

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра
здравоохранения – Главный
государственный санитарный
врач Республики Беларусь

 И.В. Гаевский
20 16 г.
Регистрационный номер №034-1215

**МЕТОДЫ ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКИ БЕЗВРЕДНОСТИ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК К ПИЩЕ,
ЯВЛЯЮЩИХСЯ ИСТОЧНИКАМИ АМИНОКИСЛОТ,
ВИТАМИНОВ И МИНЕРАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ,
НА TETRAHYMENA PYRIFORMIS**

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик: Республиканское унитарное предприятие
«Научно-практический центр гигиены»

Авторы: к.б.н. Журихина Л.Н., к.м.н. Бондарук А.М., Осипова Т.С.

Минск, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра –
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ И.В. Гаевский
07.04.2016
Регистрационный № 034-1215

**МЕТОДЫ ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКИ БЕЗВРЕДНОСТИ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК К ПИЩЕ,
ЯВЛЯЮЩИХСЯ ИСТОЧНИКАМИ АМИНОКИСЛОТ, ВИТАМИНОВ
И МИНЕРАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ, НА *TETRAHYMENA PYRIFORMIS***

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: РУП «Научно-практический центр гигиены»

АВТОРЫ: канд. биол. наук Л.Н. Журихина, канд. мед. наук А.М. Бондарук,
Т.С. Осипова

Минск 2015

ГЛАВА 1 НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. В настоящей инструкции по применению приведены методы экспресс-оценки на *Tetrahymena pyriformis* (TP) безвредности биологически активных добавок к пище (далее БАД) на этапах их создания и реализации. Изложена процедура оценки безвредности многокомпонентных БАД на этапе разработки рецептур с оценкой комбинированного действия компонентов БАД в различных сочетаниях по критериям токсичности, опасности и биологической активности. Скрининг многокомпонентных БАД разработанными методами позволяет определить оптимальный вариант рецептуры, а также безвредную дозировку БАД с экстраполяцией полученных данных на человека. Безвредность БАД — источников аминокислот, витаминов и минеральных веществ — на этапе реализации оценивается по критериям токсичности и опасности, определенным в токсикологическом эксперименте с установлением класса опасности. Безвредность рекомендуемого суточного потребления (РСП) БАД оценивается по результатам анализа адаптогенных эффектов БАД в пролонгированном эксперименте. Разработанная процедура биотестирования БАД на этапе реализации и экспертной оценки позволяет дать заключение о безвредности БАД с учетом длительности ее применения.

2. Настоящая инструкция по применению предназначена для учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор, иных организаций, проводящих исследования по оценке безвредности БАД, в т. ч. на этапе разработки.

ГЛАВА 2 ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ МЕТОДОВ ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКИ БЕЗВРЕДНОСТИ БАД, ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

1. Биологически активные добавки к пище — природные и (или) идентичные природным биологически активные вещества, а также пробиотические микроорганизмы, предназначенные для употребления одновременно с пищей или введения в состав пищевой продукции.

2. Оценка безопасности, безвредности и эффективности БАД является основной задачей при экспертной оценке и государственной регистрации данного вида продукции. Процедура регистрации БАД опирается в основном на аналитические методы контроля их безопасности. Высказывается мнение, что регистрации этих продуктов должны предшествовать экспериментальные исследования токсикологических, физиологических, протекторных и иных эффектов для подтверждения их безвредности и эффективности. Традиционные методы исследований, требующие использования большого числа теплокровных лабораторных животных, длительны, дорогостоящи и не всегда доступны, а в последнее время во многих странах считаются неэтичными (запрещены). В связи с этим задачи по обеспечению безвредности и эффективности БАД трудно разрешимы без использования альтернативных

экспрессных методов исследования — биотестирования. Сущностью биотестов является оценка безвредности или иных свойств исследуемого объекта на организмах-моделях и на основании полученных результатов прогноз реакции организма человека и/или животных на этот объект. Самым сложным в таком подходе к оценке безвредности является получение прогноза с достаточным уровнем достоверности, т. к. любые модели, в т. ч. и биологические, имеют разную степень приближения к моделируемому организму.

3. Статистический анализ накопленных результатов исследования различных объектов на инфузориях *TP* выявил их высокую достоверность, воспроизводимость, корреляцию с результатами экспериментов на теплокровных животных, возможность экстраполяции полученных данных на человека. Результаты исследования токсичности и биологической активности ряда биологически активных комплексов растений, фитокомпозиций и продуктов повышенной биологической ценности на одноклеточных организмах *TP* свидетельствуют о перспективности использования этого тест-объекта для оценки безвредности БАД.

4. Основные термины и определения

4.1. Тест-объект исследований

Tetrahymena pyriformis — лабораторная культура одноклеточных организмов (класс Ciliata – ресничные инфузории), произрастающая в среде известного состава и являющаяся изолированной популяцией организмов, рост которой подчиняется общим закономерностям роста популяций. Количество БАД, вносимой в культуру *TP*, рассчитывается в мг/мл культуры. В условиях эксперимента 1 мл культуры аналогичен одной особи экспериментального теплокровного животного (крыса) или человека, для которых БАД дозируется в мг/сут (рекомендуемое суточное потребление).

Инокулят инфузорий — объем культуры *TP* в мл, содержащий известное (подсчитанное) число особей.

Жизненный цикл развития популяции *TP* — совокупность фаз развития, пройдя которые популяция достигает максимальной численности. В питательной среде следующего состава: пептон — 2%, глюкоза — 0,5%, натрий хлористый — 0,1%, дрожжевой экстракт — 0,1%, рН — 7,2 жизненный цикл популяции *TP* осуществляется за 96 ч. За это время она проходит лаг-фазу (0–24 ч), логарифмическую фазу (24–48 ч), фазу замедленного роста (48–72 ч) и к 96 ч вступает в стационарную фазу.

4.2. Критерии токсичности

LD_{16} — доза БАД в мг/мл культуры, вызывающая в остром и подостром экспериментах гибель 16% организмов.

LD_{50} — средняя смертельная доза. Доза БАД в мг/мл культуры, вызывающая в остром и подостром экспериментах гибель 50% организмов.

LD_{84} — доза БАД в мг/мл культуры, вызывающая в остром и подостром экспериментах гибель 84% организмов.

ED_{16} , ED_{50} , ED_{84} — дозы БАД, вызывающие в хроническом эксперименте угнетение генеративной функции *TP* на 16, 50 и 84% по отношению к контролю.

$K_{\text{кум}}$ — коэффициент кумуляции. Рассчитывается путем отношения средней смертельной дозы, определенной в подостром эксперименте, к средней смертельной дозе, полученной в остром эксперименте; или путем отношения ED_{50} , определенной в стационарной фазе роста хронического эксперимента, к ED_{50} , рассчитанной в логарифмической фазе роста хронического эксперимента.

4.3. Критерии опасности

МНД — максимальная неэффективная доза БАД (мг/мл), определяемая в хроническом и пролонгированном экспериментах.

Z_{chr} — зона хронического действия. Рассчитывается путем отношения LD_{50} к ED_{50} .

$LD_{50}/\text{МНД}$ — показатель опасности, полученный отношением средней смертельной дозы, рассчитанной в остром эксперименте, к максимальной неэффективной дозе, определенной в хроническом или пролонгированном экспериментах.

$K_{\text{кд}}$ — коэффициент комбинированного действия. Характеризует характер комбинированного действия составляющих многокомпонентных БАД. Рассчитывается по показателям токсичности острого и хронического экспериментов и показателю биологической активности хронического эксперимента.

4.4. Критерии биологической активности

Принцип методов оценки безвредности БАД, приведенных в инструкции, заключается в анализе и количественной оценке изменений скорости роста популяции TP , развивающейся в среде культивирования, содержащей БАД, с использованием коэффициента адаптогенности ($K_{\text{ад}}$) — интегрального показателя, являющегося числовым выражением ответной реакции организма на действие объекта исследования. $K_{\text{ад}}$ характеризует адаптационный потенциал популяции, рассчитывается в хроническом и пролонгированном экспериментах, используется также для установления МНД.

Резерв адаптации ($P_{\text{ад}}$) — показатель, характеризующий сохранение адаптационных возможностей популяции после длительного воздействия объекта.

5. Оценка безвредности многокомпонентных БАД на этапе разработки рецептур

5.1. В остром, подостром и хроническом экспериментах осуществляется токсиколого-гигиеническая оценка компонентов, входящих в состав БАД, при изолированном воздействии и в комбинациях, соответствующих разрабатываемым рецептурам. По критериям токсичности (п. 4.2) и опасности (п. 4.3) определяется класс опасности.

5.2. По показателям токсичности острого и хронического экспериментов рассчитывают коэффициент комбинированного действия ($K_{\text{кд}}$) и оценивают его характер: аддитивное (суммация токсических эффектов), более чем аддитивное (потенцирование токсических эффектов — синергизм), менее чем аддитивное (снижение токсического эффекта — антагонизм).

5.3. В хроническом и пролонгированном экспериментах исследуют безвредность и эффективность БАД по критериям $K_{ад}$, $P_{ад}$. По результатам хронического эксперимента оценивают комбинированное действие компонентов БАД по показателю биологической активности ($K_{ад}$).

5.4. Средой культивирования является среда Б (п. 1.2, гл. 4).

6. Оценка безвредности БАД (источники аминокислот, витаминов, минералов) на этапе реализации

6.1. Токсикологическая оценка БАД сложного состава (например, витаминно-минеральных комплексов) на этапе реализации осуществляется с применением тех же принципов и критериев, что и индивидуальных химических веществ. Определяется класс опасности по критериям токсичности (п. 4.2) и опасности (п. 4.3).

6.2. Безвредность и эффективность рекомендуемого суточного потребления (РСП) оценивается по результатам анализа адаптогенных эффектов БАД ($K_{ад}$, $P_{ад}$) в пролонгированном эксперименте.

6.3. Используются среды культивирования с содержанием нутриентов, соответствующим адекватному уровню потребления человеком, и с 50% дефицитом микронутриентов.

ГЛАВА 3 ОБОРУДОВАНИЕ, ЛАБОРАТОРНАЯ ПОСУДА И МАТЕРИАЛЫ, РЕАКТИВЫ

Для оценки безвредности БАД используется нижеперечисленное оборудование, лабораторная посуда и материалы, растворы, реактивы:

1. Оборудование:

- термостат электрический воздушный, обеспечивающий температуру внутри камеры 25°C ;
- шкаф сухотепловой стерилизационный для температурных режимов: $85\pm 3^{\circ}\text{C}$ 30 ± 5 мин, $120\pm 3^{\circ}\text{C}$ 45 ± 5 мин, $160\pm 3^{\circ}\text{C}$ 150 ± 5 мин;
- иономер лабораторный (рН-метр), погрешность измерения $\text{pH}\pm 0,05$;
- весы лабораторные электронные с диапазоном измерения от 0 до 200 г, погрешность измерений $\pm 0,05-0,1$ г;
- весы электронные аналитические, диапазон измерения 0,1–210 г;
- электропечь низкотемпературная лабораторная для сушки посуды;
- дозаторы пипеточные объемом 20–200; 100–1000; 1000–5000 мкл;
- микроскоп медицинский с увеличением 40–1000^x;
- термогигрометр для измерения относительной влажности, температуры и атмосферного давления;
- холодильник бытовой по ГОСТ 16317-87;
- электроплитка бытовая по ГОСТ 14919-83;
- мельница лабораторная.

2. Лабораторная посуда и материалы:

- бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026-76;

- колбы плоскодонные конические объемом 50–1000 мл со шлифом с притертыми пробками и без шлифа по ГОСТ 25336-82;
 - колбы мерные объемом 25–2000 мл с притертыми пробками по ГОСТ 1770-74;
 - пробирки стеклянные мерные с притертыми пробками объемом 10–20 мл по ГОСТ 1770-74;
 - стаканы стеклянные объемом 50–1000 мл по ГОСТ 25336-82;
 - ступки фарфоровые с пестиками разных размеров;
 - сита лабораторные металлотканые (сеткой проволочной н/ж) с квадратными ячейками (диаметром ячейки 0,1; 0,2 мм) по ГОСТ 6613-86;
 - маркеры водостойкие;
 - наконечники к дозаторам по ГОСТ 21241-89;
 - пипетки стерильные стеклянные или пластиковые объемом 1; 10 мл;
 - пипетки стеклянные мерные на 1–10 мл по ГОСТ 20292-74;
 - цилиндры мерные объемом 50–100 мл по ГОСТ 1770-74;
 - пробирки бактериологические по ГОСТ 25336-82;
 - пробки различных размеров: стеклянные, резиновые;
 - спиртовки лабораторные стеклянные по ГОСТ 23932-90Е;
 - стекла предметные по ГОСТ 9284;
 - стекла покровные;
 - камера Фукса–Розенталя;
 - бюксы стеклянные;
 - фильтры бумажные или ватно-марлевые;
 - флаконы стеклянные на 10 мл;
 - чашки биологические (Петри) по ГОСТ 23932-90Е;
 - штативы для пробирок;
 - вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556-81;
 - бинт медицинский по СТБ 2144-2010;
 - пинцеты анатомический и хирургический;
 - палочки стеклянные;
- 3. Реактивы, компоненты сред:**
- вода дистиллированная по ГОСТ 7609–72;
 - пептон казеиновый микробиологический;
 - казеин;
 - копреципитат;
 - натрий хлористый по ГОСТ 4233-77;
 - натрия гидроокись по ГОСТ 4328-77;
 - глюкоза безводная по ГОСТ 6038-79;
 - калий хлористый по ГОСТ 4234-77;
 - дрожжевой экстракт сухой;
 - кальций углекислый по ГОСТ 4530-76;
 - магний серноокислый 7-водный по ГОСТ 4523-77;
 - медь (II) серноокислая 5-водная по ГОСТ 4165-78;
 - марганец серноокислый по ГОСТ 435-77;
 - цинк серноокислый по ГОСТ 4174-77;

- железо сернокислое 7-водное по ГОСТ 4148-78;
- калий фосфорнокислый двузамещенный по ГОСТ 2493-75;
- алюмокалиевые квасцы по ГОСТ 4329-77;
- калий йодистый по ГОСТ 4232-74;
- кобальт хлористый (II), 6-водный по ГОСТ 4525-77;
- натрий фтористый по ГОСТ 4463-76;
- пептон сухой микробиологический;
- спирт этиловый 96%;
- йода раствор спиртовой 50 мг/мл;
- холекальциферол (витамин D);
- ретинол (витамин A);
- викасол (витамин K);
- α -токоферол (витамин E);
- тиамин гидрохлорид (витамин B₁);
- рибофлавин (витамин B₂);
- никотиновая кислота (витамин PP);
- холин хлорид (витамин B₄);
- кальция пантотенат (витамин B₃);
- пиридоксин (витамин B₆);
- цианокобаламин (витамин B₁₂);
- биотин (витамин B_n);
- инозит (витамин B₈);
- парааминобензойная кислота;
- фолиевая кислота (витамин B_c);
- аскорбиновая кислота (витамин C).

Допускается применение оборудования и материалов с аналогичными по назначению техническими и метрологическими характеристиками для проведения исследований в соответствии с данным документом. При их применении следует руководствоваться рекомендациями изготовителя. Биологические препараты импортного производства должны иметь международный сертификат качества ИСО 9000 или EN 29000, препараты отечественного производства должны вырабатываться по нормативной документации, утвержденной в установленном порядке.

ГЛАВА 4 ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Культивирование *Tetrahymena pyriformis*

1.1. Культура *TP* требует к себе большого внимания, ибо от ее сохранности и качества зависит исход всех последующих исследований. Наиболее надежный способ хранения культуры – систематический пересев ее на новую питательную среду.

1.2. Маточная культура инфузорий выращивается при температуре 25°C в питательной среде следующего состава: - среда А: пептон — 2,0 г, глюкоза — 0,5 г, натрий хлористый — 0,1 г, дрожжевой экстракт — 0,1 г,

дистиллированная вода — до 1 л; среда Б: пептон — 20,0 г, глюкоза — 5,0 г, натрий хлористый — 1,0 г, дрожжевой экстракт — 1 г, дистиллированная вода — до 1 л; рН среды А и Б доводят до 7,1–7,2.

1.3. После этого среду разливают по 10 мл в стерильные конические колбочки на 50 мл с ватно-марлевыми пробками и подвергают тиндализации, выдерживая четырежды при 85°C в течение 30 мин с интервалом в 1 сут. В промежутках между нагреваниями колбочки хранят при комнатной температуре. Колбочки со средой можно хранить в холодильнике при 4±2°C в течение 1 мес.

1.4. Для получения достоверных результатов необходимо работать с чистой культурой инфузорий. Проверку культуры на стерильность производят путем посева на мясопептонный агар, суслоагар, бульон. В случае загрязнения культуры микрофлорой (плесени, грибки, бактерии), приводящего к изменению чувствительности инфузорий к воздействию изучаемых факторов или даже к гибели *ТР*, ее очищают антибиотиками, к которым загрязняющая культуру микрофлора проявила чувствительность, или вытяжками из растительного сырья, обладающего бактерицидным действием.

1.5. Для подсчета инфузорий используют камеру Фукса–Розенталя. Считают под микроскопом при увеличении: объектив — 10, окуляр — 10. Инфузории предварительно фиксируют 5%-м спиртовым раствором йода. Для этого 1 мл культуры вносят в 10-миллиметровый флакончик, добавляют каплю раствора йода. Флакончик закрывают пробкой и встряхивают. Фиксированную культуру вводят в камеру. Подсчитывают число инфузорий в 10 больших квадратах по диагонали. Умножая среднее число инфузорий в одном квадрате на 5000, находят число инфузорий в 1 мл культуры. При необходимости можно развести культуру, добавив 3 мл 0,1% раствора хлорида натрия (0,5 г хлорида натрия растворяют в 500 мл дистиллированной воды). Тогда при подсчете культуры среднее число инфузорий в одном квадрате умножают на 20000.

1.6. Пересев маточной культуры производится одноразовыми стерильными серологическими пипетками на 1 мл 2 раза в неделю, например, в понедельник и пятницу; 0,2 мл культуры инфузорий, выращенной в среде А, пересеивается в среду Б; 0,2 мл культуры инфузорий, выращенной в среде Б, пересеивается в среду А. Такое чередование позволяет длительное время поддерживать жизнедеятельность инфузорий на оптимальном уровне.

2. Требования к помещению для проведения исследования

2.1. Поскольку при работе с *ТР* следует соблюдать стерильность, необходимы моечная, бокс с предбоксником, лабораторная комната. В боксе осуществляются работы, требующие строгого соблюдения стерильности: пересев маточной культуры, проведение хронического и пролонгированного экспериментов. Стерилизация бокса осуществляется бактерицидными лампами.

2.2. В лабораторной комнате осуществляются подготовительные работы (приготовление реактивов, посуды, подготовка проб продуктов, приготовление питательных сред и т. д.), сушится и стерилизуется посуда, осуществляются подсчет инфузорий под микроскопом, компьютерная обработка данных.

2.3. Помещение должно быть сухим, чистым, в нем не должны проводиться какие-либо другие исследования.

2.4. Оборудование и приборы для работы с *ТР* не следует использовать для других работ, а для посуды это полностью исключается.

3. Подготовка посуды

3.1. Чистота посуды достигается путем тщательной мойки проточной водопроводной водой, затем дистиллированной. В качестве моющих средств используется хромовая смесь или детергенты, предназначенные для работы с культурой клеток, после применения которых посуда тщательно моется и прополаскивается водопроводной водой не менее 20 раз и дистиллированной — трех раз. Использование стиральных порошков, паст, поверхностно-активных веществ исключается. Сушка чистой посуды осуществляется в электропечи низкотемпературной лабораторной при температуре 100°C.

3.2. Ватно-марлевые пробки для каждой серии экспериментов готовят заново. Вымытые и высушенные колбы закрывают ватно-марлевыми пробками и стерилизуют при 160°C в течение 2,5 ч.

ГЛАВА 5 ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Определение класса опасности БАД на основании параметров токсичности и опасности в остром, подостром и хроническом экспериментах

1.1. Класс опасности определяется при оценке БАД на этапах разработки (п. 5, гл. 2) и реализации (п. 6, гл. 2).

1.2. Отбор проб и составление среднего образца БАД осуществляются согласно действующим на период проведения исследования техническим нормативным правовым актам.

1.3. Первичная токсикологическая оценка БАД на *ТР*.

1.3.1. Установление параметров токсичности в остром и подостром эксперименте не требует строгого соблюдения стерильности. Стерильной должна быть только исходная культура.

1.3.2. Острый (0,5–6 ч) и подострый (24 ч) эксперименты осуществляются на популяции *ТР* в стационарной фазе роста, поддерживаемой в питательной среде Б при 25°C. Эффект токсического действия учитывается по реакции «жизнь-смерть». На данном этапе определяются параметры острой и подострой токсичности: доза БАД, вызывающая в остром и подостром экспериментах гибель 16% организмов (LD_{16}), средняя смертельная доза, вызывающая в остром и подостром экспериментах гибель 50% организмов (LD_{50}), доза препарата, вызывающая в остром и подостром экспериментах гибель 84% организмов (LD_{84}), коэффициент кумуляции ($K_{кум}$).

1.3.3. Метод определения зависит от степени токсичности исследуемых объектов. В зависимости от токсичности исследуемого объекта длительность острого эксперимента 0,5–6 ч, подострого — 24 ч.

1.3.4. БАД измельчается с помощью лабораторной мельницы, затем просеивается через сито (диаметр ячеек 200 мкм = 0,2 мм или 100 мкм = 0,1 мм). Затем готовятся водные растворы или суспензии. В случае растворения БАД в органическом растворителе (например, спирт) последний удаляется выпариванием после внесения раствора в воду; рН растворов или суспензий доводится до 7,1–7,2.

1.3.5. Определяются смертельная и недействующая концентрация. Готовятся 3–5 промежуточных концентраций. По 1 мл раствора каждой концентрации вносятся в три 10-миллилитровых флакончика. В каждую пробу добавляется инокулят инфузорий в стационарной фазе роста (100000 организмов) и инкубируется при 25°C. По истечении срока инкубации под микроскопом в нативном препарате наблюдают картину интоксикации. В счетной камере Фукса–Розенталя подсчитывают число погибших инфузорий до их фиксации и общее число инфузорий после фиксации 5% раствором йода. При подсчете % летальности учитывается число лизировавших организмов.

1.3.6. Пробит-анализ кривой летальности проводится с использованием общепринятых в токсикологии методов (таблицы 1, 2).

Таблица 1. — Перевод процентов летальности в пробиты по Блессу

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	–	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,44	3,52	3,60	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,06	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,62	4,64	4,67	4,70	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,98
50	5,00	5,02	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,30	5,33	5,36	5,38	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
90	6,28	6,34	6,40	6,48	6,56	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
Примечание — Для эффекта 0% принимают пробит 3,04; 100% — 6,96.										

Таблица 2. — Весовой коэффициент пробитов

Пробит	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
3	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0	2,3	2,6	2,9	3,2
4	3,5	3,7	3,9	4,1	4,3	4,5	4,6	4,7	4,8	4,9
5	5,0	4,9	4,8	4,7	4,6	4,5	4,3	4,1	3,9	3,7
6	3,5	3,2	2,9	2,6	2,3	2,0	1,8	1,6	1,4	1,2

Зависимость между дозами и пробитами выражается уравнением:

$$Y = A_0 + A_1 X. \quad (1)$$

A_1 и A_0 находят по формулам:

$$\frac{\sum XB}{\sum B} (\sum YB - \sum XBA_1) + \sum X^2 BA_1 = \sum XYB \quad (2)$$

$$A_0 = \frac{\sum YB - \sum XBA_1}{\sum B} \quad (3)$$

Ошибка DL_{50} ($S\bar{x}$) рассчитывается двумя способами:

а) по формуле Миллера и Тейнера:

$$S\bar{x} = \pm \frac{2\delta}{\sqrt{2N}}, \quad (4)$$

где $2\delta = LD_{84} - LD_{16}$;

N — общее число инфузорий в инокулятах ($100000 \times$ число проб), летальность в которых была не менее 6,7% (пробит 3,5) и не более 93,3% (пробит 6,5).

б) путем статистической обработки результатов 3–6 определений с расчетом средней арифметической каждого вариационного ряда и стандартной ошибки.

1.3.7. Для проверки правильности расчета строится график. По оси ординат откладываются пробиты Y для испытанных доз, по оси абсцисс — места испытанных доз БАД. Совпадение LD_{16} , LD_{50} , LD_{84} расчетных с графическими свидетельствует о правильности этих данных.

1.3.8. Коэффициент кумуляции определяется как частное между средней смертельной дозой, полученной в подостром эксперименте и средней смертельной дозой, полученной в остром эксперименте.

$$K_{\text{кум}} = \frac{LD_{50} \text{chronica}}{LD_{50} \text{acuta}}. \quad (5)$$

По результатам оценки средней смертельной дозы и кумулятивных свойств устанавливается класс токсичности исследуемой БАД.

1.4. Токсикологическая оценка БАД на TP в хроническом эксперименте.

1.4.1. Исходными данными при постановке эксперимента по исследованию хронической токсичности БАД являлись результаты их первичной токсикологической оценки.

1.4.2. Пробоподготовка БАД проводится по п. 1.3.4.

1.4.3. Лабораторная посуда подвергается суховоздушной стерилизации при 120°C в течение 45 мин. Дистиллированная вода, используемая для разведения, кипятится в течение 15 мин.

1.4.4. Исследование осуществляется в боксе в стерильных условиях. Растворы или суспензии исследуемых объектов и стерильная среда культивирования разливаются по 10 мл в стерильные колбочки на 50 мл с ватно-марлевыми пробками. Каждая концентрация исследуется не менее чем в трех повторностях. Колбочки с растворами или суспензиями дополнительно стерилизуются при 85°C в течение 30 мин. После охлаждения в каждую пробу вносят по 20000 инфузорий трехсуточной культуры *TP*, культивируемой в среде Б (2000 инфузорий/мл). Пробы в течение 96 ч выдерживают в термостате с вентиляцией при 25±0,1°C. Анализ и оценка результата осуществляются на этапах интерфазной активности *TP* через 24; 48; 72 и 96 ч. Для этого из каждой колбочки стерильно отбирают по 1 мл культуры. В нативном препарате отмечают состояние организмов: наличие погибших, характер морфологических и функциональных изменений.

1.4.5. После фиксации 1 каплей 5% раствора йода подсчитывают число организмов в счетной камере Фукса–Розенталя в 10 больших квадратах. Умножая среднее число организмов в 1 квадрате на 5000 (если отобранный инокулят не разводился) или на 20000 (при разведении инокулята в 4 раза), получают число особей в 1 мл культуры.

1.4.6. Параметры хронической токсичности определяют в диапазоне концентраций, когда увеличение эффекта пропорционально увеличению дозы. Угнетение роста для каждой из доз в этом диапазоне рассчитывают по формуле:

$$\text{Угнетение роста (\%)} = 100 - (N_o / N_k \times 100), \quad (6)$$

где N_o — число организмов в опыте;

N_k — число организмов в контроле.

ED_{16} , ED_{50} , ED_{84} рассчитывают с помощью таблиц и формул, используемых для определения LD_{16} , LD_{50} , LD_{84} (п. 1.3.6).

1.4.7. По результатам подсчета числа организмов определяют концентрации, вызывающие угнетение роста популяции на 16% (ED_{16}), 50% (ED_{50}), 84% (ED_{84}), коэффициент кумуляции при хроническом воздействии ($K_{\text{кум chr}}$), зону хронического действия (Z_{chr}) (пп. 4.2, 4.3, гл. 2).

1.4.8. В хроническом эксперименте по исследованию биологической активности БАД в нетоксичных концентрациях определяют коэффициент адаптогенности ($K_{\text{ад}}$). На основании полученных данных определяют

максимальную неэффективную дозу (МНД), рассчитывают показатель ЛД₅₀/МНД.

1.4.9. По результатам оценки полученных данных устанавливают класс опасности БАД (таблица 3).

Таблица 3. — Гигиеническая классификация БАД по результатам изучения их токсичности на *Tetrahymena pyriformis*

Показатели токсичности и опасности	Классы по убывающей степени токсичности и опасности				
	1 чрезвычайно опасные	2 высоко-опасные	3 умеренно опасные	4 мало-опасные	5 неопасные
ЛД ₅₀ , мг/мл	менее 0,1	0,1–1,0	1,1–20	21–50	более 50
Ккум _{ac} , Ккум _{chr}	менее 0,1	0,10–0,30	0,31–0,49	0,50–1,0	более 1,0
Z _{chronica}	более 10	10,0–5,0	4,9–2,5	2,49–1,0	менее 1,0
МНД, мг/мл	менее 10 ⁻⁶	10 ⁻⁶ –10 ⁻⁴	10 ⁻⁴ –10 ⁻¹	0,11–1,0	более 1,0
ЛД ₅₀ /МНД	более 10 ⁵	10 ⁵ –10 ⁴	Менее 10 ⁴ –2×10 ²	менее 200–50	менее 50

2. Оценка безвредности многокомпонентных биологически активных добавок к пище на этапе разработки их состава с учетом комбинированного действия компонентов БАД

2.1. При проведении исследований в качестве среды культивирования используется среда Б (п. 1.2, гл. 4).

2.2. В остром, подостром и хроническом экспериментах осуществляется токсиколого-гигиеническая оценка компонентов, входящих в состав БАД, при изолированном воздействии и в комбинациях, соответствующих разрабатываемым рецептурам. По критериям токсичности (п. 4.2, гл. 2) и опасности (п. 4.3, гл. 2) определяется класс опасности.

2.3. Комбинированное действие (КД) многокомпонентных БАД в остром эксперименте на *TR* исследуют общепринятыми в токсикологии методами по показателю ЛД₅₀.

2.3.1. Характер КД выявляют и оценивают на основе сопряженного анализа дозовых зависимостей, полученных для БАД и отдельных ее компонентов:

$$K_{\text{кд}} = \frac{ЛД_{50\text{эксп}}}{D_{\text{экв}}}, \quad (7)$$

где ЛД_{50эксп} — средняя смертельная доза многокомпонентной БАД, полученная экспериментальным путем;

$D_{\text{экв}}$ — эквивалентная доза для исследуемой БАД, рассчитанная с учетом удельной дозы (D_i) каждого компонента (i) смеси и результатов определения его средней смертельной дозы.

2.3.2. По формуле (7) рассчитывается комбинированное действие БАД в хроническом эксперименте по ED_{50} .

2.3.3. $K_{\text{кд}}$ равен $1 \pm 0,1$ при аддитивном действии компонентов смеси, более 1,1 — при действии более чем аддитивном (потенцирование эффектов); менее 0,9 — при действии менее чем аддитивном (антагонизм эффектов).

2.4. Биологическое действие многокомпонентной БАД и каждого компонента оценивается в хроническом и пролонгированном экспериментах с расчетом коэффициента адаптогенности, резерва адаптации и характера комбинированного действия по коэффициенту адаптогенности.

2.4.1. Оценка БАД в пролонгированном эксперименте осуществляется при семикратном (что соответствует семи поколениям теплокровных животных) пересеве популяции TP , культивируемой в среде, содержащей исследуемые объекты, в свежеприготовленную среду, содержащую объект в тех же концентрациях.

Этапы пролонгированного эксперимента:

- через 24; 48; 72; 96 ч (первый жизненный цикл) осуществляется регистрация состояния популяции и подсчет организмов. С интервалом в 48 ч, когда популяция находится в логарифмической фазе роста, после предварительного подсчета инфузорий производят их пересев в свежеприготовленные растворы исследуемых объектов;

- 48 ч — подсчет и пересев в свежеприготовленные растворы объектов;

- 96 ч — подсчет и пересев в свежеприготовленные растворы объектов;

- 144 ч — подсчет и пересев в свежеприготовленные растворы объектов;

- 192 ч — подсчет и пересев в свежеприготовленные растворы объектов;

- 240 ч — подсчет и пересев в свежеприготовленные растворы объектов;

- 288 ч — подсчет и пересев в свежеприготовленные растворы объектов

исследуемых концентраций;

- 312; 336; 360; 384 ч (7-й жизненный цикл) — регистрация состояния и подсчет организмов.

2.4.2. В первом жизненном цикле (24–48–72–96 ч) рассчитывают $K_{\text{ад}24-96}$ компонентов БАД и их комбинаций в составе БАД. Оценивают характер комбинированного действия компонентов по коэффициенту адаптогенности. В 7-м жизненном цикле (312–336–360–384 ч) определяют $K_{\text{ад}312-384}$. Дополнительно рассчитывается показатель, характеризующий резерв адаптационных возможностей популяции — $P_{\text{ад}}$. Показатели 7-го жизненного цикла позволяют судить об отдаленных эффектах действия БАД.

2.4.3. По итогам оценки полученных результатов для каждой из исследуемых комбинаций и концентраций БАД устанавливают максимальную неэффективную концентрацию (дозу), которую учитывают при определении класса опасности.

2.4.4. Коэффициент адаптогенности популяции — интегральный показатель, являющийся числовым выражением ответной реакции организма на действие БАД.

$K_{ад24-96}$ — коэффициент адаптогенности 1-го жизненного цикла популяции.

$K_{ад312-384}$ — коэффициент адаптогенности 7-го жизненного цикла популяции.

$P_{ад}$ — резерв адаптации, коэффициент, характеризующий адаптационный потенциал популяции после длительного воздействия БАД.

Эти показатели рассчитываются по формулам 8–10:

$$K_{ад24-96} = \frac{N_{o-24} + N_{o-48} + N_{o-72} + N_{o-96}}{N_{k-24} + N_{k-48} + N_{k-72} + N_{k-96}} \quad (8)$$

$$K_{ад312-384} = \frac{N_{o-312} + N_{o-336} + N_{o-360} + N_{o-384}}{N_{k-312} + N_{k-336} + N_{k-360} + N_{k-384}} \quad (9)$$

$$P_{ад} = \frac{K_{ад312-384}}{K_{ад24-96}} \quad \text{или} \quad P_{ад} = \frac{N_{o-312} + N_{o-336} + N_{o-360} + N_{o-384}}{N_{o-24} + N_{o-48} + N_{o-72} + N_{o-96}} \quad (10)$$

где N_o — число организмов в опыте;

N_k — число организмов в контроле.

2.4.5. Если $K_{ад}$ и $P_{ад}$ равны $1,00 \pm 0,05$, это свидетельствует о равновесии механизмов адаптации (гомеостаз). Когда эти величины менее 1, адаптационный потенциал снижен. Если же $K_{ад}$ более 1, это свидетельствует о стимуляции механизмов адаптации.

2.4.6. В таблице 4 приведена шкала количественной оценки адаптогенных свойств биологически активных комплексов растений.

Таблица 4. — Шкала количественной оценки адаптогенных свойств БАД

Величина коэффициента адаптогенности	Оценка адаптогенных свойств	
	по выраженности эффекта	в баллах
1,00–1,05	Отсутствуют	0
1,06–1,10	Слабо выражены	1
1,11–1,20	Умеренно выражены	2
1,21–1,40	Выражены	3
1,41–1,60	Сильно выражены	4
1,61–1,99	Чрезвычайно выражены	5
2,00 и более	Стимуляторы	

2.4.7. При изучении хронического комбинированного действия многокомпонентных БАД по функциональному показателю ($K_{ад}$) БАД и их компоненты исследуются в диапазоне концентраций от пороговой до рекомендуемой и исчезающе малой. $K_{ад}$ рассчитывается как для индивидуальных компонентов, так и для их комбинаций в составе БАД.

2.4.8. Коэффициент хронического комбинированного действия смеси веществ – частное, полученное путем деления коэффициента адаптогенности смеси веществ, умноженного на число компонентов смеси (n), на сумму коэффициентов адаптогенности каждого индивидуального компонента смеси (формула 11).

$$K_{кд} = \frac{K_{адсмеси} \times n}{K_{ад-1} + \dots + K_{ад-n}} . \quad (11)$$

2.4.9. $K_{кд}$ равен $1 \pm 0,1$ при суммации эффектов (аддитивное действие). $K_{кд}$ менее 0,9 свидетельствует о снижении аддитивных свойств смеси и увеличении токсического эффекта; $K_{кд}$ более 1,1 — о возрастании аддитивных свойств смеси и ее адаптогенного эффекта.

2.5. С целью установления безвредной дозы для человека биологическое действие БАД исследуется в 5–6 концентрациях: максимальная — нетоксичная концентрация, определенная в хроническом эксперименте, и несколько последовательных разведений этой концентрации.

2.5.1. Определяется концентрация вещества, безопасная и в то же время эффективная для тест-объекта по комплексу оцениваемых показателей – доза экспериментальная ($D_{эксп.}$). Она является исходной для расчета суточной дозы БАД, эффективной и безопасной для приема человеком в течение длительного времени ($D_{чел.}$).

$D_{чел.}$ в мг равняется $D_{эксп.}$ в мг, деленной на содержание белка в среде культивирования *Tetrahymena pyriformis* в мг/мл и умноженной на суточное потребление белка человеком в мг.

$$D_{чел} = \frac{D_{эксп} \times 80000}{4} = D_{эксп} \times 20000 \quad (12)$$

2.5.2. Такой подход правомерен и целесообразен, поскольку биологически активные вещества проявляют свою эффективность, включаясь в процессы метаболизма, в которых активно участвуют белки.

3. Оценка безвредности БАД, являющихся источниками витаминов и минеральных веществ

3.1. Определение класса опасности по п. 3, гл. 4.

3.2. При исследовании биологического действия БАД в пролонгированном эксперименте используются среды культивирования (СК) двух составов:

среда № 1 — полноценная среда, содержащая белки (казеин или копреципитат, или яичный белок, или пептон), углеводы (глюкоза, крахмал, мальтодекстрин) в пропорции 1:4 (4 мг/мл белка и 16 мг/мл углеводов), минералы и витамины в концентрациях, эквивалентных рекомендуемым уровням потребления человеком. Контролем (К-1) является среда № 1 без БАД;

среда № 2 — среда культивирования, содержащая белки и углеводы в таком же количестве, как и среда № 1, а витамины и минеральные вещества в концентрациях, соответствующих 50% от адекватного уровня потребления. Контролем (К-2) является среда № 2 без БАД.

3.2.1. Для приготовления среды, содержащей витамины и минеральные вещества, используются адекватные уровни (АУ) суточного потребления пищевых и биологически активных веществ в составе рациона энергетической ценностью 2300 ккал, приведенные в Единых санитарно-эпидемиологических и гигиенических требованиях к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю). С использованием коэффициента экстраполяции рассчитывается содержание витаминов и минеральных элементов (МЭ) в 1 мл среды культивирования *TP* (таблицы 5, 7).

Таблица 5. — Содержание витаминов в среде культивирования *Tetrahymena pyriformis*, соответствующее адекватному уровню потребления человеком

Витамины и витаминоподобные вещества	Суточная доза для человека согласно Единым санитарным требованиям Таможенного союза (ТС)	Содержание в 1 мл среды культивирования <i>Tetrahymena pyriformis</i>
В ₁ (тиамин)	1,5 мг	0,0001 мг/мл
В ₂ (рибофлавин)	1,8 мг	0,0001 мг/мл
В ₃ (РР, ниацин)	20 мг	0,0010 мг/мл
В ₄ (холин-хлорид)	0,5 г	0,0250 мг/мл
В ₅ (пантотенат)	5 мг	0,0003 мг/мл
В ₆ (пиридоксин)	2 мг	0,0001 мг/мл
В ₉ (В _с , фолацин)	400 мкг	0,0200 мкг/мл
В ₁₂ (кобаламин)	3 мкг	0,0002 мкг/мл
В _н (биотин)	50 мкг	0,0025 мкг/мл
В ₈ (инозит)	500 мг	0,0250 мг/мл
ПАБК (параамино-бензойная кислота)	100 мг	0,0050 мг/мл
С (аскорбиновая кислота)	90 мг	0,0045 мг/мл
А (ретинол)	0,9 мг РЭ	0,0450 мкг/мл
Е (токоферолы)	15 мг ТЭ	0,0008 мг/мл
Д (кальциферол)	10 мкг (400 МЕ)	0,0005 мкг/мл
К (филлохиноны)	120 мкг	0,0060 мкг/мл

3.2.2. Навески витаминов берутся на аналитических весах. Водорастворимые витамины (ВВ) растворяются в подогретой дистиллированной воде; объем стандартного раствора 200 мл. Жирорастворимые витамины (ЖВ) растворяются в этаноле; объем стандартного раствора 200 мл. Растворы ВВ и ЖВ переливаются в склянки темного стекла с притертыми пробками и хранятся в холодильнике (таблица 6).

Таблица 6. — Приготовление растворов витаминов, соответствующих адекватному уровню потребления

Витамины	Приготовление стандартного раствора			Внесение в среду культивирования <i>ТР</i>		
	навеска	H ₂ O, мл	концентрация	стандарт, мл	среда, мл	концентрация в СК
Витамины водорастворимые (ВВ)						
V ₁	10 мг	до 200	0,0500 мг/мл	2	до 1000	0,0001 мг/мл
V ₂	10 мг	до 200	0,0500 мг/мл	2	до 1000	0,0001 мг/мл
V ₃ (РР)	100 мг	до 200	0,5000 мг/мл	2	до 1000	0,0001 мг/мл
V ₄ (холин-хлорид)	2500	до 200	12,5 мг/мл	2	до 1000	0,0250 мг/мл
V ₅	30 мг	до 200	0,1500 мг/мл	2	до 1000	0,0003 мг/мл
V ₆	10 мг	до 200	0,0500 мг/мл	2	до 1000	0,0001 мг/мл
V ₉ (Вс.)	2 мг	до 200	10 мкг/мл	2	до 1000	0,0200 мкг/мл
V ₁₂	20 мг	до 100	200 мкг/мл	—	—	—
	200 мкг	до 10	20 мкг/мл	—	—	—
	20 мкг	до 200	0,1 мкг/мл	2	до 1000	0,0002 мкг/мл
V _н (биотин)	250 мг	до 100	2,5 мг/мл	—	—	—
	2,5 мг	до 10	250 мкг/мл	—	—	—
	250 мкг	до 200	1,25 мкг/мл	2	до 1000	0,0025 мкг/мл
V ₈ (инозит)	2500 мг	до 200	12,5 мг/мл	2	до 1000	0,0250 мг/мл
ПАБК	500 мг	до 200	2,5 мг/мл	2	до 1000	0,0050 мг/мл
С	450 мг	до 200	2,25 мг/мл	2	до 1000	0,0045 мг/мл
Витамины жирорастворимые (ВЖ) в этаноле						
А	4,5 мг	до 200	22,5 мкг/мл	2	до 1000	0,0450 мкг/мл
Е	80 мг	до 200	0,4 мг/мл	2	до 1000	0,0008 мг/мл
Д	50 мг	до 100	500 мкг/мл	—	—	—
	500 мкг	до 10	50 мкг/мл	—	—	—
	50 мкг	до 200	0,25 мкг/мл	2	до 1000	0,0005 мкг/мл
К	60 мг	до 100	600 мкг/мл	—	—	—
	600 мкг	до 200	3 мкг/мл	2	до 1000	0,0060 мкг/мл

3.2.3. В среду культивирования № 1 (1 л) добавляют по 2 мл смеси водорастворимых и жирорастворимых витаминов, в среду № 2 — по 1 мл.

Таблица 7. — Содержание минеральных элементов в среде культивирования *ТР*, соответствующее адекватному уровню потребления человеком

Элемент	Суточная доза для человека согласно Единым санитарным требованиям ТС	Содержание в 1 мл среды культивирования <i>ТР</i>
Кальций-ион	1000 мг	0,0500 мг/мл
Магний-ион	400 мг	0,0200 мг/мл
Фосфор-ион	800 мг	0,0400 мг/мл
Калий-ион	2500 мг	0,1250 мг/мл
Натрий-ион	1300 мг	0,0650 мг/мл
Железо-ион	18 мг	0,0009 мг/мл
Цинк-ион	12 мг	0,0006 мг/мл
Йод-ион	150 мкг	0,0075 мкг/мл
Селен-ион	75 мкг	0,0038 мкг/мл
Медь-ион	1 мг	0,0500 мкг/мл
Молибден-ион	70 мкг	0,0035 мкг/мл
Хром-ион	50 мкг	0,0025 мкг/мл
Марганец-ион	2 мг	0,1000 мкг/мл
Кремний-ион	30 мг	0,0015 мг/мл
Кобальт-ион	10 мкг	0,0005 мкг/мл
Фтор-ион	4 мг	0,2000 мкг/мл
Ванадий-ион	15 мкг	0,0008 мкг/мл
Бор-ион	2 мг	0,1000 мкг/мл
Серебро-ион	30 мкг	0,0015 мкг/мл
Алюминий-ион	20 мг	0,0010 мг/мл

3.2.4. Исходя из содержания элемента в минеральной соли, рассчитываются навески солей для внесения в 1 л среды культивирования *ТР*, необходимые для обеспечения адекватного уровня содержания элемента в 1 мл среды.

3.2.5. Исходные растворы и смеси солей готовятся в соответствии с таблицами 8, 9. Для приготовления смеси солей А навески солей берутся на

технохимических весах, тщательно перемешиваются при растирании в ступке. Хранятся в склянке с притертой пробкой.

Таблица 8. — Приготовление солевой смеси А

Химическая формула соли	Навеска, г
CaCO ₃	12,49
MgSO ₄ 7H ₂ O	20,27
KH ₂ PO ₄	17,58
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	21,30
NaCl	16,52
KAl(SO ₄) ₂ 12 H ₂ O	1,76
Вес солевой смеси	89,92
Добавление в среду № 1, г/л	0,90
Добавление в среду № 2, г/л	0,45

3.2.6. Для приготовления смеси солей Б навески солей берутся на аналитических весах, растворяются в подогретой дистиллированной воде в мерной колбе на 200 мл. После охлаждения до комнатной температуры раствор доводится до метки. Приготовленный таким образом раствор солей Б переносится в склянку с притертой пробкой и хранится в холодильнике. Раствор йодида калия готовится в день исследования.

Таблица 9. — Приготовление солевой смеси Б

Химическая формула соли	Навеска, г/200 мл
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,4500
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,2600
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,0196
MnSO ₄ H ₂ O	0,0308
NaF	0,0526
CoCl ₂ 6H ₂ O	2,00 до 100 мг = 20 мг/мл, отсюда 1 мл до 100 мл = 0,2 мг/мл
CoCl ₂ 6H ₂ O, раствор 0,2 мг/мл	1 мл/200 мл
KI готовится в день проведения исследования	0,1960 г до 100 мл = 1,96 мг/мл
KI раствор 1,96 мг/мл	0,5 мл/200 мл
Добавление в среду № 1, мл/л	2
Добавление в среду № 2, мл/л	1

3.2.7. Среду культивирования после доведения pH до 7,1–7,2 разливают по 10 мл одноразовыми стерильными серологическими пипетками в стерильные конические колбочки на 50 мл с ватно-марлевыми пробками. Колбочки подвергают процедуре тиндализации, выдерживая трижды при 85°C в течение 30 мин с интервалом в 1 сут. В промежутках они хранятся при комнатной температуре.

3.3. Расчет концентраций БАД для исследования на инфузориях осуществляется в соответствии с рекомендуемым суточным потреблением БАД человеком, а также с учетом адекватного и верхнего допустимого уровня потребления человеком витаминов и минеральных веществ в составе БАД.

3.4. Безвредность и эффективность рекомендуемого суточного потребления (РСП) оценивается по результатам анализа адаптогенных эффектов БАД ($K_{ад}$, $P_{ад}$) в пролонгированном эксперименте.

4. Оценка безвредности БАД, являющихся источниками аминокислот

4.1. Определение класса опасности по п. 1, гл. 5.

4.2. Исследование биологического действия аминокислот осуществляется в хроническом эксперименте. БАД вносится в среду культивирования Б (п. 1.2, гл. 4) в концентрациях, эквивалентной рекомендуемой суточной дозе, и на порядок выше и ниже.

4.3. По подсчету числа инфузорий на этапах жизненного цикла популяции рассчитываются показатели жизнедеятельности и коэффициент адаптогенности, на основании чего делается вывод о безвредности рекомендуемой суточной дозы БАД.

5. Статистический анализ экспериментальных данных

5.1. Полученные экспериментальные данные обрабатывают статистически с определением средней арифметической каждого вариационного ряда, стандартной ошибки и установлением степени вероятности нулевой гипотезы по сравнению с контролем путем вычисления критерия Стьюдента. При $p < 0,05$ различие средних арифметических сравниваемых рядов считают статистически достоверным.

5.2. Оценка аналитической надежности методов исследований на *ТР* выявила их высокую чувствительность, прецизионность и правильность. Осуществление статистического контроля качества анализа методом контрольных карт качества показывает, что, например, из 24 анализов одной пробы 18 результатов определения средней смертельной дозы (75 %) находятся в пределах одного среднеквадратичного отклонения ($X \pm S$) и 6 анализов (25%) — в пределах двух среднеквадратичных отклонений ($X \pm 2S$). При этом результаты распределяются с одинаковой частотой на каждой стороне от линии средней. Коэффициент вариации колеблется от 1 до 8% и составляет в среднем 3–5%.

ГЛАВА 6 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Разработанная процедура биотестирования многокомпонентных БАД предназначена для их оценки на *ТР* по критериям токсичности и биологической активности с учетом комбинированного действия компонентов.

2. Комбинации БАД, проявившие потенцирование при острой и хронической токсичности, требуют корректировки рецептуры или отклоняются от разработки в зависимости от выраженности потенцирующего эффекта.

3. Если БАД по критериям токсичности и опасности, определенным в остром, подостром и хроническом экспериментах, относится к 1 или 2 классу опасности, то она не рекомендуется к производству и дальнейшему исследованию не подлежит.

4. БАД, относящиеся к 3–4–5 классам опасности, исследуются на протяжении семи жизненных циклов популяции по критериям биологической активности ($K_{ад24-96}$, $K_{ад312-384}$, $P_{ад}$).

5. БАД, не проявившие биологической активности в первом жизненном цикле популяции, но выявившие нарастающую токсичность при пролонгированном воздействии, не рекомендуются к производству.

6. БАД, проявившие умеренный (2 балла) и выраженный (3–4 балла) адаптогенный эффект в первом жизненном цикле, сохранившийся или возросший при пролонгированном воздействии, рекомендуются к производству.

7. БАД, проявившие чрезвычайно выраженный (5 баллов) адаптогенный эффект в первом жизненном цикле, снизившийся при пролонгированном воздействии, или приведший к срыву адаптационного потенциала популяции, не могут быть рекомендованы к производству БАД.

8. По результатам оценки БАД на *ТР* оформляется протокол исследований.