Государственная система санитарно-эпидемиологического нормирования Российской Федерации

Федеральные санитарные правила, нормы и гигиенические нормативы

2.3.2. ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ И ПИЩЕВЫЕ ДОБАВКИ

Определение безопасности и эффективности биологически активных добавок к пище

Методические указания
МУК 2.3.2.721—98

Издание официальное

Минздрав России
Москва • 1999

gost.e-ecolog.ru

2.3.2. ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ И ПИЩЕВЫЕ ДОБАВКИ

Определение безопасности и эффективности биологически активных добавок к пище

Методические указания
МУК 2.3.2.721—98

ББК 51.23
О60

О60 **Определение** безопасности и эффективности биологически активных добавок к пище: Методические указания.—М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 1999.—87 с.

ISBN 5—7508—0137—3

1. Методические указания разработаны:

Институтом питания РАМН – В. А. Тутельян (руководитель), И. Н. Аксюк, А. К. Батурин, А. В. Васильев, М. Н. Волгарев, Л. Ш. Воробьева, В. Г. Высоцкий, М. Г. Гаппаров, А. Н. Зайцев, И. Я. Конь, Л. В. Кравченко, И. Б. Куваева, М. М. Левачев, В. К. Мазо, Г. Р. Покровская, М. А. Самсонов, Е. Ю. Сорокина, В. Б. Спиричев, С. А. Хотимченко, К. И. Эллер;

Московской медицинской академией им. И. М. Сеченова Минздрава России – В. А. Княжев, Б. П. Суханов;

Центральным НИИ эпидемиологии МЗ России – А. В. Тутельян, В. В. Лебедев;

Институтом вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова РАМН – Н. С. Захарова, М. В. Брицина;

Государственным научным Центром наркологии Минздрава России – В. М. Булаев;

НИИ традиционных методов лечения Минздрава России – В. Г. Кукес;

Министерством здравоохранения Российской Федерации (Департамент госсанэпиднадзора) – А. А. Монисов, Л. П. Терешкова, А. И. Петухов, Н. Н. Иванова;

Федеральным Центром госсанэпиднадзора Минздрава России – В. И. Чибураев, А. А. Иванов, Г. К. Егорова.

2. Утверждены и введены в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 15.10.98.

3. Введены впервые.

ББК 51.23

ISBN 5—7508—0137—3

© Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России

Содержание

1. Область применения 4
2. Нормативные ссылки....5
3. Термины и определения....5
4. Общие положения 6
5. Порядок гигиенической экспертизы, государственной регистрации и перерегистрации биологически активных добавок к пище....12
6. Гигиеническая характеристика производства биологически активных добавок к пище 16
7. Порядок осуществления контроля за производством и реализацией БАД....17
8. Оценка БАД по санитарно-химическим показателям безопасности 20
9. Санитарно-микробиологический контроль безопасности и качества биологически активных добавок к пище 21
10. Радиологические показатели безопасности 23
11. Нутрицевтики....23
12. Парафармацевтики 26
13. О порядке проведения клинических испытаний биологически активных добавок к пище 51
Приложения к разделу «Нутрицевтики» 63
Приложения к разделу «Парафармацевтики» 71
Приложение к разделу 13 79
Список литературы.... 80

УТВЕРЖДАЮ
Главный Государственный
санитарный врач Российской Федерации
_____ Г. Г. Онищенко

15 октября 1998 г.
МУК 2.3.2.721—98
Дата введения: 1 января 1999 г.

2.3.2. ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ И ПИЩЕВЫЕ ДОБАВКИ

Определение безопасности и эффективности биологически активных добавок к пище

Методические указания
МУК 2.3.2.721—98

1. Область применения

1.1. Методические указания предназначены для органов государственной исполнительной власти и органов местного самоуправления, предприятий, организаций, учреждений и иных юридических лиц (далее – организации), граждан предпринимателей без образования юридического лица, должностных лиц и граждан, деятельность которых осуществляется в области обращения БАД, для организаций санитарно-эпидемиологической службы Российской Федерации (далее – госсанэпидслужбы России), осуществляющих государственный и ведомственный санитарно-эпидемиологический надзор, а также для других организаций, уполномоченных на осуществление государственного контроля за безопасностью и эффективностью БАД.

1.2. Требования, изложенные в настоящих методических указаниях в отношении биологически активных добавок к пище, применяются на этапах экспертизы и регистрации биологически активных добавок к пище, а также при разработке и постановке их на производство, промышленном производстве, хранении, транспортирова-

нии, закупке, ввозе в страну и реализации (далее – при обращении БАД), при разработке нормативной и технической документации, регламентирующей вопросы обращения БАД.

1.3. За качество, безопасность, заявленные свойства, эффективность и рекламу выпускаемой биологически активной добавки к пище полную ответственность несет производитель.

1.4. Гигиенические требования к веществам, материалам, в том числе вспомогательным и упаковочным, контактирующим с биологически активной добавкой к пище, устанавливаются специальными санитарными правилами и нормами.

2. Нормативные ссылки

2.1. Закон РСФСР «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» от 19 апреля 1991 года.

2.2. «Основы законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан» от 22 июля 1993 года.

2.3. Федеральный закон «О внесении изменений и дополнений в Закон Российской Федерации «О защите прав потребителей» и Кодекс РСФСР об административных правонарушениях» от 9 января 1996 года.

2.4. Положение о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании, утвержденное Постановлением Правительства Российской Федерации от 5 июня 1994 года № 625.

2.5. Положение о Государственной санитарно-эпидемиологической службе Российской Федерации, утвержденное Постановлением Правительства Российской Федерации от 30 июля 1998 г. № 680.

2.6. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 117 от 15.04.97 «О порядке экспертизы и гигиенической сертификации биологически активных добавок к пище».

2.7. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации № 21 от 15.09.97 «О государственной регистрации биологически активных добавок к пище».

3. Термины и определения

Пищевые продукты – продукты, используемые человеком в пищу в натуральном или переработанном виде.

Биологически активные добавки к пище – композиции натуральных или идентичных натуральным биологически активных веществ, предназначенных для непосредственного приема с пищей или введе-

ния в состав пищевых продуктов с целью обогащения рациона отдельными пищевыми или биологически активными веществами и их комплексами.

Нутрицевтики – биологически активные добавки к пище, применяемые для коррекции химического состава пищи человека (дополнительные источники нутриентов: белка, аминокислот, жиров, углеводов, витаминов, минеральных веществ, пищевых волокон).

Парафармацевтики – биологически активные добавки к пище, применяемые для профилактики, вспомогательной терапии и поддержки в физиологических границах функциональной активности органов и систем.

Качество биологически активных добавок к пище – совокупность характеристик, которые обусловливают потребительские свойства, эффективность и безопасность биологически активных добавок к пище.

Безопасность биологически активных добавок к пище – отсутствие опасности для жизни и здоровья людей нынешнего и будущих поколений.

Эубиотики – биологически активные добавки к пище, в состав которых входят живые микроорганизмы и (или) их метаболиты, оказывающие нормализующее воздействие на состав и биологическую активность микрофлоры пищеварительного тракта. *Пробиотики* – синоним понятия эубиотики.

4. Общие положения

4.1. Методические указания «Определение безопасности и эффективности биологически активных добавок к пище» (далее по тексту используются сокращенные термины – методические указания и БАД) устанавливают гигиенические требования по определению безопасности и эффективности для человека биологически активных добавок к пище и сырья для их производства, а также требования по соблюдению указанных нормативов при разработке нормативной и технической документации на них и обращения БАД.

4.2. Настоящие методические указания разработаны на основании закона РСФСР «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения», «Основ законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан», федерального закона «О внесении изменений и дополнений в закон Российской Федерации «О защите прав потребителей», Положения о государственном санитарно-эпидемио-

логическом нормировании, Положения о Государственной санитарно-эпидемиологической службе Российской Федерации, Приказа Минздрава России № 117 от 15.04.97 «О порядке экспертизы и гигиенической сертификации биологически активных добавок к пище», Постановления Главного государственного санитарного врача Российской Федерации № 21 от 15.09.97 «О государственной регистрации биологически активных добавок к пище».

4.3. Методические указания разработаны с целью обеспечения единого, научно-обоснованного подхода к оценке эффективности и безопасности биологически активных добавок к пище на этапах разработки, экспертизы, регистрации и обращения БАД.

4.4. Требования настоящих методических указаний должны выполняться при разработке государственных стандартов, нормативной и технической документации, регламентирующей вопросы обращения БАД.

Проекты нормативной и технической документации должны быть согласованы с организациями госсанэпидслужбы России в соответствии с утвержденным порядком.

4.5. Гигиеническая экспертиза биологически активных добавок к пище проводится специально уполномоченными организациями в порядке, утвержденном Министерством здравоохранения Российской Федерации, на основании нормативных и методических документов Государственной системы санитарно-эпидемиологического нормирования Российской Федерации.

4.6. При разработке новых видов биологически активных добавок к пище и их усовершенствовании, а также при разработке (изменении) технологических процессов юридическими лицами, осуществляющими разработку, обеспечивается обоснование их соответствия заявленным медико-биологическим эффектам, срокам годности, показателям качества и безопасности продукции, требованиям по их соблюдению на этапах обращения, а также методам контроля.

4.7. Разработчик новой биологически активной добавки к пище и (или) ее производитель обязаны включить в нормативную и техническую документацию показатели ее качества и безопасности, гигиенические нормативы, требования по обеспечению указанных нормативов в процессе производства, хранения, транспортирования и реализации продукции, а также требования к ее упаковке и маркировке, сроки годности и методы контроля качества и безопасности продукции.

4.7.1. Производство биологически активных добавок к пище должно осуществляться в соответствии с нормативной и технической документацией и отвечать требованиям санитарных правил и норм в области обеспечения качества и безопасности.

4.7.2. Качество и безопасность каждой партии (серии) биологически активных добавок к пище подтверждается производителем в удостоверении о качестве.

4.8. Постановка на производство новых биологически активных добавок к пище, производство БАД допускается только после проведения регистрации данной биологически активной добавки к пище в соответствии с процедурой, устанавливаемой Министерством здравоохранения Российской Федерации.

4.9. Постановка на производство биологически активных добавок к пище, не являющихся новыми, но впервые осваиваемых на предприятии, допускается только при наличии:

- регистрационного удостоверения на данные БАД;
- гигиенического заключения, выданного уполномоченными организациями госсанэпидслужбы России о соответствии условий производства санитарным правилам и нормам, требованиям по обеспечению качества и безопасности БАД, установленным в технической документации, а также регламентируемыми в «Регистрационном удостоверении».

4.10. Импортируемые на территорию Российской Федерации биологически активные добавки к пище должны отвечать требованиям действующих в Российской Федерации санитарных правил и гигиенических нормативов, если иное не оговорено международными соглашениями.

4.10.1. Безопасность и эффективность импортируемых БАД к пище определяется на основании гигиенической экспертизы конкретного вида импортируемой продукции и оценке ее соответствия действующим санитарным правилам и гигиеническим нормативам Российской Федерации с учетом соответствия БАД требованиям безопасности, установленным для такой продукции в стране ее происхождения.

4.10.2. Показатели качества и безопасности, гигиенические нормативы, которым соответствует предполагаемый к ввозу вид БАД и которым должна соответствовать импортируемая в страну продукция, устанавливаются в Регистрационном удостоверении.

4.10.3. Организации, осуществляющие производство и поставку импортируемых на территорию Российской Федерации биологически активных добавок к пище, обязаны зарегистрировать их в соот-

ветствии с правилами и процедурой, установленной Министерством здравоохранения Российской Федерации до ввоза на территорию Российской Федерации.

4.11. Организации, осуществляющие деятельность в области обращения биологически активных добавок к пище, несут ответственность за обеспечение качества и безопасности БАД. Они обязаны проводить мероприятия, направленные на выполнение требований санитарных правил и гигиенических нормативов, технической документации по обеспечению условий производства, транспортирования, хранения и реализации БАД.

4.12. Расфасовка и упаковка биологически активных добавок к пище должны обеспечивать сохранение их качества и безопасности на всех этапах обращения продукции.

4.13. Производитель биологически активных добавок к пище, предназначенных для реализации на территории Российской Федерации, должен выпускать их маркированными в соответствии с законодательством Российской Федерации и нормативной документацией, регламентирующей вопросы маркировки продукции.

4.13.1. Расфасованные и упакованные биологически активные добавки к пище должны иметь этикетки, на которых на русском языке указывается:

- наименование продукта и его вид;
- номер технических условий (для отечественных БАД);
- область применения;
- название организации-изготовителя и ее юридический адрес (для импортируемых на территорию Российской Федерации продуктов – страна происхождения и наименование фирмы изготовителя);
- вес и объем продукта;
- наименование входящих в состав продуктов ингредиентов, включая пищевые добавки;
- пищевая ценность (калорийность, белки, жиры, углеводы, витамины, микроэлементы);
- условия хранения;
- срок годности и дата изготовления;
- способ применения (в случае, если требуется дополнительная подготовка БАД);
- рекомендации по применению, дозировка;
- противопоказания к использованию и побочные действия (при необходимости);

• особые условия реализации (при необходимости).

4.13.2. Рекомендации по применению биологически активных добавок к пище должны быть составлены на основе экспериментального изучения БАД и клинических испытаний и содержать сведения о дозировке БАД, курсе приема препарата, противопоказаниях и побочных эффектах.

4.14. Организация, осуществляющая реализацию биологически активных добавок к пище, обязана обеспечить условия реализации в соответствии с согласованными при регистрации регламентами, а также санитарными правилами и нормами в области обеспечения ее безопасности.

4.14.1. Не допускается реализация биологически активных добавок к пище:

• не соответствующих санитарным правилам и нормам в области обеспечения качества и безопасности;

• без удостоверения о качестве;

• с истекшим сроком годности;

• при отсутствии надлежащих условий реализации;

• без информации о проведении обязательной регистрации БАД;

• без этикетки, а также в случае, когда информация на этикетке не соответствует информации, согласованной при регистрации;

• идентифицировать которые не представляется возможным.

4.15. Не допускается использование при производстве БАД к пище растительного сырья и продукции животноводства, полученных с применением генной инженерии (трансгенных продуктов), без разрешения на то Министерства здравоохранения Российской Федерации.

4.16. Фирма-изготовитель должна гарантировать, что животноводческое сырье, использованное для производства биологически активных добавок к пище, получено из хозяйств, не регистрировавших прионовых заболеваний, и свободно от других возбудителей, потенциально опасных для человека. В целях снижения риска передачи агентов прионовых заболеваний (Bovine Spongiform Encephalopathy – BSE) через биологически активные добавки к пище рекомендуется везде, где это возможно, запретить в качестве источника биологического сырья материалы риска. Решением Комиссии ЕС «EU Commission Decision of Juli 30th, 1997 (97/534/EC) 75/320/EEC on prohibition of the use of material presenting risks as regard of transmissible spongioforme encephalopaties» определены материалы риска:

а) череп, включая мозг и глаза, небные миндалины и спинной мозг быков (коров) старше 12 месяцев, коз (козлов), овец (баранов) старше 12 месяцев или имеющих коренные резцы, прорезывающиеся сквозь десны;

б) селезенка овец (баранов) и коз (козлов).

При ввозе биологически активных добавок к пище, изготовленных из сырья животного происхождения, должна приниматься во внимание эпидемиологическая ситуация по BSE в стране фирмы-изготовителя.

4.17. Производство, ввоз в страну, хранение, транспортирование и реализация населению биологически активных добавок к пище, не соответствующих нормативам качества и безопасности, утвержденным в установленном порядке, не допускается.

4.18. Для проведения лабораторных исследований (измерений) качества и безопасности пищевой продукции допускаются метрологически аттестованные методики, соответствующие требованиям ГОСТов 8.010—90 и 8.556—91, установленные значения показателей погрешности которых не превышают норм погрешности по ГОСТу 27384—87, а также методики, утвержденные или допущенные к применению госсанэпидслужбой России.

Для определения эффективности биологически активных добавок к пище используются методы, указанные в данных методических указаниях.

4.19. Качество, безопасность биологически активных добавок к пище и способность их оказывать декларируемый изготовителем эффект определяются соответствием их гигиеническим нормативам, установленным СанПиН 2.3.2.560—96 «Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов» и настоящими методическими указаниями.

4.20. Органолептические свойства биологически активных добавок к пище определяются показателями вкуса, цвета, запаха и консистенции, установленными производителем и характерными для каждого вида продукции.

4.21. Требования, которым должны соответствовать органолептические свойства биологически активных добавок к пище, устанавливаются в нормативной и технической документации на их производство.

4.22. Гигиенические нормативы включают химические соединения и биологические объекты, присутствие которых в пищевой продукции не должно превышать допустимых уровней их содержания в заданной массе (объеме) исследуемой продукции.

4.23. В биологически активных добавках к пище регламентируется содержание основных действующих веществ.

4.24. При получении неудовлетворительных результатов анализа хотя бы по одному из показателей, по нему проводят повторный анализ удвоенного объема выборки, взятого из той же партии.

5. Порядок гигиенической экспертизы, государственной регистрации и перерегистрации биологически активных добавок к пище

5.1. Проведение гигиенической экспертизы и регистрации биологически активных добавок к пище осуществляется в соответствии с порядком, установленным Министерством здравоохранения Российской Федерации.

5.2. Гигиеническая экспертиза и регистрация биологически активных добавок к пище включает следующие процедуры:

- первичную экспертную оценку документов и материалов, характеризующих данную продукцию;
- определение потребности в проведении необходимых исследований;
- проведение комплекса необходимых санитарно-химических, санитарно-микробиологических и других видов исследований;
- экспериментальные исследования токсикологических, физиологических и метаболических эффектов, подтверждающие заявленный профиль БАД;
- клиническую оценку эффективности;
- комплексную экспертную оценку результатов с учетом полученных в ходе исследований данных;
- оформление регистрационного удостоверения на биологически активную добавку к пище, присвоение номера, включение в реестр.

5.3. Для проведения работ по гигиенической экспертизе и регистрации биологически активных добавок к пище ее производитель, поставщик или полномочный представитель представляют следующие документы:

- заявку установленной формы с указанием полных реквизитов производителя и поставщика БАД;
- акт отбора проб установленной формы, в котором указывается дата, место отбора образцов, их количество, наименование продукции, юридический адрес предприятия-изготовителя, дата

производства БАД, фамилии, должности и подписи лиц, отбиравших образцы;

- при наличии посредника – доверенность от производителя на проведение работ по регистрации биологически активной добавки к пище с указанием получателя регистрационного удостоверения и его владельца;
- образцы биологически активных добавок к пище в количестве, определенном действующим порядком экспертизы. В случае проведения токсикологических или клинических испытаний количество необходимых образцов определяется дополнительно.

5.3.1. Для биологически активных добавок к пище, производимых в России, представляются:

- нормативная или техническая документация (технические условия, технологическая инструкция, рецептура), оформленная в соответствии с установленной формой;
- пояснительная записка, описывающая биологически активную добавку к пище, область ее применения, рекомендации по применению, противопоказания, ограничения по применению БАД при их наличии;
- потребительская этикетка или ее проект, заверенный производителем;
- инструкция по применению с указанием доз, сроков и способов употребления БАД, заверенную производителем;
- материалы (оригинальные и литературные для аналогов) по токсиколого-гигиенической и биологической оценке БАД и ее клинической оценке;
- санитарно-гигиеническая характеристика производства, выданная центром госсанэпиднадзора по месту производства БАД.

5.3.2. Для импортируемых биологически активных добавок к пище представляются:

- сертификаты качества и безопасности фирмы-изготовителя, содержащие данные о показателях безопасности, ингредиентный состав и его характеристику, сроки годности, условия хранения;
- для БАД, содержащих части растения, указывается их ботаническое название на латинском языке и форма (экстракт, настой и т. п.);
- документы официально уполномоченного органа страны-экспортера, подтверждающие безопасность данной продукции и ее эффективность, документ о регистрации;

• краткие сведения о технологии производства, стандарт предприятия на выпуск БАД;

• пояснительная записка, описывающая биологически активную добавку к пище, область ее применения, рекомендации по применению, противопоказания, ограничения по применению БАД при их наличии;

• потребительская этикетка или ее проект, заверенная производителем;

• инструкция по применению с указанием доз, сроков и способов употребления БАД, заверенная производителем продукции;

• материалы (оригинальные и литературные для аналогов) по токсиколого-гигиенической и биологической оценке БАД и ее клинической эффективности, протоколы или заверенные копии результатов клинических испытаний, в которых указаны учреждения, проводившие эти испытания, схема проведения испытаний и результаты в сравнении с контрольной группой;

• гигиенический сертификат, в котором указывается, что производство данной продукции осуществляется в соответствии с национальными и/или международными требованиями для БАД к пище (требования GMP – Good manifacture practice, стандартам Международной организации стандартизации – ISO 9000, 9001, 9002); или Сертификата национальных и/или международной («EuroNett») организаций о соответствии производства БАД стандартам ISO 9000—9002. Декларация фирмы изготовителя о соответствии производства указанным выше требованиям ISO может быть представлена в виде специальных знаков на бланках фирмы.

Все материалы представляются в оригинале и (или) нотариально заверенные копии, и в переводе на русский язык.

5.4. Проведение исследований осуществляется в учреждениях и лабораториях, аккредитованных в установленном порядке в «Системе аккредитаций лабораторий центров государственной санитарно-эпидемиологической службы Российской Федерации».

5.5. По результатам проведенной работы готовится экспертное заключение.

5.6. В случае отсутствия или непредставления необходимых документов, наличия в составе БАД неразрешенных компонентов или лекарственного сырья, не разрешенного в Российской Федерации, содержания сильнодействующих компонентов, являющихся лекарственными средствами в терапевтических дозах, может быть принято решение об отказе в регистрации.

5.7. При экспертизе биологически активных добавок к пище, предназначенных для детей, необходимо учитывать следующие факторы:

- БАД для детей первых трех лет жизни не должен содержать ароматизаторы, консерванты и стабилизаторы;
- БАД для детей могут включать только биологически активные соединения, которые разрешены для использования детьми соответствующего возраста.

5.8. Перерегистрация биологически активных добавок к пище осуществляется в соответствии с порядком, установленным Министерством здравоохранения Российской Федерации.

5.8.1. Основанием для перерегистрации биологически активных добавок к пище является:

- окончание срока действия ранее выданного регистрационного удостоверения;
- изменение формы выпуска БАД;
- изменение области применения и рекомендаций по использованию БАД;
- изменение наименования, смена торговой марки фирмы-изготовителя;
- изменение гигиенических требований к БАД;
- изменение противопоказаний и ограничений по применению БАД;
- внесение изменений в нормативную и техническую документацию на БАД.

5.8.2. Для перерегистрации БАД ее производитель, поставщик или полномочный представитель представляет:

- заявку на перерегистрацию биологически активной добавки к пище с пояснительной запиской о причинах перерегистрации БАД до окончания срока действия «Регистрационного удостоверения»;
- документы в соответствии с перечнем, установленным для регистрации БАД;
- промышленные образцы БАД;
- копию ранее выданного «Регистрационного удостоверения».

5.8.3. Для внесения изменений в область применения и рекомендации по использованию БАД необходимо представление данных клинико-эпидемиологических исследований, выполненных по программам, утвержденным в установленном порядке.

5.9. По итогам экспертизы уполномоченным учреждением госсанэпидслужбы России готовится регистрационное удостоверение или мотивированный отказ в адрес заявителя.

5.10. В случае обращения по поводу перерегистрации БАД, связанного с изменением или увеличением числа фирм-поставщиков, уполномоченным учреждением госсанэпидслужбы России – Федеральным центром ГСЭН МЗ РФ в порядке, установленном Минздравом России, выдается документ, подтверждающий право поставки и реализации данной БАД на территории Российской Федерации. Вышеуказанный документ выдается только при наличии доверенности от фирмы-изготовителя, подтверждающей права фирмы-поставщика на право распространения данной БАД.

5.11. При выдаче «Регистрационного удостоверения» на отечественный БАД, уполномоченное учреждение госсанэпидслужбы России направляет информацию в территориальный центр госсанэпиднадзора по месту его производства (разработки) для осуществления госсанэпиднадзора за соблюдением установленных требований при обращении БАД.

6. Гигиеническая характеристика производства биологически активных добавок к пище

6.1. Гигиеническая оценка производства биологически активных добавок к пище осуществляется с целью проверки соответствия условий производства БАД действующим санитарным правилам и гигиеническим нормативам, организации производственно-технологического контроля за качеством и безопасностью сырья и готовой продукции.

6.2. Гигиеническая оценка производства БАД к пище осуществляется Департаментом госсанэпиднадзора Минздрава России, Федеральным центром ГСЭН МЗ РФ и территориальными центрами ГСЭН по месту производства БАД.

6.3. При проведении гигиенической оценки производств, расположенных на территории Российской Федерации, учитываются:

- наличие на предприятии необходимых условий для производства данного вида и объема БАД;
- возможное неблагоприятное влияние работы предприятия на условия проживания населения или на окружающую среду (рассматриваются: заключение по отводу земельного участка, санитарно-

гигиеническое заключение по проекту строительства или реконструкции, вопросы очистки территории);

• состояние условий труда работающих на предприятии, соблюдение правил личной гигиены персоналом, наличие медицинской документации персонала;

• организация производственного контроля на предприятии за качеством исходного сырья, технологией производства и показателями безопасности конечной продукции;

• соответствие набора производственных помещений технологии производства данного вида БАД.

6.4. При проведении гигиенической оценки производств, расположенных за пределами Российской Федерации, учитываются:

• наличие на предприятии необходимых условий для производства данного вида БАД;

• осуществление производственного контроля за качеством исходного сырья, технологией производства и показателями безопасности конечной продукции;

• соответствие выпускаемой продукции требованиям санитарных правил и норм, действующих на территории Российской Федерации.

6.5. По результатам гигиенической оценки производства представляется заключение о соответствии условий производства БАД к пище требованиям санитарного законодательства Российской Федерации.

7. Порядок осуществления контроля за производством и реализацией БАД

7.1. За соответствием качества и безопасности биологически активных добавок к пище гигиеническим нормативам должен осуществляться производственный контроль, государственный и ведомственный санитарно-эпидемиологический надзор.

7.2. Производственный контроль за соблюдением гигиенических нормативов качества и безопасности биологически активных добавок к пище осуществляют организации, действующие в сфере производства данной продукции. Порядок проведения производственного контроля определяется организацией в соответствии с требованиями нормативной и технической документации по рабочим программам и технической документации, согласованным с организациями госсанэпидслужбы России.

7.3. Государственный санитарно-эпидемиологический надзор за качеством и безопасностью биологически активных добавок к пище

осуществляют организации госсанэпидслужбы России, ведомственный санитарно-эпидемиологический надзор – организации санитарно-эпидемиологических служб федеральных органов исполнительной власти, на которые санитарным законодательством Российской Федерации возложены эти функции.

7.4. Организация производства биологически активных добавок к пище осуществляется при наличии заключения территориального ЦГСЭН о соответствии условий действующим требованиям санитарного законодательства и согласованным при регистрации регламентам, а также утвержденным и согласованным с органами госсанэпидслужбы России рабочим программам производственного контроля.

7.5. Центры госсанэпиднадзора в субъектах Российской Федерации и на транспорте осуществляют контроль за условиями производства и реализации БАД, соответствием этикетки на готовой продукции установленным требованиям и информации, заложенной в регистрационном удостоверении, проводят выборочный отбор проб и лабораторные исследования соответствия БАД установленным требованиям качества и безопасности, осуществляют контроль за условиями производства, поставки, хранения и реализации БАД.

7.5.1. По заявке производителя БАД, а также в соответствии с поручениями Департамента госсанэпиднадзора Минздрава России и Федерального центра ГСЭН МЗ РФ осуществляют оценку состояния производства и производственно-технологического контроля качества и безопасности сырья и готовой продукции на функционирующих производствах, предполагаемых к открытию, применительно к производству БАД с составлением гигиенического заключения.

7.5.2. Осуществляют госсанэпиднадзор на производстве, при хранении на оптовых и розничных предприятиях, в торговле за соблюдением:

- условий производства, технологического и лабораторного контроля качества и безопасности сырья;
- условий хранения;
- порядка реализации;
- информации, выносимой на этикетку (соответствие ее данным «Регистрационного удостоверения»), соответствия рекламы БАД информации, согласованной при регистрации (по данным «Регистрационного удостоверения»).

7.5.3. Проводят выборочный отбор проб и лабораторные исследования соответствия БАД установленным требованиям качества и безопасности.

7.5.4. При выявлении нарушений принимают меры в соответствии с законом Российской Федерации «О санитарно-эпидемиологическом благополучии».

7.5.5. Направляют информацию в Федеральный центр ГСЭН о выявленных нарушениях, принятых мерах и результатах проведенной работы.

7.6. Биологически активные добавки к пище, качество которых не соответствует гигиеническим нормативам, изымаются из обращения их владельцем, а также по постановлению организаций, осуществляющих госсанэпиднадзор, и не подлежат реализации по целевому назначению. Изъятые БАД могут быть использованы в иных целях, утилизированы или уничтожены в соответствии с «Положением о проведении экспертизы некачественных и опасных продовольственного сырья и пищевых продуктов», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 29 сентября 1997 г. № 1263. Удостоверение отзывается в установленном порядке.

7.7. Обоснование возможных способов и условий использования, утилизации или уничтожения биологически активных добавок к пище проводится их владельцем по согласованию с органами, вынесшими постановление об их изъятии.

7.8. Использование, утилизация или уничтожение изъятой продукции осуществляется их владельцем или организацией (физическим лицом), которой владелец передает по договору выполнение этих работ.

7.9. Изъятая продукция до ее использования, утилизации или уничтожения подлежит хранению в отдельном помещении (резервуаре), на особом учете, с точным указанием ее количества, способов и условий использования, утилизации или уничтожения.

Ответственность за сохранность такой продукции несет владелец.

7.10. Биологически активные добавки к пище, подлежащие уничтожению, должны быть подвергнуты денатурации, способы, сроки и условия проведения которой определяются в каждом конкретном случае их владельцем по согласованию с организациями госсанэпиднадзора.

7.11. Владелец БАД представляет в органы, вынесшие постановление об изъятии, акт об ее использовании, утилизации или уничтожении.

7.12. Организации, осуществляющие госсанэпиднадзор, вынесшие постановление об изъятии из обращения биологически актив-

ных добавок, осуществляют контроль за ее использованием, утилизацией или уничтожением.

7.13. Реклама БАД в средствах массовой информации не должна противоречить материалам, согласованным при регистрации БАД.

Не допускается реклама БАД, не прошедших Государственную регистрацию в Министерстве здравоохранения Российской Федерации.

Не допускается реклама БАД как уникального, наиболее эффективного и безопасного в плане побочных эффектов средства.

Реклама не должна вводить в заблуждение потребителя относительно состава БАД к пище и ее эффективности.

Недопустимо в рекламе создавать впечатление, что природное происхождение сырья, используемого в составе БАД, является гарантией ее безопасности.

Реклама БАД не должна подрывать веру потребителей в эффективность других средств при профилактике и вспомогательной терапии.

Реклама БАД не должна создавать впечатление о ненужности участия врача при применении БАД, в особенности БАД парафармацевтической группы.

7.14. В случае выявления фактов несоответствия проводимой рекламы информации, содержащейся в «Регистрационном удостоверении», направляют материалы в территориальные органы государственного управления, уполномоченные осуществлять контроль за соблюдением закона «О рекламе».

8. Оценка БАД по санитарно-химическим показателям безопасности

Показатель	Метод определения	Предел обнаружения	Литературный источник
Цинк, медь, свинец, кадмий, олово, железо	Атомно-абсорбционный	1 мкг /кг	(1)
Ртуть	Колориметрический	10 мкг/кг	(2)
Мышьяк	Колориметрический	100 мкг/кг	(3)
Пестициды	Газо-жидкостная хроматография	1 мкг/кг	(4)
Углеводороды	Оптические и хроматографические методы (ГЖХ, ВЭЖХ, ХМС)	100 мкг /кг	(5)
Патулин	Хроматографический (ТСХ)	10 мкг /кг	(76)

Продолжение

Афлатоксин M_1	Хроматографические ТСХ, ВЭЖХ	0,3 мкг/кг 0,02 мкг/кг	(6)
Афлатоксин B_1	Хроматографические ТСХ, ВЭЖХ	1 мкг/кг 0,15 мкг/кг	(6)
Зеараленон	Хроматографические ТСХ, ВЭЖХ	100 мкг/кг 5 мкг/кг	(8)
Дезоксиниваленол	Хроматографические ТСХ, ВЭЖХ	200 мкг/кг 50 мкг/кг	(8)
Т-2 токсин	Хроматографический ГЖХ	50 мкг /кг	(9)
Нитриты	Титрометрический	10 мг /кг	(78)
Нитрозамины	Флюориметрический, хемилюминисцентный	1 мкг /кг 0,1 мкг/кг	(77)
Остаточные количества антибиотиков	Микробиологический	0,01—0,5 ЕД/г	(10)

Все санитарно-химические показатели БАД должны соответствовать нормам, указанным в «Гигиенических требованиях к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов» СанПиН 2.3.2.560—96 (127).

9. Санитарно-микробиологический контроль безопасности и качества биологически активных добавок к пище

9.1. Биологически активные добавки к пище из растительного сырья, из сырья животного происхождения, поликомпонентные добавки с включением витаминов, микроэлементов, минерального сырья и т. д.

Показатель	Документ
Количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов	(11)
Бактерии группы кишечных палочек (колиформы)	(12)
E. coli	(13)
S. aureus (коагулазоположительные стафилококки)	(14)
B. cereus	(15)

Продолжение

Патогенные микроорганизмы, в т. ч. сальмонеллы	(16)
Дрожжи	(17)
Плесневые грибы	(17)

9.2. Биологически активные добавки к пище с эубиотическим действием на основе чистых культур микроорганизмов

Показатель	Документ
Количество жизнеспособных клеток в культуре микроорганизма эубиотика	(18)
Количество бифидобактерий в 1 г препарата типа бифидобактерина	(19)
Количество молочнокислых бактерий в 1 г препарата типа лактобактерина	(20)
Бактерии группы кишечных палочек (колиформы)	(21)
S aureus (коагулазоположительные стафилококки)	(22)
Патогенные микроорганизмы, в т. ч. сальмонеллы	(16)
Дрожжи	(17)
Плесневые грибы	(17)

Название микроорганизма эубиотика в нормативной документации и в этикетной надписи должно быть указано на латинском языке с обозначением рода и вида микроорганизма.

9.3. Биологически активные добавки к пище смешанного состава (культуры эубиотиков, добавки различных нутриентов)

Показатель	Документ
Контроль за количеством жизнеспособных микроорганизмов эубиотиков	(21)
Бактерии группы кишечных палочек (колиформы)	(21)
E. coli	(13)
S. aureus (коагулазоположительные стафилококки)	(22)
Патогенные микроорганизмы, в т. ч. сальмонеллы	(16)
Дрожжи	(17)
Плесневые грибы	(17)

Конкретные микробиологические нормативы для различных групп биологически активных добавок к пище приведены в «Гигиенических требованиях к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов» СанПиН 2.3.2.560—96 (127).

10. Радиологические показатели безопасности

Согласно «Гигиеническим требованиям к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов» СанПиН 2.3.2.560—96 для биологически активных добавок к пище, в состав которых входит растительное сырье, определяются радиологические показатели безопасности.

Показатель	Допустимый уровень (не более)	Литературный источник
Цезий-137	200 Бк/кг	(156)
Стронций-90	100 Бк/кг	(157)

Радиационная безопасность БАД к пище, загрязненной другими радионуклидами, определяется соответствием ее нормативам ГН 2.6.1.054—96 «Нормы радиационной безопасности (НРБ-96)».

11. Нутрицевтики

Биологически активные добавки к пище подразделяются на нутрицевтики и парафармацевтики (134). Нутрицевтики – биологически активные добавки к пище, применяемые для коррекции химического состава пищи человека, смысл применения которых заключается в том, чтобы довести содержание естественных эссенциальных макро- и микронутриентов до уровня их содержания в суточном рационе, соответствующем физиологической потребности здорового человека в них. В этой связи нутрицевтики – источники витаминов, полиненасыщенных жирных кислот, макро- и микроэлементов, пищевых волокон, других пищевых веществ в большем числе случаев не нуждаются в оценке их профилактической эффективности в эксперименте или в клинических наблюдениях, поскольку при экспертной оценке рецептур этих продуктов, заключение о возможной их эффективности эксперт может строить на основе общеизвестных литературных данных и учете рекомендованных доз компонентов нутрицевтика в сравнении с физиологической суточной

потребностью в них здорового человека. Нутрицевтики подвергаются полной схеме исследований на определение в них декларируемых величин пищевых веществ и показателей безопасности.

Функциональная роль нутрицевтиков направлена на:

- восполнение дефицита эссенциальных пищевых веществ;
- направленные изменения метаболизма веществ;
- повышение неспецифической резистентности организма к действию неблагоприятных факторов окружающей среды;
- иммуномодулирующее действие;
- связывание и выведение ксенобиотиков;
- лечебное питание.

Конечной целью использования нутрицевтиков является улучшение пищевого статуса человека, укрепление здоровья и профилактика ряда заболеваний.

При проведении оценки безопасности и эффективности необходимо определить долю (в процентах) от суточной потребности, которая обеспечивается нутриентами, входящими в состав предлагаемой биологически активной добавки к пище при рекомендуемой дозе приема. Этикетка маркируется лишь теми величинами, значения которых превышают 5 % (витамины и макро- и микроэлементы) или 2 % (другие пищевые вещества и энергия). Содержание витаминов не должно превышать суточную потребность более чем в три раза для витаминов А, Д, B_1, B_2, B_6, B_{12}, ниацина, фолиевой кислоты, пантотеновой кислоты, биотина и не более чем в 10 раз – для витаминов Е и С*.

Средневзвешенные нормы физиологических потребностей в пищевых веществах и энергии

энергия	2500 ккал
белок	12 % по калорийности или 75 г
жир	30 % по калорийности или 83 г
углеводы	58 % по калорийности или 363 г
пищевые волокна	20,0 г
витамины:	
С (аскорбиновая кислота)	60—70 мг
тиамин (B_1)	1,5 мг

* При расчете на среднюю массу (60 кг), при превышении массы вносятся соответствующие коррективы.

Продолжение

рибофлавин (B_2)	2,0 мг
пиридоксин (B_6)	2,0 мг
цианокобаламин (B_{12})	0,003 мг (3 мкг)
биотин	0,15 мг (150 мкг)
пантотеновая кислота	5—7 мг
фолиевая кислота	0,2 мг (200 мкг)
ниацин РР	20 мг
витамин А	1 мг (3300 МЕ)
витамин Е	10 мг
витамин Д	дети 400 МЕ (10 мкг), взрослые 100 МЕ (2,5 кг)
микро- и макроэлементы:	
кальций	800 мг/сутки
магний	400 мг /сутки
фосфор	1200 мг /сутки
железо	мужчины – 10 мг, женщины – 20 мг в сутки
медь	2 мг
цинк	15 мг
йод	0,2 мг
эссенциальные жирные кислоты с расшифровкой семейства	4 % по калорийности или 11 г в сутки

11.1. Типовая схема экспериментальной модели на лабораторных животных оценки эффективности нутрицевтиков

В случае, если эффективность нутрицевтика не доказана, проводятся экспериментальные исследования на лабораторных животных. Типовая модель таких исследований представлена в таблице.

Вид животных	Количество групп животных	Количество животных в группе	Продолжительность опыта	Название групп
крысы, мыши, морские свинки, кролики и др.	4	8—10	1—2 месяца	контроль опыт-1 опыт-2 опыт-3

Описание групп животных:

контроль – животные находятся на полноценном общевиварном или синтетическом рационе;

опыт-1 – модель дефицита изучаемого нутриента;

опыт-2 – модель дефицита изучаемого нутриента на фоне введения в рацион изучаемого нутрицевтика;

опыт-3 – животным вместе с кормом вводится испытываемый нутрицевтик в аггравированной дозе.

Забой животных проводится через 1—2 месяца от начала введения испытуемого нутрицевтика. Проводится оценка интегральных показателей состояния животных (внешний вид, активность, масса тела, абсолютная и относительная масса внутренних органов). Специальные биохимические, гематологические, иммунологические и морфологические методы исследования в зависимости от состава испытуемого нутрицевтика изложены в приложениях.

12. Парафармацевтики

Парафармацевтики – биологически активные добавки к пище, применяемые для профилактики, вспомогательной терапии и поддержки в физиологических границах функциональной активности органов и систем.

Суточная доза парафармацевтика или, в случае композиции, суточная доза действующего начала парафармацевтика, не должна превышать разовую терапевтическую дозу, определенную при применении этих веществ в качестве лекарственных средств, при условии приема БАД не менее двух раз в сутки.

Все растения, входящие в состав парафармацевтика, должны быть проверены по отечественной и международной нормативной документации в плане разрешения их применения в пищевой промышленности, а также в составе лекарственных чаев и сборов в соответствии с требованиями: Российской Фармакопеи (61—62); зарубежных Фармакопей (68); Методических указаний о порядке доклинического и клинического изучения препаратов природного происхождения и гомеопатических лекарственных средств (Минздравмедпром Российской Федерации 08.04.94); Flavouring substance sand natural sources of flavourings, 111 ed, Council of Europe, 1981; Flavors and Fragrance Materials. A Worldwide reference list of materials used in compounding flavors and fragrances with sources of supply, 1993.

12.1. Показатели подлинности некоторых лекарственных растений, входящих в состав парафармацевтиков, и методы их определения

Растения, оказывающие влияние на центральную нервную систему

Наименование растения	Показатель	Метод	Литературный источник
Женьшень (корень)	панаксозиды	ТСХ, КЦР	(62)
Аралия маньчжурская (корень)	аралозиды А, В, С	ТСХ, ПМТ	(62)
Лимонник китайский (семена)	эфирные масла	ГЖХ, ХМС	(62, 67)
Золотой корень (родиола розовая) (корневище, корень)	салидрозид (антрагликозид)	ТСХ, СФ	(62)
Чай китайский (листья)	алкалоиды (кофеин, ксантин)	ГЖХ	(71)
Валериана лекарственная (корневище, корень)	эфирное масло борнизовалерианат	ГЖХ, ХМС	(65, 67)
Синюха голубая (корневище, корни)	тритерпеновые сапонины	КЦР	(62)
Душица обыкновенная (трава)	эфирные масла	В, ГЖХ	(61, 62)
Пустырник пятилопастный (трава)	флавоноиды, алкалоиды (стахидрин)	КЦР	(62)
Амми зубная (плоды)	флавоноиды (келлин)	ХСФ	(63)
Пастернак посевной (плоды)	фурокумарины	П, ФЛ	(63)
Вздутоплодник мохнатый (корневище, корни)	дигидросамидин (пиранокумарины	ГЖХ	(63)
Мята перечная (листья)	эфирное масло (ментол, ментон, пинен, лимонен)	В, ГЖХ, ХМС	(61—67)

Растения, применяемые при атеросклерозе

Наименование растения	Показатель	Метод	Литературный источник
Боярышник кроваво-красный (цветки, плоды)	флавоноиды (гиперозид)	ХСФ	(62)
Роза коричная (шиповник) (плоды)	витамин С	Т	(62)
Ламинария сахаристая (слоевище)	йод	Т	(62)

Растения, содержащие вещества, обладающие общеукрепляющим и противовоспалительным действием

Наименование растения	Показатель	Метод	Литературный источник
Ромашка аптечная (цветки)	эфирное масло	В, ГЖХ	(62)
Череда трехраздельная (трава)	флавоноиды полисахариды	ТСХ, К	(62)
Толокнянка обыкновенная (листья)	фенольные гликозиды (арбутин)	Т	(62)
Календула лекарственная (цветки)	каротин, ликопин	ХСФ	(72)
Сосна лесная (почки)	эфирное масло	В, ГЖХ, ХМС	(61, 65—67)
Девясил высокий (корневище и корни)	инулин	КЦР	(62)
Алтей лекарственный (корни)	полисахариды (слизи)	КЦР	(62)
Шалфей лекарственный (листья)	эфирное масло (цинеол, туйон, сальвен)	ГЖХ, ХМС	(65—67)
Зверобой продырявленный (трава)	флавоноиды (рутин)	СФ	(62)
Сушеница топяная (трава)	флавоноиды (гиафалозид А)	В	(62)
Подорожник большой (листья)	полисахариды (галактоуроновая кислота)	В, КЦР	(62)

Растения, оказывающие влияние на пищеварительную систему

Наименование растения	Показатель	Метод	Литературный источник
Бессмертник песчаный (цветки)	флавоноиды (изосалилпурпозид)	СФ, ХСФ	(69, 63)

Растения, содержащие горечи

Наименование растения	Показатель	Метод	Литературный источник
Одуванчик лекарственный (корни)	инулин	КЦР	(62)
Золотысячник зонтичный (трава)	горькие гликозиды (аллизарин)	ХСФ	(62)
Вахта трелистная (листья)	горькие гликозиды флавоноиды (рутин)	КЦР СФ	(62)
Аир (корневище)	эфирное масло (каломен, камфен)	В, ГЖХ, ХМС	(61, 65—67)
Тмин обыкновенный (плоды)	эфирное масло (карвон, карвакрон, лимонен)	В, ГЖХ, ХМС	(61, 65—67)

Растения, обладающие слабительными, закрепляющими и вяжущими свойствами

Наименование растения	Показатель	Метод	Литературный источник
Лист сенны	производные антрацена (истизин)	СФ	(62—63)
Крушина ольховидная (кора)	производные антрацена	СФ, ХСФ	(62)
Ревень тунгутский (корни)	производные антрацена (истизин)	СФ	(62—63)
Стальник полевой (корни)	изофлавоноиды (ононин)	ТСХ, СФ	(62)
Ольха серая (соплодия)	дубильные вещества	КЦР	(62)
Черемуха обыкновенная (плоды)	дубильные вещества амигдаллин	КЦР	(62)
Дуб чешуйчатый (кора)	дубильные вещества	КЦР	(62)
Бадан толстолистый (корневище)	дубильные вещества	КЦР	(62)

Растения, обладающие диуретическими свойствами

Наименование растения	Показатель	Метод	Литературный источник
Брусника (листья)	арбутин, дубильные вещества	КЦР	(62)
Можжевельник (плоды)	эфирное масло	В, ГЖХ	(62—63)
Марена красильная (корневище, корни)	производные антрацена	СФ	(62)
Василек синий посевной (цветки)	антоцианы	СФ	(62)
Хвощ полевой (трава)	флавоновые гликозиды	ТСХ	(62—63)
Горец птичий спорыш (трава)	флавоноиды (авикулярин)	СФ, ТСХ	(62,63)

Сокращения: Б – биологический, БХ – бумажная хроматография, В – весовой, ГЖХ – газожидкостная хроматография, ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография, СФ – спектрофотометрия, ФЛ – флуориметрия, ХСФ – спектрофотометрический анализ с предварительным хроматографическим разделением образца, ТСХ – тонкослойная хроматография, П – полярография, ПТ – потенциометрическое титрование, Т – титрование, ХМС – хромато-масс-спектрометрия, КЦР – качественная цветная реакция.

12.2. Экспериментальное изучение функциональной активности парафармацевтиков

Физиологический уровень содержания действующих начал многих парафармацевтиков в клетках и тканях организма не известен (например, биогенные амины, олигопептиды, гликозиды, органические кислоты, сапонины и др.), равно как и не известна физиологическая потребность в них взрослого здорового человека. Более того, у достаточно большого количества таких БАД вообще не идентифицированы активные компоненты, т. е. действующие начала. Примером таких соединений могут служить экстракты, получаемые из сложных комплексов пищевых и лекарственных растений и других видов природного сырья. Отсутствие нормы количественного содержания в организме действующих веществ парафармацевтиков, а также физиологической потребности в них, в ряде случаев

вызывает необходимость оценки их действия на организм в целом или отдельные его системы и органы, т. е. возникает задача исследования функциональной активности парафармацевтиков.

Назначение парафармацевтиков, состоящих из лекарственных растений с высоким уровнем содержания высокоактивных действующих начал без четко установленных доз и четкого знания механизмов действия, в ряде случаев может привести к тому, что реакции компенсаторно-адаптационного характера могут оказаться неадекватными: более сильными, чем нужно, или ослабленными. Это может стать причиной развития последующих патологических изменений в организме. Так, например, если при общем адаптационном синдроме секреция глюкокортикоидов окажется чрезмерной, они будут угнетать развитие иммунологических, неспецифических защитных реакций (воспаление), и тогда резко повышается риск развития огромного числа заболеваний, связанных с недостаточной функциональной активностью иммунной системы (135).

Целью данного раздела методических указаний является выявление влияния БАД-парафармацевтиков на показатели систем, участвующих в механизмах развития компенсаторно-приспособительных реакций, на основании которых можно было бы судить, в конечном счете, об эффективности некоторых видов БАД-парафармацевтиков, которая в большинстве случаев заключается в их профилактическом (в отношении развития патологических процессов) или общеукрепляющем действии.

Основные отличия БАД-парафармацевтиков от лекарств

а. БАД-парафармацевтики в большинстве случаев являются источниками природных компонентов пищи, не обладающих питательной ценностью, однако относящихся к незаменимым факторам питания – органическим компонентам пищевых и лекарственных растений, продуктов моря и компонентов животных тканей. Реже действующие начала БАД-парафармацевтиков могут быть получены биотехнологическими или химическими способами. К БАД-парафармацевтикам относятся и продукты, приготовленные на основе композиций микроорганизмов, предназначенные для нормализации и поддержания микробиоценоза кишечника (эубиотики/пробиотики). Действующие начала БАД-парафармацевтиков специфически поддерживают или регулируют в физиологических пределах функции отдельных органов и систем. Применяются исключительно «per os». Реализуются в свободной продаже как через специальные отделы продовольственных магазинов, так и через отделы безрецеп-

турных средств аптек. При использовании БАД-парафармацевтиков в качестве вспомогательных средств при диетотерапии заболеваний человека или в качестве специфических профилактических средств перед их применением необходима консультация врача-специалиста.

б. Эффект БАД-парафармацевтиков реализуется путем инициации универсальных механизмов адаптационно-приспособительных реакций организма на воздействие раздражителей самой различной природы.

в. Количественные изменения параметров функционирования систем и органов организма лежат в пределах их физиологической нормы.

г. Широкий (гораздо более чем у лекарств) диапазон используемых доз, при которых БАД-парафармацевтики оказывают свое нормализующее и корректирующее действие на функции отдельных органов и систем организма человека при отсутствии токсичных и побочных эффектов.

Принципы экспериментального изучения БАД-парафармацевтиков

а. Учитывая комплексность и плейотропность физиологических эффектов БАД-парафармацевтиков при изучении их эффективности, предпочтение следует отдавать экспериментальным моделям «in vivo».

б. Исходя из абсолютной предопределенности алиментарного пути поступления пищевых веществ, все изучаемые БАД-парафармацевтики должны вводиться при их экспериментальной оценке «per os».

в. Тестированию следует подвергать готовую к применению форму БАД-парафармацевтика, а не отдельные компоненты, входящие в ее состав, на уровне доз, рекомендованных для человека (используя общепринятые для этого в токсикологии и фармакологии методики пересчета, в т. ч. на кг массы тела)

г. При оценке действия БАД-парафармацевтиков необходимо исследовать их влияние на системы, участвующие в формировании реакций острой фазы или общих механизмов реализации адаптационного синдрома.

Основные методические подходы к экспериментальной оценке эффективности БАД-парафармацевтиков

Большое разнообразие адаптационных неспецифических защитно-приспособительных реакций организма на раздражители различного рода крайне затрудняет оценку функциональной актив-

ности БАД-парафармацевтиков на системы сохранения динамического гомеостаза организма. Однако, как известно, все системы, участвующие в реакциях острой фазы, тесно связаны друг с другом посредством различного рода медиаторов, пептидов, гормонов, трофических факторов, лимфокинов через соответствующий рецепторный аппарат (136). Иными словами, любое изменение одной системы обязательно приводит к изменениям в других системах. В этой связи выбор исследуемых систем диктуется набором преимущественных эффектов БАД-парафармацевтика.

Как известно, основным эффектом БАД-парафармацевтиков является повышение резистентности организма к инфекциям, стрессорным, агрессивным воздействиям химической и физической природы. Такие эффекты БАД-парафармацевтиков в большинстве случаев обусловлены положительным влиянием их на различные звенья иммунной и детоксикационной систем организма и другие общие механизмы адаптационно-приспособительных реакций, в т. ч. за счет поддержания функции антиоксидантных систем организма.

Вышеизложенное позволяет констатировать, что оптимальная схема определения функциональной активности БАД-парафармацевтиков должна включать изучение их влияния на систему иммунитета, резистентность к стрессорным воздействиям разнообразной природы (физическая нагрузка, длительный стресс, химические и т. д.) и на окислительно-антиокислительный статус организма. Правильность именно такого подхода к экспериментальной оценке эффективности БАД-парафармацевтиков вытекает из известных и многократно доказанных учеными разных стран фактах о том, что поражение именно этих систем лежит в основе наиболее распространенных заболеваний человека. Взаиморегуляция нервной, иммунной и окислительно-антиокислительной систем определяет надежность их совместной деятельности. Нарушение же функциональной активности одной из этих систем резко повышает риск развития функциональных расстройств общих механизмов зашитно-приспособительных реакций на воздействие факторов окружающей и внутренней среды организма человека. Так, например, нарушение нейрорегуляторных механизмов реализации адаптационного синдрома может играть важную роль в патогенезе иммунологических расстройств и дизрегуляции радикальных окислительных процессов, а иммунологические механизмы, в свою очередь, могут участвовать в патогенезе заболеваний центральной нервной системы и формировании окислительного стресса (136).

Учитывая это, для большей информативности и удешевления исследований эффективности БАД-парафармацевтиков следует использовать унифицированные экспериментальные модели. Примером может служить модель истощающей физической нагрузки, которая кроме непосредственного изучения адаптогенного действия БАД-парафармацевтика дает возможность исследования его влияния на показатели иммунной (ФНО, ИЛ-2) и окислительно-антиокислительной (МД, каталаза) систем. Использование данной модели позволяет установить функциональную, энантиостатическую безопасность* (Mangum, Towle,1977) БАД-парафармацевтиков для здоровья человека, тем самым предопределяя обязательность такого рода исследований.

В случае, когда назначение БАД-парафармацевтика предполагает наличие какого-либо преимущественного эффекта или эффектов (радиопротекторного, иммуномодулирующего, антиоксидантного и т. д.) необходимо дополнительное изучение активности таких БАД в экспериментах, моделирующих соответствующие нарушения.

Так, для определения специфических эффектов БАД-парафармацевтиков можно использовать следующие методические подходы:

- *радиопротекторного действия БАД-парафармацевтиков* – мышей облучают сублетальными дозами рентгеновского излучения (200—300 Рад) и изучают влияние БАД на показатели иммунной системы, с добавлением методов оценки пролиферативной и антителообразующей активности клеток селезенки и ОАО системы;
- *иммуномодулирующего действия БАД-парафармацевтиков* – мышам вводят циклофосамид или циклоспорин А (применение того или иного иммунодепрессанта определяется преимущественным действием БАД на конкретное звено иммунной реакции) и изучают влияние БАД на показатели иммунной системы с добавлением методов определения пролиферативной и антителообразующей активности клеток селезенки мыши;
- *антиоксидантного действия* – мышам вводят раствор четыреххлористого углерода и изучают показатели ОАО системы, с добавлением методов определения диеновой коньюгации ПНЖК и гидроперекиси липидов;
- *резистентности к инфекциям* – мышей заражают штаммом S. typhi и изучают показатели иммунной системы с добавлением метода определения неспецифической резистентности к инфекциям;

---

* Энантиостатическая безопасность – поддержание функции.

• *изучение адаптогенного действия парафармацевтиков* проводят на стандартных моделях различных экстремальных условий (повышенная физическая нагрузка, гиподинамия), а также исследуют эмоциональные поведенческие реакции животных.

Лабораторные животные

Для изучения функциональной активности БАД-парафармацевтиков различной природы используют мышей-самцов линии CBA/CaLacSto. Количество животных в опытной группе следует определять с учетом используемой модели исследования, кратности обследования животных и подсчета статистически достоверных результатов (137). В качестве контроля используют группу здоровых интактных мышей той же линии.

Модель истощающей физической нагрузки

Влияние на общую физическую выносливость следует определять на мышах с помощью стандартной методики – плавания животных в бассейне с температурой воды (20 ± 0,5) °С. Для уменьшения вариабельности получаемых результатов к каждой мыши подвешивают груз (5 % от массы тела), не затрудняющий движения животного.

Исследуемую добавку вводят животным внутрижелудочно за 40 мин до помещения их в бассейн. Контрольным животным вводят тот же объем дистиллированной воды или физиологического раствора. Продолжительность плавания регистрируют в секундах. Контрольную и опытную группы животных делят на две подгруппы. Первую подгруппу мышей забивают сразу же после проведения опыта, выделяют селезенку (для изучения иммунной системы), печень и эритроциты (для изучения ОАО системы). Вторую подгруппу животных забивают спустя 1 ч после опыта и также выделяют селезенку, печень и эритроциты для изучения темпов восстановления исследуемых показателей (138).

Изучение адаптогенного действия БАД-парафармацевтиков

Общие положения

В развитии адаптационных реакций, которые являются ответом на значительную физическую, стрессорную, гипоксическую или любую другую нагрузку выделяют два этапа: этап срочной, но несовершенной адаптации и последующий этап относительно устойчивой и достаточно совершенной долговременной адаптации (139). Срочный этап адаптационной реакции возникает непосредственно после начала действия раздражителя и, следовательно, может реали-

зоваться лишь на основе готовых, ранее сформировавшихся биологических механизмов. Важнейшая черта этого этапа адаптации состоит в том, что деятельность организма протекает на пределе его физиологических возможностей при полной мобилизации функционального резерва – и далеко не в полной мере обеспечивает необходимый адаптационный эффект. Другим неотъемлемым компонентом срочной адаптации при достаточно интенсивном действии патологических факторов окружающей и внутренней среды организма человека является значительная стресс-реакция со всеми ее проявлениями, т. е. увеличением концентрации катехоламинов, кортикостероидов, медиаторов, эозинопенией и т. д. Наконец, существенным компонентом срочной адаптации может оказаться более или менее выраженное повреждение организма, проявляющееся отрицательным азотистым балансом, увеличением пероксидации липидов, ферментемией и т. д. (139).

Долговременный этап адаптации возникает постепенно в результате длительного или многократного действия на организм факторов среды. По существу он развивается на основе многократной реализации срочной адаптации и характеризуется тем, что в итоге постепенного количественного накопления каких-то изменений организм приобретает новое качество.

Таким образом, в зависимости от продолжительности действия патологического фактора, адаптация может быть кратковременной или долговременной (140).

Специфичность адаптации проявляется в реакциях доминирующих систем т. е. функциональных систем организма, изменение функции которых обеспечивает гомеостаз под влиянием изменяющихся условий существования (141). Доминирующими системами могут быть системы различных видов нервной деятельности, транспорта жидких тканей, газов и метаболитов, мышечного сокращения, кислотно-щелочного состояния, терморегуляции, гемеостаза, иммунитета и т. д. В функциональной системе, ответственной за адаптацию различают эффекторную и управляющую части (142).

Эффекторная часть представлена выполняющими специализированную функцию элементами (субсистемными, структурно-функциональными единицами органов, тканями, клетками, ультраструктурами, метаболическими путями) Управляющая часть состоит из центрального и периферического звеньев нейрогуморальной регуляции (Данное разграничение довольно условно, так как механизмы, распределяющие каскады метаболических реакций между эф-

фекторной и управляющей частями недостаточно изучены). Эффекторная часть определяет специфическую функцию (например повышение физической выносливости и работоспособности за счет возбуждения соответствующих моторных центров, мобилизации скелетных мышц, а также кровообращения и дыхания). Управляющая часть обеспечивает адаптивное изменение специализированной функции клетки путем ее мобилизации или перевода в неактивное состояние, новообразования или редукции ее структурных или молекулярных компонентов (например изменение эмоциональных поведенческих реакций, а также иммунного и окислительно-антиокислительного статуса) (143).

В связи с этим БАД к пище следует изучать на обе составляющие адаптивной реакции организма к действию различных раздражителей.

Методы оценки адаптогенного действия БАД-парафармацевтиков

а. Оценка влияния БАД-парафармацевтиков на выносливость мышей к скоростной нагрузке.

Влияние на выносливость к скоростной физической нагрузке следует определять на 10-дорожном третбане при скорости движения полотна 40 м/мин.

Моментом окончания опыта считается пребывание животных на электрической сетке третбана под напряжением 25 В более 10 с. Опыт проводят при двух функциональных состояниях животных: на фоне относительного покоя (свободного содержания животных в клетках) и на фоне предварительной физической нагрузки. Нагрузку осуществляют с помощью принудительного бега животных в третбане при скорости движения ленты 28 м/мин в течение 5 мин. Животные, получившие предварительную физическую нагрузку, разделяются на 2 подгруппы. В первой подгруппе мыши подвергаются однократной физической нагрузке в течение 5 мин. Вслед за этим животным вводят изучаемую БАД и спустя 1 ч исследуют скоростную выносливость. Животные второй группы ежедневно получают дозированную физическую нагрузку в течение 7 дней. В первый день длительность бега составляет 5 мин, в другие дни продолжительность нагрузки последовательно увеличивают на 1 мин. Сразу же за проведением нагрузки мышам вводят изучаемую БАД. На 7-й день через 1 ч после последнего введения добавки у животных изучают скоростную выносливость. Во всех экспериментах БАД-парафарма-

цевтики вводят «per os», а животным контрольных групп – дистиллированную воду в том же объеме (138).

б. Оценка действия БАД-парафармацевтиков на переносимость животными физических нагрузок.

Влияние на переносимость физических нагрузок следует изучать, вызывая у животных состояние стресса в сочетании с гиподинамией, при подвешивании мышей за шейную складку в течение 3-х дней по 18 ч ежедневно. В интервале между экспериментальными «подвешиваниями» животные получают полноценное питание в условиях вивария. Введение БАД-парафармацевтика осуществляется алиментарным путем. Контрольные мыши во время «подвешивания» подопытных животных лишаются воды и пищи. Оценку работоспособности проводят по продолжительности бега животных в третбане при скорости движения полотна 28 м/мин (138).

в. Оценка действия БАД-парафармацевтиков на эмоциональные поведенческие реакции животных.

Используют метод спровоцированных эмоциональных реакций (Гацура, 1974).

Изучение свойств БАД проводят методом электростимуляции попарно сгруппированных животных (Thedeschi et. al. 1959) в модификации Полевого Л. Г. (1967) и Кудрина А. И. (Кудрин, Пономарева, 1967). Сущность методики заключается в возможности дифференцированно оценивать пороги эмоциональных поведенческих реакций страха и ярости (агрессивности) у мышей путем градуального повышения напряжения электрической площадки, на которую помещают 2-х животных. Изучаемую БАД вводят за 40 мин до посадки животных на электрическую площадку (Полевой, 1967, 1970).

Изучение иммуномодулирующего действия БАД-парафармацевтиков

Общие положения

Во всех случаях развития адаптивных реакций происходит активация иммунной системы как конкретного звена управляющей части функциональной системы, ответственной за адаптацию. В основе иммуноадаптивных процессов лежат межклеточные взаимодействия, опосредованные гуморальными факторами. Полипептидные факторы неиммуноглобулиновой природы, относящиеся к медиаторам неиммунологических реакций, получили название цитокинов. Подобно регуляторным субстанциям другой природы и гормонам цитокины по характеру действия представляют собой факто-

ры роста или дифференцирования клеток и реализуют свое действие через обычные для подобных факторов механизмы. Основными цитокинами, включающими группу приспособительных реакций функциональной системы, являются медиаторы естественного иммунитета, которые, действуя на клетки-мишени разных органов, изменяют их функции. В результате выявляются следующие эффекты:

- в печени происходит усиление синтеза белков острой фазы (С-реактивный белок, гаптоглобин, церулоплазмин и т. д.) и их выделение в кровь;
- в костном мозге стимулируется развитие нейтрофилов, что приводит к нейтрофилии. Усиливается их хемотаксис и активируется образование этими клетками лактоферрина;
- активируются центры терморегуляции в гипоталамусе (действие в качестве эндогенных пирогенов);
- стимулируется катаболизм белков в мышцах. Образующиеся аминокислоты поступают в печень, где они используются для синтеза белков острой фазы и глюконеогенеза (135).

Типичным представителем группы медиаторов естественного иммунитета, которые непосредственно участвуют в развитии иммунной реакции на действие раздражителя является фактор некроза опухоли – ( ) (ФНО-).

ФНО- является медиатором широкого спектра действия, посредством которого осуществляется регуляция функциональной активности клеток иммунной и воспалительной системы организма. Биологическое действие ФНО-, подобно влиянию ЛПС, определяется его концентрационной зависимостью. В низкой концентрации порядка 10^{-9}М, действует на лейкоциты и клетки эндотелия локально, т. е. по паракринному или аутокринному типу. В результате ФНО- вызывает на клетках эндотелия сосудов появление новых рецепторов адгезии лейкоцитов, прежде всего нейтрофилов, а затем и моноцитов и лимфоцитов. Усиление адгезии клеток на сосудистых стенках вызывает появление очагов локального воспаления. В пределах данных очагов лейкоциты усиливают бактериальный киллинг, а действие ФНО- на мононуклеарные фагоциты и другие типы клеток активирует продукцию цитокинов, включая ИЛ-1, ИЛ-6, хемокинов и самого ФНО-. Таким образом, возникает каскад цитокиновых реакций, регулирующий активность локального иммунного и воспалительного процесса. Кроме того, ФНО- обладает интерферон-подобным действием, усиливает экспрессию антигенов 1 класса

МНС и цитолитическую активность Т-лимфоцитов ($CD8^+$) в отношении вирус-инфицированных клеток (144, 145, 146).

Другая группа медиаторов включает цитокины, регулирующие активацию, рост и дифференцирование лимфоцитов. Среди них наиболее важным и хорошо изученным медиатором является интерлейкин-2 (ИЛ-2).

ИЛ-2 является ключевым цитокином, активирующим митотическую активность и переход клетки из фазы G 1 в фазу S. Основное количество ИЛ-2 продуцируется Т-лимфоцитами CD-4+ и гораздо меньший вклад для образования медиатора имеют Т-лимфоциты CD8+. Основными клетками-мишенями ИЛ-2 являются сами клетки-продуценты, то есть данный медиатор выполняет роль аутокринного фактора активации и созревания Т-лимфоцитов. Регуляция роста и созревания Т-лимфоцитов, прежде всего хелперных CD-4+ лимфоцитов, включает механизм последовательного взаимодействия ИЛ-2 с рецепторами разной аффинности. Созревание покоящихся Т-лимфоцитов ограничено действием высокой концентрации ИЛ-2, а пролиферация активированных лимфоцитов – диапазоном его низких концентраций.

Указанные взаимодействия ИЛ-2 и Т-лимфоцитов осуществляются преимущественно по аутокринному типу. Однако ИЛ-2 может оказывать действие и на клетки ближайшего окружения, выполняя функции паракринного ростового фактора CD-4+ и CD-8+ Т-лимфоцитов. В период развития физиологической иммунной реакции на антиген ИЛ-2 не поступает в кровяное русло. Поэтому при нормальном течении иммунного ответа его действие как эндокринного ростового фактора не проявляется. Локальная продукция ИЛ-2 в зоне созревания CD-4+ и CD-8+ клеток позволяет регулировать количество и соотношение субпопуляций Т-лимфоцитов, определяя тем самым величину иммунного ответа на Т-зависимые антигены. Кроме того, ИЛ-2 стимулирует В-лимфоциты и усиливает продукцию специфических антител (5, 6, 14, 21).

Таким образом, в механизмах адаптационных изменений иммунного статуса организма ведущая роль принадлежит продукции таких медиаторов иммуногенеза, как ФНО- и ИЛ-2. В этой связи влияние БАД к пище на иммунную систему следует оценивать по изменению уровня продукции иммунокомпетентными клетками вышеупомянутых цитокинов.

Методы оценки действия БАД к пище на показатели иммунной системы

При оценке специфической активности БАД в отношении показателей иммунной системы необходимо исследовать ее действие не только на уровень секретируемых иммунокомпетентными клетками растворимых медиаторов иммуногенеза, но и исследовать следствия изменения продукции цитокинов т. е. изучать клеточный и гуморальный ответ. Комплексное иммунологическое исследование необходимо для решения вопроса о сохранении функциональной полноценности иммунной системы после применения БАД.

Как известно, одним из важнейших условий формирования иммунного ответа является пролиферация антиген-стимулированных иммунокомпетентных клеток под действием медиаторов иммуногенеза, в частности ИЛ-2. Моделью такой пролиферации является реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) под воздействием митогенов. Митогены, конканавалин А (КонА) или фитогемагглютинин ФГА, связываясь с рецептором клеточной поверхности, приводят к продукции ИЛ-1 и ФНО, способствующих усилению экспрессии рецептора для ИЛ-2 – основного фактора пролиферации Т-лимфоцитов. Кроме того, ИЛ-2 стимулирует В-лимфоциты и усиливает продукцию специфических антител. Наиболее распространенный экспериментальный подход изучения гуморального иммунитета заключается в инициации процесса антигензависимой пролиферации и дифференцирования В-лимфоцитов, являющихся предшественниками антителообразующих клеток.

Для статистической обработки данных следует использовать критерий t Стьюдента, представляя среднюю ошибку и ошибку средней (M + m) (147).

1. Оценка влияния БАД на показатели иммунной системы интактных мышей

а. Определение влияния БАД на неспецифическую резистентность мышей к бактериальной инфекции.

Мышам вводят перорально и внутривенно БАД в трех дозах. Контролем служат мыши, не получавшие БАД. На каждую дозу берут по 10 мышей. Через 24 ч всех мышей внутрибрюшинно заражают штаммом S. tiphi 4446, ресуспендированным в 0,5 %-ном муцине или используют любую другую инфекционную модель. Заражающая доза равна 100 LD_{50}, оттитрованная на интактных мышах предварительно. Гибель животных учитывается в течение 5 сут. Параллельно ставят

контроль вирулентности используемого штамма. Через 5 сут подсчитывают ЕД-50 по формуле Кебера (Ашмарин И. Л., Воробьев А. А., 1962) или любым другим статистическим методом.

Статистически значимое уменьшение значения ЕД-50 в опытных группах свидетельствует о стимулирующем действии БАД, увеличение – о супрессивном.

б. Определение уровня антител в сыворотке крови мышей к корпускулярному тимусзависимому антигену.

Для определение антител в сыворотке крови мышей используют эритроциты барана. Иммунизируют мышей 2-х линий: С57В1 – низкореагирующие на эритроциты барана и мышей линии СВА – высокореагирующие. Опытную группу мышей (5 мышей) внутрибрюшинно иммунизируют 0,5 мл эритроцитами барана (концентрация 20 млн. кл/мл). Эритроциты барана предварительно 3 раза отмывают 0,9 %-ным раствором хлорида натрия путем центрифугирования 7 мин при 400 *g* и доводят до концентрации 50 млн. кл/мл. Одновременно этой же группе животных вводят исследуемую добавку к пище в трех дозах. Контролем служат две группы мышей: одна группа – интактные мыши, другая иммунизирована только эритроцитами барана. Через равные промежутки времени, начиная с 4-го дня после введения препаратов, у каждой мыши берут кровь из ретроорбитального пространства. Срок исследования – не менее 21 дня. Из крови мышей получают сыворотку, которую титруют в реакции прямой гемагглютинации общепринятым методом.

Подсчитывают среднеарифметическую титра гемагглютиногенов в сыворотке крови опытной группы мышей. Увеличение титров гемагглютиногенов в сыворотке крови опытной группы мышей свидетельствует о стимулирующем действии БАД.

в. Определение уровня антител в сыворотке крови мышей к растворимому тимусзависимому антигену.

В качестве растворимого тимусзависимого антигена используют бычий сывороточный альбумин (БСА).

Мышей иммунизируют БСА дозой 50 мкг в 0,5 мл 0,9 %-ного раствора хлорида натрия внутрибрюшинно. Исследуемые продукты вводят в трех дозах одновременно с БСА или за 30 мин до иммунизации БСА. Контролем служат две группы мышей: одна группа получает только БСА (без БАД), другая интактная.

На 28 день после иммунизации проводится ревакцинация мышей той же дозой БСА и берется кровь у мышей на 7, 14 и 21 дни после ревакцинации. Получают сыворотку крови и исследуют ее в реакции РПГА на наличие гемагглютининов к БСА общепринятым методом.

Для постановки РПГА готовят эритроцитарный диагностикум. Формалинизированные эритроциты в 50 %-ной концентрации трехкратно отмывают 0,9 %-ным физиологическим раствором центрифугированием при 400 g 10 мин. После чего концентрация эритроцитов доводится до 2,5 %.

На 1000 мл диагностикума берется 50 мг танина, 2 л буфера pH 7,2 (фосфатного), все смешивается и энергично встряхивается 10 мин. После чего производится осаждение и двукратное отмывание эритроцитов на центрифуге при том же режиме. Ресуспензируют фосфатным буфером (pH 6,4) до 1 л. Затем на 1000 мл эритроцитов (2,5 %) добавляют 250 мг БСА, перемешивают и помещают в термостат на 24 ч при 37 °С, перемешивают не менее 5 раз. После инкубирования добавляют 10 мл формалина, перемешивают и помещают в термостат на 30 мин. После этой процедуры отмывают физиологическим раствором (pH 7,2) два раза, затем ресуспензируют буфером pH 7,2 с добавлением формалина так, чтобы в конечном продукте содержалось 2,5 % эритроцитов и 1 % формалина. Для постановки реакции обязательно применяется 0,9 %-ный физиологический раствор, содержащий 1 % формалина.

Подсчитывают среднеарифметическую титра гемагглютиногенов в группе и определяют их разницу по критерию Стьюдента.

Увеличение титров антител в опытных группах свидетельствует о стимулирующем действии их проявления вторичного иммунного ответа БАД.

г. Определение поликлональной активности В-лимфоцитов.

Активность В-лимфоцитов определяется на модели подсчета спонтанных «фоновых» клеток селезенки мышей, продуцирующих антитела к эритроцитам барана (АОК) методом локального гемолиза эритроцитов в геле. Опытной группе мышей двух линий (по три мыши) вводят БАД. На 5—7 день мышей забивают, извлекают селезенки и готовят взвесь спленоцитов (концентрация 100 млн. кл/мл). Эритроциты барана отмывают 0,9 %-ным раствором хлорида натрия путем центрифугирования 7 мин при 400 g три раза. Приготавливают 0,9 %-ный раствор агара «Дифко» с раствором Хенкса, доводят pH раствора до 7,2 1 %-ным раствором КН PO_4 или NaOH по цвету индикатора, находящегося в растворе Хенкса. Для приготовления 10 чашек Петри необходимо 225 мг агара, 22,5 мл дистиллированной воды и 2,5 мл раствора Хенкса. К приготовленному раствору агара добавляют отмытые эритроциты барана из расчета получаемой концентрации эритроцитов 20—30 млн. в 1 мл.

Полученную рабочую смесь разливают по 2,5 мл в пробирки, которые помещают в водяную баню при температуре 43—44 °С. В каждую пробирку добавляют по 0,2 мл взвеси исследуемых клеток селезенки, перемешивают и выливают на чашку Петри. Через 5—7 мин чашки помещают в термостат при температуре (37 ± 2) °С на 1 ч, затем в каждую чашку выливают по 2,5 мл разведенного в 5 раз средой 199 сухого комплемента морской свинки (при использовании свежезамороженного комплемента его разводят в 10 раз). Чашки Петри оставляют при комнатной температуре на 30 мин и затем подсчитывают макроскопически число зон гемолиза в каждой чашке Петри. Рассчитывают число клеток, образующих антитела на селезенку и на 1 млн. ядросодержащих клеток селезенки.

Полученные результаты в опытных группах сравнивают с контролем (группа мышей, не получавшая БАД). Увеличение количества АОК после введения БАД свидетельствует о поликлональной активности В-лимфоцитов.

д. Определение гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) к эритроцитам барана.

Мышей одного веса, одной линии разделяют на 2 группы. Опытной группе мышей вводят подкожно в межлопаточную область эритроциты барана в дозе 10 млн. клеток на одну мышь в объеме 0,1 мл. Одновременно «per os» этим же мышам вводят БАД. Вторая группа мышей – интактная. На 5 день всем мышам обеих групп в подушечку одной задней лапки вводят разрешающую дозу эритроцитов барана в концентрации 1 млрд. кл/мышь в объеме 0,02 мл. В контрлатеральную подушечку лапки в том же объеме – 0,9 %-ный раствор хлорида натрия. Местную воспалительную реакцию оценивают через 18—20 ч путем определения веса опытной (P_o) и контрольной ($P_к$) лапок мышей. Забивают мышей хлороформом. Отделяют лапки по выступу кости ниже сочленения большеберцовой кости и выше пяточного сустава.

Интенсивность местной реакции определяют по индексу реакции (*ИР*), рассчитываемому по формуле:

$$ИР = (P_o - P_к) : P_к \cdot 100\,\%$$

Препарат, влияющий на клеточное звено иммунитета, вызывает изменение индекса реакции.

е. Определение фагоцитарной активности макрофагов под влиянием БАД.

Опытной группе (3—5 мышей) вводят БАД в дозе, оптимальной для человека. Контролем служат интактные животные. От заби-

тых животных получают перитонеальный эксудат (ПЭ) путем 2—3-кратного промывания брюшной полости мышей средой 199, содержащей 5 МЕ гепарина в 1 мл. ПЭ собирают в центрифужные пробирки, стоящие на льду. После центрифугирования ПЭ при 150 g в течение 10 мин клетки ресуспендируют в среде 199 с 10 %-ной сывороткой крупного рогатого скота и антибиотиками (100 ед. в мл). Концентрацию клеток доводят до 2 млн. кл/мл и разливают по 2 мл в чашки Петри диаметром 40 мм. Чашки помещают в термостат с содержанием 5 % углекислого газа. Через 1 ч смывают не прилипшие клетки раствором Хенкса, добавляют 2 мл среды 199 и помещают в термостат с углекислым газом на 18—24 ч.

Объектом фагоцитоза могут служить эритроциты барана, лабораторные штаммы Staphilococcus или любые другие микроорганизмы.

Суточные культуры живых или убитых прогреванием при температуре (90 ± 2) °С микроорганизмов отмывают не менее трех раз 0,9 %-ным раствором хлорида натрия. Определяют концентрацию суспензии микробных клеток по стандарту оптической плотности. Суспензию клеток разводят средой 199 до концентрации 10—20 млрд. кл/мл

Эритроциты барана отмывают 3-кратно 0,9 %-ным раствором хлорида натрия центрифугированием при 800 g 5 мин и готовят 0,5 %-ную взвесь эритроцитов в среде 199. Наливают 1 мл среды 199 в чашки Петри с клетками ПЭ, затем вносят 1 мл взвеси эритроцитов барана или микроорганизмов. Через 30—60 мин в чашки Петри наливают холодный раствор Хенкса и тут же выливают, высушивают и фиксируют клетки метанолом. Затем клетки окрашивают азур-эозином по Романовскому-Гимзе.

При учете результатов необходимо просмотреть под микроскопом не менее 200 клеток, подсчитывают фагоцитирующие клетки и количество эритроцитов или микробов в одном макрофаге.

Подсчитывают процент фагоцитирующих клеток и фагоцитарное число.

Результаты, полученные в опытной группе, сравнивают с контролем.

ж. Оценка влияния БАД на продукцию растворимых медиаторов иммуногенеза-цитокинов.

Для определения продукции цитокинов клетки селезенки (КС) мыши инкубируют в течение: 12—14 ч в присутствии ЛПС для инициации синтеза ФНО; 24 ч в присутствии конканавалина А (Кон А) или фитогемагглютинина (ФГА) для инициации синтеза ИЛ-2. Ко-

личественное содержание цитокинов оценивают в надосадочных жидкостях при помощи цитокин-зависимых или цитокин-чувствительных клеточных линий.

з. Определение ФНО-.

Содержание ФНО- в исследуемых образцах надосадочной жидкости (НЖ) КС мыши определяют по прямому лизису клеток ФНО-зависимой клеточной линии L-929 (фибробласты мыши) в присутствии актиномицина D (148). Клетки пересевают по 2030 тыс./лунка в плоскодонные 96-луночные планшеты в среде 199 с добавлением 5 % инактивированной при 56 °С сыворотки крови крупного рогатого скота и инкубируют 24 ч при 37 °С. Образцы НЖ вносят в микропласты в разведениях 1 : 2—1 : 16 и инкубируют при 37 °С в течение 16—20 ч. Результаты реакции учитывают после окрашивания клеток 0,2 %-ным раствором кристалл-виолета в 2 %-ном этаноле в течение 12 мин. Оптическую плотность слоя выживших окрашенных клеток измеряют при длине волны 540 нм на спектрофотометре с вертикальным лучом (Multiscan, Великобритания). В качестве стандарта в данном тесте используют рекомбинантный ФНО-. Количество ФНО- в НЖ оценивают в пкг/мл, используя калибровочные кривые, полученные при использовании стандарта.

и. Определение ИЛ-2.

При определении ИЛ-2 КС мыши культивируют в концентрации $5 \cdot 10^6$ /мл в присутствии 5 мкг/мл Кон А в среде RPMI-1640, содержащей 2 % сыворотки АВ в течение 20—24 ч. Содержание ИЛ-2 в НЖ определяют по способности образцов поддерживать пролиферацию ИЛ-зависимой цитотоксической клеточной линии.

CTLL-2 (лимфоциты мыши), оцениваемую по включению Н-тимидина в ДНК клеток. Уровень включения радиоактивной метки определяют с помощью сцинтилляционного бета-спектрометра. В качестве контроля используют раствор рекомбинантного ИЛ-2 с известной активностью. Количество ИЛ-2 в НЖ оценивают в МЕ/мл, используя калибровочные кривые, полученные при использовании стандарта.

к. Оценка влияния БАД на пролиферацию Т-лимфоцитов при циклоспорин-индуцированной иммунодепрессии.

Мышей самцов линии Balb/c иммунизируют внутривенно эритроцитами барана в оптимальной дозе ($5 \cdot 10^8$), с целью индукции иммунодепрессии через 24 ч вводят циклоспорин А внутрибрюшинно в дозе 100 мг/кг. Через 4 ч изучаемую БАД в различных дозах, еще через 4 ч животных забивают, извлекают клетки селезенки, ко-

торые культивируют с Кон А (митогеном, реализующим свой эффект преимущественно на Т-клетки) в течение 72 ч. Степень пролиферации клеток селезенки мыши оценивают по включению в ДНК лимфоцитов тимидина, меченного тритием, который вносят в культуру за 4—6 ч до окончания инкубации. Количество включенного клетками изотопа после соответствующей обработки измеряют на сцинтилляционном бета-счетчике (149).

л. Оценка влияния БАД на гуморальный иммунный ответ.

Мышей самцов Balb/c иммунизируют внутривенно эритроцитами барана в оптимальной дозе ($5 \cdot 10^8$), через 24 ч вводят циклоспорин А (мощный иммунодепрессант, оказывающий свое действие преимущественно путем ингибиции процессов активации Т-лимфоцитов) внутрибрюшинно в дозе 100 мг/кг, еще через 4 ч – изучаемую БАД в различных дозах (рекомендуемая доза обязательна). На 4 сутки после иммунизации определяют число антителообразующих клеток в селезенке мыши методом локального гемолиза в агарозном геле по Jerneи Nordin (150).

Методы исследования аллергических свойств биологически активных добавок к пище

1. Оценка влияния БАД на общую анафилактическую реакцию.

Морских свинок 200—250 г сенсибилизируют подкожно каким-либо чужеродным белком. Наиболее удобно использовать нормальную лошадиную сыворотку или бычий сывороточный альбумин в дозе 0,1 мл и 10 мг соответственно. Одновременно свинкам вводят «per os» или внутримышечно исследуемую субстанцию – это опытная группа животных. Контролем служит группа свинок, не получавшая БАД. На 14—21 день после иммунизации свинкам двух групп внутрисердечно или внутривенно вводят ту же или удвоенную дозу антигена, использованного для сенсибилизации. Реакция у животных наступает через 1—2 мин. Наблюдают за животными в течение 30 мин.

Оценка реакции производится по четырехплюсовой системе:

А (+) – кратковременное почесывание носа, взъерошивание шерсти, падение температуры (не менее чем на 1°);

Б (++) – четко выраженные частые почесывания, единичные чихания, падение температуры;

В (+++) – спастический кашель, боковое положение животного, отделение кала и мочи;

Г (++++)– спазм дыхательных путей, конвульсивные движения, судороги. Животные погибают;

Д – реакция отсутствует.

Полученные результаты в контрольной группе сравнивают с результатами в опытной группе.

В качестве положительного контроля используют животных, сенсибилизированных нормальной гетерологической сывороткой и получивших разрешающую дозу в те же сроки. Одновременно разрешающую дозу испытуемой БАД «per os» вводят животным, которые предварительно получили соответствующий объем 0,9 %-ного хлорида натрия – отрицательный контроль.

Индекс синдрома в группе вычисляют по формуле Вейгла (*И*) :

$$И = \frac{(А \cdot 1) + (Б \cdot 2) + (В \cdot 3) + (Г \cdot 4)}{А + Б + В + Г + Д}, \text{ где}$$

А, Б, В, Г, Д – число животных с данной выраженностью синдрома.

Изучаемые БАД не должны вызывать развития смертельного шока.

Изучение действия БАД на показатели окислительно-антиокислительной системы

Общие положения

К основным внутриклеточным химическим повреждающим агентам следует, в первую очередь, отнести свободные радикалы, образование которых приводит к нарушению функционирования клеточных структур, включая биологические мембраны. Наибольшее значение для патологии имеют свободные радикалы кислорода, а также пероксид водорода. Все эти так называемые активные формы кислорода образуются в большом количестве клетками-фагоцитами, а также могут образовываться в митохондриях и эндоплазматической сети других клеток в условиях патологии. Реагируя с ненасыщенными жирными кислотами, входящими в состав мембранных липидов, радикалы инициируют цепную реакцию их перекисного окисления. Реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ) тормозятся антиоксидантными системами клетки, благодаря наличию которых скорость реакции образования гидроксильных радикалов и разветвления цепи окисления липидов находится в пределах физиологической нормы. Постоянное образование прооксидантов уравновешено той же скоростью их дезактивации антиоксидантами. Резкое усиление окислительных процессов при недостаточности системы антиоксидантной защиты приводит к развитию «оксидантного стресса», который рассматривается как один из общих

механизмов повреждения тканей организма. Реакции окислительного стресса являются результатом нарушения взаимоотношений между оксидантной и антиоксидантной составляющими свободнорадикальных процессов за счет гиперактивности или недостаточности одного из указанных компонентов. В ходе реализации окислительного стресса, являющегося реакцией организменного уровня, создаются условия для развития специфических для нервной системы патологических процессов, что в свою очередь усугубляет окислительный стресс в центральной нервной системе (151).

В связи с вышеизложенным, БАД к пище следует изучать как по изменению активности ферментных систем генерирования свободных радикалов кислорода и гидроперекисей, так и по изменению содержания антиоксидантных белков и ферментов, обеспечивающих утилизацию активных форм кислорода, H_2O_2 и липопероксидов.

Методы оценки действия БАД к пище на показатели перекисного окисления липидов

Мышам-самцам линии линии Balb/cвводят 0,25 мл 7 %-ного масляного раствора CC14 – одного из сильнейших стимуляторов ПОЛ, внутримышечно или алиментарно, через 15—20 мин животным «per os» вводят исследуемую БАД к пище (5 животных в группе), 5-ти мышам контрольной группы вводят аналогичный объем физиологического раствора. Через 2 сут животных забивают, выделяют печень и определяют продукты перекисного окисления липидов, такие как диеновые коньюгаты (появляются на начальных этапах перекисного окисления), гидроперекиси липидов (обнаруживаются на более поздних этапах перекисного окисления) и малоновый диальдегид (один из наиболее важных конечных продуктов перекисного окисления липидов).

а. Определение малонового диальдегида в гомогенате печени мыши.

Печень мыши растирают в гомогенезаторе Поттера в 3 мл 0,025 М трис-HCl (pH 7,4), содержащей 0,175 М хлорида калия. Гомогенат по 2,5 мл помещают в центрифужные пробирки и осаждают белок добавлением 1 мл 17 %-ного раствора ТХУ (конечная концентрация 5 %). Образующийся осадок отделяют центрифугированием в течение 10 мин при 4000 g. Надосадочную жидкость переносят в пробирки, добавляют по 1 мл 0,8 %-ного водного раствора 2-тиобарбитуровой кислоты и помещают пробы на 10 мин в кипящую водяную баню. В качестве контроля используют пробы, содержащие вместо надосадочной жидкости буфер (pH 7,4). После развития ро-

зовой окраски пробы охлаждают до комнатной температуры и измеряют оптическую плотность при 532 нм. Количество малонового диальдегида рассчитывают, используя молярный коэффициент экстикции $1{,}56 \cdot 10^5$ $см^{-1} \cdot М^{-1}$, а полученный результат выражают в нмолях на пробу (152).

б. Определение диеновой конъюгации полиненасыщенных высших жирных кислот в гомогенате печени мыши.

Печень мыши растирают в гомогенизаторе Поттера с 9 мл экстрагирующей смеси гептана с изопропиловым спиртом в объемном отношении 1 : 1. Полученную суспензию центрифугируют 10 мин при 4000 g. Надосадочную фракцию переносят в пробирки и добавляют одну десятую часть объема дистиллированной воды. После 2-кратного встряхивания и расслаивания фаз отсасывают гитпановую фазу. К равным объемам по 0,5 мл добавляют этиловый спирт в отношении 1 : 5—1 : 10. Оптическую плотность проб измеряют при 233 нм. В качестве контроля используют только экстрагирующую смесь.

Содержание диеновых конъюгатов рассчитывают, исходя из величины молярного коэффициента экстинкции при 233 нм для сопряженных диенов ПНЖК, равного $2{,}2 \cdot 10^5$ $см^{-1} \cdot М^{-1}$ (152).

в. Определение гидроперекиси липидов в гомогенате печени мыши.

Печень мыши растирают в гомогенизаторе Поттера в 3 мл 0,025 М трис HCL буфера (pH 7,4), содержащей 0,175 М хлорида калия. Гомогенат по 2,0 мл помещают в центрифужные пробирки и осаждают белок добавлением 0,2 мл 50 %-ного раствора ТХУ (конечная концентрация 5 %). Образующийся осадок отделяют центрифугированием в течение 10 мин при 4000 g. 2 мл надосадочной жидкости доводят 96 %-ным этанолом до 27 мл. К равным объемам до 27 мл добавляют 0,2 мл концентрированной соляной кислоты и 0,025 мл 5 %-ного раствора соли Мора в 3 %-ной соляной кислоте, пробы интенсивно встряхивают. Точно через 30 с приливают 1 мл 20 %-ного раствора тиоцианата аммония, после чего развивается малиновая окраска. В качестве контроля используют пробы, содержащие 96 %-ный этанол вместо НЖ. Изменение оптической плотности проводят в течение 10 мин после добавления тиоцианата аммония при 480 нм. Об относительном уровне гидроперекисей в биологическом материале судят по величине оптической плотности при 480 нм (152).

12.3. Экспериментальная схема модели на лабораторных животных для оценки эффективности профилактического действия парафармацевтиков

Вид животных	Количество групп животных	Количество животных в группе	Продолжительность опыта	Название групп
крысы, мыши, кролики и др.	3	8—10	в зависимости от срока получения модели	контроль опыт-1 опыт-2

Описание экспериментальных групп:

контроль – животные находятся на общевиварном рационе или на обычном полусинтетическом рационе;

опыт-1 – крысы вместе с рационом получают изучаемую БАД к пище на протяжении одного месяца;

опыт-2 – крысы на протяжении первого месяца находятся на общевиварном или обычном полусинтетическом рационе.

Через месяц от начала опыта у крыс групп *опыт-1* и *опыт-2* получают модель патологического состояния или помещают их в экстремальные условия.

Далее, используя соответствующие тесты, оценивают профилактические свойства изучаемой БАД.

Конкретные модели патологических и экстремальных состояний изложены в приложениях к разделу «Парафармацевтики».

13. О порядке проведения клинических испытаний биологически активных добавок к пище

1. При направлении Федеральным центром госсанэпиднадзора в экспертный совет Института питания РАМН материалов для проведения гигиенической экспертизы и выдачи заключения с целью последующей Государственной регистрации какого-либо типа БАД вопрос о необходимости проведения клинических испытаний этой БАД решается главным экспертом экспертного совета.

2. Клинические испытания биологически активных добавок к пище осуществляются, как правило, в контролируемых условиях стационара или в амбулаторных условиях в специализированных учреждениях, которые располагают квалифицированными специалистами в области науки о питании или в соответствующей области медицины, современным научным оборудованием, хорошей много-

профильной клинической базой и аккредитованных на проведение подобных исследований в порядке, установленном МЗ РФ.

3. Образцы биологически активных добавок к пище предоставляются фирмой в том количестве, которое предусматривается программой испытания.

4. Схема проведения испытаний биологически активных добавок к пище включает следующие этапы:

• экспериментальную и/или аналитическую оценку основных компонентов БАД к пище на основании представленной фирмой-производителем документации и результатов исследований (см. разделы 4, 5, 6);

• разработку программ клинических испытаний биологически активных добавок к пище, которая определяется, с одной стороны, особенностями химического состава и предполагаемого биологического действия исследуемых БАД на организм, применительно к тем нозологическим формам заболевания, при которых использование добавок с профилактической целью представляется наиболее адекватным и перспективным, а с другой стороны, типом функциональных и метаболических нарушений, свойственных данной патологии;

• определение методики проведения клинических испытаний. Для получения достоверных данных о профилактическом действии БАД к пище необходимым условием является наличие двух групп: основной (опытной) и контрольной. Они могут формироваться из здоровых лиц или больных с определенной патологией. Группы сравнения должны быть максимально сходными по половозрастному признаку, массе тела, пищевому статусу. В случае проведения испытаний на больных, помимо этого учитывается степень тяжести основного заболевания, характер сопутствующей патологии. Оценка эффективности БАД к пище осуществляется на фоне идентичных режимов питания в опытной и контрольной группах. Предпочтительным при этом является использование двойного слепого метода испытаний с применением плацебо в контрольной группе. В процессе проведения клинических испытаний определяются органолептические свойства БАД и их переносимость, осуществляется оценка их эффективности, выявление возможных побочных эффектов;

• помимо общих клинических показателей в план исследований включаются гематологические и специальные функциональные тесты, биохимические, микробиологические, иммунологические и другие показатели. Выбор критериев оценки эффективности апробируемых БАД к пище определяется характером испытуемых БАД и

клинико-патогенетическими особенностями нозологических форм, при которых они применяются;

• продолжительность клинической апробации устанавливается в зависимости от типа БАД к пище и по согласованию с фирмой-заявителем;

• в заключении по итогам испытания БАД должны быть представлены результаты изучения переносимости БАД, ее эффективности, рекомендуемая дозировка БАД, показания к применению, возможные побочные эффекты.

Клиническая оценка эффективности БАД к пище и их переносимости

1. Оценка органолептических свойств БАД и их переносимости

Изучение органолептических свойств БАД осуществляется с использованием анкетно-опросного метода. Оценивается вкус, запах, цвет, консистенция БАД, наличие посторонних запахов и т. д.

Переносимость БАД оценивается путем клинического наблюдения по субъективным и объективным признакам. Исследуется:

• состояние кожных покровов;

• системы пищеварения;

• сердечно-сосудистой системы и других органов и систем организма.

2. Оценка БАД по общеклиническим показателям:

• определение росто-весовых параметров (с использованием индекса Кетле);

• определение других антропометрических показателей (измерение окружности плеча, талии, бедер);

• определение тощей и жировой массы тела (по показаниям);

• оценка влияния БАД на общее состояние наблюдаемого контингента и состояние различных органов и систем организма;

• общий анализ мочи и крови;

• определение биохимических показателей – содержание в сыворотке крови общего белка, холестерина, билирубина, глюкозы, активности аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы, креатинина, азота мочевины.

Все исследования осуществляются в динамике, как минимум 2 раза, до применения БАД и после завершения курса лечения.

3. Перечень дополнительных специальных тестов, используемых при клинических испытаниях различных типов БАД

3.1. Биологически активные добавки к пище – источники белка и аминокислот.

Показатель	Литературный источник
Содержание в сыворотке крови:	
Общий белок	(24)
Белковые фракции (альбумины глобулины)	(26—27)
Креатинин	(100)
Азот мочевины	(101)
Мочевая кислота	(102)
Отдельные аминокислоты (по показаниям)	(133)
Содержание в моче (по показаниям)	
Креатинин	(100)
Азот мочевины	(101)
Отдельные аминокислоты	(23)
Балансовые исследования обмена белка (по показаниям)	(24)

3.2. Биологически активные добавки к пище – источники липидов.

Биохимические показатели

Показатель	Литературный источник
Содержание в сыворотке крови	
Общий холестерин	(103)
Триглицериды	(104)
Липопротеиды высокой плотности (по показаниям)	(107, 108)
Липопротеиды низкой и очень низкой плотности (по показаниям)	(107, 108)
Продукты перекисного окисления липидов (по показаниям) малоновый диальдегид, диеновые коньюгаты	(110)
Аполипопротеины A_1, B (по показаниям)	(133)
Показатели антиоксидантной защиты организма (по показаниям): ферменты (каталаза, супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, глютатионредуктаза) витамин А, витамин Е, витамин С, SH-группы, селен	(36, 35, 42, 109, 111, 133)
Эссенциальные жирные кислоты (по показаниям) Жирно-кислотный состав тромбоцитов и эритроцитов (по показаниям) Содержание и состав фосфолипидов в тканях (по показаниям)	(28) (31) (32)

3.3. Биологически активные добавки к пище – источники углеводов.

Показатель	Литературный источник
Содержание в сыворотке крови	
Гликемия натощак	(57, 58)
Гликемический профиль	(57, 58)
Гликемические кривые с нагрузкой (по показаниям)	(57, 58)
Триглицериды (по показаниям)	(104)
Гликозилированный гемоглобин (по показаниям)	(105)
Содержание в моче	
Содержание глюкозы в суточном количестве мочи	(56, 57)
Реакция на ацетон (по показаниям)	(119)

3.4. Биологически активные добавки к пище, содержащие пищевые волокна (ПВ).

При оценке БАД, содержащих пищевые волокна, используются:

- изучение характера стула;
- капрологическое исследование;
- инструментально-графические тесты, характеризующие моторно-эвакуаторную функцию желудочно-кишечного тракта (по показаниям) (128);
- микробиологический анализ для характеристики изменений в кишечной микрофлоре под влиянием БАД (по показаниям) (125);
- дуоденальное зондирование с определением химического состава желчи (по показаниям): концентрация холестерина, холевой кислоты, дезоксихолевой кислоты, фосфолипидов (124);
- микробиологический анализ желчи (по показаниям);
- изучение аноректического эффекта БАД;
- биохимические показатели:

Показатели	Литературный источник
Содержание в сыворотке крови	
Холестерин	(103)
Билирубин	(97)
Щелочная фосфатаза	(98)
Глюкоза (по показаниям)	(57, 58)
Витамины группы В, С (по показаниям)	(35, 38, 39)
Фолиевая кислота (по показаниям)	(35)
Минеральные вещества (по показаниям)	(35, 41)
Липиды в кале (по показаниям)	(120)

3.5. Биологически активные добавки к пище – источники витаминов.

При изучении эффективности БАД, основными компонентами которых являются витамины, критерием оценки служит динамика изменения витаминной обеспеченности организма под влиянием этих БАД к пище по содержанию витаминов в сыворотке крови и выделению их с мочой.

3.6. Биологически активные добавки к пище – источники минеральных веществ.

Эффективность этой категории БАД к пище подтверждается путем изучения динамики изменения концентрации соответствующих микро- или макроэлементов в биологическом материале, а также тех биологических эффектов, которые реализуются в организме в процессе накопления вводимых с БАД нутриентов.

Так, эффективность содержащих железо БАД определяется по показателям гемоглобинового и транспортного фонда железа:

Показатели в периферической крови	Литературный источник
Гемоглобин	(106)
Количество эритроцитов	(106)
Цветной показатель	(106)
Концентрация железа в сыворотке крови	(41, 121)
Коэффициент насыщения трансферрина (по показаниям)	(106)
Трансферрин (по показаниям)	(43)
Церулоплазмин (по показаниям)	(43)

3.7. Биологически активные добавки к пище с эубиотическим действием на основе чистых культур микроорганизмов.

Исследование влияния биологически активных добавок к пище на микробиоценоз кишечника проводят с использованием питательных сред для учета основных групп микроорганизмов:

Исследуемые группы и отдельные роды, виды микроорганизмов	Питательные среды
Анаэробные микроорганизмы (общее количество)	Кровяной агар (I H – среда)
Аэробные микроорганизмы (общее количество)	Кровяной агар

Продолжение

Бифидобактерии	Бактофок; Среда Блаурокка; кукурузно-лактозная среда
Лактобациллы	Среда МРС, обезжиренное молоко
Энтеробактерии	Среда Эндо, среда Плоскирева и другие
Условно-патогенные (цитратассимилирующие) энтеробактерии	Цитратный агар
Стафилококки	Желточно-солевой агар
Staph. aureus	Baird – Parker
Стрептококки (общее количество)	Кровяной агар
Энтерококки: faecalis и faecium	Молочная среда с полимиксином
Сульфитредуцирующие клостридии	Железосульфитная среда
Дрожжеподобные грибы	Среда Сабуро
Дрожжеподобные грибы рода Candida	Рисовый агар

Литературный источник: (112, 113).

4. Парафармацевтики, оказывающие влияние на состояние организма в целом и состояние отдельных его систем

При исследовании воздействия парафармацевтиков, оказывающих влияние на функциональное состояние организма в целом и отдельных его систем, используются методы врачебного контроля, характеризующие клиническое состояние пациентов, и соответствующие инструментально-лабораторные показатели.

4.1. Парафармацевтики, оказывающие влияние на центральную и периферическую нервную систему.

а. Показатели, характеризующие психоэмоциональный статус пациента.

б. Влияние на сон.

в. Динамика артериального давления и пульса.

4.2. Парафармацевтики, влияющие на состояние сердечно-сосудистой системы.

- Динамика артериального давления и частоты пульса.
- Электрокардиографическое исследование.
- Холтеровское мониторирование – по показаниям.
- Эхокардиография (по показаниям).

д. Лабораторные тесты:

Показатели	Литературный источник
Содержание в сыворотке крови	
Фибриноген	(114)
Фибринолитическая активность	(114)
Протромбиновый индекс и другие показатели системы гемакоагуляции	(114)
Холестерин	(103)
Триглицериды	(104)
Липопротеиды низкой и очень низкой плотности (по показаниям)	(133)
Аполипопротеины A_1, B (по показаниям)	(133)
Липопротеиды высокой плотности	(107, 108)
Продукты ПОЛ (малоновый диальдегид, диеновые коньюгаты) (по показаниям)	(110)
Показатели антиоксидантной защиты организма (глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза, каталаза, супероксиддисмутаза, витамин А, Е, С, SH-группы, трансферрин, селен) (по показаниям)	(35, 36,42, 109, 111, 133)

4.3 Парафармацевтики, оказывающие влияние на пищеварительную систему.

Тесты, характеризующие состояние желудка

- Изучение желудочной секреции (по показаниям).

а. «Тонкий зонд с нагрузкой» (пентагастрин, инсулин, гистаминпентагастрин+ глютамат натрия).

Исследования желудочного сока на кровь, слизь, цитологию, пепсин.

б. pH-метрия (2—3-точечная, 24-часовое исследование на переносимость и реактивность пищи и ферментных препаратов).

в. Радиотелеметрия.

г. Рентгеноскопия желудка и 12-перстной кишки (по показаниям).

- Эзофагогастродуоденоскопия (по показаниям).

Забор биопсийного материала на морфологию, содержимое желудка на цитологию, исследование на наличие хеликобактериоза.

- Исследование моторики пищевода и желудка (по показаниям).

Тесты, характеризующие состояние кишечника

- Пассаж бария по тонкой кишке (транзит) (по показаниям).
- Ирригоскопия (по показаниям).
- Гептороманоскопия (по показаниям).
- Колоноскопия (по показаниям) (еюноперфузия).
- Исследование кишечного транзита радионуклидным методом (по показаниям).
- Копрологическое исследование кала (по показаниям).
- Микробиологическое исследование кала на дисбактериоз.
- Исследование моторики кишечника инструментально-графическим методом (по показаниям).

Тесты, характеризующие состояние поджелудочной железы

- УЗИ поджелудочной железы (по показаниям).
- Эндоскопическая холангопанкреатикография (по показаниям).
- Исследование в сыворотке крови и моче панкреатических ферментов; в дуоденальном содержимом (по показаниям).
- Сцинтиграфия, сканирование поджелудочной железы (по показаниям).

4.4. Парафармацевтики, обладающие желчегонными, гепатопротекторными свойствами

- Изучение желчевыделительной функции гепатобилиарной системы с использованием дуоденального зондирования и определения химического состава желчи (по показаниям) (124).
- Холецистографическое исследование (по показаниям) для изучения динамики двигательной функции желчного пузыря под влиянием БАД к пище.
- УЗИ желчного пузыря и печени.
- Микробиологический анализ желчи (по показаниям)
- Сцинтиграфия печени (по показаниям) (124).
- Сканирование печени (по показаниям) (124).
- Пункциональная биопсия печени (по показаниям).

Биохимические показатели

Содержание в сыворотке крови	Литературный источник
Холестерин	(103)
Билирубин (прямой, непрямой)	(97)

Продолжение

Аланинаминотрансфераза	(92)
Аспартатаминотрансфераза	(92)
Щелочная фосфатаза	(98)
Амилаза	(115)
Тимоловая проба	(116)
Сулемовая проба	(116)
Гаммаглютаминтранспептидаза (по показаниям)	(133)
Гаммаглютаминтрансфераза (по показаниям)	(123)
Альдолаза (по показаниям)	(94)
Глютаматдегидрогеназа (по показаниям)	(122)

4.5. Парафармацевтики, обладающие диуретическими свойствами.

- Определение суточного диуреза.
- Контроль за уровнем артериального давления.
- Определение концентрации калия и натрия в сыворотке крови, эритроцитах и моче (по показаниям).
- Определение кислотно-основного состояния крови (по показаниям).
- Показатели системы свертывания крови (по показаниям).
- Электрокардиографическое исследование в динамике.

4.6. Парафармацевтики, обладающие общеукрепляющим и противовоспалительным действием.

По показаниям изучается состояние гуморального и клеточного иммунитета, интенсивность процессов перекисного окисления липидов и показатели антиоксидантной защиты организма.

Показатели гуморального иммунитета – количество В-клеток ($СД_{19}$, $СД_{20}$).

Иммуноглобулины основных классов (JgA, JgM, JgG) (132).

Показатели клеточного иммунитета – фенотипирование Т-клеток ($СД_3$ – общий Т-лимфоцитов $СД_4$ – хелперы, $СД_8$ – цитотоксические клетки супрессоры) (132).

Неспецифический иммунный ответ-компоненты системы комплемента, определение числа фагоцитирующих клеток и фагоцитарного индекса, генерация супероксидного аниона нейтрофилами (O_2^*) (132).

4.7. Критерии анорексигенной активности БАД.

Оценка биологически активных добавок к пище анорексигенного действия осуществляется по степени выраженности специфического эффекта и динамике массы тела.

Критерии анорексигенной активности БАД.

Объективная оценка чувства голода проводится каждый день перед приемом пищи в одно и то же время одним и тем же врачом по специальной шкале: невыносимый голод – 5 баллов, голод с чувством беспокойства – 4 балла, чувство голода – 3 балла, еда с аппетитом – 2 балла, еда без аппетита – 1 балл, отвращение к еде – 0 баллов.

О выраженности анорексигенного действия можно судить по частоте приема БАД в течение дня.

Степень потери массы тела оценивается по коэффициенту потери массы тела от исходной величины до лечения (ПИ). Коэффициент расчитывается в конце курса лечения по следующей формуле:

$$ПИ = \frac{E}{T} \cdot 100\ \%\ ,\ \text{где}$$

E – потеря массы тела,

T – исходная масса тела.

При исследовании анорексигенного действия БАД необходима проверка на отсутствие в их составе эфедрина и других психостимулирующих средств. Метод определения эфедрина изложен в приложениях к данному разделу.

5. Биологически активные добавки к пище могут быть разрешены к применению без проведения клинических испытаний на основании экспертизы необходимой документации:

а) при наличии представленных фирмой-изготовителем материалов, свидетельствующих о клинических испытаниях эффективности предлагаемой БАД; клинические испытания должны быть выполнены в уполномоченных на проведение таких исследований учреждениях в Российской Федерации и/или стране-изготовителе;

б) если БАД содержит отдельные нутриенты и их комплексы в дозировке уже установленной и апробированной для этого вида БАД в Российской Федерации;

в) если парафармацевтики содержат изученные и уже использующиеся в клинической практике растительные компоненты в дозах, установленных для БАД в Российской Федерации.

Решение о необходимости проведения клинических испытаний принимаются, если:

а) фирмой-заявителем направляется на сертификацию БАД без соответствующей документации, подтверждающей ее эффективность результатами проведенных клинических испытаний;

б) БАД содержит новые действующие ингредиенты;

в) требуется разрешение к применению в связи с новыми показаниями, новой дозировкой, изменением состава, а также в случае изменения в технологическом регламенте.

Приложение № 1
к разделу «Нутрицевтики»

Биологически активные добавки к пище – источники белка и аминокислот

Показатели и методы оценки эффективности

Показатель	Метод	Литературный источник
Аминокислотный состав нутрицевтика с отдельным изучением триптофана и серосодержащих аминокислот	Исследования проводятся на автоматических анализаторах аминокислот	(24)
Биологическая ценность и усвояемость БАД к пище	Исследования проводятся в эксперименте на крысах с изучением скорости роста молодых животных или расчетом аминокислотного скора	(24)
Общий белок	Унифицированный метод по биуретовой реакции	(25)
Альбумин	Унифицированный метод с бромкрезоловым зеленым	(26)
Белковые фракции (альбумины, глобулины)	Унифицированный метод электрофоретического разделения на пленках из ацетата целлюлозы	(27)

Приложение № 2
к разделу «Нутрицевтики»

Биологически активные добавки к пище - источники липидов (эссенциальные и неэссенциальные липидные компоненты пищи)

Определение содержания липидных компонентов в БАД к пище

Показатель	Метод	Литературный источник
Эссенциальные жирные кислоты	ГЖХ-жирных кислот	(28)
Фосфолипиды	ВЭЖХ	(29)
Стерины	Хромато-масс-спектрометрический	(30)

Определение липидных компонентов в биологических жидкостях (эффективность усвоения)

Показатель	Литературный источник
Жирно-кислотный состав тромбоцитов и эритроцитов	(31)
Содержание и состав фосфолипидов в тканях	(32)

Приложение № 3
к разделу «Нутрицевтики»

Биологически активные добавки к пище – источники углеводов

Показатели и методы оценки эффективности и качества

Показатель	Метод	Литературный источник
Углеводы в БАД к пище	ВЭЖХ	(56)
Исследования гликемических кривых	Спектрофотометрический	(57, 58)
Дисахариды в слизистой кишечника		(59)
Экспериментальная оценка гипогликемического действия в опытах на животных		(60)

Приложение № 4
к разделу «Нутрицевтики»

Биологически активные добавки к пище – источники витаминов

Определение содержания витаминов в БАД к пище

Показатель	Метод	Литературный источник
Витамин А и каротиноиды	ВЭЖХ	(33)
Витамин Е	ВЭЖХ	(33)
Витамин Д	ВЭЖХ	(33)
Витамин С (аскорбиновая кислота)	Метод визуального титрования 2,6 дихлорфенолиндофенолом	(34)
Витамин B_1	Флуориметрический тиохромный метод	(35)
Витамин B_2	Флуориметрический (титрование рибофлавинсвязывающим апобелком)	(38)
Витамин РР	Флуориметрический метод	(35)
Витамин B_6	ВЭЖХ	(33)
Витамин B_{12}	Радиоиммунологический	(35)
Фолиевая кислота	Радиоиммунологический метод конкурентного связывания	(35)

Продолжение Приложения № 4
к разделу «Нутрицевтики»

Определение содержания витаминов в биологических средах

Показатель	Метод	Литературный источник
Витамин А и каротиноиды	ВЭЖХ	(36)
Витамин Е	ВЭЖХ	(36)
Витамин С (аскорбиновая кислота)	Метод визуального титрования 2,6 дихлорфенолиндофенолом	(35)
Витамин B_1	Определение коэффициента активации транскелолазы эритроцитов колориметрическим методом (в крови), спектрофотометрическим (в моче)	(35)
Витамин B_2	Флуориметрический (титрование рибофлавинсвязывающим апобелком)	(38)
Витамин РР	Флуориметрический метод (в крови и моче)	(40)
Витамин B_6	ВЭЖХ (в крови и моче)	(39)

Приложение № 5
к разделу «Нутрицевтики»

Биологически активные добавки к пище – источники минеральных веществ

Определение содержания минеральных веществ в БАД к пище

Показатель	Метод	Литературный источник
Кальций	Визуальное титрование с кальцеином	(35)
Фосфор неорганический	Колориметрический	(35)
Натрий, калий, магний, железо, цинк, медь, хром, молибден	Атомно-абсорбционный	(41)
Селен	Спектрофлюориметрический	(42)

Определение минеральных веществ в биологических средах

Показатель	Метод	Литературный источник
Кальций	Визуальное титрование с кальцеином (кровь, моча)	(35)
Фосфор неорганический	Колориметрический	(35)
Натрий, калий, магний, железо, цинк, медь, хром, молибден	Атомно-абсорбционный (кровь, моча)	(41)
Селен	Спектрофлюориметрический	(42)

Приложение № 6
к разделу «Нутрицевтики»

Оценка эффективности биологически активных добавок к пище, содержащих железо

Экспериментальные исследования на крысах

Количество групп крыс	Количество крыс в группе	Экспериментальные группы	Продолжительность опыта	Исходная масса крыс, г
3	8—10	контроль опыт-1 опыт-2	2—3 месяца	30—50

Описание групп крыс:

• *контроль* – контрольная группа крыс находится на обычном полусинтетическом рационе;

• *опыт-1* и *опыт-2* – у этих групп животных создается модель алиментарной железодефицитной анемии. Для этого крысы этих групп рассаживаются в специальные клетки (пластмассовые клетки без каких-либо железосодержащих составляющих с прорезями внизу, что исключает копрофагию у крыс) и получают корм, из которого полностью исключено железо (при необходимости отдельные компоненты полусинтетического рациона максимально отмывают от железа). Состав экспериментального рациона: казеин – 22 %, подсолнечное масло (рафинированное – 10 %, кукурузный крахмал – 60,7 %, целлюлоза – 3 %, солевая смесь – 0,1 % (без добавления железа), витаминная смесь – 0,1 %, холинхлорид – 0,2 %. С подсолнечным маслом в корм вносится ретинолпальмитат и витамин Д. Весь рацион готовится на деионизированной воде, эту же воду в ходе эксперимента используют в качестве питьевой воды. Скорость и глубину развития железодефицитной анемии контролируют, определяя концентрацию гемоглобина в периферической крови. При снижении концентрации гемоглобина ниже 90 г/л считается, что у животных имеется железодефицитная анемия. Для ее подтверждения часть животных из группы *опыт-1* забивают и определяют: концентрацию гемоглобина в периферической крови, концентрацию железа в сыворотке крови, общую железосвязывающую способность сыворотки крови и рассчитывают коэффициент насыщения трансферрина, содержание железа в сыворотке в печени крыс, количество эритроцитов в периферической крови, мазок крови на наличие анизо- и пойкилоцитоза. При подтвер-

ждении железодефицитной анемии животным группы *опыт-2* в корм вносят исследуемую биологически активную добавку к пище (с соответствующим расчетом на содержание железа). Восстановление статуса железа в организме крыс в дальнейшем ходе эксперимента оценивают по концентрации гемоглобина в крови. При восстановлении концентрации гемоглобина в крови до величин, имеющих место у контрольной группы животных, экспериментальных животных забивают и определяют гематологические и биохимические показатели, характеризующие состояние обмена железа в организме. Важно определить содержание железа в печени, т. к. этот показатель характеризует запасы железа в организме.

Приложение № 7
к разделу «Нутрицевтики»

Биологические активные добавки к пище, способствующие выведению из организма чужеродных и токсичных веществ, продуктов обмена веществ

Показатель	Метод	Литературный источник
Определение содержания цитохрома Р-450 в органах экспериментальных животных	Спектрофотометрический	(46)
Определение активности о-демитилирования амидопирина	Спектрофотометрический	(47)
Определение активности о-демитилирования р-нитроанизола	Спектрофотометрический	(48)
Определение гидроксилирования 3,4 бензпирена	Спектрофлюориметрический	(49)
Определение о-диэтилирования 7-этоксикумарина	Спектрофлюориметрический	(50)
Определение о-диэтилирования 7-этоксирезофурина	Спектрофлюориметрический	(51)
Определение активности лизосомальных ферментов: арилсульфатазы А и В, бета-галактозидаза, бета-глюкуронидаза, альфа-маннозидаза, бета-N-ацетилглюкозаминидаза в сыворотке крови и органах лабораторных животных	Спектрофотометрический, спектрофлюориметрический	(52)
Определение активности эпоксидгидролазы в субклеточных фракциях печени и слизистой тонкой кишки	Спектрофлюориметрический	(53)
Определение активности УДР -- глюкуронозилтрансферазы	Спектрофотометрический и спектрофлюориметрический	(54)
Определение активности карбоксилэстеразы в субклеточных фракциях и слизистой тонкой кишки	Спектрофотометрический	(55)

Приложение № 1
к разделу «Парафармацевтики»

Оценка эффективности биологически активных добавок к пище, применяемых в качестве ингибиторов образования N-нитрозаминов

Известно, что наличие в пищевых продуктах азотсодержащих соединений (аминов, амидов, алкилмочевин и др.), а также нитратов и нитритов может приводить к образованию канцерогенных N-нитрозаминов как в пищевом продукте, так и в организме, причем компоненты, входящие в состав пищевого продукта, могут усиливать, замедлять или полностью ингибировать этот процесс. БАД к пище, являющиеся в основном высокоактивными соединениями, могут играть важную роль как в экзогенном, так и в эндогенном образовании канцерогенных N-нитрозаминов. В связи с этим оценка эффективности применяемых БАД к пище как ингибиторов образования канцерогенных N-нитрозаминов имеет важное значение.

Оценка эффективности ингибирования нитрозирования в условиях IN VITRO

В среду, состоящую из 5 мл натурального желудочного сока pH 0,8—1,0, 0,5 мл водного раствора нитрита натрия (концентрация 30 мг/мл) и 0,5 мл диэтиламина (концентрация 46,7 мг/мл), вносят 1 мл раствора БАД к пище (БАД к пище растворяется в соответствующем растворителе, концентрация БАД выбирается в зависимости от рекомендуемой дозировки), энергично перемешивают до полного растворения, доводят pH раствора до 4,5 добавлением 0,1 н раствора соляной кислоты или 0,1 н раствора гидроокиси натрия. Контрольный опыт проводят аналогично, но вместо раствора БАД к смеси желудочного сока и предшественников нитрозаминов добавляется 1 мл соответствующего растворителя. Смеси (опыт и контроль) термостатируются при 37 °С в течение 30 мин. Реакцию останавливают добавлением 0,1 н раствора гидроокиси натрия (pH 8—9). Образовавшиеся нитрозамины извлекают из смеси экстракцией свежеперегнанным метиленхлоридом.

Объединенные экстракты высушивают прокаленным сульфатом магния, концентрируют и проводят идентификацию и количественное определение нитрозаминов хемилюминисцентным методом (80) и (41).

Продолжение приложения № 1
к разделу «Парафармацевтики»

Оценка эффективности ингибирования нитрозирования в условиях IN VIVO

Вид животных	Количество групп животных	Исходная масса животных, г	Количество животных в группе	Название групп животных
крысы, самцы	2	100—150	10	контроль опыт

Крысы обеих групп (*контроль* и *опыт*) находятся на полусинтетическом рационе. Каждому животному контрольной и опытной группы натощак вводят желудочным зондом последовательно по 1 мл водных растворов нитрита натрия (в пересчете на нитрит ион) и диэтиламина в дозах соответственно 15 и 24 мг/кг массы крысы. Животным опытной группы помимо предшественников вводят 1 мл БАД к пище. Животным контрольной группы 1 мл соответствующего растворителя, используемого для растворения БАД к пище. Ровно через 30 мин после введения растворов всех животных забивают, отделяют желудок вместе с содержимым, помещают в жидкий азот. Анализ N-нитрозаминов осуществляют хемилюминисцентным методом (81) и (41).

Нитрозопролиновый тест

Вид животных	Количество групп животных	Исходная масса животных, г	Количество животных в группе	Название групп животных
крысы, самцы	2	100—150	10	контроль опыт

Крысы обеих групп находятся на полусинтетическом рационе.

Контроль – крысам натощак вводят 1 мл водных растворов нитрита натрия и пролина в дозах соответственно 15 и 50 мг/кг массы тела животного. *Опыт* – крысам помимо нитрита натрия и пролина вводят натощак 1 мл раствора БАД к пище. Крыс обеих групп помещают в обменные клетки на сутки для сбора мочи, предварительно в сосуды для сбора мочи вносят 1 мл 30 %-ного раствора гидроксида натрия. Собранную мочу замораживают до минус 18 °С и хранят до проведения анализа на содержание нитрозопролина (не более 10 дней). Содержание нитрозопролина определяют по (79).

Приложение №2
к разделу «Парафармацевтики»

Оценка влияния биологически активных добавок к пище, предлагаемых в качестве защитных средств от ионизирующего излучения

Экспериментальные исследования на крысах

Количество групп животных	Количество животных в группе	Экспериментальные группы	Продолжительность опыта
2	10	контроль опыт	30 дней

Модель воздействия ионизирующего излучения.

Крысы контрольной и опытной групп получают однократное общее гамма-облучение в дозе 8 Гр на установке «Хизотрон» с источником Со (Е – 1,25 МэВ) с расстояния 0,7 м.

После облучения контрольная группа крыс находится на общевиварном рационе. Крысы опытной группы получают исследуемую БАД к пище вместе с кормом.

Ежедневно регистрируется гибель животных, взвешивание производится каждые трое суток.

Характеристика проницаемости кишечного барьера (экспериментальные исследования на крысах)

Количество групп животных	Количество животных в группе	Экспериментальные группы	Продолжительность опыта
2	10	контроль опыт	15—18 дней

Модель воздействия ионизирующего излучения.

Крысы контрольной и опытной групп получают однократное общее гамма-облучение в дозе 4 Гр на установке «Хизотрон» с источником Со (Е – 1,25 МэВ) с расстояния 0,7 м.

Данная доза не вызывает гибели животных в ранний период и характеризуется обратимыми изменениями в морфофункциональном состоянии эпителиального барьера тонкой кишки. Животные

опытной группы на протяжении 10—14 дней перед облучением и в течение 2 суток после облучения получают с кормом исследуемую БАД к пище. Животные контрольной группы на протяжении всего эксперимента получают общевиварный рацион.

Через сутки после облучения животным опытной и контрольной групп вводят внутрижелудочно по 500 мг ПЭГ-4000 (Serva, Германия) и собирают мочу в течение последующих 18 ч в обменных клетках. По окончании сбора мочи крысам внутрижелудочно вводят по 500 мг куриного овальбумина (пятикратно перекристаллизованного) и через 3 ч обескровливают под глубокой эфирной анестезией. Препарат слизистой оболочки тощей кишки подвергают морфометрическому исследованию на светооптическом уровне.

Из аликвоты мочи экстрагируют ПЭГ-4000 путем экстракции 10-кратным объемом перегнанного хлороформа. Хлороформ отгоняют и сухой остаток анализируют методом гель-проникающей хроматографии с рефрактометрическим детектированием в системе метанол—вода 1 : 1 (88). Содержание ПЭГ-4000 в пробах определяют по стандартному графику. Параллельно в другой аликвоте мочи анализируют содержание креатинина с помощью колориметрической реакции ЯФФЕ (89). Проницаемость кишечного барьера для ПЭГ-4000 характеризуют величиной экскреции ПЭГ-4000 с мочой в процентах от введенной дозы в расчете на 11 ммоль экскретируемого креатинина. В сыворотке крови анализируют содержание антигенных структур куриного овальбумина с помощью двухвалентного твердофазного иммуноферментного метода (sandwich-ELISA), рекомендуемого как официальный метод ВОЗ (90).

Проницаемость кишечного барьера для нерасщепленного белка характеризуется величиной его всасывания в кровь в процентах от внутрижелудочно введенной дозы.

Приложение № 3
к разделу «Парафармацевтики»

Оценка эффективности БАД к пище, рекомендуемых для профилактики и вспомогательной терапии при заболеваниях печени

Экспериментальные исследования на крысах с использованием модели подострого токсического гепатита

Количество групп крыс	Количество крыс в группе	Контроль	Опыт-1	Опыт-2
3	16	общевиварный рацион	модель гепатита	модель гепатита на фоне введения изучаемой БАД

Модели подострого гепатита.

- крысам вводится подкожно четыреххлористый углерод в дозе 2 мл/кг массы крысы в смеси с подсолнечным маслом 1 : 1 через день на протяжении одного месяца (91);
- пятикратное через 2 ч введение (внутримышечное) 50 %-ного раствора тетрахлорметана в оливковом масле по 0,3 мл на 0,1 кг массы тела крысы (82).

Опыт-1 – 1-й месяц крысы находятся на общевиварном рационе первые 3 недели, далее – получение модели токсического гепатита (срок в зависимости от вида модели): 2—3-й месяц – на общевиварном рационе.

Опыт-2 – 1-й месяц крысы находятся на общевиварном рационе с введением в него изучаемой БАД к пище первые три недели, далее – получение модели токсического гепатита (срок в зависимости от вида модели); 2—3-й месяц – на общевиварном рационе с введением в него изучаемой БАД к пище.

Контроль –1-й, 2-й и 3-й месяцы крысы находятся на общевиварном рационе.

Забои животных проводятся: 1-й забой (забивают половину крыс из каждой группы, 6—8 животных) сразу после получения модели гепатита, 2-й – через 3—4 недели после первого забоя (вторая половина животных из каждой группы).

Экспериментальные исследования, рекомендуемые для оценки данного вида БАД: интегральные показатели, т. е. внешний вид животных, активность, масса тела, абсолютная и относительная масса внутренних органов.

Продолжение приложения № 3
к разделу «Парафармацевтики»

Биохимические показатели

Показатель	Метод	Литературный источник
Аланинаминотрансфераза	Спектрофотометрический	(92)
Сорбитолдегидрогеназа	Спектрофотометрический	(93)
Альдолаза	Спектрофотометрический	(94)
Орнитинкарбомоилтрансфераза	Спектрофотометрический	(95)
Холинэстераза	Спектрофотометрический	(96)
Билирубин	Унифицированный метод по диазореакции в присутствии акселератора	(97)
Щелочная фосфатаза	Спектрофотометрический	(98)
Лактатдегидрогеназа	Спектрофотометрический	(99)
Белковые фракции	Электрофорез	(27)

Морфологические методы: макро- и микроскопическое исследование печени.

Модели патологического состояния печени представлены также в следующих работах: острый тетрациклиновый гепатоз у крыс (83), хронический гепатит (8), цирроз печени (117), другие модели токсического гепатита (85—86).

Приложение № 4
к разделу «Парафармацевтики»

Оценка эффективности БАД к пище, рекомендуемых для профилактики и в качестве вспомогательных средств при лечении сердечно-сосудистых заболеваний

Модели гиперлипиемий.

1. Крысы – введение детергентов (тритон WR-1339 225—250 мг/кг массы тела внутрибрюшинно однократно). Через 8—10 ч после введения тритона WR-1339 наблюдается 6—8-кратное увеличение уровня триглицеридов в крови и 3—4-кратное увеличение содержания холестерина (126).

2. Крысы – применение диеты, содержащей 3—5 % холестерина, 0,3 % тиоурацила, 1 % холевой кислоты. Дополнительно можно ввести витамин Д. Гиперлипидемия возникает через 3—4 недели. Длительное применение этой диеты с витамином Д (несколько месяцев) приводит к атеросклеротическому поражению аорты (126).

3. Морские свинки – применение диеты, содержащей 1,6 % холестерина и 15 % растительного масла . Через 6—10 дней развивается гиперлипидемия, усиливающаяся при более длительном применении диеты (126).

4. Кролики – применение диеты, содержащей 0,2—0,3 г/кг холестерина или введение холестерина зондом в подсолнечном масле в желудок в том же количестве (126).

При изучении БАД к пище, рекомендуемой в качестве вспомогательного или профилактического средства при лечении сердечно-сосудистых заболеваний, в эксперименте на животных можно рекомендовать следующие показатели для характеристики эффективности:

- интегральные показатели состояния животных – внешний вид, активность, масса тела, относительная масса внутренних органов;
- специальные показатели – артериальное давление, электрокардиографическое исследование.

Продолжение приложения № 4
к разделу «Парафармацевтики»

Биохимические показатели

Показатели	Литературный источник
Фибриноген	(114)
Фибринолитическая активность	(114)
Протромбиновый индекс и другие показатели системы гемакоагуляции Холестерин	(114) (103)
Триглицериды	(104)
Липопротеиды высокой плотности	(107, 108)
Продукты ПОЛ (малоновый диальдегид, диеновые коньюгаты)	(110)
Показатели антиоксидантной защиты организма (глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза, каталаза, супероксиддисмутаза, витамин А, Е, С, SH-группы, трансферрин)	(35, 36,42,109, 111)
Аспартатаминотрансфераза (инфаркт миокарда)	(92)

Макро- и микроскопические морфологические исследования сердца и, в случае необходимости, сосудов.

Приложение № 1
к разделу 13

Определение содержания эфедрина

2—3 г препарата, взвешенного с точностью до 0,01 г, обрабатывают однонормальным HCl 3 раза по 10 мл. Из объединенного экстракта удаляют липидные компоненты хлороформом 3 раза по 10 мл. Водный слой подщелачивают десятинормальным NaOH до pH 10 и хлороформом выделяют эфедрин. Хлороформовый экстракт упаривают на роторном испарителе, экстракт растворяют в 1 мл хлороформа и 1 мкл вводят в хроматограф.

Анализ проводят на хроматографе с пламенно-ионизационным детектором на полярной колонке при температуре 120 °С. В этих же условиях анализируют стандартный раствор эфедрина (0,1 мг в 1 мл хлороформа). Содержание эфедрина выражают в мг на 100 г препарата и рассчитывают по формуле:

$$C_{пр.} = \frac{C_{ст.} - H_{пр.}}{H_{ст.} \cdot q_{пр.}} \cdot 1000, \text{ где}$$

Спр. – содержание эфедрина в препарате в мг на 100 г;

Сст.– концентрация эфедрина в стандартном растворе;

Нпр. - интегральный показатель пика эфедрина в препарате;

Нст.- интегральный показатель пика эфедрина в стандартном растворе;

$q_{пр}$ – навеска препарата в г.

Список литературы

1. Методические указания по атомно-абсорбционным методам определения токсичных элементов в пищевых продуктах и пищевом сырье. ГКСЭН РФ № 02, 19/47—11.

2. ГОСТ 26927—86 «Сырье и продукты пищевые. Метод определения ртути».

3. ГОСТ 26930—86 «Сырье и продукты пищевые. Метод определения мышьяка».

4. Методические указания по определению микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах, внешней среде: Сб.—МЗ СССР, 1976, 1991.—Ч. 5—18.

5. Методические указания по выделению, идентификации и количественному определению насыщенных и моно-, би-, триряда полициклических ароматических углеводородов в пищевых продуктах. № 4721—88, 1988.

6. Афлатоксины В и М. Методические указания по обнаружению, идентификации и определению содержания в продовольственном сырье и пищевых продуктах с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. № 408286, 1986.

7. ГОСТ 28001—88 «Зерно фуражное, продукты его переработки, комбикорма. Методы определения микотоксинов: Т-2 токсина, зеараленона охратоксина А».

8. Методические указания по обнаружению, идентификации и определению содержания дезоксиниваленола и зеараленона. № 5177—90.—МЗ СССР.

9. Методические указания по обнаружению, идентификации и определению содержания Т-2 токсина в пищевых продуктах и продовольственном сырье. № 3184-84.—МЗ СССР, 1984.

10. Методические указания по определению остаточных количеств антибиотиков в продуктах животноводства.—М., 1985. Утв. МЗ СССР 29.06.84 № 3049/84.

11. ГОСТ 10444.15—94 «Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов».

12. ГОСТ 50474—93 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)».

13. СанПиН 42-123-4049—88 «Микробиологические нормативы и методы анализа продуктов детского, лечебного и диетического питания и их компонентов».—С. 54—57.

14. ГОСТ 104442—93 «Продукты пищевые. Метод выявления и определения Staphylococcus aureus».

15. ГОСТ 10444.8—88 «Продукты пищевые. Метод определения Bacillus cereus».

16. ГОСТ 50480—93 «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода Salmonella».

17. ГОСТ 10444.12—88 «Продукты пищевые. Метод определения дрожжей и плесневых грибов».

18. СанПиН 42—123—4940—88. «Микробиологические нормативы и методы анализа продуктов детского, лечебного и диетического питания и их компонентов».—С. 71—72.

19. СанПиН 42—123—4940—88. «Микробиологические нормативы и методы анализа продуктов детского, лечебного и диетического питания и их компонентов».—С. 71—73.

20. СанПиН 42-123-4940—88 «Микробиологические нормативы и методы анализа продуктов детского, лечебного и диетического питания и их компонентов».—С. 69—70.

21. ГОСТ 50474—93. «Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)» или СанПиН 42-123-4940—88 «Микробиологические нормативы и методы анализа продуктов детского, лечебного и диетического питания и их компонентов».—С. 51—54.

22. СанПиН 42-123-4940—88 «Микробиологические нормативы и методы анализа продуктов детского, лечебного и диетического питания и их компонентов».—С. 61—63.

23. Биохимические методы исследования в клинике /Под ред. Покровского А. А.—М.: Медицина, 1969.—85 с.

24. Pellet H. L., Young V. R. Nutritional Evaluation of Protein Foods. The United Nations University Tokyo, Japan, 1980.

25. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник /Под редакцией Меньшикова В. В.—М.: Медицина, 1987.—С. 174—175.

26. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник /Под редакцией Меньшикова В. В.—М.: Медицина, 1987.—С. 176.

27. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник /Под редакцией Меньшикова В. В.—М.: Медицина, 1987.—С. 177—179.

28. Iupac. Standart metods for the analysis of oil, fats and derivatives. 2.302.Pergamot press, 1979.

29. Fox J. M. in phosphatidilcholine.Peeters /ed/ Springer Berlin, 1976. — P. 3—7.

30. Левачев М. М., Медведев Ф. А., Гарбузов А. Г. и др. //Прикладная биохимия и микробиология.—1988.—№ 3.—С. 24.

31. Левачев М. М., Корф И. И. //Вестник АМН СССР.—1981.—№ 10. —С. 17.

32. Кейтс М. Техника липидологии.—М.: Мир, 1975.—С. 163, 259.

33. Якушина Л. М., Бендер Е. Д., Харитончик Л. А. //Вопросы питания.—1993.—№1.—С. 43—47.

34. Теоретические и клинические аспекты науки о питании /Под ред. Волгарева М. Н.—1987.—Т. 8.—210 с.

35. Теоретические и клинические аспекты науки о питании /Под ред. Волгарева М. Н.—1987.—Т. 8.—210 с.

36. Якушина Л. М., Таранова А. Г. //Ж. физ. хим.—1994.—№ 10.—С. 1826—1828.

37. Сокольников А. А., Коденцова В. М., Исаева В. А. //Вопросы мед. хим.—1993.—№ 3.—С. 50—53.

38. Коденцова В. М., Вржесинская О. А., Рисник В.В. //Прикладная биохимия и микробиология.—1994.— № 4—5.—С. 603—609.

39. Коденцова В. М., Рисник В. В. и др. //Клин. лаб. диагностика.—1993. —№ 6.—С. 22—27.

40. Коденцова В. М., Вржесинская О. А., Сокольников А. А. //Вопросы питания.—1992.—№ 2.—С. 62—67.

41. МУК 4.4.1.0.11—93 «Определение летучих N-нитрозаминов в продовольственном сырье и пищевых продуктах».

42. МУК 4.1.033—95 «Методы контроля. Химические факторы. Определение селена в продуктах питания».

43. Dona V., Papagni V.,Tarenghy V. et.al //J.Ital. Chim.—1987.—№ 12.—P. 205—214.

44. Keller S.Schieter S. Vc.Kednee F. //J. Immunology Meth.—1981.—№ 51.—P. 287—291.

45. Stiglic N. Vlohovic V. e.tal. //Acta Fac.Met.flumin.—1978.—№ 15.—P. 15- 17.

46. Omura T., Sato R. //Biol Chem.—1964.—№ 239.—P. 2370—2377.

47. Карузина И. И., Арчаков А. И. Современные методы в биохимии.—М.: Медицина, 1977.—С. 49—62.

48. Fuov F., Azyrv U. Kamattaki. T.et.al. //J.Pharmac.—1979.—№ 29.—P. 191—201.

49. Dehnen W. et.al. //Anal.Bioch.—1977.—№ 53.—P. 373—383.

50. Lake B. Y. //Biochem.Toxicol.—1987.—P. 207—209.

51. Lake B. Y. //Biochem.Toxicol.—1987.— P. 209—211.

52. Лингл Д. Лизосомы. Методы исследования. 1980.

53. Кравченко Л. В., Соболев В. С. //Бюлл. эксперим. биологии и медицины.—1989.—№ 8.—С. 179—181.

54. Book K. W. et.al. //Biochem. Pharmac.—1980.—№ 29.—P. 495—500.

55. Mendoza C. E. et.al. //Comh. Bioc. Phesiol.—1971.—№ 40.—P. 841—854.

56. Cheetman N. W. et.al. //J. of Chromatography.—1981.—№ 207.—P. 439—444.

57. Любченко П. Н. Клиническая лабораторная диагностика. 1994.—С. 6—7.

58. Меньшиков В. В., Ванштейн В. В. //Лаб. Дело.—1984.—№ 5.—С. 84.

59. Современные методы в биохимии.—М.: Медицина, 1977.—С. 127—131.

60. Young D.S. et. al. //J. Clinical Chemistry— 1975.—V. 5.—P. 432.

61. Госфармакопея СССР ГФ XI.—Т. 1.—1989.

62. Госфармакопея СССР ГФ XI.—Т. 2.—1990.

63. Георгиевский В. П., Комисаренко Н. Ф., Дмитрук С. Е. Биологически активные вещества лекарственных растений.—Новосибирск: Наука, 1990.

64. Drawert F., Leopold E. //J. Chromatogr.—1976.—V. 2.—№ 12.—P. 505—510.

65. Marine D., Belestrieri F.Ital //J.Food.—1995.—7.—№ 3.—P. 255.

66. T. S.Chamble, B. Clark //J.Arg.Food Chem.—1991.—39.—P. 162—169.

67. Ляпков Б. Г., Воробьева Л. Ш., Медведев Ф. А. Экстракционное концентрирование и ХМС-определение d-лимонена в маслах цитрусовых и других биологических образцах //ЖАХ.—Т. 84.—№ 4.—1996.—С. 451—454.

68. Международная фармакопея.—Изд. 3.—1990.— Т. 3.

69. Сборник международных методов анализа и оценки вин и сусел.— М.: Пищевая промышленность, 1993.

70. Swenson J.O.J.Chromatogr.,230 Biochem Appl 19,427, (1982).

71. Christophersen A.S. et.al.J.Chromatogr. 168, 476, (1979).

72. Official metods of analysis of AOAC 15th ed 1990 v.1,2.

73. ГОСТ 9517—94 «Топливо твердое. Методы определения выхода гуминовых кислот».

74. «Таблетки мумие экстракта, покрытые оболочкой». Временная фармакопейная статья ВФС 68-86—93, МЗ Республики Кыргыстан.

75. Курчубеков Б. П., Нарбеков О. Н. Кыргызский горный бальзам-мумие «Архар-Таш».—Бишкек, 1992.

76. ГОСТ 28038—89 «Продукты переработки плодов и овощей. Метод определения микотоксина патулина».

77. Методические рекомендации по определению нитратов и нитритов в молоке и молочных продуктах. МЗ СССР, 1990.

78. Методические указания по определению нитратов и нитритов в зерне и зернопродуктах. МЗ СССР, 1990.

79. Вопросы питания.—1997.—№ 4.—С. 16—18.

80. Вопросы питания.—1996.—№ 3.—С. 31.

81. *Вопросы питания.*—1994.—№ 4.—С. 32.

82. Экспериментальная и клиническая фармакология.—1992.—№ 6.— С. 49—50.

83. Макаренко Т. Н., Дудченко А. М., Лукьянова Л. Д. Разработка модели острого тетрациклинового гепатоза у крыс и получение его динамических предикторов //Бюлл. экспериментальной биологии и медицины.—1994. —№ 12.—С. 603—606.

84. In vivo correlation between liver and blood energy status as evidenced by chronic treatment of carbon tetrachloride and adenosine to rats Hernandez-Munoz Rolando, Sanchez Victoria Chagoya //Can. J. Physiol. and Pharmacol.— 1994.—72.—№ 10.—С. 1252—1255.

85. Зимин Ю. В., Солопаева И. М. Влияние хорионического гонадотропина на активность лактатдегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы патологически измененной печени //Бюлл. экспериментальной биологии и медицины.—1994.—№ 6.—С. 59—593.

86. Дроговоз С. М., Сальникова С. И. Эффективность оксикоричных кислот при токсических поражениях печени //Бюлл. экспериментальной биологии и медицины.—1993.—№ 2.—С. 55—57.

87. Конопля Е. Н., Прокопенко Л. Г. Эссенциале как иммуномодулятор при токсическом поражении печени //Экспериментальная и клиническая фармакология.—1992.—№ 6.—С. 49—50.

88. Гмошинский И. В., Радченко С. Н., Зорин С. Н., Мазо В. К. Коррекция диетой проницаемости защитного барьера кишки при гамма-облучении //Физиол. журн. им. И. М. Сеченова.—1996.—Т. 82.—№ 3.—С. 117—124.

89. Биохимические методы исследования в клинике /Под ред. Покровского А.А.—М.: Медицина, 1969.—С. 62—63,103.

90. Stuart C. A., TwisteltonR., Nicholas M. K., Hide D. W.Passage of cows milk proteins in breast milk //Clin.Allergy.—1984.—V. 14.—№ 6.—P. 533—535.

91. Шамсудинов Ш. Н. Физиологическая эффективность травы полыни эстрагона при некоторых экстремальных условиях: Автореферат на соискание ученой степени кандидата биологических наук.—Душанбе, 1996.

92. Биохимические методы исследования в клинике /Под ред. Покровского А. А.—М.: Медицина, 1969.—С. 118.

93. Биохимические методы исследования в клинике /Под ред. Покровского А. А.—М.: Медицина, 1969.—С. 156.

94. Биохимические методы исследования в клинике /Под ред. Покровского А. А.—М.: Медицина, 1969.—С. 144.

95. Биохимические методы исследования в клинике /Под ред. Покровского А. А.—М.: Медицина, 1969.—С. 124.

96. Биохимические методы исследования в клинике /Под ред. Покровского А. А.—М.: Медицина, 1969.—С. 179.

97. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник /Под ред. В. В. Меньшикова.—М.: Медицина, 1987.—С. 227.

98. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник /Под ред. В. В. Меньшикова.—М.: Медицина, 1987. —С. 207.

99. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник /Под ред. В. В. Меньшикова.—М.: Медицина, 1987.—С. 177.

100. Биохимические методы исследования в клинике /Под ред. Покровского А. А.—М.: Медицина, 1969.— С. 103.

101. Биохимические методы исследования в клинике /Под ред. Покровского А. А.—М.: Медицина, 1969.—С. 98—101.

102. Биохимические методы исследования в клинике /Под ред. Покровского А. А.—М.: Медицина, 1969.—С. 102.

103. Биохимические методы исследования в клинике /Под ред. Покровского А. А.—М.: Медицина, 1969.—С. 300.

104. Биохимические методы исследования в клинике /Под ред. Покровского А. А.—М.: Медицина, 1969.—С. 294.

105. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник /Под ред. В. В. Меньшикова.—М.: Медицина, 1987.—С. 238.

106. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник /Под ред. В. В. Меньшикова.—М.: Медицина, 1987.—С. 107—122.

107. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник /Под ред. В. В. Меньшикова.—М.: Медицина 1987.—С. 248.

108. Фенотипирование гиперлипидемий: Методические рекомендации /Под ред. Климова А. Н.—М., 1975.

109. Zanetti G. Rabbit liver glutation reductase. Purrification and properties //Arch. biochem and biophys.—1979.—V. 198.—№ 1.—P. 241—246.

110. Иргашев Ш. Б., Юлдашев Н. М., Гурнев С. Б., Хадиметова Ш. А., Эльмуратов М. Т. Процессы гидроксилирования и интенсивность ПОЛ в микросомах печени при экспериментальном инфаркте миокарда //Патологическая физиология и экспериментальная терапия.—1993.—№ 3—С. 19—20.

111. Wendel A. Glutathion peroxidase //Method in Ensymol.—1989.—V. 77.—P. 325—333.

112. Применение бактерийных биологических препаратов в практике лечения больных кишечными инфекциями, диагностика и лечение дисбактериоза кишечника: Методические рекомендации.—М., 1986.

113. Диагностика и диетотерапия пищевой аллергии: Метод ческие рекомендации.—М., 1984.

114. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник /Под ред. В. В. Меньшикова.—М.: Медицина, 1987.—С. 155—172.

115. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник /Под ред. В. В. Меньшикова.—М.: Медицина, 1987.—С. 191.

116. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник /Под ред. В. В. Меньшикова.—М.: Медицина, 1987.—С. 179.

117. Патологическая физиология и экспериментальная терапия.—1995.—№ 4.—С. 38—39.

118. Оценка физической работоспособности //Экспериментальная и клиническая фармакология.—1992.—№ 2.—С. 39—41.

119 Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник /Под ред. В. В. Меньшикова.—М.: Медицина, 1987.—С. 47—59.

120. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник /Под ред. В. В. Меньшикова.—М.: Медицина, 1987.—С. 66—79.

121. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник /Под ред. В. В. Меньшикова.—М.: Медицина, 1987.—С. 267—270.

122. Покровский А. А., Арчаков А. И. Методы разделения и ферментной идентификации субклеточных фракций.—В кн.: Современные методы в биохимии.—М.: Медицина, 1968.—С. 5—59.

123. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник /Под ред. В. В. Меньшикова.—М.: Медицина, 1987.—С. 192—194.

124. Морфологическая диагностика заболеваний печени /Под ред. В. В. Серова.—М.: Медицина, 1989.—С. 336.

125. Кресноголовец В. Н. Дисбактериоз кишечника.—М.: Медицина, 1989.—С. 208.

126. Экспериментальное изучение гиполипидемических и антиатеросклеротических средств: Методические рекомендации. Минздрав СССР, Фармакологический Комитет.—М., 1988.

127. СанПиН 2.3.2.560—96 «Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов».—М., 1997.

128. Кишковский Н. А. Дифференциальная диагностика в гастроэнтерологии.—М.: Медицина, 1984.—С. 288.

129. Коллинз У. П. Новые методы иммуноанализа.—М.: Мир, 1991.—С. 140—149.

130. Пол У. Иммунология.— М.: Мир, 1987.—Т. 1.—С. 93—96.

131. Фримель Г. Иммунологические методы исследования.—М.: Медицина, 1987.—С. 4.

132. Методы исследования в иммунологии /Под ред. Лефковиц И. и Пернис Б.—М.: Мир, 1981.— Т. 1,2.

133. Тиц Н. Энциклопедия клинических лабораторных тестов.—М.: Лабинформ, 1997.

134. Тутельян В. А. Биологически активные добавки к пище: прошлое, настоящее, будущее //Тезисы второго Международного симпозиума. Питание и здоровье. Биологически активные добавки к пище.—М., 1996.—С. 164—166.

135. Пыцкий В. И.—В кн.: Патологическая физиология /Под ред. А. Д. Адо и В. В. Новицкого.—Томск, 1994.—С. 73—75.

136. Крыжановский Г. Н., Магаева С. В., Макаров С. В. Нейроиммунопатология.—М., 1997.—С. 7.

137. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях.—Л., 1962.

138. Крендаль Ф. П., Левина Л. В., Чубарев В. Н. и др. Фармакологическое исследование адаптогенного (резистогенного) действия настойки из биомассы культуры ткани корня женьшеня.—В кн.: Новые данные об элеутерококке и других адаптогенах.—Владивосток, 1981.—С. 123—130.

139. Меерсон Ф. З. Механизмы и защитные эффекты адаптации.—В кн.: Адаптационная медицина.—М., 1993.—С. 25—31.

140. Горизонтов П. Д. Гомеостаз, его механизмы и значение. Гомеотаз /Под ред. Горизонтова П. Д.—М.: Медицина, 1981.—С. 5—28.

141. Меерсон Ф. З. Основные закономерности индивидуальной адаптации.—В кн.: Физиология адаптационных процессов: Руководство по физиологии. АН СССР.—М.: Наука, 1986.—С. 10—76.

142. Меерсон Ф. З. Общий механизм адаптации и роль в нем стресс-реакции, основные стадии процесса.—В кн.: Физиология адаптационных процессов: Руководство по физиологии. АН СССР.—М.: Наука, 1986.—С. 77—123.

143. Петров А. В., Быков Э. Г. Методологические аспекты проблемы адаптации. Формы и механизмы процессов адаптации.—В сб. научных трудов: Формы и механизмы процессов адаптации в норме и патологии.— Воронеж, 1987.—С. 5—29.

144. Beutler B., Ceram A. The biology of cachectin. TNF-a primariy mediator of the host response //Annu. Rev. Jmmunol.—1989.—Vol. 7.—P. 625—655.

145. Beutle B., Cerami A. Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator //Annu. Rev. Biochem.—1988.—Vol. 57.—P. 505—518.

146. Beuler B., Greenwald D., Hulmes J. D. et. al. Identity of tumor necrosis factor andthe macrophage-secreted factor cachectin //Nature.—1985.—Vol. 316.—P. 552—554.

147. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях.–Л., 1973.—С. 97.

148. Fisch H., Gifford J. E. A photometric and plaque assay for macrophage mediated tumor cell cytotoxity //J.Immunol. Meth.—1983.—Vol. 57.—P. 311—325.

149. Ковальчук Л. В., Константинов А. А., Павлюк А. С. Клиническое значение фактора роста Т-клеток (интерлейкинов для оценки иммунного статуса человека //Иммунология.—1986.—Т. 4.—С. 52—55.

150. Jerne N. K., Nordin A. A. Plaque formation in agar by single antibody production //Science.—1963.—Vol. 140.—P. 405.

151. Завалишин И. А., Захарова М. Н. Оксидантный стресс – общий механизм повреждения при заболеваниях нервной системы.—1996.—Т. 2.—С. 11—114.

152. Орехович В. Н. Современные методы в биохимии.—М.: Медицина, 1977.—С. 62—69.

153. Кондратенко И. В., Ярилин А. А., Хахалин Л. Н. Исследование продукции интерлейкина-2 лимфоцитами больных с иммунодефицитами (сравнительная характеристика различных методов тестирования) //Иммунология.—1991.—Т. 6.—С. 77—80.

154. Петров Р. В., Павлюк А. С., Ковальчук Л. В. и др. Интерлейкинзависимые иммунодефициты человека //Иммунология.—1987.—Т. 4.—С. 20—24.

155. Ebert E. C., Stoll D. B., Cassens B. J. et al Diminished interleukin 2 production and receptor generation characterize the acquried immunodeficiency syndrome //Clin.Immunol.Immunopatol.—1985.—Vol. 37.—P. 283—297.

156. Цезий-137. Определение в пищевых продуктах: Методические указания 5779—91.—М., 1991. Свидетельство МА МВИ ИБФ № 15/1—89.

157. Стронций-90. Определение в пищевых продуктах: Методические указания 5778—91.— М., 1991. Свидетельство МА МВИ ИБФ № 14/1—89.

Определение безопасности и эффективности биологически активных добавок к пище

Методические указания
МУК 2.3.2.721—98

Редактор Акопова Н. Е.
Технические редакторы Ломанова Е. В., Свиридова Л. В.

Подписано в печать 5.01.99

Формат 60x90/16 Печ. л. 5,5
Тираж 3000 экз. Заказ 22

ЛР № 021232 от 23.06.97 г.

Министерство здравоохранения Российской Федерации
101431, Москва, Рахмановский пер., д. 3

Оригинал-макет подготовлен к печати
и тиражирован Издательским отделом
Федерального центра госсанэпиднадзора Минздрава России
125167, Москва, проезд Аэропорта, 11.
Отделение реализации, тел. 198-61-01

gost.e-ecolog.ru