

Биологическая экспертиза качества этилового спирта, производимого из пищевого сырья

ПОГОРЕЛОВ А.Г.
ВОЗНЯК В.М.
ПОГОРЕЛОВА В.Н.
МАЕВСКИЙ Е.И.

д.б.н., в.н.с., Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН (ИТЭБ), Пущино
к.х.н., руководитель лаборатории АНО "Тест-Пущино"
н. с. ИТЭБ
д.м.н., зам. директора ИТЭБ

Показано, что биологические модели особенно эффективны при сравнительном тестировании проб сверхчистого этилового спирта, когда физико-химические методы анализа бесполезны. Для сравнения образцов сверхчистого этилового спирта, используемого в пищевом производстве, в биологической модели на мышах был использован протокол теста на острую токсичность и протокол регистрации параметров условно рефлекторной активности. Полученные данные свидетельствуют, что образец качественного спирта, содержащий микропримеси в относительно больших концентрациях, оказывал менее выраженное токсическое действие.

В Российской Федерации разработана и эффективно действует система контроля физико-химических параметров этилового спирта, произведенного из пищевого сырья [2, 3, 4]. Аналитическими методами производится мониторинг качества продукта по критерию содержания в нем ряда микропримесей, допустимая концентрация которых определена нормативными документами. Однако в результате внедрения современных технологий такой контроль становится бесполезным, т.к. в любом образце "пищевого" спирта уровень контролируемых микропримесей намного ниже того, что определено ГОСТом. Другими словами, производитель предлагает продукт, который гораздо чище того, что рассматривается в качестве эталона.

Свойства водки как пищевого продукта обусловлены композицией многих природных ингредиентов, растворенных в этиловом спирте. Их присутствие, даже в гомеопатических концентрациях, или удаление одного из них потенциально может влиять на биологическую активность этанола. Тем не менее, реальные доказательства различий в физиологическом действии водки, произведенной из «сверхчистого» спирта, и водки, произведенной по традиционной технологии, которая повсеместно применялась, например, 20 лет назад, отсутствуют. Под термином *физиологическое действие* следует понимать реакцию биологических систем разного уровня на действие алкоголя. Примером такой активности может быть как летальная токсичность (высокие дозы) или выраженность этанолового наркотика (сублетальные дозы), так и изменение параметров поведения при опьянении (умеренные дозы) или органолептических показателей при дегустации (малые дозы).

Накопленный к настоящему времени опыт свидетельствует о том, что биологические способы оценки качества алкогольной продукции могут быть более чувствительными, чем физико-химические [5, 6, 7, 8].

Целью данной работы явился сравнительный анализ химического состава и биологического действия растворов этилового спирта разной степени очистки.

Материал и методы исследования

Физико-химическая экспертиза

Газовую хроматографию проводили на приборе фирмы Varian (Германия), оснащенном капиллярной колонкой и пламенноионизационным детектором. В качестве газовой фазы носителя использовали гелий.

Высокоэффективную жидкостную хроматографию под высоким давлением (HPLC) проводили на приборе фирмы LKB (Швеция) с УФ-детектором и интегратором. Колонка заполнена обращеннофазным сорбентом Prodigy ODS3,250 4,6 мм (Фенаменех, США) с размером частиц 5 мкм. Каждый образец этилового спирта был рассмотрен в трех системах (нейтральная, основная, кислая). Хроматограмму получали в трех повторах.

Биологическая экспертиза

Действие этилового спирта испытывали на молодых (2–3 мес.) половозрелых белых мышах (самцах) из питомника ИТЭБ РАН. Животные содержались в группах по 10 особей в клетке при стандартных условиях: температура в комнате 20 ± 2 °С, корм ПК-121-2 (ООО "ИНФОРМКОРМ"), питье *ad libitum*. За час до начала эксперимента животные отсаживались на голод при свободном доступе к воде.

При исследовании на острую токсичность пробу 40-ного водного раствора изучаемого спирта "Экстра" вводили мышам путем внутрибрюшинной инъекции. В контроле, в качестве плацебо, делали инъекцию 0,7 мл физиологического раствора (0,9% NaCl). Объем инъекции водного раствора этилового спирта рассчитывали для каждого животного с учетом массы его тела из выражения:

$$V = Dm/0,4, \quad (1)$$

где V — объем пробы водного раствора (40-ного) этанола, мкл; D — изучаемая доза, мл (по этанолу); m — масса тела животного, г.

В эксперименте изучали действие двух доз этанола, которые заведомо вызывают высокий уровень гибели животных: 8,0 мл/кг (летальная) и 6,0 мл/кг (сублетальная). Термин *сублетальная* определяет условия, при которых за время наблюдения смертность в группе составляет не более 80%. Для каждой дозы регистрировался со временем уровень гибели в группе из 20 особей. Показания снимались через 1,5; 3; 6; 12 ч и на 1-, 2-, 4-, 8-, 16-е сут. после инъекции. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили, используя приложение Excel, по анализу кривых выживаемости [7].

Учитывая принятый человеком способ перорального приема алкоголя, был использован метод, моделирующий условия алкогольного опьянения. В данной схеме эксперимента 40-ный водный раствор изучаемого спирта "Экстра" вводили животному в желудок, используя металлический зонд. При дозе 3 мл/кг (по этанолу) объем пробы

определяли для каждого животного с учетом массы его тела из выражения:

$$V=7,5 \cdot m \quad (2)$$

где V — объем пробы 40°-ного водного раствора этанола, мкл; m — масса тела животного, г.

Затем мышь отсаживали в отдельную клетку и через 20 мин регистрировали параметры ее поведения. Для оценки степени алкогольного опьянения использовали тест на условнорефлекторную активность в крестообразном лабиринте. Аппарат для регистрации параметров поведения состоит из четырех одинаковых тупиковых камер (отсеков), соединенных между собой через такую же пятую, центральную, камеру. Каждый отсек представляет собой куб с ребром длиной 15 см и отверстием (7 × 7 см) в стенке для входа со стороны центральной камеры. На полу проведены маркирующие линии, разделяющие поле тупиковых и центрального отсеков. Лабиринт сверху накрывается прозрачной крышечкой красного цвета.

В начале тестирования мышь помещается в центральную камеру. Затем в течение 4 мин наблюдают последовательность ее перемещений при исследовании животным помещений крестообразного лабиринта. Заход в тупик считается состоявшимся, если все лапы перенесены через линию, отделяющую поле отсека от центральной камеры. Оцениваются следующие критерии:

количество посещенных тупиков, что показывает уровень поисковой активности;

латентный период начала исследования, что позволяет оценить показатель скорости принятия решения;

время полного обхода лабиринта, что отражает способность к пространственной ориентации, а также рассматривается как одна из форм элементарной рассудочной деятельности у животных (чем эффективнее пространственная ориентация, тем меньше число визитов, затраченное на первый полный обход);

количество возвратов в тупик, посещенный при предыдущем визите, что рассматривается как показатель ошибок краткосрочной памяти;

поочередное посещение двух из четырех тупиков, что интерпретируется как поведенческая стереотипия;

количество левых и правых поворотов при переходе из тупика в тупик через центральный отсек лабиринта, что отражает степень асимметрии локомоции;

количество диаметральных переходов из тупика в тупик через центральный отсек лабиринта, что отражает степень нарушения навигационного научения и пространственной памяти;

количество стоек, что показывает уровень исследовательской активности.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью приложения "Excel". Для групп, состоящих из 10 животных, рассчитывали среднее арифметическое значение (MEAN) и среднеквадратичную ошибку среднего (SEM).

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты физико-химической экспертизы, представленные в табл. 1, показывают, что все тестируемые этиловые спирты соответствуют требованиям, предъявляемым к такого рода продукции. Содержание некоторых микропримесей гораздо ниже допустимого уровня этих веществ, а различия, например, по метанолу имеют минорный характер. Следует отметить, что значения регистрируемых концентраций находятся на пределе чувствительности газовой хроматографии и для анализа пропанол-2 был привлечен метод хромас-спектроскопии. Анализ образцов этилового спирта методом высокоразрешающей эффективной жидкостной хроматографии каких-либо различий между анализируемыми образцами этилового спирта (№17, №20) не обнаружил. Пиков посторонних примесей не обнаружено.

Иными словами, в данной работе исследовались образцы этилового спирта, которые можно отнести к препаратам высокой химической чистоты. Следует отметить, что с учетом отмеченных выше особенностей образец №17 выглядит несколько "чище" относительно образца №20.

Результаты наблюдения за динамикой острого отравления летальной дозой алкоголя (8 мл/кг массы по этанолу) сведены в табл. 2. На рис. 1 эти же данные для наглядности представлены в виде кривых выживаемости животных, которые построены по методу Каплана—Мейера (моментный метод) с учетом того, что все особи выбывают из наблюдаемой группы только в результате экспериментальных процедур [1]. Из представленных материалов следует, что кривые выживаемости для тестируемых образцов этилового спирта различаются. Если оценить уровень токсичности по медиане выживаемости, то этот критерий составляет менее 6 ч для образца №17 и более 12 ч для образца №20. Таким образом, проба спирта №17 оказывает более выраженное токсическое действие, чем проба №20, при том, что первый образец (№17) относительно "чище" (табл. 1). Вопрос состоит в том, какова вероятность получить найденное различие выживаемости случайно. Оценим правомочность сделанного выше заключения о том, что качественный этиловый спирт, в котором содержание микропримесей было несколько выше, оказывает менее токсичное действие.

Кривые выживаемости, построенные в логарифмическом масштабе, не пересекаются (рис. 1). По этому при-

Таблица 1

Результаты анализа содержания (мг/л) примесей, полученные методом газовой хроматографии в образцах 40°-ного водного раствора этилового спирта

Показатель	Описание	Контроль*	Образец №17	Образец №20
Ацетальдегид	Альдегид	1,32	0,65	1,47
Этилацетат	Эфир	0,74	0,74	0,75
Метанол	Об. %	0,004	0,0002	0,0002
Пропанол-2	Сивушн.	6,0	0,07**	0,36**

Примечание: * — образец от производителя водок высокого качества Подмосковья;
 ** — определялось методом хромас-спектроскопии на приборе Automass-Solo (Finigan, Франция)

Количество наблюдаемых и погибших мышей в разные моменты (сутки) регистрации после алкогольной интоксикации, вызванной внутрибрюшинной инъекцией 40°-ного водного раствора этилового спирта "Экстра" (№17, №20) в дозе 8 мл/кг (по этанолу)*

Сутки	Момент регистрации (t)								
	1/16	1/8	1/4	1/2	1	2	4	8	16
Образец №17*									
n ₁₇	20	20	15	8	7	6	3	0	0
d ₁₇	0	5	7	1	1	3	3	0	0
S(t) ₁₇	1	0,75	0,40	0,35	0,30	0,15	0	0	0
Образец №20									
n ₂₀	20	20	18	13	11	9	5	5	2
d ₂₀	0	2	5	2	2	4	0	3	1
S(t) ₂₀	1	0,90	0,65	0,55	0,45	0,25	0,25	0,1	0,05

Примечание. * n — число животных в группе на начало интервала наблюдения; d — число животных, погибших к концу интервала наблюдения в момент регистрации t; S(t) — выживаемость на момент регистрации

знаку применим логранговый критерий с нулевой статистической гипотезой об одинаковости выживаемости в обеих группах мышей. Полное описание используемого метода статистической обработки кривых выживаемости дано в литературе [1]. Основные этапы вычисления приведены ниже.

Используя выражение (3), найдем сумму разностей (U) ожидаемого (E) и наблюдаемого (d₁₇) числа погибших мышей по всем моментам регистрации, например для образца №17 (табл. 2),

$$U(t) = [d_{17}(t) - E(t)] \quad (3)$$

сумма берется по всем временным промежуткам от начала эксперимента до i-го наблюдения в момент t, включительно, а E₁₇(t) определяется из соотношения:

$$E(t) = n_{17}(t) [d_{17}(t) + d_{20}(t)] / [n_{17}(t) + n_{20}(t)], \quad (4)$$

где n(t) — исходное количество животных в группах на момент t (табл.2).

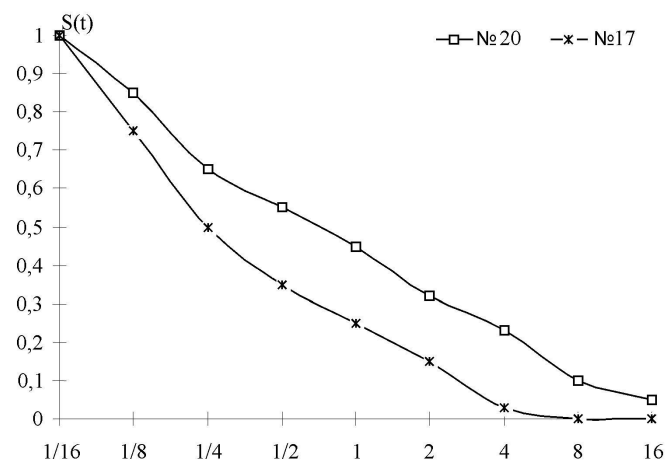


Рис. 1. Выживаемость S(t) мышей со временем (дни) после внутрибрюшинной инъекции пробы 40°-ного водного раствора этилового спирта "Экстра" (№17, №20) в летальной дозе 8 мл/кг массы (по этанолу). Кривые построены и сглажены в приложении Excel

Величина U(t) приближенно подчиняется нормальному распределению со стандартной ошибкой s(t), величина которой определяется из уравнения:

$$s(t) = \sqrt{\frac{n_{17}(t) n_{20}(t) [d_{17}(t) d_{20}(t)] [n_{17}(t) n_{20}(t) d_{17}(t) d_{20}(t)]}{[n_{17}(t) n_{20}(t)]^3 [n_{17}(t) n_{20}(t)]^2}}. \quad (5)$$

Разделив значение U(t) на его стандартную ошибку s(t), получим величину z(t) для оценки нулевой статистической гипотезы при сравнении кривых выживаемости (рис. 1). В табл. 6 приведены результаты промежуточных вычислений параметра z(t).

Распределение параметра z(t) имеет приблизительно нормальное распределение. Поэтому эту величину можно сравнить с критическим значением для стандартного распределения, которое варьирует от 1,96 до 1,64 для уровня значимости в пределах 5—10%. В указанных пределах нулевая гипотеза об отсутствии отличий в токсичности тестируемых спиртов (№17, №20) не выполняется в период начальной фазы интоксикации (1/4 суток) и в конце наблюдения (4—16-е сутки). Отмеченная временная закономерность различий в физиологической активности спиртов иллюстрируют кривые скорости гибели животных (рис. 2).

На рис. 2 видно, что для спирта №17 изменение скорости гибели имеет два максимума, что характерно для летальной хемотоксикации. По-видимому, первый пик смертности (6 ч) в токсикогенной фазе обусловлен избирательным поражением центральной нервной системы этанолом. Второй пик (4 суток) индуцирован отдаленной интоксикацией всего организма в соматогенной фазе. В случае образца №20 для течения алкогольного отравления характерны снижение уровня смертности в основных пиках и наличие третьего максимума на кривой гибели животных (рис. 2). Таким образом, мы еще раз убеждаемся в том, что летальные дозы спирта №17 и №20 различаются по биологической активности. Статистический анализ данных, полученных при исследовании острой токсичности сублетальных доз (табл. 3), значимых различий между действием тестируемых спиртов на выживаемость мышей не обнаружил.

Таблица 3

Количество наблюдаемых и погибших мышей в разные моменты (сутки) регистрации после алкогольной интоксикации, вызванной внутрибрюшинной инъекцией 40°-ного водного раствора этилового спирта "Экстра" (№17, №20) в дозе 6 мл/кг (по этанолу)*

Сутки	Момент регистрации (t)						
	1/4	1/2	1	2	4	8	16
Образец №17*							
n_{17}	20	20	19	17	14	6	6
d_{17}	0	1	2	3	8	0	0
$S(t)_{17}$	1	0,95	0,85	0,07	0,30	0,30	0,30
Образец №20							
n_{20}	20	20	19	18	16	7	7
d_{20}	0	1	1	2	9	0	1
$S(t)_{20}$	1	0,95	0,90	0,80	0,35	0,35	0,30

Примечание. * n — число животных в группе на начало интервала наблюдения; d — число животных, погибших к концу интервала наблюдения в момент регистрации t; S(t) — выживаемость на момент регистрации

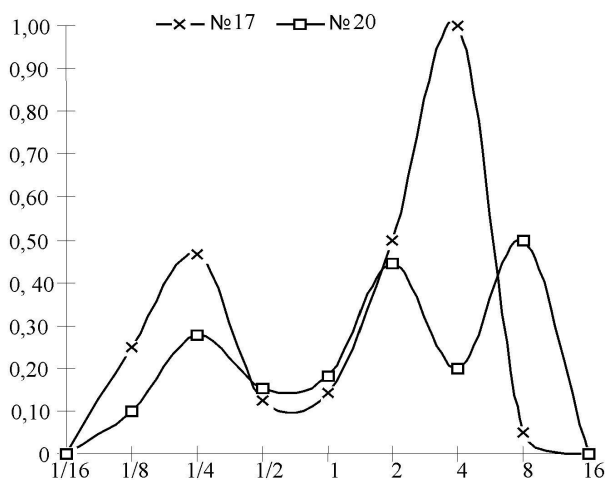


Рис. 2. Доля гибели мышей в группе за интервал наблюдения в течение алкогольной интоксикации, вызванной внутрибрюшинной инъекцией 40°-ного водного раствора этилового спирта "Экстра" (№ 17, № 20) в дозе 8 мл/кг (по этанолу). Кривые построены и сглажены в приложении Excel.

Интересные результаты получены при исследовании поведения животных в состоянии алкогольного опьянения под действием нелетальной дозы (табл. 4). В данной ситуации значение двух параметров (7, 8 в табл. 4), которые отражают степень асимметрии локомоции, не меняются. Изменение ряда критериев поведения не зависит от тестируемого спирта и, по-видимому, обусловлены только влиянием этанола. К таким характеристикам опьянения следует отнести: укорачивание латентного периода начала исследования лабиринта (1); увеличение количества диаметральных переходов (9) и уменьшение коэффициента исследовательской активности (10). Все вместе это означает уменьшение времени, требуемого для принятия решения, и нарушение пространственной ориентации животных.

Следует отметить, что изменение других критериев поведения, которое регистрируется на фоне алкогольного опьянения, зависит от тестируемого образца (табл. 4). Например, для этилового спирта №20 параметры 2, 3, 4, 5 и 6 почти не отличаются от значений, характерных для группы контрольных (не подвергавшихся действию алкоголя) животных. В случае этилового спирта №17 эти же пара-

Таблица 4

Сравнение параметров поведения в крестообразном лабиринте групп животных через 20 мин после разового перорального введения 40°-ного водного раствора этилового спирта "Экстра" (№17, №20) в дозе 3 мл/кг по этанолу или воды (плацебо) *

Проба	Параметр**									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Вода	6 2	18 1	12 1	81 11	3 1	3	5 1	6 1	4 1	2,1 0,1
№ 17	2 1	29 3	8 2	62 10	9 2	12	7 1	6 1	13 2	0,8 0,2
№ 20	3 1	22 3	14 2	86 15	6 1	5	6 1	6 1	10 2	0,8 0,2

Примечание. * — данные представлены как среднее и среднеквадратичная ошибка среднего ($M \pm S$) для групп из 10 животных
 ** — 1 — латентный период начала исследования лабиринта, с; 2 — приведено количество тупиков лабиринта, посещенных за 4 мин; 3 — время нахождения в первом тупике лабиринта, с; 4 — время полного обхода всех тупиков лабиринта, с; 5 — количество поочередных посещений двух из четырех тупиков; 6 — количество возвратов в тупик, посещенный при предыдущем визите, на группу из 10 мышей; 7 — количество правых поворотов при переходе из тупика в тупик через центральный отсек лабиринта; 8 — количество левых поворотов при переходе из тупика в тупик через центральный отсек лабиринта; 9 — количество диаметральных переходов из тупика в тупик через центральный отсек лабиринта; 10 — коэффициент исследовательской активности (отношение количества стоек к числу посещенных отсеков)

Таблица 5

Результаты сличительной органолептической оценки кодированных проб 40°-ной сортировки, приготовленных из тестируемых образцов этилового спирта "Экстра" (№17, №20) и образца одного из производителей высококачественной водки Подмосковья (контроль)

Эксперт	Контроль	№ 17	№ 20
1	9,7	9,4	9,7
2	9,6	9,4	9,6
3	9,8	9,6	9,7
4	9,8	9,4	9,4
5	9,8	9,6	9,3
6	9,8	9,7	9,6
Среднее	9,8	9,5	9,6

метры претерпевает значимые изменения. Другими словами, состояние опьянения, вызванное действием образца №20, животные переносят легче и их поведение более адекватно ситуации, которая возникает при предъявлении обстановки крестообразного лабиринта. Интересно, что органолептическое сравнение проб 40 -ной сортировки, приготовленных из тестируемых этиловых спиртов, показало более высокое потребительское качество пробы №20 (табл. 5).

В сличительной органолептической оценке участвовала и проба сортировки из спирта, используемого для производства качественной водки Подмосковья, которая показала лучшие результаты (табл. 5). В ней, как и в образце №20, достаточно высокое содержание альдегида (табл. 1), но пропанол-2 присутствует в гораздо более высокой концентрации. Возможно, сочетание этих двух веществ в малых концентрациях и обеспечивает высокое потребительское качество продукта. Заманчиво было бы более "мягкое" физиологическое действие этилового спирта №20 приписать присутствию в нем более высоких концентраций микропримесей. Однако данное предположение требует дополнительных исследований.

В заключение следует отметить, что в данной работе подходы биологической экспертизы были применены для испытания качества этилового спирта, произведенного из пищевого сырья. Такие исследования должны получить

свое развитие в области изучения сочетанного действия алкоголя и гомеопатических доз биологически активных веществ. Важность отмеченного выше направления обусловлена тем, что в рецептуру многих водок включают микропримеси без учета субстрат-метаболической активности этанола. Используемая для оценки качества продукта органолептическая экспертиза (дегустация) описывает только кратковременный эффект очень малых доз напитка. В связи с изложенным биологическая экспертиза решает проблему изучения отдаленного действия относительно высоких доз биологически активных веществ на фоне алкоголя.

Следует отметить, что методы биологической экспертизы регистрируют интегративную реакцию биологических систем, что, по сути, близко к дегустационной оценке. Однако в отличие от последней результаты экспертизы имеют форму баз количественных данных, которые могут быть сравнимы с результатами других независимых (сличительных) испытаний. Другими словами, исключается субъективный подход при контроле соответствия качества новых видов водки требованиям, предъявляемым к такого рода продукции.

Выводы

Показано, что биологические модели особенно эффективны при сличительном тестировании проб сверхчистого этилового спирта, когда физико-химические мето-

Таблица 6

Промежуточные результаты вычисления критического значения z при сравнении кривых выживаемости, полученных в тесте на острую токсичность (табл. 1) проб этилового спирта (№17, №20) и приведенных на рис. 1

t	n ₁₇ (t)	n ₂₀ (t)	d ₁₇ (t)	d ₂₀ (t)	E(t)	d E	U =	k(t)	s(t)	z = U/s
1/8	20	20	5	2	3,50	1,50	1,50	1,48	1,22	1,23
1/4	15	18	7	5	5,45	1,55	3,05	1,95	1,85	1,64
1/2	8	13	1	2	1,14	-0,14	2,90	0,64	2,02	1,44
1	7	11	1	2	1,17	-0,17	2,74	0,63	2,17	1,26
2	6	9	3	4	2,80	0,20	2,94	0,96	2,38	1,23
4	3	5	3	0	1,13	1,88	4,81	0,50	2,48	1,94
8	0	5	0	3	0,00	0,00	4,81	0,00	2,48	1,94
16	0	2	0	1	0,00	0,00	4,81	0,00	2,48	1,94

Примечание: * t — момент регистрации (сутки); k(t) - слагаемое под знаком суммы в выражении (5)

ды анализа бесполезны. Для сравнения образцов сверхчистого этилового спирта, используемого в пищевом производстве, были предложены протокол теста на острую токсичность (летальная доза) и протокол регистрации параметров условно рефлекторной активности (умеренная доза). Полученные данные экспериментов на мышах свидетельствуют, что образец качественного спирта, содержащий микропримеси в относительно больших концентрациях, оказывал менее выраженное токсическое действие.

Список литературы

1. Гланц С.: Медико-биологическая статистика/ Пер. с англ. — М.: Практика, 1999. — 459 с.
2. ГОСТ Р 51355-99. Водки и водки особые. Общие технические условия.
3. ГОСТ 30536-97. Газохроматографический метод определения содержания токсичных микропримесей.
4. ГОСТ Р 51652-2000. Спирт этиловый из пищевого сырья.
5. Нужный В.П. Методологические аспекты оценки токсичности спиртосодержащих жидкостей и алкогольных напитков// Токсикологический вестник. — 1999. — Т.4. — С. 2—10.
6. Погорелова В.Н., Аксиров А.М., Учитель М.Л. и др. Биологическая экспертиза специфических свойств препарата "АНТИП"// Горизонты биофизики: от теории к практике. — Пушкино, 2003. — С. 95—100.
7. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — М.: ИИА Ремедиум, 2000. — 398 с.
8. OECD Guideline for testing of Chemicals. — Paris; 2001.— 21 с.

APPROACHES OF EXPERIMENTAL BIOLOGY TO CONTROL ALCOHOL QUALITY

POGORELOV A.G.	Ph.D., Sci.Dr., senior researchet, Institute of Theiretical and Experimental Biophysics, RAS, Pushchino
VOZNJAK V.M.	Ph.D., Head of Laboratoty, Institute of Theiretical and Experimental Biophysics, RAS, Pushchino
POGORELOVA V.N.	senior researcher, Institute of Theiretical and Experimental Biophysics, RAS, Pushchino
MAEVSKY E.I.	Ph.D., M.D., Deputy Director, Institute of Theiretical and Experimental Biophysics, RAS, Pushchino

The approaches of experimental biology are shown to be much more effective for testing pure alcohol than analytical methods. The acute toxicity protocol and the registration of behavior parameters were employed to compare two alcohol kinds. The obtained data suggest that pure alcohol containing the minor content of controlled admixtures at relatively higher concentration leads to less toxic action on CHK mouse population.