 5. P. 788—797. DOI: 10.1017/S0007114516002713.
6. Yang L. Y., Kuksis A., Mayher J. J. Lumenal hydrolysis of menhaden and rapeseed oils and their fatty acid methyl and ethyl esters in the rat. *Biochemistry and Cell Biology*. 1989. Vol. 67. N. 4—5. P. 192—204. DOI: 10.1139/o89-030.
7. Ackman R. G. The absorption of fish oils and concentrates. *Lipids*. 1992. Vol. 27. P. 858—862. DOI: 10.1007/BF02535864.
8. Schuchardt J. P., Hahn A. Bioavailability of long-chain omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids (PLEFA)*. 2013. Vol. 89. N. 1. P. 1—8. DOI: 10.1016/j.plefa.2013.03.010.
9. Maki K. C., Dicklin M. R. Strategies to improve bioavailability of omega-3 fatty acids from ethyl ester concentrates. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 2019. Vol. 22. P. 116—123. DOI: 10.1097/MCO.0000000000000537.
10. Min D. B., Akoh C. C. Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology. Third edition. CRC Press. 2008. 930 p.

11. Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation. FAO foods and nutrition paper 91, 2008. URL: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/nutrition/docs/requirements/fatsandfattacidsreport.pdf.
12. Ляпунова Н. А. Надлежащая производственная практика лекарственных средств. К.: МОРИОН, 1999. 545 с.
13. Гаврилов Б. В., Мишкорудная М. И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови. *Лабораторное дело*. 1983, № 3. С. 33—36.
14. Меньшиков В. В., Делекторская Л. Н., Золотницкая Р. И. и др. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник. М.: Медицина, 1987. 129 с.
15. Клебанов Г. И., Бабенкова И. В., Теселкин Ю. В. и др. Определение общей антиоксидантной активности сыворотки крови. *Лабораторное дело*. 1988, № 5. С. 59—62.
16. Габрилян Н. И. Определение средних молекул скрининг-методом. *Лабораторное дело*. 1983, № 3. С. 33—36.
17. Климов А. Н., Никульчева А. Н. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения. СПб: Питер Ком, 1999. С. 47—87.
18. Bligh E. G., Dyer W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 1959. Vol. 37. N. 8. P. 911—917. DOI: 10.1139/o59-099.
19. Кейтс М. Техника липидологии: Выделение, анализ и идентификация липидов. М.: Мир, 1975. 322 с.