

УДК [613.292+613.287.5]-026.86

ТОКСИКОЛОГО-ГИГИЕНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КЛАТРАТОВ β-ЦИКЛОДЕКСТРИНА С ПЕПТИДАМИ КОРОВЬЕГО МОЛОКА

Журихина Л. Н.¹, Цыганков В. Г.¹, Курченко В. П.², Головач Т. Н.²,
Бондарук А. М.¹, Свинтилова Т. Н.¹

¹Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены»,
г. Минск, Республика Беларусь;

²Белорусский государственный университет,
г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Получены экспериментальные образцы клатратов β-циклодекстрина с пептидами сыровоточных белков молока, что подтверждено результатами термогравиметрического анализа. По результатам токсиколого-гигиенической оценки на *Tetrahymena pyriformis* клатраты β-циклодекстрина с пептидами сыровоточных белков молока являются малотоксичными.

Ключевые слова: циклодекстрины, пептиды гидролизата сыровоточных белков коровьего молока, клатраты, токсиколого-гигиеническая оценка, *Tetrahymena pyriformis*.

Введение. Впервые циклодекстрины были обнаружены в 1891 г. М. А. Villiers. В дальнейшем большой вклад в исследование циклодекстринов внес F. Schardinger [1].

Циклодекстрины (ЦД) — природные циклические олигосахариды. Все ЦД представляют собой белые кристаллические порошки, практически не имеющие вкуса, плавящиеся с разложением при температурах 260–300 °С [2].

Структурные формулы ЦД представлены на рисунке 1.

Наиболее интересное и практически значимое свойство ЦД — способность образовывать комплексы включения типа «хозяин—гость». «Хозяином» называют молекулы ЦД с внутренней гидрофобной полостью, а «гостем» — молекулу, которая входит в эту полость и задерживается там за счет межмолеку-

лярных сил (рисунок 2). При образовании комплексов включения происходит вытеснение молекул воды из полости ЦД в результате встраивания в полость ЦД соответствующей молекулы вещества «гостя» [4].

При комплексообразовании с ЦД молекулы вещества «гостя» переходят в наноструктурированное («инкапсулированное») состояние, при котором каждая молекула субстрата, размещается в полости нативной или модифицированной молекулы ЦД [1, 2]. Это вызывает значимые изменения физико-химических свойств молекул связываемого ЦД вещества: увеличивается стабильность соединений, чувствительных к воздействию кислорода или света; изменяется реакционная способность и активность молекул субстрата; происходит стабилизация легко лету-

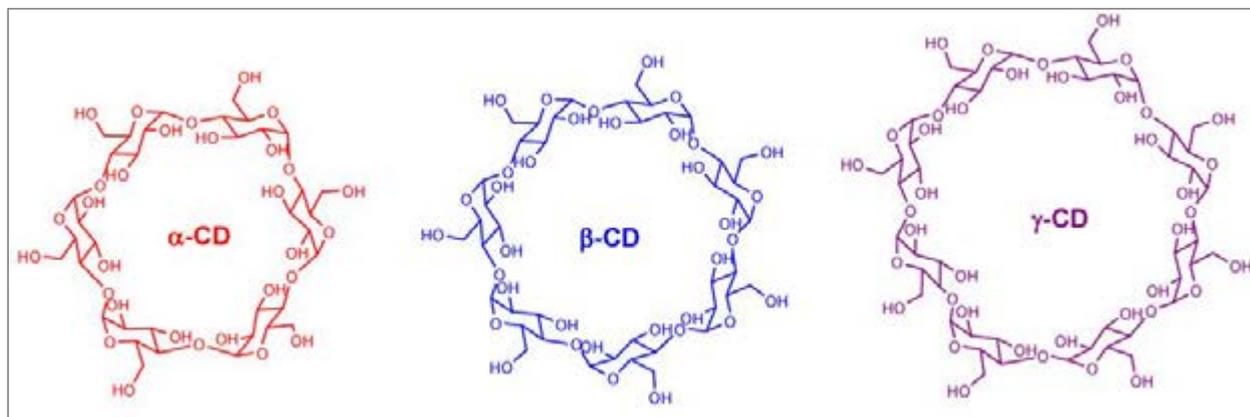


Рисунок 1 — Структурные формулы α-, β-, γ-циклодекстринов [3]

чих соединений; увеличивается растворимость ряда веществ; реализуется возможность перевода жидкостей в порошкообразную форму; повышается устойчивость субстрата к биодеградации микроорганизмами; маскируются неприятные запахи и вкус; изменяется цвет или интенсивность окраски соединений; может наблюдаться каталитическая активность ЦД [1, 2, 5, 6]. Такие свойства ЦД и их производных делает их пригодными к применению в аналитической химии, сельском хозяйстве, фармацевтике, пищевом и косметическом производстве.

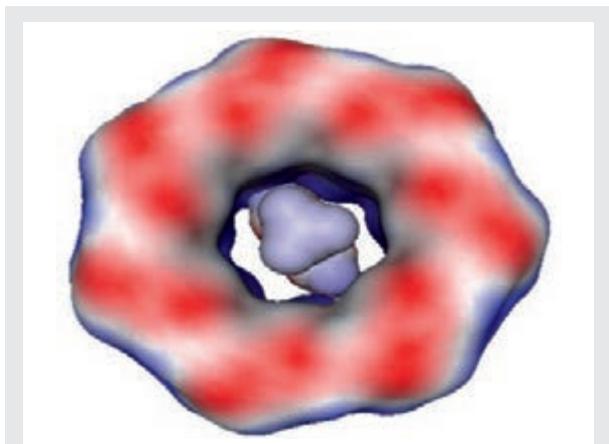


Рисунок 2 — Комплекс включения типа «гость–хозяин» [1]

Широкое применение комплексов ЦД с биологически активными веществами может получить для нутрицевтивной поддержки медицинской помощи. Под нутрицевтивной поддержкой медицинской помощи понимают процесс обеспечения полноценного питания с помощью ряда методов, отличных от обычного приема пищи. Нутрицевтивная поддержка включает в себя: энтеральное питание специальными смесями перорально (напиток, дополнение к диетическому питанию), энтеральное питание через зонд, частичное или полное парентеральное питание, энтеральное + парентеральное питание.

Ферментативные гидролизаты белков молока являются ценным пищевым продуктом для нутрицевтивной поддержки медицинской помощи. Наиболее доступным является белковое сырье, полученное в результате переработки молочной сыворотки — побочного продукта производства сыра и казеина. Гидролизованые белки молока содержат низкомолекулярные пептиды, благодаря которым они обладают иммуномодулирующим, гипотензивным, антиоксидантным, антимикробным действием.

Для дальнейшего продвижения полученных комплексов в медицинскую практику необходимо иметь токсиколого-гигиенические данные о безопасности данных соединений.

Цель работы — проведение токсиколого-гигиенической оценки на *Tetrahymena pyriformis* в остром и подостром экспериментах полученных экспериментальных образцов клатратов β -циклодекстрина с пептидами гидролизата сывороточных белков молока.

Материалы и методы. В работе использовали концентрат сывороточных белков молока (КСБ-УФ-80, ТУ ВУ 100377914.550-2008), фермент Alcalase® 2.4L (КФ 3.4.21.62, алкалаза — протеаза из *Bacillus licheniformis*, активность 2,4 ЕА/г; «Sigma», США), ацетонитрил (HPLC Gradientgrade, Fisher Chemical), ледяную уксусную кислоту (ХЧ, ГОСТ 61-75, АО «Реахим»), β -циклодекстрин («Sigma», США).

Для получения ферментативного гидролизата молочной сыворотки готовили 5%-е растворы молочной сыворотки в фосфатном буфере (рН 7,4); полученные растворы центрифугировали для удаления нерастворимых частиц при 10 000 об/мин в течение 30 мин; надосадочную жидкость использовали для гидролиза. Ферментативное расщепление проводили при соотношении фермент/субстрат 5 %, температуре 50 °С, активной кислотности среды 7,4 ед. рН в течение 2 ч при гидролизе молочной сыворотки. Для фракционирования гидролизатов применяли фильтры Spin-X UF Concentrator 20 (Corning, Англия) с разделяющей способностью 5 кДа. Пробы замораживали при минус 20 °С для последующего анализа. Содержание общего азота в образцах молочной сыворотки, их гидролизатов и ультрафильтратов определяли по СТБ ISO 8968-1-2008, массовую долю сухого вещества по ГОСТ 3626-76. Результаты исследований представляли как среднее арифметическое значение трех независимых экспериментов.

Состав пептидов гидролизата белков сыворотки молока анализировали методом хромато-масс-спектрометрии. Для достижения концентрации белка, равной 100 мкг/мл, образцы смешивали с раствором, содержащим ацетонитрил, воду и муравьиную кислоту в объемном соотношении 47,5:47,5:5,0. Полученные растворы подвергали ультразвуковой обработке продолжительностью 15 мин, далее центрифугировали при 10000 г в течение 15 мин, фильтровали в хроматографические вials с применением полипропиленовых фильтров (диаметр пор 0,45 мкм; Carl Roth, Германия). Для записи масс-спектров исполь-

зовали хромато-масс-спектрометрическую систему Agilent 1290 с масс-спектрометрическим детектором высокого разрешения Q-TOF 6550 в режиме положительной электроспрей ионизации (ESI⁺). ВЭЖХ-анализ проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1290 (Agilent, США) с применением колонки Hypersil Gold (100Ч2,1 мм, 1,9 мкм, Agilent, США). Колонку уравнивали 0,1%-м водным раствором муравьиной кислоты. Разделение образцов осуществляли с использованием линейного градиента ацетонитрила 5–95 % в течение 55 мин при температуре 45 °С; скорость потока подвижной фазы — 200 мкл/мин; объем пробы — 15 мкл; детекцию проводили при 230 и 280 нм. Параметры источника ионизации: температура газа — 290 °С; поток газа — 12 л/мин; температура оболочечного газа — 325 °С; поток оболочечного газа — 9 л/мин. Напряжение на фрагменторе устанавливали равным 150 В; диапазон регистрации спектров составлял 100–3200 м/з (соотношение массы к заряду).

Для получения комплексов включения β-циклодекстрина с пептидами сывороточных белков молока готовили раствор, содержащий β-ЦД и ультрафильтрат гидролизата в массовом соотношении 2:1. Полученный раствор циклического олигосахарид и гидролизата инкубировали в течение 4 ч при температуре 50 °С в условиях постоянного перемешивания (200 об/мин). Для последующего анализа образцы клатратов лиофильно высушивали при температуре минус 53 °С, давлении 0,1 атм в течение 24–48 ч.

Определение параметров термической деградации экспериментальных образцов клатратов β-ЦД с гидролизатами осуществляли с использованием термогравиметрического анализа (ТГА) и дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) на приборе TGA/DSC1 (Mettler Toledo, Швейцария). Расчет эффективной энергии активации (E_a) проводили в соответствии с методом Бройдо по кривым ТГА. Навеска материала составляла 20 мг, разре-

ние — 1 мкг; ТГА/ДСК-анализ проводили в температурном диапазоне 30–600 °С, скорость подъема температуры составляла 5 °С/мин, точность контроля температуры ±2 °С.

Токсиколого-гигиеническую оценку клатратов β-циклодекстрина с пептидами молока на *T. pyriformis* осуществляли согласно инструкции по применению № 034-1215, утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь 07.04.2016 [7]. Исследование проводили на *T. pyriformis* в стационарной фазе роста, поддерживаемой в стандартной питательной среде при 25 °С.

Расчет токсикологических параметров производили исходя из анализа выживаемости тест-объекта в остром и подостром экспериментах. Рассчитывались показатели, характеризующие токсичность исследуемых объектов в остром и подостром экспериментах: ЛД₁₆ (доза, вызывающая гибель 16 % особей), ЛД₅₀ (средняя смертельная доза), ЛД₈₄ (доза, вызывающая гибель 84 % особей), К_{кумуля} (коэффициент кумуляции). Результаты исследований представлялись как среднее арифметическое значение трех независимых экспериментов с определением стандартной ошибки.

Отнесение к классу опасности производили по показателю, значение которого было наиболее высоким (таблица 1).

Результаты и их обсуждение. Сравнительное исследование пептидного состава гидролизатов молочной сыворотки на основании содержания общего белка в соответствующих ультрафильтратах, а также данных хромато-масс-спектрометрии показало, что степень протеолиза в образцах гидролизатов молочной сыворотки достигает 37,2 % при содержании пептидной фракции (*m_r* ≤ 5 кДа) 39,0 %. Полученные данные указывают на увеличение доли расщепленного белкового компонента в образце гидролизата сывороточных белков в 1,6 раза в расчете на степень протеолиза / содержание пептидной фракции (таблица 2).

Таблица 1 — Гигиеническая классификация объектов по результатам изучения их токсичности на *Tetrahymena pyriformis*

Показатель токсичности	Классы по убывающей степени токсичности				
	1-й чрезвычайно опасные	2-й высоко опасные	3-й умеренно опасные	4-й мало опасные	5-й неопасные
ЛД ₅₀ , мг/мл	менее 0,1	0,1–1,0	1,1–20	21–50	более 50
Ккумуля _{ас}	менее 0,1	0,10–0,30	0,31–0,49	0,50–1,0	более 1,0

Таблица 2 — Характеристика пептидного состава образцов молочной сыворотки

Название образца	Содержание низкомолекулярной белковой фракции с $m_r \leq 5$ кДа, %	Степень протеолиза, %	Характеристика пептидной фракции (согласно хромато-масс-спектрометрии)
Молочная сыворотка (контроль)	1,0	0	—
Гидролизованная молочная сыворотка	39,0	37,2	Выявлены пептиды с $m_r < 1500$ Да, преобладают пептиды с $m_r \approx 680$ Да

На рисунке 3, согласно данным ВЭЖХ-МС, представлены пептиды, полученные после гидролиза сывороточных белков. В сравнении с составом белков сыворотки молока по данным хромато-масс-спектрометрии обнаружены отличия в составе пептидной фракции гидролизата в диапазоне 100–1500 Да, как видно из рисунка 3б. В гидролизованной молочной сыворотке выявлены пептиды с молекулярной массой до 1500 Да. Полученные результаты свидетельствуют о максимальной длине пептидов в составе 13–14 аминокислотных остатков.

В составе 20 г комплекса β -циклодекстрина с пептидами гидролизатов белков молока содержится 13,33 г циклодекстрина и 6,67 г пептидов (соотношение 2:1).

С целью подтверждения образования клатратов β -ЦД с пептидами сыворотки использо-

вали термогравиметрический анализ. Он основан на фиксации изменения массы исследуемого образца при увеличении температуры в определенном диапазоне с установленной скоростью. В таблице 3 представлена сравнительная характеристика параметров термического разложения исследованных препаратов.

Согласно расчетам энергии активации (E_a) для механических смесей и клатратов показано увеличение E_a в 1,4–1,6 по сравнению с образцами гидролизатов молочной сыворотки. Наблюдается стабилизация смеси пептидов молока в составе механических смесей и комплексов включения с β -ЦД.

Острую токсичность клатратов β -циклодекстрина с пептидами сывороточных белков молока определяли с помощью одноклеточных организмов инфузорий *T. pyriformis*. При иссле-

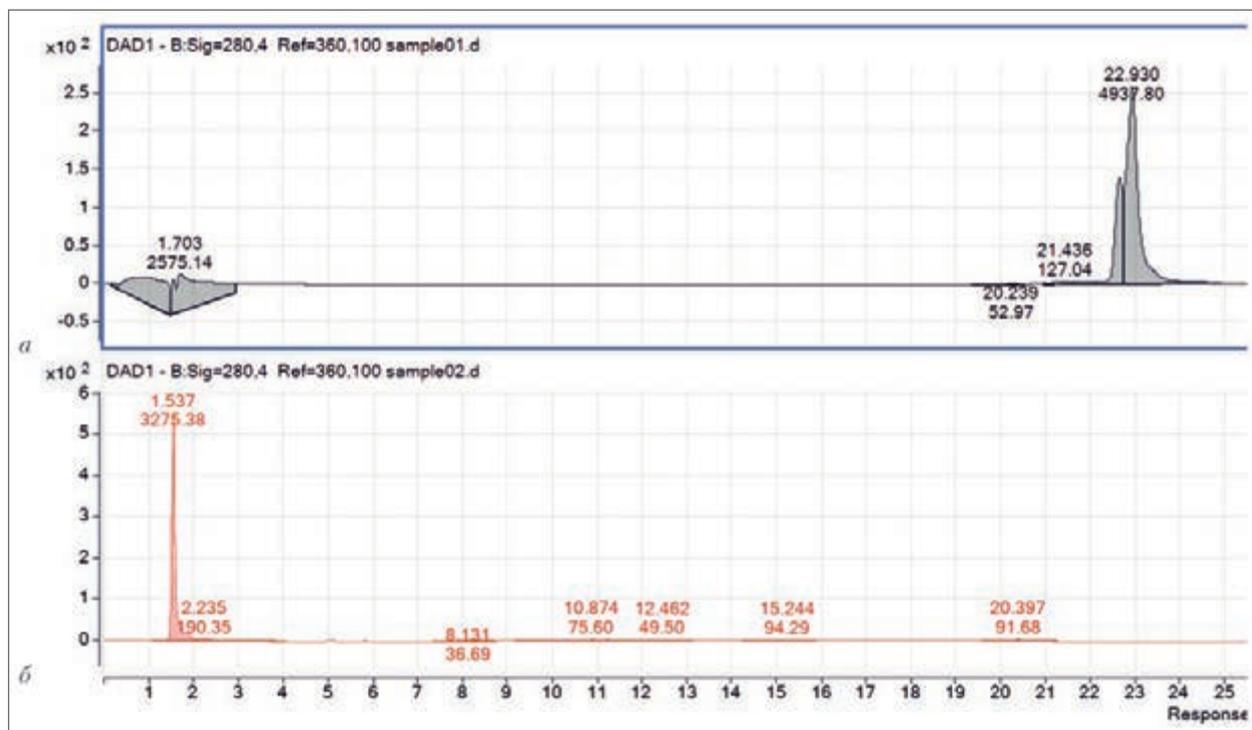


Рисунок 3 — ВЭЖХ-профиль белков молочной сыворотки (а) и ультрафильтрата гидролизованной молочной сыворотки (б)

Таблица 3 — Сравнительный анализ параметров термического разложения контрольных образцов гидролизатов и клатрата β-ЦД с гидролизатом молочной сыворотки

Наименование образца, условия образования комплекса (Т, °С)	Температура максимальной скорости деструкции (TVmax), °С	Максимальная скорость деструкции (Vmax), мг/°С	Количество образца в системе при TVmax, % от исходного содержания	Энергия активации (Ea), кДж/моль
Гидролизат молочной сыворотки (ГМС)	268,3	0,029	80,9	76
Механическая смесь (ГМС : β-ЦД = 1:2)	297,5	0,29	68,8	118
Комплекс включения (ГМС : β-ЦД = 1:2)	305,1	0,15	55,6	105

довании токсичности клатратов β-циклодекстрина с пептидами сывороточных белков молока в остром эксперименте в 1 мл среды с 100 000 инфузорий в стационарной фазе роста вносили следующие дозы: 50, 100, 150, 200, 250, 300 мг. Время экспозиции проб с простейшими при определении острой токсичности составило 5 ч.

Через 5 ч инкубации клатратов в концентрации 50 мг/мл численность инфузорий не отличалась от контрольного уровня (летальность составила 0 %), 100 мг/мл — снизилась

на 8 %, 150 мг/мл — снизилась на 17 %, 200 мг/мл — снизилась на 29–31 %, 250 мг/мл — снизилась на 40 %, 300 мг/мл — снизилась на 54 % по сравнению с контрольным уровнем.

Популяция *T. pyriformis* в остром эксперименте в контрольной пробе и в питательной среде, содержащей клатраты в концентрациях 100, 200 и 300 мг/мл продемонстрированы соответственно на рисунках 4–7 (фотографии под микроскопом при увеличении объектив 10, окуляр 10).

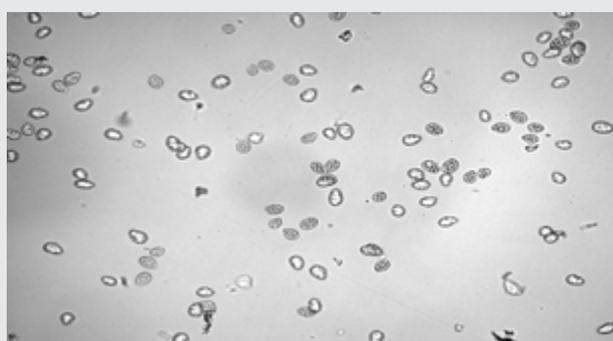


Рисунок 4 — Популяция *T. pyriformis* в остром эксперименте (5 ч), контроль

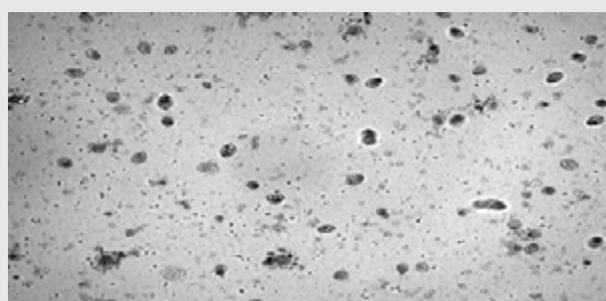


Рисунок 6 — Популяция *T. pyriformis* в остром эксперименте (5 ч), в среде, содержащей клатраты (200 мг/мл)

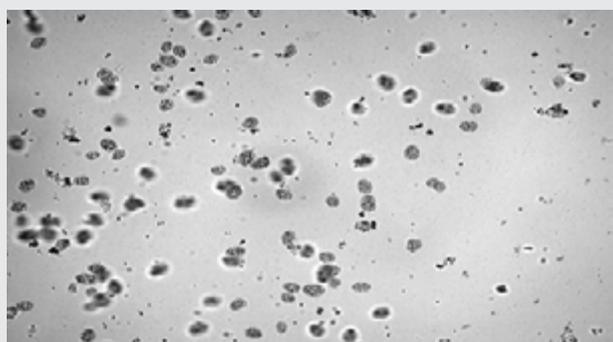


Рисунок 5 — Популяция *T. pyriformis* в остром эксперименте (5 ч), в среде, содержащей клатраты (100 мг/мл)

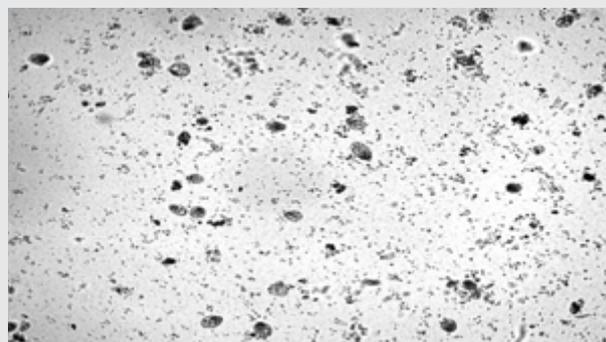


Рисунок 7 — Популяция *T. pyriformis* в остром эксперименте (5 ч), в среде, содержащей клатраты (300 мг/мл)



При исследовании подострой токсичности (время экспозиции 24 ч) клатратов β -ЦД с пептидами сывороточных белков молока наблюдалось усиление токсического эффекта по ЛД₁₆, ЛД₅₀ и ЛД₈₄ по сравнению с такового острого эксперимента. Так, в пробах, содержащих 100 мг/мл клатрата, летальность простейших составила 12 %, 150 мг/мл — 31 %, 200 мг/мл — 62–78 %, 250 мг/мл — 92 %, 300 мг/мл — 95 %.

Методом пробит-анализа летальности инфузорий рассчитаны параметры острой и подострой токсичности клатратов β -ЦД с пептидами сывороточных белков молока (таблица 4).

Токсиколого-гигиеническая оценка клатратов β -циклодекстрина с пептидами сывороточных белков молока в остром и подостром экспериментах на *Tetrahymena pyriformis* показала, что по среднесмертельной дозе он относится к 5 классу токсичности (является нетоксичным), а по коэффициенту кумуляции — к 4 классу токсичности (является малотоксичным).

Заключение. Получены опытные образцы глубоких ферментативных гидролизатов белков молочной сыворотки, представленные продуктами протеолиза с молекулярной массой до 1500 Да, соответствующей пептидам длиной до 13–14 аминокислотных остатков, а также обогащенные фракцией пептидов, включающих 6–8 аминокислотных остатков. Получены экспериментальные образцы клатратов β -циклодекстрина с пептидами сывороточных белков молока, что подтверждено результатами термогравиметрического анализа. По результатам токсиколого-гигиенической оценки на *Tetrahymena pyriformis* клатраты β -циклодекстрина с пептидами сывороточных белков молока относятся к 4 классу токсичности (является малотоксичными). Разработанные образцы клатратов β -циклодекстрина с пептидами сывороточных белков молока в дальнейшем могут использоваться для нутрицевтивной поддержки медицинской помощи и специализированной пищевой продукции.

Таблица 4 — Параметры токсичности клатратов β -циклодекстрина с пептидами сывороточных белков молока по результатам оценки на *T. pyriformis*

Показатель токсичности	Величина токсичности	Класс токсичности
Острая токсичность		
ЛД ₁₆ , мг/мл	151,91 ± 0,38	—
ЛД ₅₀ , мг/мл	277,25 ± 1,30	5
ЛД ₈₄ , мг/мл	402,58 ± 1,13	—
Подострая токсичность		
ЛД ₁₆ , мг/мл	111,20 ± 4,19	—
ЛД ₅₀ , мг/мл	173,23 ± 9,94	—
ЛД ₈₄ , мг/мл	235,26 ± 0,61	—
Ккум _{acuta}	0,62	4

Список цитированных источников

1. Природные циклические олигосахариды — циклодекстрины, в системах доставки лекарств / П. Ю. Федорова [и др.] // Междунар. журнал экспериментального образования. — 2011. — № 11. — С. 125–126.
2. Cyclodextrins — the molecular container / S. K. Das [et al.] // Res. J. of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. — 2013. — Vol. 4, № 2. — P. 1694–1720.
3. Dodziuk, H. Cyclodextrins and Their Complexes. Chemistry, Analytical Methods, Applications / H. Dodziuk. — Warsaw: Willey-VCH, Weinheim, 2006. — 504 p.
4. Frumming, K. Cyclodextrins in Pharmacy / K. Frumming, J. Szejtli. — Dordrecht–Boston: Kluwer Academic Publishers, 1994. — 218 p.
5. Dardeer, H.M. Importance of cyclodextrins into inclusion complexes / H. M. Dardeer // Int. J. of Advanced Research. — 2014. — Vol. 2, № 4. — P. 414–428.
6. Maazaoui, R. Applications of cyclodextrins: formation of inclusion complexes and their characterization / R. Maazaoui, R. Abderrahim // Int. J. of Advanced Research. — 2015. — Vol. 3, № 2. — P. 757–781.
7. Методы экспресс-оценки безвредности биологически активных добавок к пище, являющихся источниками аминокислот, витаминов и минеральных веществ, на *Tetrahymena pyriformis*: инструкция по применению № 034-1215 : утв. Гл. гос. санитар. врачом Респ. Беларусь 07.04.2016 г. / авт.-сост. Л. Н. Журихина, А. М. Бондарук, Т. С. Осипова. — Минск, 2015. — 25 с.

Toxicological and hygienic evaluation of β -cyclodextrin clathrates with cow's milk peptides

*Zhurikhina L. N.¹, Tsygankov V. G.¹, Kurchenko V. P.², Halavach T. N.²,
Bondaruk A. M.¹, Svintilova T. N.¹*

*¹Republican unitary enterprise “Scientific practical centre of hygiene”,
Minsk, Republic of Belarus;*

²Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

Experimental samples of β -cyclodextrin clathrates with milk whey protein peptides were obtained, which was confirmed by the results of thermogravimetric analysis. According to the results of a toxicological and hygienic evaluation on *Tetrahymena pyriformis*, β -cyclodextrin clathrates with milk whey protein peptides are low-toxic.

Keywords: cyclodextrins, peptides of cow's milk whey protein hydrolysate, clathrates, toxicological and hygienic evaluation, *Tetrahymena pyriformis*.

Поступила 23.05.2022