

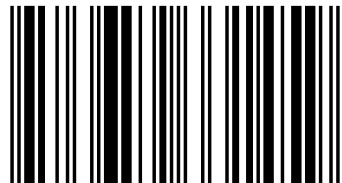


Монография посвящена проблемам комплексной оценки потребительских свойств биологически активных добавок к пище (БАД), на основе которой возможно их более рациональное использование в оздоровительных программах населением. При проведении добровольной сертификации БАД, особенно БАД-парафармацевтиков, предложено контролировать содержание в них минорных компонентов пищи официальными методами анализа или проводить клинические исследования. Показана целесообразность контроля содержания «миноров» в сырье для производства БАД и конечной продукции для определения ее сохраняемости. Биотестирование на планариях и культуре клеток рассматривается как инструмент для предварительной оценки эффективности БАД, а биотестирование по Эймс – для оценки потенциальной опасности БАД, содержащих липиды гидробионтов. Идентифицированы химические соединения, являющиеся предполагаемыми носителями мутагенной активности. Результаты работы могут быть использованы в процессе создания специальных технических регламентов на БАД, а также при учреждении процедур их добровольной сертификации и санитарной экспертизы, а также внедрены в учебный процесс при изучении курса «Пищевые и биологически активные добавки»



Василий Карагодин

Карагодин Василий Петрович, выпускник кафедры биофизики биологического факультета МГУ, сотрудник научно-исследовательского института атеросклероза Инновационного Центра Сколково (Москва, Россия), доцент Российского Экономического Университета им. Г.В.Плеханова, лектор курса «Пищевые и биологически активные добавки»



978-3-659-33145-9

Василий Карагодин

Качество и безопасность биологически активных добавок к пище

Минорные компоненты пищи, качество, сохраняемость, добровольная сертификация

Василий Карагодин

**Качество и безопасность биологически активных
добавок к пище**

Василий Карагодин

**Качество и безопасность
биологически активных
добавок к пище**

**Минорные компоненты пищи, качество,
сохраняемость, добровольная
сертификация**

LAP LAMBERT Academic Publishing

Impressum / Выходные данные

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek: Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Alle in diesem Buch genannten Marken und Produktnamen unterliegen warenzeichen-, marken- oder patentrechtlichem Schutz bzw. sind Warenzeichen oder eingetragene Warenzeichen der jeweiligen Inhaber. Die Wiedergabe von Marken, Produktnamen, Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen u.s.w. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutzgesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Библиографическая информация, изданная Немецкой Национальной Библиотекой. Немецкая Национальная Библиотека включает данную публикацию в Немецкий Книжный Каталог; с подробными библиографическими данными можно ознакомиться в Интернете по адресу <http://dnb.d-nb.de>.

Любые названия марок и брендов, упомянутые в этой книге, принадлежат торговой марке, бренду или запатентованы и являются брендами соответствующих правообладателей. Использование названий брендов, названий товаров, торговых марок, описаний товаров, общих имён, и т.д. даже без точного упоминания в этой работе не является основанием того, что данные названия можно считать незарегистрированными под каким-либо брендом и не защищены законом о брендах и их можно использовать всем без ограничений.

Coverbild / Изображение на обложке предоставлено: www.ingimage.com

Verlag / Издатель:

LAP LAMBERT Academic Publishing

ist ein Imprint der / является торговой маркой

AV Akademikerverlag GmbH & Co. KG

Heinrich-Böcking-Str. 6-8, 66121 Saarbrücken, Deutschland / Германия

Email / электронная почта: info@lap-publishing.com

Herstellung: siehe letzte Seite /

Напечатано: см. последнюю страницу

ISBN: 978-3-659-33145-9

Copyright / АВТОРСКОЕ ПРАВО © 2013 AV Akademikerverlag GmbH & Co. KG

Alle Rechte vorbehalten. / Все права защищены. Saarbrücken 2013

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1. Возникновение, развитие и современное состояние российского рынка БАД.....	7
1.2. Особенности БАД как товарной группы и контроль их качества, эффективности, безопасности	21
1.3. Оценка клинической эффективности БАД	37
1.4. Биоиндикация и биотестирование безопасности пищевых продуктов и БАД.....	43
1.4.1. Методология биоиндикации и биотестирования	45
1.4.2. Накопление и механизмы действия мутагенных и канцерогенных соединений в окружающей среде.....	47
1.4.3. Тест-системы для обнаружения мутагенов и канцерогенов в окружающей среде.....	51
1.4.4. Использование газовой хроматографии-масс-спектрометрии при анализе органических загрязняющих веществ.....	59
1.4.5. Аналитические альтернативы с учетом степени риска природных и искусственных загрязнителей для человека.....	64
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	71
2.1. Объекты исследования.....	71
2.2. Экстрагирование минорных компонентов пищи из БАД и сырья для их получения.....	72
2.3. Идентификация и количественное определение МКП хроматографическими методами.....	73
2.4. Получение фракций неомыляемых веществ из БАД на основе масел зародышей пшеницы и определение в них фитостеринов с помощью ВЭЖХ.....	77

2.5. Определение органических загрязнителей в липидах рыб и морских млекопитающих методом ГХ-МС.....	80
2.6. Тестирование на мутагенность по Эймс.....	81
2.7. Биотестирование на планариях.....	83
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	87
3.1. Минорные компоненты пищи в составе БАД как индикаторы их качества	87
3.2. Минорные компоненты пищи и качество растительного сырья для производства БАД.....	100
3.3. Минорные компоненты пищи и обоснование сроков хранения БАД...	104
3.4. Использование клеточных моделей и планарий как тест-систем для предварительной оценки эффективности БАД	111
3.5. Биотестирование БАД на мутагенность и идентификация потенциально опасных соединений.....	121
ВЫВОДЫ	133
4. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	135
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	145
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	147

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы «Качество и безопасность биологически активных добавок к пище» в принципиальном плане определена, *во-первых*, современной ситуацией, вызывающей у человека микроэкологические и иммунные нарушения, которые обусловлены возрастанием дисбаланса в питании, загрязнением окружающей среды, психогенными факторами, малоподвижным образом жизни, низким уровнем знания населения о здоровом питании и другими причинами. В концепции государственной политики в области здорового питания населения России отмечается, что в области профилактики алиментарно-зависимых состояний и заболеваний необходимо ликвидировать существующий дефицит витаминов, макро- и микроэлементов.

Во-вторых, по мнению многих ученых в России и за рубежом, широкое применение БАД является наиболее быстрым, экономически приемлемым и научно обоснованным путем решения указанной проблемы, связанной с питанием, так как не требует радикальной перестройки пищевой промышленности и сельского хозяйства и может быть реализовано с использованием имеющихся мощностей пищевого и фармацевтического производства. Кроме того, уже произведенные БАД могут быть быстро транспортированы в любой регион, включая отдаленные районы Севера и Сибири, зоны экологического неблагополучия, причем сроки хранения БАД значительно превышают таковые у традиционных и модифицированных продуктов питания. Создание биологически активных добавок к пище перевело решение проблемы сбалансированного питания на более высокий технологический уровень и позволило решить проблемы регуляции основных физиологических процессов организма.

В-третьих, товарное предложение БАД в весьма специфических отечественных условиях характеризуется многочисленными “болезнями роста”, а именно варьирующим качеством продукции, необоснованностью рекламных аргументов, отступлением от норм этикетирования и так далее. Нерешенные проблемы с комплексной оценкой качества и безопасности БАД приводят к на-

растанию сомнений потребителей в их эффективности, затрудняют разработку технических регламентов и создание систем добровольной сертификации этой продукции. Кроме того, научная обоснованность длительных сроков хранения БАД вызывает определенные сомнения, так как технические условия (ТУ) на БАД содержат в большинстве случаев немногочисленные, довольно простые (интегральные) физико-химические показатели качества, по которым трудно судить об изменении полноценности БАД в процессе хранения.

В-четвертых, методология управления качеством БАД, контроля их безопасности и сохраняемости требуют дополнительного изучения и научного анализа. Отсутствие теоретических и методических разработок по различным аспектам государственного регулирования этого сегмента товарного рынка не позволяет сегодня проводить единую политику обеспечения полноценного питания населения. Данные обстоятельства, а также необходимость скорейшего проведения реформы технического регулирования в отрасли обусловили выбор темы настоящего исследования.

В этой связи **целью исследования** стало изучение потребительских характеристик БАД, позволяющее разработать предложения по созданию систем контроля их качества, добровольной сертификации на эффективность, оценке безопасности и обоснованию сроков хранения.

В соответствии с поставленной целью, сформулированы следующие основные **задачи** и направления исследования:

- определить возможность использования минорных компонентов пищи как индикаторов качества и эффективности БАД и сырья для их производства;
- изучить применимость биотестирования для предварительной оценки эффективности БАД;
- исследовать мутагенное действие БАД, полученных из гидробионтов, идентифицировать источники мутагенности и определить достаточность современных требований к безопасности БАД;
- расширить методические возможности определения рекомендуемых сроков хранения БАД.

Объектом исследования избраны биологически активные добавки к пище, а **предметом** – комплексная оценка потребительских свойств БАД, на основе которой возможно их более рациональное использование в оздоровительных программах населением России.

Научная новизна. В качестве принципиального подхода при проведении оценки качества, в том числе в рамках добровольной сертификации БАД, особенно БАД-парафармацевтиков, предложено контролировать содержание в них идентифицированных минорных компонентов пищи (МКП) с использованием современных физико-химических методов анализа (при проведении сертификации – с применением официальных методов). Показана необходимость контроля содержания «миноров» в сырье для производства БАД и в самой конечной продукции для определения ее сохраняемости.

Выявлены МКП, являющиеся компонентами действующего начала БАД, но не входящие в настоящее время в перечень пищевых и биологически активных веществ, для которых рекомендуемый уровень потребления утвержден Роспотребнадзором (МР 2.3.1.1915–04; МР 2.3.1.24.32–08).

Биотестирование на планариях и культуре клеток впервые предложено использовать для предварительной оценки эффективности БАД, а биотестирование по Эймс – для оценки потенциальной опасности БАД, содержащих липиды гидробионтов. Идентифицированы химические соединения, являющиеся предполагаемыми носителями мутагенной активности.

Практическая значимость работы выражается в разработке конкретных предложений, позволяющих повысить эффективность государственного регулирования товарного предложения на российском рынке БАД. Результаты работы могут быть использованы в процессе создания специальных технических регламентов на БАД, а также при учреждении процедур их добровольной сертификации. По результатам исследования внедрены в производственную деятельность компании ИНАТ-Фарма рекомендации по контролю качества готовой продукции, сырья и установлению предельных сроков хранения выпускаемой этой организацией продукции на основе чеснока, черники и солодки.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Возникновение, развитие и современное состояние российского рынка БАД

Анализ национальных исследований, посвященных самостоятельному лечению и заботе о своем здоровье, показал, что некоторые закономерности являются общими для многих стран мира. У людей, независимо от того, в какой стране они проживают, могут возникать одинаковые незначительные нарушения здоровья. Наиболее часто встречаются такие недомогания, как простуда, головная боль, нарушения пищеварения, боль в мышцах. Процент случаев легких заболеваний, при которых широко используются БАД, варьирует в широких пределах. В среднем при лечении около четверти всех заболеваний на Западе так или иначе используются БАД. Интересно, что потребители в разных странах, отвечая на просьбу сравнить БАД и медикаменты, считают БАД столь же эффективными, как и лекарственные препараты.

Название американской корпорации «Herbalife Inc.» несколько лет назад стало собирательным не только для всей распространяемой ею продукции, но и практически для всех БАД. Сетевой маркетинг и навязчивая реклама сделали такого рода продукцию известной и легко узнаваемой.

Российский рынок БАД прошел примерно 15-летний путь своего развития. Без всякого сомнения, можно признать, что за это время он стал более насыщенным, цивилизованным и законодательно оформленным. Более того, за последние 3 года о роли БАД в жизни нашего населения написано едва ли не больше, чем за все предыдущие 12 лет [4, 9].

Официальное появление биологически активных добавок в России можно отнести к 1994 г., именно в этом году начинают регистрировать данные продукты не как лекарственные средства (ЛС), а выносят в отдельную группу, которую и назвали БАД. Широкое распространение в России биологически активные добавки получили в конце 90-х годов. По разным сведениям, в 2010 г.

БАД употребляли от до 20% населения, а в 2001 г. ими регулярно пользовались только 3% населения России (по данным НИИ питания РАМН).

В настоящее время российский рынок биологически активных добавок к пище продолжает развиваться, хотя и не так стремительно, как до 1998 г. По экспертной оценке, его стоимостная емкость в настоящее время приближается к 2 млрд. долл. (в конечных розничных ценах, включая неофициальную торговлю), а сами препараты в виде таблеток, капсул, настоек, бальзамов и т.п. стали широкодоступным атрибутом розничной, дистанционной и сетевой торговли, по крайней мере, в крупных городах. Для сравнения укажем, что годовой оборот аналогичного рынка в США – около 5 млрд. долл. (без витаминно-минеральных комплексов). При этом по некоторым оценкам, годовой объем аптечных продаж БАД в РФ составляет около 700–900 млн. долл. Около 150 млн. долл. – неаптечная розница («Лавки жизни», «Товары для здоровья», супермаркеты и т.д.), и около 1 млрд. долл. оборачивается в сетевом маркетинге и дистанционной торговле.

Как ни странно, такой интересный и прибыльный рынок долгое время не привлекал внимания отечественных маркетингов, однако со второй половины 1999 г. его исследования стали проводиться в РЭУ им. Г.В.Плеханова [40], а несколько позже – другими серьезными организациями, например, КОМКОН-Фарма [40].

В ходе изучения российского рынка БАД применялись подходы, известные как кабинетный и полевой маркетинг. В частности, для сбора т.н. вторичной информации анализировались данные Росстата, ФТС, публикации в специальной литературе и прессе, электронные публикации в глобальной сети Интернет, специализированные отчеты и т.п. Первичная информация была получена за счет проведения массовых опросов потребителей, а также анкетирования экспертов (производителей, оптовиков, дистрибьюторов сетевого маркетинга, розничных продавцов).

Современная ситуация на рынке БАД России и перспективы ее развития могут быть рассмотрены в классических координатах спрос-предложение-система дистрибуции.

Типология потребителя. Потребитель БАД весьма неоднороден. Наиболее активные покупатели по доходам представляют собой среднеобеспеченные и более бедные слои населения, соотношение по полу 75/25 (в пользу женщин) сдвигается к 60/40 в последнее время. Другой заметной тенденцией является то, что потребитель БАД постепенно становится моложе (5–6 лет назад возрастная граница начиналась примерно с 40 лет) [35, 103].

Для определения целевых рынков *сегментация потребителей* по социально-демографическим признакам (включая профессиональную принадлежность) не является самой целесообразной, так как в этом случае не удовлетворяются известные из теории критерии успешности выделенных сегментов. В то же время отсутствие более удачной сегментации потребителей затрудняет пока использование т.н. концентрированного маркетинга, т.е. идентификацию целевых групп населения и выпуск продукции, адаптированной к нуждам каждой конкретной группы. Вероятнее всего, для достижения этих целей необходимо сегментировать потребителей не по отношению к БАД в целом, а по отношению к выявленным укрупненным ассортиментным группам, а также проводить поведенческую или психографическую сегментацию [24, 28].

Интервью с респондентами позволили установить, что количество «новаторов» среди систематических потребителей БАД – около 12–15%. Значительная часть «новаторов» переходит от уже знакомых на другие препараты из-за того, что не верит в способность отечественных производителей поддерживать на должном уровне качество продукции при ее выпуске в течение длительного времени.

Факторы, влияющие на принятие решения о покупке БАД. Кроме цены (наиболее важного фактора), весомым фактором, предопределяющим вероятность покупки БАД, является их происхождение (импортные-отечественные, из общего числа регулярных пользователей БАД приверженцами импортной про-

дукции являются примерно 30%). Заметим здесь же, что импортные БАД (особенно распространяемые по каналам сетевого маркетинга) характеризуются более узким диапазоном рекомендуемой физиологической направленности действия, чем отечественные, которые зачастую рекламируются как средство «почти от всего». Значительная часть потребителей опирается на рекомендации врача (22%) или консультации продавца (22%) (рис. 1.1.).

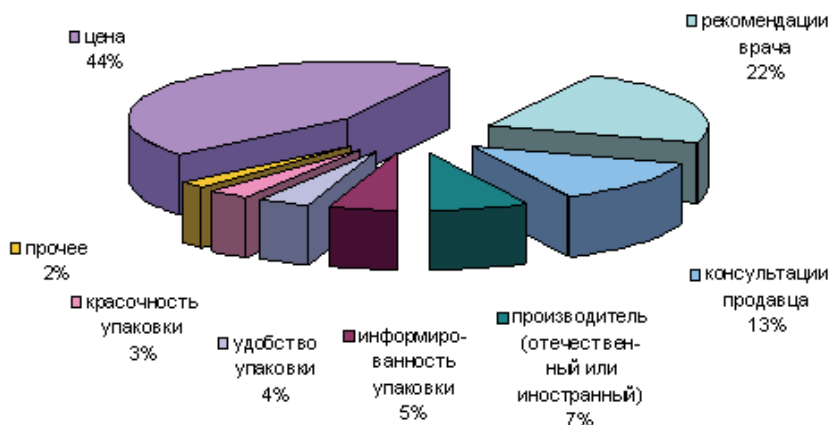


Рисунок 1.1. Факторы, влияющие принятие решения о покупке БАД
(по данным «Бизнес-Эксперт К»)

Для потребителя важны удобство и красочность упаковки и этикетки, их информативность (включая перечисление основных компонентов состава) и другие признаки качества товара. Менее важен такой параметр, как сохранность. Поскольку в большинстве случаев препараты приобретаются для применения в ближайшее время, оптимальная величина объема индивидуальной закупки предполагает ее использование в течение одного месяца. Помимо характеристик собственно БАД как товара (реакции на атрибуты), вероятность покупки сильно зависит от грамотной консультации продавца [10,43].

При анализе *мотивов приобретения БАД* обращает на себя внимание тот факт, что примерно 40% потребителей делают покупку вследствие наличия то-

го или иного заболевания. Вот как, по данным Вот как, по данным маркетинго-
гов, воспринимаются БАД потребителями [38, 49]:

- не лекарства (44% всех ответов), но почти лекарства (25%);
- производятся фармацевтическими компаниями (58%);
- состоят только из натуральных компонентов (56%);
- намного безопаснее лекарства (64%);
- должны быть рекомендованы врачом или фармацевтом (61%);
- подходят для лечения нетяжелых заболеваний (66%);
- БАД не лечит, а используется только для профилактики/оздоровления (75%);
- БАД должны быть в рационе каждого человека (63%).

Анализируя эти данные, мы видим, что потребители в целом оценивают БАД как определенную помощь в решении проблем со здоровьем. Предпочтение отдается препаратам из натуральных компонентов. И это общемировая тенденция – страны Запада переживают бум спроса на препараты растительного происхождения. БАД здесь наиболее точно соответствуют запросам обывателя. Тот факт, что 63% опрошенных считают, что БАД должны быть в рационе каждого, иллюстрирует эту обнадеживающую тенденцию [48].

Итак, важнейшими мотивами приобретения БАД является наличие более или менее выраженного недомогания, с которым предполагается справиться, не прибегая к официальной медицинской помощи, а опираясь на собственную интуицию, а также информационную осведомленность за счет рекомендаций знакомых или рекламы. Менее значимыми мотивами обращения к БАД являются общее укрепление здоровья и профилактика заболеваний (мотив – болеть слишком дорого), отдаление старости, улучшение внешнего вида и достижение сбалансированности и полноценности диеты (рис. 1.2). Нельзя не отметить, что переключению спроса лекарства/БАД (для заболевших) способствует относительная дешевизна последних и отсутствие у БАД побочных эффектов. Все эти данные подтверждают, что потребители еще не видят четкой грани между биологически активной добавкой к пище и лекарством [103].

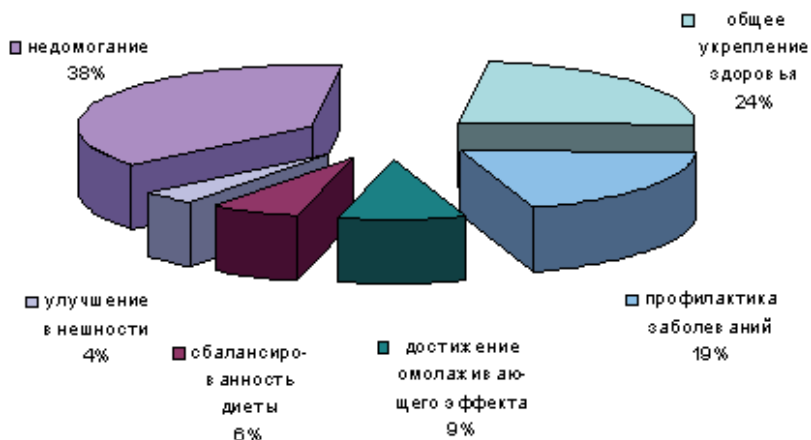


Рисунок 1.2. Мотивы потребления БАД (по данным «Бизнес-эксперт К»)

Весьма интересен анализ отношения к БАД работников аптек. Эти данные иллюстрируют существующие настроения в среде профессионального сообщества. Например, более 80% респондентов в той или иной степени согласны, что БАД нельзя активно рекламировать из-за «непросвещенности» потребителя. И едва ли не треть опрошенных уверены, что в состав БАД входят гормональные средства. Как мы видим, здесь еще огромное поле для работы с персоналом, неисчерпаемый резерв для повышения уровня продаж. На сегодняшний день представления фармацевтов о БАД не отвечают потребностям развивающегося рынка [23].

Лояльность по отношению к брэндам. Среди современных пользователей БАД весьма незначительное количество составляют приверженцы каких-либо торговых марок (брэндов), зато в большей степени выражена лояльность к местам приобретения добавок. В этой связи к использованию приемов «раскрутки» брэндов в товарной политике на рынке БАД следует относиться с осторожностью, принимая во внимание высокую затратность этой процедуры (в США на рекламу брэндов только поливитаминов затрачивается в год около 100 млн. долларов). Тем не менее, отметим, что за рубежом на рынке БАД господствуют

именно брэнды, цена которых в среднем в 1,5–2 раза выше, чем цена аналогичных дженериков [66].

Ценовая эластичность спроса. Как выяснилось, добавки, реализуемые в обычной розничной торговле, являются достаточно высокоэластичным в отношении спроса товаром, по крайней мере, для покупателей, представляющих собой низкодходные группы населения. При повышении доходов наблюдается чаще всего не увеличение объемов потребления БАД, а частичное переключение спроса на более дорогие импортные добавки, с которыми связываются надежды как в отношении высокого качества, так и эффективности [97].

Доля отечественных производителей в формировании товарного ресурса российского рынка БАД, с учетом доступных данных экономической статистики и экспертных оценок, в натуральном выражении (в условных единицах – усредненные упаковки препаратов в расчете на месячный курс), составляет в настоящее время 65–70%, остальное приходится на импортную продукцию [23].

Ассортимент БАД представлен огромным количеством наименований. В 2011 г. российская аптечная сеть представляла 2 567 торговых наименований БАД, причем 1 785 из них – российского происхождения (406 фирм-производителей) и 782 торговых наименования – зарубежного происхождения (194 фирмы-производителя). Всего на 1 января 2011 г. было зарегистрировано 8209 наименований добавок. Российские БАД отличает более широкий ассортимент и более низкая цена по сравнению с импортными. Возрастание интереса к БАД наблюдается и среди фармацевтических производителей (11% производителей БАД являются одновременно производителями лекарств) [52].

Управление выпускаемым ассортиментом БАД происходит в основном стихийно, поскольку большинство производителей исходят из имеющихся сырьевых, технологических и других возможностей, не анализируя рыночный потенциал своих биодобавок и их предполагаемое позиционирование.

Выбор оптовиков у отечественных производителей БАД невелик. При организации торговли добавками используются классическая система дистрибуции (производитель – оптовик – розничное звено), сетевой (многоуровневый,

MLM) маркетинг и дистанционная торговля. С точки зрения нарастания цены в цепи товародвижения БАД и разброса цен на одни и те же препараты (и та, и другая величины весьма значительны, причем выше нарастание цены от производителя до конечного потребителя в цепях сетевого маркетинга по сравнению с «цивилизованной» торговлей, соответственно в 3,5 и 2 раза) можно утверждать, что существующая система товародвижения БАД функционирует недостаточно эффективно [74].

Стоимостная доля продукции, реализуемой сетевиками, в общем объеме продаж БАД составляет сейчас примерно 50%, тогда как 10 лет назад эта величина приближалась к 80%. По-видимому, здесь уместно заметить, что в США современная торговля добавками оставила «сетевикам» только 6–7% от общего объема продаж БАД. В России в настоящее время эти схемы товародвижения обнаруживают способность к своего рода «переплетению», своеобразной конвергенции при торговле одними и теми же добавками [36].

В соответствии с данными статистики ВЭД, в регионы практически не поступают импортные БАД по прямым контрактам местных фирм с зарубежными производителями или фирмами-экспортерами [39].

За рубежом розничные каналы сбыта БАД сформировались и структурировались достаточно давно. Так, в настоящее время в США функционируют следующие основные каналы:

- Специализированные магазины БАД и Здоровой пищи.
- Аптеки.
- Супермаркеты.
- «Многоуровневый» рынок.
- Каталоги.
- «Прямая продажа».

Специализированные магазины являются на сегодняшний день основными каналами сбыта БАД. Более 9 000 специализированных магазинов генерируют 62% от всех продаж БАД в стране [102]. Специализированные магазины делятся на 5 категорий, указанных в табл. 1.1.

Таблица 1.1. Типы специализированных магазинов для торговли пищевыми биокорректорами в США

Тип магазина	Основной товар	Численность по стране	Доля в структуре сбыта БАД
Супермаркет натуральных продуктов	Органически (без химических удобрений) выращенные овощи и фрукты	700	Незначительна
Магазин натуральных продуктов	Пищевые продукты без консервантов	2000	Незначительна, но стремительно растет
Сеть магазинов здоровой пищи	Бад всех видов	3000	Основной канал сбыта
Независимые магазины здоровой пищи	Бад всех видов	3200	Основной канал сбыта
Кооперативы магазинов здоровой пищи	Органически выращенные продукты на полях кооператива и распределенные между его членами	325	Отсутствует

В аптеках США продается 25% от всех БАД. На сегодняшний день в супермаркетах продается 6% от всего объема БАД [102].

«Многоуровневый» рынок, или «Пирамида», был популярен в США на этапе становления рынка БАД. В дальнейшем, как считают сами американцы, энтузиасты были вытеснены профессионалами торговли. Сегодня его доля в общей структуре распределения БАД – около 4%. Продажа БАД по каталогам не приобрела особой популярности, по-видимому из-за «ненаглядности» (все баночки с капсулами и таблетками похожи друг на друга) товара. Доля продаж – 0,9%. Появление компьютерных программ, позволяющих распечатать и разослать, фактически без участия человека, сотни тысяч именных (с персональным обращением к адресату) писем, вызвало определенный рост «прямых» продаж

БАД. Адреса и имена перспективных потребителей обычно покупают у издатель тематических журналов, руководства ассоциаций или клубов по интересам. Этот канал обеспечивает в США сбыт 3,4% БАД на сегодняшний день [102].

Обычное место приобретения БАД в России (если речь не идет о MLM) – аптеки, аптечные киоски, лотки (расположенные в наиболее посещаемых местах – метро, торговые центры и т.п.), небольшие специализированные магазины. По анализу каналов, через которые продаются БАД в РФ (без учета сетевого маркетинга), видно, что основной объем реализуется через аптеки. Это тенденция последних лет, и если мы возьмем самые свежие данные, то доля аптек составит уже около 70%. На наш взгляд, требуется глубокое изучение причин, препятствующих развитию в России специализированной розничной торговли «товарами для здоровья» по аналогии с тем, как это происходит за рубежом. Пока же установлено, что фирменная торговля БАД со стендов и лотков на арендуемой торговой территории осуществляется лучше, чем при «встраивании» БАД в продовольственный ассортимент [38].

Несмотря на широкие возможности *продвижения БАД*, ни одна из сторон сферы их оборота не является столь противоречивой и часто нарушаемой, как рекламная деятельность производителей и продавцов БАД. Поэтому все больше повышаются требования к контролю рекламы биологически активных добавок [92].

В частности, в рекламе БАД установлены следующие ограничения:

- Реклама БАД в средствах массовой информации не должна противоречить материалам, согласованным при регистрации БАД.
- Не допускается реклама БАД, не прошедших государственную регистрацию.
- 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 и ее эффективности.
- Недопустимо в рекламе создавать впечатление, что природное происхождение сырья, используемого в составе БАД, является гарантией их безопасности.

– Реклама БАД не должна подрывать веру потребителей в эффективность других средств при профилактике и вспомогательной терапии [82].

– Реклама БАД не должна создавать впечатления о БАД как лекарственном средстве.

Крупные рекламодатели размещают рекламу БАД в основном на наиболее массовом носителе – телевидении. Менее крупные рекламодатели активно используют прессу. Радио и наружная реклама в сравнении с ТВ и прессой используются значительно меньше [18].

При попытках стимулирования сбыта в БАД-бизнесе редко используется весь маркетинговый арсенал «промоушн», в точках розничной торговли не всегда даже присутствуют аннотационные листовки и буклеты. Тем не менее, можно отметить успешные попытки применения радио- и телерекламы и Internet-страниц, подарочных купонов и скидок, организации специальных отделов для пенсионеров.

Другие средства стимулирования сбыта, используемые за рубежом и мало применяемые у нас:

- купи один – получишь второй бесплатно;
- value-pack (большой объем за меньшие деньги);
- купонные приемы.

Пока слабо используется большинством фирм (классическая дистрибуция) механизм public relations, тогда как фирмы MLM применяют приемы PR гораздо интенсивнее. В стимулировании продаж (а это в маркетинге любая форма продвижения товара, кроме рекламы, в основном рассчитанная на так называемый эффект импульсивной покупки) успехи в последнее время налицо.

Для популяризации БАД их производителям желательно проводить последовательную рекламную политику, включающую следующие этапы:

- проведение образовательных семинаров и конференций по разъяснению преимуществ и необходимости профилактики широко распространенных заболеваний среди людей, входящих в группы риска (нерациональное питание,

стрессы, повышенные умственные и физические нагрузки, предрасположенность к определенным заболеваниям);

- активное доведение информации до врачей поликлиник, стационаров, коммерческих медицинских центров, работа с представителями СМИ – регулярное предоставление материалов о своей продукции, о готовящихся мероприятиях и акциях;

- выбор целевого объекта (дом инвалидов, поликлиника и т.д.) для проведения и широкого освещения благотворительных просветительских акций, связанных с популяризацией БАД [104].

Методами кабинетного маркетинга определена привлекательность региональных рынков РФ, основанная на анализе важнейших экономических показателей: емкости, платежеспособного спроса населения, сложившегося уровня цен, самообеспечения за счет местного производства БАД. В российских условиях важное значение имеет и степень развитости систем сетевого маркетинга в регионах (для успешности традиционной торговли это – отрицательный фактор). Установлено, что привлекательные региональные ниши находятся в республиках, краях и областях с высокой долей городского населения и относительным благополучием по уровню дохода на душу населения. Так, помимо Московского региона, это Самарская, Саратовская, Новосибирская, Свердловская области, Красноярский край, Татарстан и Башкирия. Обнаружился своеобразный феномен – там, где население в большей степени способно покупать лекарства, выше и уровень потребления БАД [58]. Таким образом, регионы со сложившимся достаточно высоким уровнем потребления БАД не являются регионами, население которых наиболее остро нуждается в потреблении БАД вследствие экологических, эпидемиологических, демографических и прочих причин – по-видимому, это уже государственная проблема.

По оценкам маркетинговых агентств, наибольший вклад в объемы продаж вносят БАД следующих пяти категорий:

- для улучшения функции зрения;
- для улучшения функций опорно-двигательного аппарата;

- для улучшения функций сердечно-сосудистой системы;
- для улучшения функций нервной системы;
- для улучшения обмена веществ (для похудения).

Сезонность продаж БАД в России показана на рис. 1.3. Увеличение объемов продаж биологически активных добавок происходит в холодное время года.

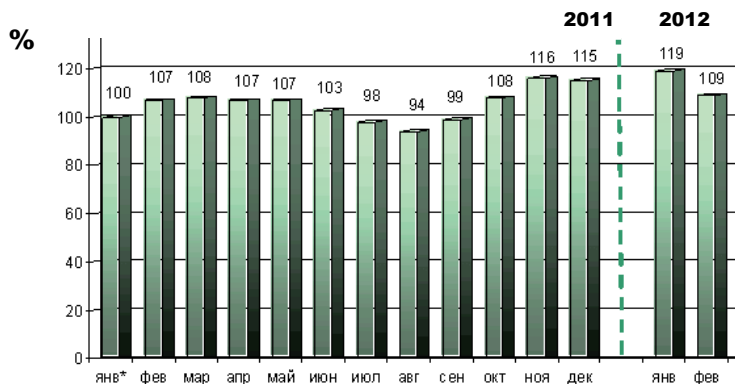


Рисунок 1.3. Сезонность продаж БАД в РФ (*январь 2011 г. = 100%)

Рынок БАД пока в значительной степени свободноконкурентен и входные барьеры для новых операторов относительно невысоки. Однако в связи с ужесточившейся конкуренцией и возросшим уровнем административного контроля рентабельность этого бизнеса уверенно понижается. Рост цен на БАД постоянно отстает от уровня инфляции потребительского рынка (4–5% по БАД и 9% в 2012 г. по промышленности в целом) – это товар не первой необходимости, спрос не него эластичен, много взаимозаменяемых с БАД средств решения тех же проблем со здоровьем. Поэтому легко указать на примеры, когда пришедшие за последнее время на этот рынок компании, обладающие серьезным финансовым и административным ресурсом, потерпели фиаско или близки к этому. Более или менее успешным состоянием дел характеризуются не новые, а несколько известных (существующих более 5 лет) компаний [20].

По-видимому, современный рынок биологически активных добавок перспективен в основном для серьезных производителей с развитой научно-

производственной базой. Для них наиболее реальны возможности привлечения инвесторов и завоевания значительной целевой аудитории. Прогноз аналитиков указывает на то, что в ближайшие годы наибольший объем продаж будет принадлежать препаратам для профилактики и лечения сердечно-сосудистых и респираторных заболеваний, а также ЦНС, желудочно-кишечных и инфекционных болезней, заболеваний крови.

В интересах многих компаний было бы создание информационной системы для мониторинга рынка БАД, поскольку, невзирая на ужесточение конкуренции, у крупных производителей и оптовиков есть много общих целей (например, корреляция объемов продаж с макроэкономическими показателями), включая и реализацию образовательных программ для населения, что позволит увеличить число регулярных потребителей БАД [35, 37].

Наконец, должно стать более агрессивным внедрение БАД в продовольственную торговлю. За рубежом потребитель давно привык находить добавки в отделах здорового питания в сетевых супермаркетах и магазинах здоровой пищи. А появились в розничной торговле пищевыми продуктами сначала витамины и витаминно-минеральные комплексы, затем обогащенные БАД крупы и, наконец, большой ассортимент продуктов, в состав которых входят БАД: печенье, картофельные чипсы, крекеры, напитки, приправы и соусы.

Что же касается перспектив дальнейшего развития отечественного рынка оздоровительной продукции и БАД в частности, то вопрос заключается, по-видимому, в том, сможет ли бизнес работать в большей степени, чем сейчас, в интересах не только себя, но и всего общества. Что этому может помешать? Ответ достаточно прост – основанное на отжившей парадигме маркетинга стимулирование продаж малоэффективных БАД за счет мощного арсенала «промоушн». Воспрепятствовать этому может разумное государственное регулирование рынка, в том числе с использованием новых возможностей, которые предоставляет ФЗ «О техническом регулировании» [80].

1.2. Особенности БАД как товарной группы и контроль их качества, эффективности, безопасности

Стандартный рацион современного человека не обеспечен целым рядом биологически активных веществ, потребность в которых заложена в нас эволюционно, однако человеку необходимо потреблять ограниченное количество калорий. Если раньше эта норма составляла 5 000–6 000 ккал, что было обусловлено повышенными физическими нагрузками, климатическими факторами, то в наше время суточная норма потребления, учитывая реальную гиподинамию, не должна превышать 2 400–2 600 ккал, в противном случае может развиваться целый комплекс алиментарно-зависимых заболеваний: гипертония, атеросклероз, остеопороз, диабет II типа и т.д. Наличие в рационе наиболее важных биологически активных соединений можно обеспечить как традиционным способом, используя сбалансированную диету, так и с помощью БАД [7, 12].

Биологически активные добавки к пище, согласно российскому и европейскому законодательству, не относятся к лекарственным средствам, а представляют собой компоненты нашего рациона. Это представление о БАД нашло отражение в Директиве Европейского парламента 2002/46/ЕС от 10 июня 2002 г. «О единых законах о биологически активных добавках в странах-участниках ЕС:

1. Настоящая Директива применяется по отношению к биологически активным добавкам (БАД), распространяемым на рынке в качестве продовольственных товаров. Такие продукты предлагаются конечному потребителю только в упакованном виде.

2. Настоящая Директива не применяется по отношению к лекарственным средствам и медикаментам, подпадающим под действие Директивы Парламента и Совета ЕС 2001/83/ЕС «О принятии Кодекса Европейского сообщества о лекарственных средствах и медикаментах, используемых человеком».

В настоящей Директиве используется термин: «биологически активные добавки», означающий пищевые продукты, назначением которых является дополнение нормального рациона питания, и которые представляют собой кон-

центрированные источники питательных веществ и других субстанций с питательным или физиологическим действием, отдельно или в сочетаниях. Выпускаются в капсулах, пастилках, таблетках, пилюлях и других похожих формах, в пакетиках с порошком, ампулах с жидкостью, флаконах с дозатором и других сходных формах жидкостей и порошков, пригодных для приема в небольших отмеренных количествах...» [88]

В Федеральном Законе от 2 января 2000 г. N 29-ФЗ «О качестве и безопасности пищевых продуктов» [93] закреплён аналогичный подход к определению БАД к пище: «биологически активные добавки – природные (идентичные природным) биологически активные вещества, предназначенные для употребления одновременно с пищей или введения в состав пищевых продуктов».

Биологически активные добавки к пище содержат вещества, необходимые для поддержания нормальной жизнедеятельности и повышения неспецифической резистентности организма, а также средства сопутствующей или вспомогательной терапии при различных заболеваниях.

Классификация БАД до сих пор не устоялась. Так, в США их принято подразделять на 4 группы: травы и фиточаи; витамины, минералы, ферменты; БАД для спортсменов; обогащенные пищевые продукты.

В РФ биологически активные добавки к пище исторически делят на две группы: нутрицевтические средства и парафармацевтические препараты [96].

Нутрицевтические средства представляют собой эссенциальные биологически активные вещества, которые являются основными компонентами организма: витамины или их предшественники, макро- и микроэлементы (железо, кальций, селен, цинк, фтор и т.д.), полиненасыщенные жирные кислоты, незаменимые аминокислоты, некоторые моно- и дисахариды, пищевые волокна, применяемые для коррекции химического состава пищи человека. В настоящее время основной функцией нутрицевтиков считается поддержание витаминно-минерального статуса организма [14].

Парафармацевтические препараты – биологически активные вещества, обладающие определённой фармакологической активностью и применяемые для

профилактики, вспомогательной терапии и поддержки в физиологических границах функциональной активности органов и систем. Действующим началом парафармацевтиков являются т.н. минорные компоненты пищи, принадлежащие к различным классам соединений: биофлавоноиды, алкалоиды, гликозиды, сапонины, органические кислоты, эфирные масла, полисахариды, полифенолы, некоторые амины, фитоэстрогены и т.п.

Деление БАД на нутрицевтики и парафармацевтики довольно условно. Большинство разработанных БАД имеют поликомпонентный состав и содержат БАВ обеих групп [106].

Выделяют также эубиотики (пробиотики) – БАД, в состав которых входят живые микроорганизмы и (или) их метаболиты, оказывающие нормализующее воздействие на состав и биологическую активность микрофлоры желудочно-кишечного тракта.

Конечной целью использования нутрицевтиков является улучшение пищевого статуса человека, укрепление здоровья и профилактика ряда заболеваний; парафармацевтиков – профилактика и вспомогательная терапия различных патологических состояний и регуляция деятельности организма в границах функциональной активности [50].

Таким образом, анализируя показания к применению БАД и сравнивая их с лекарственными препаратами, можно отметить следующую основную направленность использования БАД и лекарственных препаратов. С учётом того, что состояние человека можно охарактеризовать как здоровье, предболезнь или болезнь, лекарственные препараты применяются в основном для лечения различных заболеваний, для их профилактики в состоянии предболезни и очень редко у здоровых людей (например, контрацептивные препараты, адаптогены), при этом часть лекарственных препаратов, применяемых у здоровых людей, в настоящее время можно отнести к разряду БАД (например, комплексные препараты, содержащие витамины, макро- и микроэлементы, дозировки которых соответствуют критериям БАД).

В отличие от лекарственных препаратов, БАД в основном применяются у здоровых людей по перечисленным выше показаниям, реже в состоянии предболезни, в состоянии болезни эти вещества могут применяться только как дополнение основной терапии, но ни в коем случае не как средства монотерапии [89].

Многокомпонентный состав БАД обеспечивает их полифункциональную биологическую активность, которая основана на способности соединений в составе БАД специфически взаимодействовать с мембранами клеток и функционально важными белковыми молекулами (рецепторами, регуляторными белками, ферментами) [31].

В Государственном Реестре БАД используется расширенная функциональная классификация, в соответствии с которой БАД делятся на 15 групп по способу воздействия на организм человека [95].

Использование психометрического анализа позволило количественно описать реакцию потребителей на БАД, а дальнейшая обработка полученной информации с помощью методов многомерной статистики (факторного анализа) выявила «покупательскую классификацию» БАД, которая существенно отличается от научной. Глазами рядовых потребителей весь ассортимент БАД группируется в средства общеукрепляющие; профилактические и лечебные по отношению к отдельным системам организма; онкологические; очищающие организм и способствующие похудению; антиалкогольные и антикурительные.

По механизму действия БАД классифицируются на монофункциональные и полифункциональные. Многокомпонентный состав БАД обеспечивает их полифункциональную биологическую активность, которая основана на способности соединений в составе БАД специфически взаимодействовать с мембранами клеток и функционально важными белковыми молекулами (рецепторами, регуляторными белками, ферментами) [28].

Классификация БАД требует дальнейшего совершенствования и научного обоснования. БАД – обособленная, вполне сформировавшаяся группа продуктов. Следовательно, БАД должны иметь не только научную классификацию, но и весь набор кодов, присущий любому классу реально существующей продукции.

Именно разработка принципов классификации БАД создает в дальнейшем возможность дифференцированного подхода к выявлению эффективности продукции данного класса и созданию более точных методологических подходов к изучению любого из этих средств [16].

В 1996 г. в РФ была сформирована триада принципов, вокруг которых строится все нормативно-правовое поле законодательного контроля БАД:

- федеральный уровень принятия решений о гигиенической сертификации (регистрации) БАД;

- экспертная оценка в Институте Питания РАМН (позже – и в других Центрах);

- выдача и последующее использование только одного разрешительного документа – гигиенического сертификата (регистрационного удостоверения).

Рынок БАД, возможно, как никакой другой рынок потребительских товаров в России, регламентирован множеством самых разных административных норм [99]. Ни в одной стране мира нет такого количества законов и нормативных актов, касающихся данной сферы. И при этом все эти нормы оказываются недейственными в области сетевого маркетинга и дистанционной торговли, где объемы продаж значительны и чаще всего случаются реальные нарушения прав потребителей.

По мере развития рынка БАД в России, НД на них постепенно совершенствовалась. Сначала это были «Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов» СанПиН 2.3.2.560–96, которые, в свою очередь, были унифицированы практически для всех БАД. Затем в течение 1997–1998 гг. был подготовлен и утвержден первый российский документ, нормирующий требования к экспертной оценке и надзору за оборотом БАД к пище – «Методические указания МУК 2.3.2.721–98. Пищевые продукты и пищевые добавки». В МУК устанавливаются гигиенические требования по определению безопасности и эффективности для человека БАД и сырья для и производства, а также требования по соблюдению указанных нормативов при разработке нормативной и технической документации. В настоящее

время при проведении экспертизы БАД на безопасность руководствуются требованиями СанПиН 2.3.2.1078–01 [54–56].

Новый этап развития правовых отношений при производстве и обороте БАД начинается после принятия 30.03.1999 г. Государственной Думой Федерального закона №52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения», а в 02.01.2000 – Федерального закона №29-ФЗ «О качестве и безопасности пищевых продуктов» [93]. Именно в них на законодательном уровне был определен юридический статус БАД, их место в общей структуре товаров, а также процедура вывода на российский рынок. В ст.1 ФЗ №29 определено, что к пищевым продуктам относятся продукты натурального происхождения или в переработанном виде, употребляемые человеком в пищу, а также продовольственное сырье, пищевые добавки и БАД.

Многие производители и поставщики БАД предлагают свою продукцию в качестве альтернативы ЛС. Не только различные рекламные материалы, но и научные публикации, доклады специалистов содержат информацию о лечебных свойствах БАД. В то же время по Закону РФ «О качестве и безопасности пищи» от 02.01.2000 БАД относятся к пищевым продуктам и в соответствии с Санитарными правилами и нормами СанПиН 2.3.2.1078–01 не являются ЛС, а область их применения определяется текстом, вносимым в регистрационное удостоверение [55].

Для лекарств существует большое число регуляторных ограничений, не применяемых к БАД:

- обязательными являются доклинические и клинические испытания готовых ЛС, а для БАД – только токсикологические и гигиенические исследования;
- для лекарств регистрируются конкретные показания, и продвижение их для лечения других заболеваний запрещено. БАД же имеют только рекомендации по применению, что дает возможность их производителям довольно произвольно выбирать акценты при рекламе этих препаратов;

– продажа готовых ЛС разрешена только в аптечной сети, БАД могут продаваться как в аптеках, так и в любом предприятии торговли, имеющем лицензию на торговлю пищевыми продуктами.

Рассматривая историю появления БАД, необходимо вспомнить, что биодобавки первого поколения создавались как средства восполнения питания. В дальнейшем, по мере развития методов биотехнологии, которые позволили выделять из пищи необходимые составляющие, появились БАД второго поколения. В них можно было поместить и сконцентрировать практически любые компоненты, присутствующие в различных продуктах животного или растительного происхождения, до уровня, совпадающего или превосходящего среднее суточное поступление этих веществ с пищей.

В результате БАД стали способны решать не только проблемы коррекции питания и восполнения недостатка отдельных компонентов. Появилась возможность решать задачи функционального воздействия на различные органы и системы организма благодаря тому, что в состав БАД вошли такие вещества и в таких количествах, что могла проявляться заметная биологическая и фармакологическая активность [9,105].

В том, что многие, если не все, компоненты обычного пищевого рациона обладают определенной биологической активностью, оказывая влияние на различные процессы в организме, хорошо известно. Вопрос о пользе или вреде пищевых субстратов, их биоактивности часто заключается в количестве этих веществ. Известно, что недостаток многих макро- и микронутриентов способен приводить к дезорганизации обменных процессов в организме, заболеваниям или смерти [17]. Однако избыток этих веществ также вреден. При избыточном содержании любые полезные компоненты пищи (белки, аминокислоты, липиды, витамины, микроэлементы и др.) могут изменять или угнетать метаболические процессы, проявлять токсичность. Известно, что нерациональное, не только дефицитное, но и избыточное или несбалансированное по составу веществ питание может приводить к патологии или ускорять развитие различных заболеваний. Напротив, оптимальное для данного человека питание или питание,

измененное в сторону увеличения или уменьшения содержания в нем отдельных компонентов, может стать достаточно мощным лечебным фактором. Таким образом, изменяя питание, можно эффективно управлять здоровьем. Еще Гиппократ говорил: «Пусть ваша пища станет вашим лекарством...», понимая под этим то, что пища может оказывать лечебное воздействие. Влияние на здоровье могут оказывать не только такие биологически активные вещества, как, например, витамины или биофлавоноиды, но и обычные пищевые субстраты: аминокислоты, моносахариды, липиды. Следует отметить, что провести четкую границу между нутритивным (питательным) или лечебным воздействием пищевого субстрата достаточно сложно [42].

Часто трудно провести четкую границу между рекомендациями по питанию (диетой), БАД и некоторыми лекарственными препаратами, в основе которых лежат природные компоненты. Все эти вещества могут поступать в организм в сопоставимых количествах: в составе модифицированного пищевого рациона, БАД или лекарственных препаратов. Часто граница будет проходить по концентрации активных веществ в составе того или иного БАД или лекарственного препарата [3, 6]. Именно различия в содержании одних и тех же компонентов определяют отличия БАД-парафармацевтиков от фармакологических препаратов. Низкое содержание компонентов в составе БАД снижает пользу от их применения. Все усилия разработчиков БАД направлены на увеличение количества полезных компонентов, что фактически приближает БАД к классу фармакологических препаратов.

Мы не склонны противопоставлять БАД и фармакологические препараты для решения проблем здоровья. Напротив, БАД должны занять подобающее место среди оздоровительных и лечебных технологий и препаратов, применяемых с лечебной и профилактической целями наряду с традиционными фармакологическими препаратами и лечебным питанием. Но для этого мы должны хорошо себе представлять результаты и механизмы воздействия БАД на организм человека [14].

Следует отметить, что в последнее время при регистрации БАД все чаще начинают требовать подтверждения полезного эффекта БАД, которые включают в рекомендации по их применению. С другой стороны, многие фирмы-производители БАД сами стремятся получить более или менее объективные данные о результативности применения БАД. Такая информация никогда не бывает лишней. Напротив, она позволяет уверенно рекомендовать БАД с гарантией ожидаемого положительного результата. Таким образом, вопрос о необходимости проведения клинических исследований и изучения клинической эффективности БАД очевиден – их проводить необходимо. Гораздо более сложным является вопрос о том, каким образом их осуществлять и сколько это будет стоить. Для многих клинические исследования представляются сложным и очень дорогим предприятием.

Качество БАД подтверждает специальный документ – «Удостоверение качества». Требования к контролю качества БАД и порядок получения удостоверения качества детально излагают следующие документы [54]:

- МУК 2.3.2.721–98, которые разъясняют процедуру получения этого документа, выдаваемого производителем на уровне выходного контроля.
- СанПин 2.3.2.1078–01, в которых говорится, что каждая серия БАД должна сопровождаться удостоверением качества и безопасности.
- Постановление Правительства РФ №81 от 06.02.2002 г., которое является дополнением к постановлению №55 «О правилах продажи отдельных видов товаров». Этот документ предписывает в месте продажи БАД предоставлять по требованию покупателей удостоверение качества БАД.
- СанПин 2.3.2.1290–03 «Гигиенические требования к организации производства БАД к пище».

Проблемами качества и эффективности БАД занимались и продолжают заниматься ведомства, связанные с медициной (МинЗдрав РФ, РАМН), а некоторыми сопряженными с реализацией БАД проблемами (фальсификация, реклама) – МВД, прокуратура и Министерство по антимонопольной политике и

предпринимательству (ныне ФАС), однако ясно, что коэффициент полезного действия этих организаций пока низок.

Что же такое качество БАД? Закон определил, что БАД являются одним из видов пищевых продуктов, и дал следующее определение: качество пищевых продуктов – совокупность характеристик пищевых продуктов, способных удовлетворять потребности человека в пище при обычных условиях их использования.

Если попытаться собрать воедино довольно абстрактно звучащие определения, переработать и раскрыть их применительно к обсуждаемому продукту, то получится примерно следующее: качество БАД – степень, с которой совокупность собственных характеристик выполняет требования соответствия предназначенному применению, всем условиям регистрации в части производства и контроля, официально утвержденной рецептуре, а также другим официальным требованиям, применимым к данному продукту и его производству [54].

Если содержание витаминов и минеральных веществ в БАД для контроля их качества определяли давно, то внимание к т.н. минорным компонентам пищи (МКП) усилилось относительно недавно, несмотря на известное высказывание академика А.А. Покровского, что «...пищу следует рассматривать не только как источник энергии и пластических веществ, но и как весьма сложный фармакологический комплекс...» [68].

Действительно, для нормального функционирования организма и всех его систем необходимы не только сбалансированные витаминно-минеральные комплексы [13, 32], а значительно более широкий набор натуральных компонентов пищи, к которым организм человека генетически адаптирован и которые, следовательно, также являются факторами питания. Они присутствуют в пище в миллиграммовых и даже микрограммовых дозах, а основные источники этих веществ – растения и соответственно растительная пища. Предполагается, что эффект БАД-парафармацевтиков реализуется путем инициации универсальных механизмов адапционно-приспособительных реакций организма на воздействие внешних и внутренних раздражителей самой различной природы.

В последние годы появляются новые данные о биологической роли многих МКП [100], которые ранее рассматривались лишь с точки зрения их опасности для здоровья, как, например, селен, или вообще не рассматривались в качестве факторов, необходимых для жизнедеятельности человека. На основе принципов доказательной медицины получены принципиально новые данные в отношении роли для организма так называемых «миноров». Это, прежде всего, относится к таким биологически активным соединениям, как:

1. Различные группы флавоноидов (флавонолы и их гликозиды – кверцетин, кемферол, рутин и др., флавоны – лютеолин, апигенин и др., флавононы – нарингенин, гесперидин и др., дигидрофлавонолы, проантоцианидины, катехины и др.), физиологические функции которых чрезвычайно разнообразны и важны для снижения риска развития многих широко распространенных в настоящее время заболеваний.

2. Индолы, одной из важнейших функций которых является регуляция активности ферментов первой и второй фаз метаболизма ксенобиотиков и протекторная роль в отношении некоторых форм онкологической патологии.

3. Экзогенные пептиды и отдельные аминокислоты пищевого происхождения, участие которых в регуляции функций органов и систем организма доказана многочисленными исследованиями (например, пептиды, обеспечивающие специфическое межмолекулярное взаимодействие с промоторными участками генов, присутствуют в качестве фрагментов в составе интерлейкинов, цитостатина, тиреоглобулина и др.) [51].

Эти и многие другие биологически активные вещества пищевых растений, животных, одноклеточных микроорганизмов: фитостерины, изофлавоны, изотиоцианты, глюкоманнаны, полифруктаны, гиперидин, глюкламины, хондроитинсульфат, хитозан и т.п. Наиболее изученные на сегодняшний день из них представлены в Приложении 1.

Дефицит МКП в рационе приводит к снижению резистентности организма к неблагоприятным факторам окружающей среды (маладаптации), формированию иммунодефицитных состояний, нарушению функций систем антиокси-

дантной защиты, хронизации болезней, повышению риска развития распространенных заболеваний, снижению качества жизни и эффективности лечебных мероприятий [22].

Возвращаясь к качеству БАД, особенно БАД-парафармацевтиков, следует указать, что определение МКП (например, иохимбина в ЙОХИМБЕ, цикорийной кислоты в ЭХИНАЦЕЕ, птероподина в КОШАЧЬЕМ КОГТЕ и т.п.) уже давно рассматривается рядом авторов как инструмент соответствующего контроля. Однако это требует не только знания состава действующего начала, но и использования сложного и довольно дорогого аналитического инструментария (ВЭЖХ, ТСХ, УФ-спектроскопия). К тому же производитель не всегда информирован сам и информирует общество об оптимальных дозировках МКП (а не товарной формы препарата) при регулярном приеме БАД.

Назначение парафармацевтиков, получаемых из лекарственных растений с высоким уровнем содержания высокоактивных действующих начал, без четко установленных доз и знания механизма действия, может в ряде случаев привести к тому, что реакции компенсаторно-адаптационного характера окажутся неадекватными, т.е. ослабленными или более сильными, чем это необходимо.

Следовательно, встает проблема возможности определения норм МКП, входящих в состав как традиционной, так и нетрадиционной пищи (БАД), где эти вещества содержатся в более концентрированном виде. Именно эта необходимость вызвала появление новых Методических рекомендаций МР 2.3.1. 1915–04 «Рекомендуемые уровни потребления пищевых и биологически активных веществ» [51]. Поскольку речь идет о биологически активных компонентах пищи, разработка данного пособия потребовала комплексной высококвалифицированной работы специалистов в областях фармакологии, нутрициологии, диетологии, биохимии, биологии. Данный документ назван «Методические рекомендации», так как он призван ориентировать производителей и специалистов в области здорового питания на средневзвешенные нормы потребления биологически активных веществ при создании новой продукции и при рекомендации ее потребителю [51].

В разработке этого важного документа приняли участие ГУ НИИ питания РАМН, Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителя и благополучия человека, ММА им. Сеченова, Институт медико-биологических проблем РАН, Фармакологический комитет Минздрава России, Санкт-Петербургская Государственная химико-фармацевтическая академия, ГУ «ВИЛАР» РАСХН, АНО «Центр биотической медицины» и другие серьезные научные структуры. Если по целому ряду биологически активных компонентов пищи (витамины, многие микро- и макроэлементы) еще до издания данных Методических рекомендаций имелось ясное представление по адекватным уровням среднесуточного потребления, то впервые были определены адекватные и предельно допустимые уровни активных компонентов пищевых растений, животных, одноклеточных микроорганизмов и т.п. Важно отметить, что появление такого документа лишней раз отражает позицию Минздравсоцразвития РФ, что БАД к пище не являются лекарственными средствами, а призваны восполнять наш рацион в необходимых биологически активных компонентах [67].

Теперь разработчик БАД обязан включить в НТД методы, позволяющие подтвердить подлинность и количественное содержание действующих компонентов БАД. При введении в состав пищевых продуктов биологически активных компонентов, имеющих запатентованные фирменные названия, производитель обязан иметь полную информацию о составе и методах контроля подлинности этих компонентов [51].

Таким образом, просматривается суть нового подхода к оценке качества и эффективности БАД. Он основан на применении относительно простых инструментов химического анализа, изложенных в документе Государственной системы санитарно-эпидемиологического нормирования РФ и Минздрава России – Р 4.1.1672–03 «Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище» по отношению к микронутриентам и «минорам», перечисленным в МР 2.3.1. 1915–04 «Рекомендуемые уровни потребления пищевых и биологически активных веществ» [51].

Информация этикетки должна содержать, в частности, сведения о составе БАД с указанием ингредиентного состава в порядке, соответствующем их убыванию в весовом или процентном выражении (СанПиН 2.3.2.1290–03). Понятно, что выражение «ингредиентный состав» можно толковать достаточно широко и избегать упоминания (на этикетке) тех компонентов, в содержании которых производитель и сам не уверен.

Таким образом, в РФ появился дополнительный критерий экспертной оценки документов для регистрации отечественной и импортной продукции, который повлечет за собой совершенствование системы контроля качества БАД и используемого сырья. Этот документ предназначен для предприятий и организаций, деятельность которых осуществляется в области обращения БАД, для госсанэпидслужбы России, а также для других организаций, осуществляющих контроль за безопасностью, качеством и эффективностью БАД. Требования, изложенные в методических указаниях, применяются на этапах экспертизы БАД, а также при разработке и постановке их на производство, промышленном производстве, хранении, транспортировании, закупке, ввозе в страну и реализации, при разработке нормативно-технической документации, регламентирующей вопросы обращения БАД.

Дополнительную актуальность описанному выше подходу к оценке качества БАД придает с 01.07.03 Федеральный Закон «О техническом регулировании» [94]. Данный закон направлен на реформу действующей системы стандартизации (замену в соответствии с требованиями международной практики обязательной стандартизации на добровольную). Основными целями нового правового акта являются ограничение ведомственного нормотворчества в сфере технических требований к продукции и контроля за их соблюдением. Закон призван заменить существующую громоздкую систему стандартизации и сертификации, а также гармонизировать российское законодательство с мировыми стандартами и снизить бюрократическую нагрузку на бизнес. Осуществляемая в стране реформа технического регулирования направлена на то, чтобы обеспечить на рынке достижение необходимого баланса между интересами потреби-

теля и изготовителя. При этом, с одной стороны, должна быть обеспечена безопасность продукции для человека и окружающей среды, а с другой – барьеры на пути движения товара к рынку (оценка и подтверждение соответствия, контроль и надзор и т.д.) не должны быть препятствием для развития бизнеса.

Новое нормативное и правовое пространство видоизменяет структуру системы подтверждения соответствия. Государство теперь несет ответственность только за безопасность товаров народного потребления.

Новая система подтверждения соответствия делится на две части:

- Процедуры обязательного подтверждения соответствия
 - сертификация
 - декларация.
- Система добровольной сертификации продукции (СДС), услуг и систем менеджмента качества.

Добровольной сертификацией охватывается та часть функциональных параметров продукции, которая выпадает из требований обязательной сертификации. СДС создается организациями как средство влияния на рынок и производителей товаров. Повышаются возможности, например, выбора при тендерах продукции (оборудования) с сертификатами в добровольной системе. По закону «О техническом регулировании» [94], требования добровольной сертификации не могут быть такими же, как требования обязательной системы. Важна и независимость СДС от государственных органов. У компаний появляется и возможность провести испытания сразу в двух системах – в обязательной и в добровольной, если соответствующий испытательный центр аккредитован и там, и там. В последние годы в России происходит заметное расширение сферы применения добровольной сертификации (ДС) как основного инструмента рыночного регулирования качества и конкурентоспособности продукции, услуг, работ и других объектов. Это объясняется многими факторами. Один из них – сокращение сферы обязательной сертификации в связи с исключением из нее определенных видов продукции, работ и услуг. Расширение сферы применения ДС основано не только на использовании зарубежного опыта, где она рассмат-

ривается как основная форма подтверждения соответствия третьей стороной, но и на отечественном опыте деятельности систем ДС.

В ближайшее время ситуация в сфере производства и оборота оздоровительных продуктов может либо существенно измениться в положительную сторону, либо остаться прежней, либо ухудшиться, в случае если БАД отнесут к лекарственным средствам. Последний вариант значительно усложнит процесс вывода оздоровительных продуктов на рынок, а это не в интересах, как производителей, так и потребителей БАД [80].

В связи с вступлением в силу Закона “О техническом регулировании”, появилась возможность введения системы добровольной сертификации БАД и других биокорректоров. На сегодняшний день для проведения добровольной сертификации БАД предлагаются два основных подхода.

Первый – медико-биологический [91]. Эффективность БАД – это то, что интересует потребителей в первую очередь. Ведь покупатель платит деньги за эти средства не потому, что они безвредны. Вполне естественно, что он ждет от них определенной пользы. Если раньше при выводе биодобавки на рынок выдавалось регистрационное удостоверение, в котором была хоть какая-то, пусть неполная информация об эффективности (к примеру, значилось, что продукт обладает общеукрепляющим, иммуностимулирующим, адаптогенным свойством или его можно использовать для профилактики и вспомогательной терапии определенных заболеваний), то в разрешительном документе нового образца (СГР) информация о биологической активности отсутствует. В СГР указывается только, какие компоненты входят в состав продукта, а также то, что он не содержит вредных веществ, к которым относятся патогенная микрофлора, тяжелые металлы, радиоактивные элементы.

Второй подход к добровольной сертификации БАД – химико-аналитический. Если декларированный производителем состав БАД (т.е. содержание в нем микронутриентов и «миноров») опытным путем, с помощью официальных методов (естественно, в аккредитованной лаборатории) подтвержден, то товар будет считаться сертифицированным. Экспериментальному изу-

чению такого подхода применительно к нескольким обширным группам БАД посвящен один из разделов настоящей монографии.

1.3. Оценка клинической эффективности БАД

Эффективные БАД определяются как пероральные препараты на основе натуральных и/или идентичных натуральным продуктов, обладающие подтвержденным оздоровительным действием, предназначенные для профилактики неинфекционных и инфекционных заболеваний путем подавления хронических патологических процессов и коррекции основных функций организма, назначаемые для длительного (постоянного) приема, применяемые при острых состояниях лишь в качестве вспомогательных средств [61].

Требования к эффективным БАД включают в себя научное обоснование разработки, базирующееся на результатах фундаментальных исследований. БАД должны обладать патогенетическим действием, то есть воздействовать на ключевые звенья в патогенезе заболевания. Однако нерешенной остается проблема фармакологической характеристики и стандартизации продукта. До сих пор непонятно, каким образом это может быть реализовано, особенно в случае парафармацевтиков, представляющих собой многокомпонентную смесь. Оценка клинической эффективности нелекарственных оздоровительных препаратов, в частности, БАД, не регламентирована.

Есть ли критерии объективной оценки эффективности БАД? Во-первых, это учет содержания физиологически активных соединений в продукте [17] и, во-вторых, это клинические исследования БАД для представления результатов в орган добровольной сертификации для получения сертификата соответствия. Если отсутствует первый или второй показатель эффективности БАД, этот продукт не должен регистрироваться в качестве биологически активной добавки к пище. Поэтому о БАД, по определению, можно говорить как об эффективных препаратах, содержащих необходимые организму вещества, недостаток или от-

сутствие которых ведет к нарушениям гомеостаза отдельных систем или организма в целом.

Роспотребнадзор России предъявляет довольно жесткие требования в отношении контроля БАД [15]. Аналогичные правила и законодательные акты других стран существенно различаются. В США перед выводом на рынок биологически активных добавок фирме-производителю достаточно предоставить в соответствующий орган (FDA) информацию, подтверждающую их безопасность [143]. Регулируется лишь список веществ, которые могут служить традиционной основой для биодобавок. Для выпуска той или иной добавки на рынок не требуется ни госрегистрации, ни доказательства эффективности препарата. Государство активно поддерживает рынок, финансируя институты, проводящие исследования в этой области, такие, как Центр комплементарной и альтернативной медицины (NCCAM) и управление по БАД (ODS).

В Европе контроль над рынком БАД более серьезный, в частности, на государственном уровне запрещена реклама БАД как лекарственных препаратов [23]. Страны Евросоюза также ограничивают вещества, разрешенные к использованию при производстве БАД, и устанавливают их безопасные дозы.

В Китае технологическое/исследовательское досье и образцы продукта предоставляются для рассмотрения в исследовательское учреждение, определенное Государственным управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов Китая (SFDA) для проверки [65]. Исследовательское учреждение проводит оценку стабильности, гигиенические исследования, идентификацию компонентов, тест по определению функциональной активности, оценку токсикологической безопасности и передает отчет о результатах испытаний претендентам. Завершенные досье предоставляются претендентами в SFDA. SFDA назначает инспекционное учреждение для контроля исследований образца и выдает заключение. Аттестационный центр SFDA дает заключительный комментарий и выдает разрешения на продукты, удовлетворяющие требованиям законодательства. Продолжительность полного цикла регистрации нового продукта составляет почти 260 рабочих дней с момента подачи

всех необходимых материалов в SFDA. Таким образом, регулирующее воздействие государства в Китае, это:

- ответственность SFDA за БАД;
- децентрализация рекламных и маркетинговых акций;
- отмена ограничений по дистрибуции путем прямых продаж в 2005 г.

На одной из последних международных конференций IADSA (International Alliance of Dietary/Food Supplement Associations) рассматривались вопросы совершенствования законодательства в области БАД, причем в основном с точки зрения обеспечения их безопасности для потребителей [127]. К наиболее актуальным вопросам, связанным с регулированием рынка БАД, участники конференции отнесли, в частности, проблемы классификации БАД, их этикетирования, контроля качества, обоснованности заявляемых эффектов. Считается, что гармонизации европейских требований к БАД мешает различие в их дистрибуции – так, во многих странах более 80% БАД реализуется через аптеки, тогда как, например, в Голландии большая часть такой продукции имеет другие каналы сбыта. Этикетка БАД, как предполагается, не должна способствовать убеждению потребителя в том, что биодобавки заменяют разнообразие естественной диеты. Судя по материалам конференции, значительное внимание участников было уделено таким «вечным» вопросам, как разграничение пищевых продуктов и лекарственных средств (включая возможность выделения БАД в особую товарную группу), различие между понятиями «физиологическое» и «фармакологическое» действие, дозирование потребления витаминов и минеральных веществ, контроль за безопасностью потребления растений (причем не только лекарственных) и их компонентов; обсуждался также вывод на рынок новых БАД.

По мнению одного из специалистов российского Общества доказательной медицины В.В.Власова, «должен быть государственный список, как в Великобритании, препаратов, эффективность которых доказана – формуляр, попасть в который можно не за деньги, а на основании проведенных испытаний. Должны быть образованные врачи, которые будут знать, что такое доказательная медицина, где взять достоверные сведения. Должны быть центры, которые занима-

лись бы оценкой эффективности всех медицинских вмешательств в соответствии с общепринятыми мировыми стандартами. И должны быть источники информации и для пациентов. Нужно, чтобы пациенты учились защищать свои права. Все страны, так или иначе, через это прошли» [41].

Естественно, что существующая проблема оценки эффективности нелекарственных оздоровительных средств должна решаться и в России. Для поиска подходов к решению этой проблемы целесообразно обратиться к зарубежному опыту, прежде всего, к крупнейшему и старейшему рынку БАД в мире – рынку США.

В США считается, что доказательство клинической эффективности имеет отношение в основном к БАД, созданным на основе лекарственных растений. Алгоритм для оценки клинической эффективности лекарственных растений в США давно разработан. Проводится идентификация и характеристика самого лекарственного (или пищевого) растения, которое является сырьем для БАД, устанавливается его биодоступность и биологическая активность, идентифицируются активные компоненты, исследуются механизмы их действия. Затем проводится клиническая оценка – обычные клинические исследования в соответствии с рекомендациями ВОЗ: фаза 1 и фаза 2, а иногда и фаза 3 клинических исследований [62]. Никаких новшеств, никаких специальных подходов для оценки эффективности БАД, отличных от оценки эффективности лекарственных средств, нет. Используется тот же алгоритм, который применяется в клинической фармакологии. Единственное существенное отличие – нет исследований по токсичности. Известно, что исследования по токсичности занимают от 60 до 90% в стоимостном выражении работ, связанных с выводом лекарства на рынок. В случае БАД нет необходимости исследования токсичности, если заранее предполагается, что используются те натуральные компоненты в БАД, которые не могут нанести вреда здоровью человека. Если в рецептуру БАД вносится новый пищевой ингредиент (тот, которого не использовался до октября 1994 г., когда был принят специальный законодательный акт), производитель должен лишь уведомить FDA о своих планах по выводу продукта на рынок, и, если в течение 75 последующих дней FDA не предприняла никаких ограничи-

тельных или запретительных мер, с этого момента наличие такого препарата на рынке становится ответственностью FDA. Таким образом, в США существует работающая система, позволяющая выявлять клиническую эффективность БАД и доводить до общества, прежде всего до врачей и потребителей, истинную информацию об эффективности нелекарственного оздоровительного средства. Эта система имеет законодательную поддержку и федеральное финансирование.

Оценка клинической эффективности является ключевой проблемой БАД и в России. В течение многих лет основным препятствием для более широкого и обоснованного применения как биологически активных добавок к пище, так и других нелекарственных средств, населением было недоверие потребителей к тому, что утверждает продавец с помощью рекламы, аннотации, этикетки. Присутствие такой продукции на прилавке со всеми сопровождающими необходимыми документами, выданными государственными органами, гарантировало только ее безвредность, а ведь производитель обещал людям совсем другое и чаще всего, вынужденно или намеренно, соревновался с конкурентом в искусстве стимулирования сбыта или внешней привлекательности товара.

Постепенно наш рынок становится цивилизованнее, и часть производителей указывает на проведенные клинические исследования своих препаратов, понимая, однако, под этим самые разные процедуры. Поэтому и оценить надежность представленной информации объективно по-прежнему весьма трудно, особенно неспециалистам.

На примере БАД, которые составляют большую часть биокорректоров, можно пояснить, в чем суть этой проблемы, как она решается на сегодняшний день и как она должна быть решена. В настоящее время БАД в России проходят государственную регистрацию. Если эксперты оценивают образцы как безвредные, продукция попадает на рынок. Безусловно, гарантируется безвредность, а об эффективности БАД в свидетельстве о государственной регистрации ничего не говорится.

В отсутствие официальных заключений об эффективности, по-видимому, наиболее приемлемым вариантом могла бы стать система добровольной сер-

тификации эффективности нелекарственных оздоровительных средств. В 2003 г. вступил в действие Федеральный закон «О техническом регулировании», который создал законодательную базу для организации системы добровольной сертификации.

В соответствии с законом «О техническом регулировании», профессиональные организации разрабатывают технический регламент на производство и распространение каких-либо товаров и услуг, правила их сертификации и сертифицируют эти товары и услуги. Органы исполнительной власти осуществляют контроль и надзор за соблюдением технического регламента и сертификацией. Они же выдают аккредитацию на право сертификации товаров и услуг. Существуют аккредитованные государственными структурами центры, которые занимаются добровольной сертификацией эффективности оздоровительных нелекарственных продуктов и технологий. Разработчик или производитель может обратиться в Сертификационный центр и, при наличии положительного заключения экспертов, получить сертификат эффективности. Наличие таких сертификатов в местах продаж позволяет продавцу и покупателю правильно ориентироваться в выборе БАД. Разработаны знаки, подтверждающие сертификацию. Это должно существенно повысить конкурентоспособность БАД, позволяет заявлять об эффективности биокорректоров в рекламе и других информационных материалах, снимает ответственность с производителя, продавца и рекламодателя за достоверность сведений о лечебно-профилактических (полезных) свойствах сертифицированного товара. А торгующие организации и рекомендуемые биокорректоры работники здравоохранения могут получить надежный ориентир, позволяющий им предлагать пациентам только самое лучшее из имеющегося на рынке товарного предложения.

В частности, основной целью создания Системы добровольной сертификации «Эффективные биокорректоры» является оценка соответствия объектов сертификации признакам клинической эффективности, установленным Стандартом отрасли ОСТ 42–511–99 «Правила проведения качественных клинических испытаний в Российской Федерации».

К сожалению, за прошедшие годы процедура добровольной сертификации БАД в России не стала массовой, а критерием эффективности являются не столько результаты клинических испытаний, сколько подтверждение ингредиентного состава, заявленного производителем (как альтернатива испытаниям). Более того, даже самые крупные операторы рынка не смогли согласовать общую позицию в отношении как к добровольной сертификации, так и способам ее проведения.

Возможно, этим объясняется в значительной степени и тот факт, что с 1 июля 2006 г. в России вступил в силу ФЗ «О рекламе» от 13 марта 2006 г. Законом предусмотрены определенные ограничения в рекламировании БАД, например, статья 25 (п. 5) запрещает утверждать в рекламе, что продукция прошла клинические испытания.

Тем не менее, сохраняется надежда на то, что оздоровительные программы с использованием БАД будут строиться на основе известных приоритетов, связанных с сохранением здоровья. Опыт проведения массовых оздоровительных мероприятий в ряде регионов свидетельствует о том, что можно за один год добиться снижения общей заболеваемости в 5–6 раз, снижения заболеваемости ОРВИ и гриппом в 7 раз, снижения общей и сердечно-сосудистой смертности в 2–3 раза, снижения риска онкологических заболеваний – на 30% [26, 64, 75]. Добиться подобных эффектов с помощью лекарственных средств невозможно ни при каких обстоятельствах. Причины необыкновенной эффективности БАД достаточно простые: своевременный прием еще до появления заболевания, постоянный длительный прием (1 год и более) и массовое применение, что особенно важно для инфекционных заболеваний.

1.4. Биоиндикация и биотестирование безопасности пищевых продуктов и БАД

Рост промышленного и сельскохозяйственного производства, а также военная деятельность государств, несмотря на систему мер по охране окружающей среды, приводят к всё возрастающему поступлению в экосистемы ксено-

биотиков – чужеродных для организма соединений, не вступающих в организм ни в пластический, ни в энергетический обмен.

Накапливаясь по пищевым цепям, ксенобиотики поступают в продукты питания (прежде всего, в ткани промысловых рыб и сельскохозяйственных животных), а с ними (так же, как и с продуктами их переработки, включая БАД) – в организм человека.

При мониторинге экосистем индивидуальный анализ химических компонентов в окружающей среде, и особенно в тканях животных, растений и продуктов питания, необходим, однако не всегда возможен, так как, во-первых, часто неизвестен даже класс химических соединений, которые нужно контролировать, а во-вторых, действующие концентрации некоторых ксенобиотиков столь малы, что для химико-аналитического контроля не всегда достаточно даже специальных высокочувствительных и дорогостоящих методов анализа (например, хромато-масс-спектрометрии) [2].

Многие биологически активные вещества, кроме этого, нестабильны и после взаимодействия с биологической мишенью в короткие сроки распадаются.

Эти условия объясняют возрастающий в настоящее время интерес к изучению отклика как экосистем, так и отдельных биологических объектов на антропогенные воздействия. Подобные исследования проводятся на основе биотестирования и биоиндикации. При этом необходимо проводить эти испытания на различных уровнях организации живых систем [1].

Анализ отклика на молекулярном уровне дает возможность регистрировать генетические и биохимические изменения в клетках, которые могут привести к далеко идущим последствиям для данного вида организмов задолго до того, как наступят необратимые изменения в численности, биологической продуктивности, ареале распространения вида и т.п.

Развитие молекулярной биологии и биотехнологии делает доступным использование этих наук для создания тест-систем, которые все шире внедряются в мировой практике для биомониторинга, анализа продуктов питания, а также для

тестирования и сертификации биологически активных продуктов, получаемых из природного материала [19].

Действительно, с помощью биотестирования можно определить как опасные, так и положительные свойства различных компонентов, используемых в составе биологически активных добавок – БАД.

1.4.1 Методология биоиндикации и биотестирования

Биотестирование – это оценка в лабораторных условиях объектов окружающей среды с использованием живых организмов, клеток, клеточных структур и биологических молекул.

Под биотестированием (bioassay) обычно понимают процедуру установления токсичности среды с помощью тест-объектов, сигнализирующих об опасности независимо от того, какие вещества и в каком сочетании вызывают изменения жизненно важных функций у тест-объектов. Благодаря простоте, оперативности и доступности биотестирование получило широкое признание во всем мире и его все чаще используют наряду с методами аналитической химии.

Биотестирование регулярно используется [27]:

- при проведении токсикологической оценки промышленных, сточных бытовых, сельскохозяйственных, дренажных, загрязненных природных вод с целью выявления потенциальных источников загрязнения,
- в контроле аварийных сбросов высокотоксичных сточных вод,
- в контроле токсичности сточных вод, подаваемых на очистные сооружения биологического типа с целью предупреждения проникновения опасных веществ для биоценозов активного ила,
- при определении уровня безопасного разбавления сточных вод для гидробионтов с целью учета результатов биотестирования при корректировке и установлении предельно допустимых сбросов (ПДС) веществ, поступающих в водоемы со сточными водами,

- при проведении экологической экспертизы новых материалов, технологий очистки, проектов очистных сооружений,
- при разработке санитарно-гигиенических и рыбохозяйственных ПДК.

Организм, или биологический объект, используемый при оценке токсичности химических веществ, природных и сточных вод, почв, донных отложений, кормов и биологических добавок называется тест-объектом, или биомаркером.

Тест-объекты, по определению Л.П.Брагинского, это «датчики сигнальной информации о токсичности среды и заменители сложных химических анализов, позволяющие оперативно констатировать факт токсичности (ядовитости, вредности) водной среды («да» или «нет»), независимо от того, обусловлена ли она наличием одного точно определяемого аналитически вещества или целого комплекса аналитически неопределяемых веществ, какой обычно представляют собой сточные воды. Тест-объекты с известной степенью приближения дают количественную оценку уровня токсичности загрязнения водной среды – сточных, сбросных, циркуляционных и природных вод» [11].

Биоиндикаторы или биомаркеры – это организмы, присутствие, количество или интенсивность развития которых служит показателем каких-либо естественных процессов или условий окружающей среды, наличия определенных веществ в воде или в почве, степени загрязненности и др. Другими словами – биоиндикатор это группа особей одного вида или сообщества, по наличию или по состоянию которых, а также по их поведению судят о естественных и антропогенных изменениях в среде.

В современной литературе биоиндикаторами или биомаркерами называют не только организмы, но и биологические тест-системы: биологические ткани, клетки, клеточные структуры и даже отдельные биологические молекулы [34,72,73] (Приложение 2).

Биоиндикация – это оценка качества среды обитания и ее отдельных характеристик по состоянию ее биоты в природных условиях. Для учета изменения среды под действием антропогенного фактора составляются списки инди-

каторных организмов (биомаркеров). Как уже отмечалось выше, в качестве биомаркеров могут выступать и биологические системы: мембраны, ферменты, биомолекулы (Приложение 3).

Для анализа действия различных факторов окружающей среды в биотестировании и биоиндикации следует применять те биомаркеры, которые наиболее адекватно реагируют на изменение соответствующего фактора. С другой стороны, для выяснения механизмов действия антропогенных факторов приходится применять целый ряд тест-систем, использовать различные биомаркеры.

1.4.2. Накопление и механизмы действия мутагенных и канцерогенных соединений в окружающей среде

Действие антропогенных факторов на биологические системы (в том числе и на человека) обычно разделяют на две группы:

- острый стресс, который характеризуется внезапным началом, быстрым ростом интенсивности и короткой продолжительностью воздействия;
- хронический стресс, при котором воздействия слабой силы длительны или часто повторяются – эффект «постоянного вмешательства» [69].

Как правило, биологические системы обладают устойчивостью, которая позволяет им переносить тяжелые периодические или острые изменения. Более того, многим популяциям необходимы некоторые стохастические вмешательства в их развитие, такие как огонь или резкие изменения климатических условий.

Однократное попадание даже значительных количеств токсичных соединений может быть не особенно опасными, если эти вещества нестабильны или быстро выводятся из экосистем. Однако хронические вмешательства могут привести к стабильным и необратимым последствиям, особенно в случае загрязнения ксенобиотиками, которые не имелись до этого в окружающей среде [133].

Как правило, ксенобиотики не принимают участие ни в энергетическом, ни в пластическом обмене веществ, накапливаются в тканях и подвергаются (с той

или иной скоростью) химическим изменениям в процессе взаимодействия с жизненно важными биологическими молекулами, такими как ДНК, РНК и белки.

Воздействие канцерогенных и мутагенных соединений наиболее опасно, так как их влияние проявляется и через несколько поколений. Накапливаясь в экосистемах, они могут необратимо изменять биоценоз. Кроме того, эти мутагенные компоненты, как правило, канцерогенны и вызывают появление опухолей у животных и людей [123]. По некоторым оценкам, они составляют не менее 5% от общего числа антропогенных загрязнений экосистем.

Эти соединения могут не обладать острой токсичностью, но, накапливаясь в организме, оказывают продолжительное действие с особо опасными последствиями. В связи с этим биологическое тестирование мутагенных и канцерогенных соединений имеет особо важное значение.

Среди генотоксикантов следует различать химические соединения, которые образуют аддукты с ДНК и соединениями, требующими метаболических изменений или активации для проявления генотрансформирующей активности. Примером непосредственно взаимодействующих веществ могут служить алкилсульфат, эпоксиды, ароматические N-оксиды, ароматические нитросоединения, лактоны, алкилнитраты.

Примеры веществ, реагирующих после модификаций: ПАУ, ароматические амины, алкил- и арилнитрозамины, ароматические азотсодержащие соединения и алифатические винилсодержащие. Особую опасность представляют хлорсодержащие соединения, попадающие в окружающую среду, как правило, с хлорорганическими пестицидами [30].

Хлорорганические пестициды обнаруживаются как в тканях морских животных, так и в тканях людей. ПХБ находят в тканях китов, в молоке женщин с островов Тихого океана. В настоящее время хлорорганические соединения обнаруживаются даже в тех местах, где эти химические вещества никогда не использовались.

Повышение частоты некоторых заболеваний, ослабление иммунной системы и некоторые наследственные патологии среди населения связаны с присут-

ствием ксенобиотиков в окружающей среде. Считается, что от 5 до 25% злокачественных заболеваний людей связано с загрязнением воздуха, пищи и питьевой воды канцерогенными и мутагенными соединениями [129].

Мутагенные и канцерогенные соединения, образовавшиеся в результате промышленной и сельскохозяйственной деятельности, рано или поздно попадают в морские экосистемы, переносимые реками и с атмосферными осадками. Значительная часть этих соединений попадает в моря непосредственно во время разливов нефти с кораблей, иногда во время кораблекрушений и пр. В течение последних лет отмечен резкий рост числа опухолевых образований в тканях морских рыб, в том числе потребляемых человеком в пищу [45,46]. Некоторые заболевания имеют вирусное происхождение, но большая часть связана с загрязнением морей и океанов мутагенными и канцерогенными ксенобиотиками.

Одно из характерных черт мутагенных и канцерогенных веществ – способность проявлять биологическое воздействие в очень низких концентрациях. Это мешает их аналитическому определению в биологических тканях. С другой стороны, с помощью химических методов невозможно определить, какие вещества проявляют канцерогенное и мутагенное действие. По этой причине биологические тесты и биологические показатели канцерогенности и мутагенности соединений применяются все шире [81].

Увеличение содержания мутагенных соединений в морепродуктах, используемых в пищу человеком, приводит к необходимости мониторинга генотоксичных соединений в прибрежных зонах и, особенно в тех местах, где проводится промышленный лов рыбы и моллюсков. Действительно, мутагенные и канцерогенные соединения, накапливающиеся в морских животных, могут не только изменять существующие экосистемы, но представляют прямую опасность для человека, вызывая различные мутации в тканях людей.

Мутации – это наследственные изменения, приводящие к увеличению или уменьшению количества генетического материала, изменениям структуры хромосом или нуклеотидной последовательности генов. Мутации могут возникать спонтанно или под действием различных мутагенных факторов, таких, как

ультрафиолетовое (УФ) облучение, ионизирующие излучения, химические мутагены.

Хромосомные мутации – широкая группа перестроек (аббераций) хромосом, включающих обмен частями между негомологичными хромосомами (транслокация), изменение ориентации внутренних частей хромосом на противоположную (инверсия), утрата частей хромосом (делеция) или удвоение частей (дупликация), включение посторонних фрагментов ДНК (инсерция) и разрывы хромосом (фрагментация). Хромосомные перестройки, особенно такие, как делеции и фрагментации, ведут, главным образом, к снижению жизнеспособности или гибели клеток.

Точковые (генные) мутации – изменения в нуклеотидных последовательностях ДНК – могут быть двух типов: замены оснований, т.е. изменение одного из азотистых оснований ДНК на другое, и сдвига рамки считывания генетического кода (вставка или выпадение одного из нуклеотидов ДНК). Хотя во многих случаях генные мутации, так же как и хромосомные, являются летальными, именно генные мутации вносят основной вклад в изменчивость наследственных признаков (фенотипа). Они лежат в основе многих аномалий развития организмов, наследственных заболеваний, злокачественного перерождения клеток.

Необходимо иметь в виду, что генотоксические агенты вызывают, помимо мутаций, и другие генетические эффекты. Прежде всего, это разнообразные повреждения ДНК: разрывы одной или обеих нитей в дуплексе ДНК (однонитевые и двунитевые разрывы, соответственно), бреши, модификация азотистых оснований ДНК, утрата пуриновых оснований и многие другие. Эти первичные повреждения ДНК являются объектом исправления со стороны разнообразных специальных репарационных систем, в результате работы которых они либо устраняются, либо превращаются в генные мутации. Поэтому уровень функционирования клеточных репаративных процессов (например, так называемого внепланового синтеза ДНК), индуцированных химическим веществом, является показателем ДНК-повреждающей активности этого вещества.

1.4.3. Тест-системы для анализа мутагенов и канцерогенов в окружающей среде

С целью анализа мутагенного и канцерогенного эффекта химических веществ и оценки генетических последствий загрязнения окружающей среды во многих лабораториях мира активно разрабатываются специальные тест-системы. Такие тест-системы должны отличаться, прежде всего, высокой чувствительностью, способностью улавливать мутагенную и канцерогенную активность как можно более широкого спектра химических соединений, быстротой, экономичностью, возможностью анализа молекулярных механизмов действия мутагенов.

Из многочисленных тест-систем, регистрирующих генотоксичность, можно выделить следующие основные группы [31].

Тест-системы на бактериальных объектах. Бактериальные тест-системы разработаны на классических объектах генетики микроорганизмов – *Bacillus subtilis*, *Escherihia coli*, *Salmonella typhimurium*. В основе этих тестов лежат сходные методические приемы. Общим достоинством бактериальных тестов является быстрота, экономичность, высокая чувствительность, возможность учета мутаций различных типов. Основной недостаток заключается в отсутствии у этих бактерий ферментных систем метаболической активации ксенобиотиков. Известно, что в организме млекопитающих и других высших организмов многие промутагены и проканцерогены могут подвергаться так называемой метаболической активации при участии монооксигеназ – ферментных систем, осуществляющих микросомное окисление. Центральную роль в этих системах, максимальная активность которых связана с эндоплазматическим ретикуломом клеток печени, играют множественные индуцируемые формы цитохрома Р-450 [46].

Основное назначение этих систем (кроме участия в пластическом обмене) заключается в инаktivации чужеродных соединений, но определенная часть промутагенов и проканцерогенов может активироваться в качестве побочных продуктов, т.е. превращаться в мутагены и канцерогены. Поэтому бактерии

оказались нечувствительными к ряду промутагенов и проканцерогенов, активных в отношении высших организмов.

Эти трудности удалось значительно уменьшить благодаря разработке систем метаболической активации ксенобиотиков в условиях *in vivo* и *in vitro* [47].

Тест-системы с метаболической активацией *in vivo* включают введение культуры тест-организма в обработанное мутагеном животное, обычно внутрибрюшинно, с последующим выделением культуры и анализом частоты индуцированных мутаций. С помощью этого метода удалось продемонстрировать активность целого ряда соединений (нитрозоморфолин, диметилнитрозамин и др.) на сальмонелле. Однако при использовании этого метода трудно определить мутагенность короткоживущих метаболитов. Метод также непригоден для изучения органо- и тканеспецифичности метаболической активации. Диапазон исследуемых концентраций препарата ограничен уровнем его токсичности для животного-посредника [148].

Наиболее широкое распространение получили тесты с метаболической активацией *in vitro*, в которых используется фракция микросом (постмитохондриальный супернатант) из гомогенатов печени животных, обычно крыс или мышей (так называемая фракция S₉). При введении в тест-систему фракции S₉ и необходимых кофакторов (Mg⁺⁺, НАДФН) начинает функционировать система микросомного окисления, осуществляющая, по существу, те же процессы, что происходят в печени животного. Использование метаболической активации *in vitro* резко повысило чувствительность бактериальных тест-систем и существенно расширило их возможности. Достаточно сказать, что сравнение частот реверсий у индикаторных бактерий в вариантах с метаболической активацией и без нее позволяет судить о том, как зависит мутагенная активность исследуемого препарата от функционирования микросомных систем монооксигеназного окисления.

В то же время необходимо иметь в виду, что такие модельные системы с использованием фракции микросом из печени крыс или мышей, предварительно активированных одним из стандартных индукторов (фенобарбитал, метил-

холантрен, арохлор 1254), имеют определенные ограничения, связанные с тем, что скорость и соотношение разнообразных реакций активации и инактивации зависит от индуцирующего агента, от возраста, пола, физиологического состояния, тканевой принадлежности фракции микросом [133], от генотипа, не говоря уже о видовой принадлежности объекта, послужившего источником фракции S9. Определенные отличия в метаболизме микросомных систем обнаружены у кур, рыб и других объектов [45].

Таким образом, конечный мутагенный и канцерогенный эффект исследуемого соединения в организме определяется совокупностью целого ряда факторов. Очевидно, что эти ограничения можно в определенной мере снять, используя для метаболической активации фракцию S9, наиболее соответствующую требованиям каждого конкретного эксперимента [81].

Система метаболической активации может использоваться во всех бактериальных тест-системах. В дальнейшем при сопоставлении различных бактериальных тестов мы будем рассматривать их в этом наиболее чувствительном варианте.

Тесты на реверсии к прототрофности. Для этих тест-систем были созданы специальные штаммы бактерий, несущие одну или несколько мутаций ауксотрофности, природа которых известна. Это либо мутации типа замены оснований, либо типа сдвига рамки считывания генетического кода (вставка или выпадение нуклеотида). Мутации типа замены оснований ревертируют только под действием мутагенов, вызывающих замены оснований; мутации типа сдвига рамки – под действием соответствующих мутагенов [2]. Хотя такое утверждение кажется упрощенным, так как не учитывает возможности возникновения реверсий за счет супрессорных мутаций любого типа, оно хорошо согласуется с экспериментальными данными и лежит в основе дифференцирования мутагенов с помощью тест-системы на агенты, вызывающие мутации типа замены оснований и типа сдвига рамки. Для повышения чувствительности тест-штаммов в них вводятся мутации, приводящие к дефектам процессов репара-

ции генетических повреждений, что снижает их способность восстанавливать повреждения ДНК [29].

Наиболее распространенными для учета ревертантов являются так называемые чашечные тесты, где проводят учет колоний прототрофных ревертантов на твердой селективной среде. Эти тесты можно подразделить на полуколичественные, где учитывается число ревертантов на чашку, и количественные, где определяется частота ревертантов среди выживших клеток [79]. Количественные тесты целесообразно использовать для определения частоты индуцированных мутаций, а также в тех случаях, когда исследуемый препарат обладает бактерицидным действием.

Тесты на регистрацию хромосомных перестроек. Это цитогенетические тесты *in vivo* или *in vitro*, выполняемые на эукариотических организмах с использованием светового микроскопа. Наиболее распространены тесты на обнаружение структурных изменений хромосом в метафазе или анафазе митоза [59] и микроядерный тест.

Накопление хромосомных aberrаций в соматических клетках является одним из факторов, приводящих к таким генетическим эффектам, как злокачественное перерождение, старение, дегенерация и гибель клеток и тканей. Обнаружена высокая степень корреляции (около 90%) между способностью химических мутагенов вызывать хромосомные перестройки и генные мутации. Несмотря на различия механизмов этих типов мутаций, цитогенетическая активность тестируемых веществ может указывать на их способность индуцировать генные мутации и наоборот [118].

Хромосомные перестройки можно индуцировать в клеточных культурах или лимфоцитах периферической крови *in vitro* и в активно делящихся соматических клетках животных и растений *in vivo*. Обычно регистрируют разрывы хромосом с образованием свободных или связанных с ними фрагментов и меж- и внутрихромосомные обмены их частями.

Наиболее информативен анализ разных типов хромосомных перестроек на стадии метафазы митоза. Делящиеся клетки могут быть задержаны в этой фазе

с помощью митотических ядов (колхицин и др.). Однако для проведения метафазного анализа необходимо, чтобы кариотип тестируемого организма был хорошо изучен и удобен для цитогенетических исследований: крупные, но немногочисленные хромосомы, хорошо различимые морфологически после дифференциального окрашивания. Для количественной оценки индукции хромосомных перестроек проще проводить анализ на стадии анафазы митоза. В этом случае можно регистрировать возникновение хромосомных фрагментов и дицентриков – структур с двумя центромерами, образовавшихся в результате транслокации. Последние хорошо различимы в анафазе в виде так называемых мостов [119].

Для изучения индукции хромосомных перестроек *in vitro* удобно использовать лимфоциты периферической крови человека и животных, стимулированные к клеточным делениям фитогемагглютинином. Достоинства этого метода в его простоте, доступности материала, синхронности клеточных циклов, низком уровне спонтанного мутирования. Последнее обстоятельство составляет важное преимущество перед культурами клеток, отличающимися высоким спонтанным уровнем хромосомных перестроек. Среди обнаруживаемых перестроек около 90% составляют ацентрические фрагменты.

Для изучения индукции хромосомных перестроек *in vivo* используются клетки костного мозга лабораторных мышей, которым внутрибрюшинно введено испытуемое вещество. Основное достоинство метода в высокой пролиферирующей активности клеток, простоте приготовления препаратов. Морфология хромосом мыши хорошо изучена.

Для оценки уровня индукции хромосомных перестроек сравнивается частота метафаз (или анафаз) с хромосомными аномалиями в опыте и необработанном контроле [29].

Тест Эймса и система метаболической активации. Для создания тест-системы Эймсом и его сотрудниками были сконструированы специальные штаммы. Все штаммы происходят от лабораторного штамма *S. typhimurium* LT2, у которого были выделены ауксотрофные по гистидину мутанты *his* G-46

(мутация замены оснований в *his G*-гене гистидинового оперона), *his C-3076* и *his D-3052* (мутации типа сдвига рамки считывания в генах *C* и *D*, соответственно). Мутация *his G-46* ревертирует под действием мутагенов, вызывающих замены оснований, две другие – под действием агентов, индуцирующих сдвиг рамки считывания [30]. Для повышения чувствительности штаммов в них была введена протяженная делеционная мутация *gal bio urvB*, захватывающая биотин-новый оперон, часть галактозного оперона и ген *urvB*. Последняя мутация вызывает нарушение системы эксцизионной репарации и, в силу своей делеционной природы, является очень стабильной. Следующим этапом повышения чувствительности штаммов было введение в них мутации *rfa*, приводящей к утрате наружного липосахарида и к увеличению проницаемости клеточной стенки. Таким образом, были созданы штаммы:

- TA 1535 *hisG-46 gal bio urvB rfa*,
- TA 1537 *his C-3076 gal bio urvB rfa*,
- TA 1538 *hisD-3052 gal bio urvB rfa*,

получившие широкое распространение в исследованиях по генетической токсикологии. Однако эти штаммы оказались нечувствительными или малочувствительными к ряду известных мутагенных соединений (метилметансульфат, 4-нитрохинолин-1-оксид, бензилхлорид, бенз/а/пирен, различные нитрофураны и др.). Этот недостаток удалось устранить путем введения в штаммы TA 1535 и TA 1538 особой плазмиды pKM 101, являющейся R-фактором и одновременно передающей штаммам устойчивость к ампицилину. Таким образом были сконструированы высокочувствительные штаммы [81]

- TA 100 *hisG-46 gal bio urvB rfa*, pKM 101 amp R,
- TA 98 *hisD-3052 gal bio urvB rfa*, pKM 101 amp R.

– Вещества, вызывающие мутации типа замены оснований, вызывают реверсии к прототрофности по гистидину у штаммов TA 1535 и TA 100, а мутагены, вызывающие сдвиг рамки считывания – у штаммов TA 1537, TA 1538 и TA 98.

На основе штаммов сальмонеллы были созданы полуколичественные и количественные тесты для оценки мутагенной активности. Их детальное описание дано в методическом руководстве Фонштейна и сотр. Как уже было отмечено выше, количественные тесты целесообразно использовать в целях определения частоты мутаций, а также в тех случаях, когда исследуемые вещества являются токсичными и вызывают гибель большей части клеток тест-объекта. Поэтому наиболее широкое распространение получил ставший классическим полуколичественный тест Эймса с метаболической активацией *in vitro* [151] или, как его иногда еще называют тест Эймса сальмонелла/микросомы.

Принципиальная схема теста проста. В пробирку с расплавленным 0,6% агаром вносятся определенные количества клеток тестерного штамма, испытываемого вещества, фракции S9 и кофакторов. В варианты без метаболической активации вместо фракции S9 вносят равный объем 0,15 М KCl. Полученная смесь выливается в качестве верхнего слоя на поверхность твердой среды, обеспечивающей селективный рост ревертантов His⁺. Через 2–3 дня проводится учет колоний ревертантов на чашках.

Оценка результатов производится, исходя из следующих критериев. Если количество колоний на опытных чашках превышает число колоний на контрольных чашках без мутагена не более чем в 1,7 раза, делается заключение, что мутагенная активность не выявлена. Если наблюдается превышение в 1,7–10 раз, делается вывод о слабой, в 10–100 раз – о средней, более чем в 100 раз – о сильной мутагенной активности препарата [156].

Для оценки теста Эймса сальмонелла/микросомы существенное значение имеет вопрос о совпадении канцерогенной и мутагенной активности проверяемых соединений, т.е. о чувствительности теста по отношению к канцерогенам. В лаборатории Эймса [76] было показано, что 90% из 175 известных канцерогенов, выявленных в опытах на животных, проявили мутагенную активность в тесте на сальмонелле. Аналогичным образом, около 90% веществ, не проявляющих канцерогенной активности у животных, не вызывали обратных мутаций у сальмонеллы, хотя некоторая часть таких неканцерогенов была активна в

тесте Эймса (так называемые «фальшивопозитивные результаты»), что можно рассматривать как свидетельство его более высокой чувствительности по сравнению с тестами на животных. Следует отметить, что именно с использованием теста Эймса было проведено наиболее тщательное и систематическое сопоставление мутагенной и канцерогенной активности большого числа химических соединений. Все это позволяет сделать вывод о высокой чувствительности теста Эймса по отношению к канцерогенам.

Однако, тест Эймса не способен выявлять активность таких известных канцерогенов, как уретан, 1,2-диметилгидразин, дизельдрин и некоторых других (так называемые «фальшиво-негативные результаты»), а также не пригоден для изучения канцерогенных металлов [163], что требует привлечения для этих целей других тест-систем.

Большая часть мутагенов находится во внешней среде в виде промутагенов. Для того, чтобы под влиянием этих веществ возникла мутация, необходима их метаболическая активация [2].

Обычно работу монооксигеназной системы учитывают лишь при регистрации мутагенов непрямого действия, что не совсем правильно. Прямые мутагены не нуждаются в метаболической активации, но, попадая в организм, также подвергаются воздействию монооксигеназной системы. Но, если в случае не прямых мутагенов эта система выполняет роль активирующей, то в случае прямых мутагенов она детоксицирует, то есть снижает выход мутаций.

В настоящее время тест Эймса является наиболее широко распространенным и общепризнанным. С 1997 г. он включен в систему разработки рыбохозяйственных ПДК [2]. В связи с этим, мы выбрали именно этот тест для анализа генотоксичности наших препаратов.

Однако, выявление генотоксичности – это только первый этап экологотоксикологического анализа. Необходимо также выяснить, какое из химических соединений обладает мутагенным действием, определить источник его поступления в экосистему. Для этого используются химико-аналитические мето-

ды, среди которых наиболее чувствительным является хроматомасс-спектрометрия.

1.4.4. Использование хромато-масс-спектрометрии при анализе органических загрязняющих веществ

Метод хроматомасс-спектрометрии (ГХ-МС) появился в конце 50-х годов прошлого века и вскоре показал свои преимущества над ранее раздельно использовавшимися методами хроматографии и масс-спектрометрии. Хроматографическая часть прибора обеспечивает эффективное разделение компонентов анализируемой смеси по временам выхода из колонки. Однако, располагая только временами удерживания, не всегда можно сделать вывод о природе разделенных соединений. Более того, идентификация соединений хроматографическим методом – это очень длительная, трудоемкая задача. Кроме того, надежность результатов часто оказывается невысокой. Интересующую исследователей информацию о каждом соединении (молекулярная масса, элементный состав, природа функциональных групп и полная структура) получают с помощью масс-спектрометрической части прибора.

Из используемых в настоящее время для анализа органических соединений методов (газовая и жидкостная хроматография, УФ- и ИК-спектроскопия, спектроскопия ядерного магнитного резонанса, флуоресцентный и фосфоресцентный анализ) хроматомасс-спектрометрия, бесспорно, является наиболее чувствительным, универсальным и информативным методом. В связи с тем, что большинство органических соединений дает индивидуальные масс-спектры, являющиеся характеристиками конкретных веществ и отражающие их структурные особенности, идентификация отдельных соединений в исследуемых смесях осуществляется быстро и однозначно. Для получения достоверного масс-спектра каждого из компонентов смеси достаточно наличия в ней 1 нг (10^{-9} г) отдельного соединения. Если же необходимо лишь зафиксировать присутствие конкретного вещества в изучаемой смеси, этот порог может быть снижен до 1 пг (10^{-12} г) [113].

В современных хроматомасс-спектрометрах широко используется компьютерная техника. С развитием системы хроматограф – масс-спектрометр – компьютер стал возможным переход от вышеизложенной методики к записи полных масс-спектров в память прибора каждую секунду анализа, независимо от появления хроматографических пиков [147].

Компьютеризованная хроматомасс-спектрометрия открывает новые возможности для исследований: например, позволяет вычитать фон из масс-спектров, облегчая идентификацию, получать индивидуальные масс-спектры для компонентов, имеющих близкие времена удерживания и выходящие из колонки хроматографа в виде плохо разрешенных пиков, дает возможность определять компоненты, присутствующие в следовых количествах [164].

Анализ неразрешенных и даже совпадающих пиков легко осуществляется с помощью компьютера при работе в режиме масс-хроматографии. После окончания хроматомасс-спектрометрического эксперимента с записью всех спектров в память, компьютер строит хроматограммы для каждого заданного иона в координатах: номер сканирования – интенсивность тока данного иона [161]. Это позволяет точно определить номер сканирования, при котором ток по заданному иону имеет максимум. Если в масс-спектрах неразделенных компонентов имеются специфические пики, характеризующие каждый из компонентов и отсутствующие (или незначительные) в спектрах других компонентов, то масс-хроматограммы по каждому из этих характеристических ионов показывают элюирование соответствующих им компонентов независимо от того, перекрываются ли хроматограммы по полному ионному току (ПИТ) [121].

Структурное определение сложных соединений по их масс-спектрам часто является трудноразрешимой задачей. Однако, существует большая вероятность, что соединения, обнаруженные в пробе, ранее были изучены, и их масс-спектры опубликованы. Поэтому при анализе сложных объектов широко используются библиотеки масс-спектров, содержащие данные для большого количества ранее изученных соединений [131]. В настоящее время доступны библиотеки объемом до 270 000 масс-спектров.

Однако не всегда можно целиком положиться на библиотечный поиск, так как не все вещества имеют уникальные масс-спектры. Например, масс-спектры электронного удара таких разных соединений, как метилпиридин, метилхинолин и аминафталин, полностью неразличимы [132]. В подобных случаях следует учитывать информацию о временах удерживания, но иногда и этого недостаточно для однозначной идентификации. По масс-спектрам часто трудно различить, например, изомеры полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), а времена удерживания изомеров очень близки. Так как токсичность этих соединений сильно зависит от структуры, а, с другой стороны, такие изомеры легко различимы в ИК-спектрах, при анализе ПАУ часто используют данные обоих методов анализа: хроматомасс-спектрометрии и хромато-ИК-спектрометрии. Из масс-спектров легко устанавливают молекулярные массы соединений, а ИК-спектры позволяют дифференцировать изомеры [136]. Недостатком метода является низкая чувствительность хромато-ИК-спектрометра: в обычном анализе природных объектов он в десятки раз менее чувствителен, чем хроматомасс-спектрометр [149].

Повысить чувствительность хроматомасс-спектрометрии примерно на два порядка можно работая в режиме масс-фрагментографии (мониторинг заданных ионов) [98]. В этом случае из всех ионов, образующихся в ионном источнике, на детектор попадают только ионы с одной или несколькими заданными массами. Поэтому во время эксперимента строятся хроматограммы не по полному ионному току, а по току заранее выбранных ионов. Повышение чувствительности достигается за счет того, что время регистрации полностью затрачивается на детектирование нужных для анализа характеристических ионов. Метод масс-фрагментографии широко используется при анализе природных продуктов, лекарственных препаратов, хлорсодержащих органических соединений и других объектов окружающей среды [150].

Пределы обнаружения различных компонентов в анализируемых смесях методом масс-фрагментографии составляют от 10^{-9} до 10^{-12} г в зависимости от типа соединений и характера анализа [154]. Необходимо отметить, что надеж-

ность определения веществ этим методом ниже, чем методом хроматомасс-спектрометрии с полным сканированием масс-спектра. Отсутствие полного масс-спектра элюируемого соединения может привести к ошибкам в качественном анализе в случае большого числа органических веществ в исследуемой смеси, так как пик на масс-хроматограмме может быть обусловлен ионом, образовавшимся при распаде других компонентов смеси. Поэтому необходимо принимать во внимание информацию о временах удерживания. Устранить возможные неточности в идентификации можно, также используя масс-фрагментографию высокого разрешения (мониторинг заданных ионов с высоким разрешением).

При увеличении разрешающей способности масс-спектрометра уменьшаются перекрестные вклады соседних масс, а соответственно уменьшаются и наложения фона и других компонентов смеси на ионы регистрируемой массы. Работа при повышенном разрешении является основой общепринятого метода улучшения эксплуатационных качеств прибора при масс-фрагментографии. Обычно используется разрешение 5 000–10 000, следовательно, метод приемлем исключительно для магнитных секторных приборов, способных дать требуемое разрешение с достаточной чувствительностью [98].

Хотя при высоком разрешении достигается улучшенная дискриминация ионов, абсолютная чувствительность прибора уменьшается. Это не обязательно приводит к ухудшению пределов обнаружения по сравнению с низким разрешением; например, если при разрешении 7 500, когда чувствительность приблизительно в 7,5 раза меньше, чем при стандартном разрешении 1 000, взаимные наложения пиков ионов в определенных случаях снижаются до пренебрежимо малого уровня, то предел обнаружения (пик, обусловленный 100 ионами) обеспечивается количеством $1,2 \cdot 10^{-14}$ г образца в источнике [155].

Дополнительно к возможности достижения улучшенных пределов обнаружения использование высокого разрешения делает любой анализ более специфичным. Так, например, менее вероятно, что регистрация отклика во время масс-фрагментографии высокого разрешения будет обусловлена вкладом соседней массы. К сожалению, стало общепринято при проведении масс-

фрагментографии высокого разрешения приводить точную массу, на которую настроен прибор. В результате создается неверное впечатление, что все регистрируемые сигналы обусловлены ионами, обладающими этой точной массой. В действительности, даже при высоком разрешении прибор все-таки может регистрировать сигнал, обусловленный ионом с близкой массой, за счет фиксации не вершины ожидаемого пика, а краев соседнего [157].

Метод масс-фрагментографии высокого разрешения успешно применялся для количественного определения никотина [129], метаболитов лекарственных препаратов [113], фенилуксусных кислот [114] и гормональных стероидов в биологических жидкостях [120], а также для определения гормональных стероидов в тканях [140, 141]. Он зарекомендовал себя также чрезвычайно полезным методом определения следовых количеств ксенобиотиков типа N-нитрозодиметиламина [162] и ТХДД [153, 112] в сложных смесях.

В относительно новом методе, разработанном для дальнейшего увеличения селективности метода масс-фрагментографии высокого разрешения, калиброванная узкая развертка масс синхронизируется с началом поступления информации от каждой регистрируемой массы, а результаты представляют собой профили пиков [111, 124, 125]. Если затем эти данные обработать с учетом результатов каждой развертки, получаются обычные масс-фрагментограммы. Если же все данные о развертке суммируются в течение всего периода элюирования образца, но не интегрируются по всему диапазону масс, можно получить масс-фрагментограмму с улучшенным отношением сигнал/шум.

Возрастающее число определений с помощью масс-фрагментографии высокого разрешения осуществляется сейчас в условиях химической ионизации. Во многих случаях это обусловлено тем, что под электронным ударом исследуемое соединение не дает интенсивных молекулярных или фрагментных ионов с достаточно высокой массой, необходимых для проведения мониторинга.

Одно из достоинств хроматомасс-спектрометрии заключается в том, что она в отличие от других методов, позволяет проводить не только качественный, но и с высокой точностью количественный анализ сложных смесей. С этой це-

лью в пробу вводят внутренние стандарты, в качестве которых обычно используются perdeйте́рированные соединения [1].

Для количественных расчетов измеряют отношения площадей профилей пиков на масс-хроматограммах анализируемого соединения и стандарта. Так как одинаковые количества разных соединений дают на масс-хроматограммах по своему характеристичному иону пики разной площади, предварительно проводят калибровку по стандартной смеси и вычисляют «факторы отклика» каждого соединения относительно стандарта.

Факторы отклика определяются по формуле (1):

$$RF = A_x \cdot W_{is} / A_{is} \cdot W_x, \quad (1)$$

где RF – фактор отклика; W – количество введенного вещества X и внутреннего стандарта IS; A – площадь пика, обусловленного током характеристического для каждого соединения иона. Как правило, выбирается ион с максимальной интенсивностью в спектре, но если возможны перекрывания, для расчетов используют второй или третий по интенсивности ион в масс-спектре.

1.4.5. Аналитические альтернативы с учетом степени риска природных и искусственных загрязнителей для человека

Анализ загрязнения окружающей среды, пищевых продуктов и БАД органическими соединениями – сложная, многоцелевая задача. Идентификация и количественная оценка всех компонентов сложных смесей органических веществ – трудоемкий процесс, требующий специалистов высокой квалификации. Поэтому в практической работе часто ограничиваются определением какого-то отдельного класса веществ или конкретных соединений, присутствующих в образцах. Можно выделить три основных подхода к анализу образцов:

1 – анализ наиболее опасных для человека классов органических соединений;

- 2 – определение в анализируемом образце конкретных токсикантов;
 - 3 – полный анализ органических веществ в объектах окружающей среды.
- Рассмотрим отдельно каждый из этих подходов.

Анализ наиболее опасных для человека классов органических соединений. К этой группе относятся методики, позволяющие идентифицировать соединения, принадлежащие к определенному классу органических веществ. Заключительной стадии анализа в таком случае предшествует длительная и весьма трудоемкая процедура отделения интересующих исследователя веществ от соединений других классов.

В указанном направлении достигнуты заметные успехи, особенно в отношении классов соединений, представляющих наибольшую опасность для человека. Среди известных полигалогенированных ароматических соединений наибольшей активностью обладает 2,3,7,8-тетрахлордибензо-*p*-диоксин, инициирующий развитие множества гено-, фено- и местоспецифических эффектов у всех исследованных видов животных и человека [2]. В последние годы в литературе появилось понятие «диоксиноподобные соединения», к которым относят определенные изомеры полихлорированных дибензо-*p*-диоксинов (ПХДД), дибензофуранов (ПХДФ) и бифенилов (ПХБ). Общность физико-химических свойств, механизмов биологического действия и патогенетически значимых звеньев сложных процессов формирования эффектов позволяют авторам рассматривать «диоксиноподобные соединения» вместе с ПХДД под общим условным названием «диоксины». «Диоксины» химически и метаболически инертны, долгое время сохраняются и кумулируются в объектах окружающей среды и мигрируют по пищевым цепям. Они поступают в организм через желудочно-кишечный тракт, легкие и кожу. Трансплацентарно и с молоком матери передаются плоду и ребенку. Они кумулируются в организме и оказывают аномально продолжительное гормоноподобное влияние на развитие и функционирование многих его систем. Эти особенности экотоксикологии «диоксинов» позволяют отнести их к особому классу гормоноподобных полифункциональных суперэкоксикантов.

Методики определения ультраследовых (10^{-12} – 10^{-15} г) количеств ПХДД и ПХДФ в природных образцах методом хроматомасс-спектрометрии описаны в работах [107,108, 116,118, 136,137,144, 150]. Авторы методик предлагают выделения ПХДД и ПХДФ из различных природных объектов (рыба, яйца, донные отложения, речная вода и др.). Используется метод химической ионизации отрицательных ионов с помощью водорода. Анализ ведется в режиме селективного ионного мониторинга.

Анализ ПХБ впервые был осуществлен методом газовой хроматографии с электронно-захватным детектором [160]. Однако этот метод не позволяет достаточно надежно идентифицировать определяемые соединения в сложных природных смесях, поэтому для идентификации ПХБ в природных образцах были предложены методики с использованием хроматомасс-спектрометрии [163, 136].

Результаты исследований хлорорганических пестицидов, а также продуктов их био- и фотодеградации опубликованы в работах [141, 147,150]. Раньше для анализа этих соединений в смесях использовали метод газовой хроматографии. Однако с тех пор как в окружающей среде стали встречаться полихлорированные бифенилы, аналогичные по структуре хлорсодержащим пестицидам, газохроматографический анализ стал затруднительным. Метод хроматомасс-спектрометрии полностью преодолел эти трудности

Одними из наиболее опасных органических загрязнителей являются полициклические ароматические углеводороды (ПАУ). Основными источниками этих соединений в окружающей среде являются продукты сжигания нефти и угля, автомобильные выхлопы, табачный дым. Как уже упоминалось выше, токсичность ПАУ сильно зависит от их структуры. Для увеличения селективности определения этих соединений было предложено использовать химическую ионизацию отрицательных ионов [117,149]. Этим методом удастся избирательно регистрировать важнейшие микрокомпоненты смесей в присутствии макрокомпонентов. Например, высокотоксичный бенз(а)пирен и практически безопасный бенз/е/пирен имеют близкие факторы отклика при работе в режиме электронного удара. Переход к химической ионизации отрицательных ионов

приводит к увеличению интенсивности пика бенз(а)пирена в 1 000 раз при неизменной величине пика бенз/е/пирена .

В последнее время резко возросла обеспокоенность выбросами галогенсодержащих органических соединений в атмосферу, так как многие из них токсичны и зачастую имеют большую устойчивость по отношению к химическому и биологическому разложению. Для селективного определения хлорсодержащих соединений в сложных пробах была создана специальная компьютерная программа, с помощью которой хроматограммы по полному ионному току трансформируются в хроматограммы по полному току хлорсодержащих соединений. Такое селективное детектирование основано на характерном распределении интенсивностей в масс-спектрах хлорсодержащих соединений, соответствующем изотопному составу атомов хлора [107] .

Определение конкретных токсикантов в анализируемом образце. Как уже отмечалось выше, настройка масс-спектрометра на массы ионов, характерных для распада конкретных соединений, интересующих исследователей, т.е. работа в режиме масс-фрагментографии, приводит к увеличению чувствительности хроматомасс-спектрометрического анализа примерно в 100 раз. Часто при анализе объектов окружающей среды ставится задача определения одного или нескольких соединений, присутствующих в микроколичествах, а информация об основных компонентах смеси не представляет ценности. В этом случае масс-фрагментография, а иногда и масс-фрагментография высокого разрешения являются незаменимыми методами. В случае, когда концентрация интересующих компонентов достаточно высока, появляется возможность использования более гибкого метода масс-хроматографии, не требующего априорного выставления масс, характерных для анализируемых соединений. В таком методе, помимо информации о времени удерживания и массах характеристичных ионов, имеется возможность подтвердить правильность идентификации рассмотрением полного масс-спектра [112].

В 1979 г. Агентство по охране окружающей среды США в результате обработки данных о загрязнении биосферы опубликовало список 114 органических

соединений, являющихся приоритетными загрязняющими веществами [158]. В список вошли соединения, наиболее часто встречающиеся в питьевой воде, морской воде, сточных водах, почвах и атмосфере, обладающие канцерогенной или мутагенной активностью, а также способностью к биоаккумуляции и токсичностью по отношению к живым организмам. В пробах воды эти вещества предлагалось анализировать методом хроматомасс-спектрометрии по методикам, запатентованным под номерами 624 и 625 [158].

Все указанные вещества были разделены на 4 группы. К первой группе отнесли 32 “летучих соединения”, анализируемые так называемым методом “выдувания-улавливания”. Этот метод заключается в выдувании током гелия летучих компонентов анализируемой смеси и их адсорбции на силикагеле с последующей десорбцией в колонку хроматографа.

Вторая группа – соединения, экстрагируемые в нейтральной и щелочной средах. Эта группа наиболее многочисленна и состоит из 47 соединений.

Третья группа – фенолы и другие соединения, экстрагируемые из кислой среды. В нее входит 11 соединений [159].

Четвертая группа включает в себя главным образом пестициды. Вся необходимая для анализа информация по масс-спектрометрическому поведению этих соединений представлена в работе. Несколько позднее Агентство опубликовало дополнительный список из 79 веществ, считающихся вредными, но для них не было предложено конкретных методов анализа. Как показали дальнейшие исследования, многие вещества из этого списка могут быть с успехом проанализированы методом хроматомасс-спектрометрии.

Полный анализ органических веществ в объектах окружающей среды.

При анализе загрязняющих веществ в биоте (тканях птиц, рыб и млекопитающих, в крови и жировой ткани человека и в женском молоке) общая схема анализа может быть подобной изложенным выше, а основная трудность заключается в отделении анализируемых веществ от липидов.

В работе [139] для очистки жировой ткани при анализе на содержание ПХБ и хлорорганических пестицидов использовали низкотемпературное осаж-

дение с последующей хроматографией. Наличие ПХБ подтверждалось использованием ТСХ с последующим сочетанием ГХ высокого разрешения и МС. Использовалась методика масс-фрагментографии с детектированием наиболее интенсивных пиков в масс-спектрах тетрахлорбифенилов.

Сеймуром и соавт. [152] была предпринята попытка создания эффективных методов предварительной подготовки образца при анализе молока на содержание ПХБ и хлорорганических пестицидов. Был предложен метод, включающий адсорбцию на полярном субстрате, последующую экстракцию в аппарате Сокслета и ВЭЖХ-очистку экстракта. Был достигнут предел обнаружения гексахлорбензола 10 пг/мл и предел определения 0,1 нг/мл.

Изучалась возможность концентрирования промышленных липофильных галогенированных ПАУ и отделения их от липидной матрицы для последующего анализа с помощью ГХ-МС [155]. Из ряда использованных методов (адсорбция липидов на окиси алюминия и последующее фракционирование на флорисиле, адсорбция липидов на силикагеле, жидкостно-жидкостное распределение между диметилформамидом и н-гексаном, перегонка с паром, распределение между обращенными фазами, адсорбция липидов на флорисиле) наиболее эффективным оказалось жидкостно-жидкостное распределение между диметилформамидом и н-гексаном с последующим распределением между обращенными фазами.

Одними из наиболее интересных, но и наиболее сложных природных объектов являются ткани животных, содержащие от 40% жира и более (часто именно они являются сырьем для получения БАД). Благодаря большому содержанию липидов, эти ткани являются “накопителями” липофильных органических соединений, к которым относятся практически все наиболее токсичные персистентные хлорорганические соединения, такие как ТХДД и ТХДФ, ПХБ, ДДТ и его метаболиты, и ПАУ. Так, в подкожном жире Байкальской нерпы, который содержит более 95% липидов, исследователями обнаружены ПХБ [123], ПХДД и ПХДФ [156], ДДТ, ДДЕ, ДДД и токсафен [134,135]. При подготовке образцов к анализу авторы используют различные способы отделения экстрактов от липидов: гидролиз жиров под действием концентрированной

серной кислоты, нанесенной на силикагель, нагревание в растворах щелочи с последующей колоночной хроматографией. Недостатком этих методов могут быть большие потери определяемых соединений и невозможность определения других органических соединений, кроме персистентных. В этих случаях невозможно говорить о проведении полного анализа образца.

Наряду с традиционными методами, использующими ионизацию электронным ударом, в современном масс-спектрометрическом анализе применяются методы положительной и отрицательной химической ионизации, бомбардировки пучками ионов и нейтральных частиц, лазерной десорбции, десорбционной химической ионизации, tandemной масс-спектрометрии. Особенно эффективно сочетание масс-спектрометрии с газовой и жидкостной хроматографией. Это позволило существенно расширить круг анализируемых объектов, включив в их число нелетучие и термически нестабильные соединения, полярные и высокомолекулярные вещества.

Сложность управления экспериментом и обработка огромного объема информации успешно решаются компьютеризацией, что позволяет в большинстве случаев получать результаты в реальном масштабе времени. Возможность применения библиотечного поиска, различных математических методов обработки данных позволяет осуществить эффективный анализ сложных многокомпонентных смесей – от следов, на уровне десятков и сотен фемтограмм, до микропримесей и основных компонентов.

Разработанные методы качественного и количественного анализа, реализуемые на специализированных приборах, позволяют быстро и эффективно определять состав загрязняющих веществ в природных объектах и БАД. Однако, как уже отмечалось выше, полный эколого-токсикологический анализ биологических объектов невозможен без биоиндикации и биотестирования.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Объекты исследования

Образцами для исследования при проведении экспериментов являлись следующие БАД: Алисат, Алликор, Каринат, Лакринат (производитель – компания «ИНАТ-ФАРМА», РФ), Виратон и Виардо («ДИОД», РФ), Кардипан («Экко-Плюс», РФ), Вита-Чеснок («Вита-Лайн», РФ), таблетки «Чесночные» («Леовит-Нутрио», РФ), Garlic Caps Calivita Int., («Витамакс», США), масло зародышей пшеницы (МЗП) Особое («Бионал», Венгрия), МЗП Молодильное («Мелькомбинат №4», РФ), масло ростков пшеницы холодного отжима («Styx», Австрия), Окулист («Диод»), Глазки («Грин Фарм», РФ), Зоркий глаз («Фарматоп», РФ), Витамины для глаз («Фора-Фарм», РФ), Камелия «Черника+Селен» («Камелия НПП», РФ), Лютеин-комплекс («Экомир», РФ), Визион («Труффини и Редже Фармачеутичи С.р.л.», Италия), Чернега («Курортмедсервис», РФ), Черника («Экко Плюс»), Сплат № 1 Зрение («ФГУП ЦНКБ», РФ), Черника форте («Эвалар», РФ), Оковит для детей («Фитора», РФ), Ключи жизни (НПФ «Висэл-СВ», РФ).

Объектами для исследования также являлись липиды из рыб и морских млекопитающих (обитающих в условиях морей с разной степенью промышленной загрязненности), характеристика которых представлена ниже, в табл. 2.1.

Таблица 2.1. Объекты исследования из жиров рыб и морских млекопитающих

Название образца	Район добычи	Товарные особенности
Жир из печени макруруса	Северо-Западная Атлантика	Вытопленный жир
Жир из покровного сала тюленя	Баренцево море	Вытопленный жир
Жир из печени трески (БАД)	Северо-Западная Атлантика	Капсулы в желатиновой оболочке

На все объекты исследования имелась сопроводительная документация (свидетельства о государственной регистрации, удостоверения качества и безопасности), подтверждающие их пригодность для пищевого использования.

В ряде опытов использовано растительное сырье для производства БАД: высушенные чеснок и солодка (коммерческая продукция, приобретенная у оптовых поставщиков сырья и ингредиентов).

2.2. Экстрагирование минорных компонентов пищи из БАД и сырья для их получения

Выделение из БАД экстракта, содержащего компоненты действующего начала (индикаторных соединений или минорных компонентов пищи), в ряде опытов (главным образом с чесночными препаратами и сырьем для их получения) проводили двуокисью углерода в сверхкритическом состоянии (СКЭ) в лаборатории сверхкритических технологий ГосНИИОХТ (Москва).

Данный метод, эффективно используемый в последнее десятилетие, обладает рядом преимуществ перед традиционными, в числе которых возможность извлечения химически нестойких компонентов и проведение экстракции при низких температурах, что чрезвычайно важно в случае использования растительной матрицы, в состав которой входят термолабильные и реакционноспособные вещества. Технология СКЭ экстракции позволяет получать концентрат биологически активных компонентов растения практически в его полном природном состоянии с сохранением тончайших биохимических нюансов, присущих растению. СКЭ позволяет извлечь из исходного растительного сырья биологически активные соединения в составе, наиболее полно отвечающем нативному составу растений, в который могут входить эфирные масла, фенольные соединения, вторичные монотерпеновые спирты, сесквитерпены, дитерпеновые спирты (фитол), а также их производные [83]. При СКЭ и при дальнейшем хранении экстрактов не образуется никаких органических примесей, что наблюда-

ется при других видах экстракции. Условия экстрагирования: растворитель CO_2 в сверхкритическом состоянии, давление – 250 атм., температура 40°C, время экстракции – 30 мин, поток растворителя – есть, возможность фракционирования экстрактов – есть. В проведенных экспериментах использовались также другие виды экстракции: дистиллированной водой (антоцианины), этиловым спиртом (МКП из солодки), диэтиловым эфиром (МКП из масла зародышей пшеницы).

Анализ и разделение полученного экстракта на индивидуальные компоненты осуществлялись методом аналитической и препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [107].

2.3. Идентификация и количественное определение МКП хроматографическими методами

Подготовленные пробы экстрактов анализировали методами ВЭЖХ. Проба с помощью инжектора вводилась в верхнюю часть хроматографической колонки. С помощью насоса анализируемая смесь прокачивалась элюентом через хроматографическую колонку, в которой происходило разделение анализируемой смеси на отдельные вещества (компоненты). Вытекающий из колонки элюат, содержащий отдельные компоненты анализируемой смеси, детектировался УФ-детектором (при длине волны 252 нм), показания которого регистрировались регистратором [122,126,141].

Полученные пробы анализировали в одинаковых условиях. Количественное определение аллицина, аллиина и аджоена осуществляли на жидкостном микроколоночном хроматографе «Милихром» с привлечением метода градуировочной зависимости совместно с внутренним стандартом. Время удерживания веществ: аллицин и аллиин – 5,1, аджоен – 15,0 мин. На основании полученной хроматографической информации с помощью программы «Полихром» рассчитывали градуировочные коэффициенты – коэффициенты пропорциональности между соотношением площадей пиков и концентраций аллицина,

аллиина, аджоена и внутреннего стандарта. Применение метода градуировочной зависимости совместно с внутренним стандартом для ВЭЖХ-анализа сложных по составу образцов экстрактивных веществ позволяет повысить точность количественного определения индивидуальных соединений. В целом использованная методика обращенно-фазового ВЭЖХ-анализа БАВ чеснока характеризуется достаточной точностью, высокой чувствительностью (предел обнаружения аллицина и аллиина не превышает $0,05 \text{ мг/см}^3$) и селективностью определения.

Антоцианины относятся к классу флавоноидов и представляют собой гликозиды катиона флаволия. Количественное и качественное определение антоцианиновых пигментов проводили с помощью ВЭЖХ. Образцы БАД с антоцианин-содержащими компонентами экстрагировали дистиллированной водой таким образом, чтобы суммарная концентрация антоцианинов составляла $0,05\text{--}0,2 \text{ мг в см}^3$. Пробы фильтровали через мембранный фильтр Zetapor с диаметром пор $0,2 \text{ мкм}$. Разделение проводили на хроматографической колонке PLRP-S полистирол-дивинилбензол (PolymerLabs, Великобритания), 100 А , 5 мкм , $250 \times 4,6 \text{ ГО мм}$, элюент: $4 \text{ об.}\%$ ортофосфорная кислота, ацетонитрил, $90 : 10 \text{ об.}\%$, скорость подачи элюента $1,0 \text{ см}^3/\text{мин}$; детектирование фотометрическое при длине волны 520 нм .

Идентификацию пиков проводили путем сравнения с хроматограммами ягод с известным составом антоцианиновых пигментов и сравнения с литературными данными [154]. Относительное содержание индивидуальных пигментов определяли как отношение площади хроматографического пика и суммы площадей пиков всех идентифицированных антоцианинов. Факторы удерживания антоцианинов приведены в табл. 2.2.

На рис. 2.1. приведена хроматограмма антоцианинов сока черники, для которой характерен самый богатый профиль пигментов. Номера пиков на этом рисунке соответствуют номерам антоцианинов в табл. 2.1. Относительное содержание антоцианинов, полученное из систематизированных литературных и экспериментальных данных по составу антоцианиновых пигментов из разных

ягод, служили критерием для идентификации происхождения антоцианинов в образцах БАД.

Таблица 2.2. Факторы удерживания (k) антоцианиновых пигментов

№	Антоцианины		k
1	Cyd-3-sop-5-glu	Цианидин-3-софорозид-5-глюкозид	1,9
2	Dpd-3-gal	Дельфинидин-3-галактозид	3,0
3	Dpd-3-glu	Дельфинидин-3-глюкозид	3,6
4	Cyd-3-sop	Цианидин-3-софорозид	3,9
5	Cyd-3-glu-rut	Цианидин-3-глюкорутинозид	4,0
6	Dpd-3-rat	Дельфинидин-3-рутинозид	4,2
7	Cyd-3-gal	Цианидин-3-галактозид	5,2
8	Dpd-3-ara	Дельфинидин-3-арабинозид	5,5
9	Cyd-3-glu	Цианидин-3-глюкозид	5,9
10	Cyd-3-xyl-mt	Цианидин-3-ксилозрутинозид	6,1
11	Cyd-3-rut	Цианидин-3-рутинозид	7,0
12	Ptd-3-gal	Петунидин-3-галактозид	7,5
13	Cyd-3-ara	Цианидин-3-арабинозид	7,9
14	Ptd-3-glu	Петунидин-3-глюкозид	8,4
15	Pgd-3-glu	Пеларгонидин-3-глюкозид	9,6
16	Pnd-3-gal	Пеонидин-3-галактозид	10,0
17	Pgd-3-ara	Пеларгонидин-3-арабинозид	11,9
18	Pnd-3-glu	Пеонидин-3-глюкозид	12,3
19	Mvd-3-glu	Мальвидин-3-глюкозид	16,1
20	Pnd-3-ara	Пеонидин-3-арабинозид	16,2

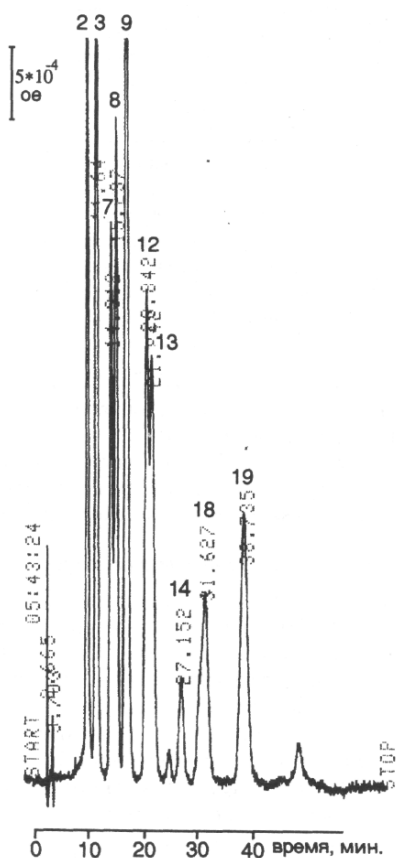


Рисунок 2.1. Хроматограмма антоцианинов черничного сока

Для идентификации и количественного определения глицирризина и ликвирицина в солодке использовали ТСХ и ВЭЖХ. Индикаторные соединения экстрагировали этиловым спиртом и идентифицировали на пластинах «Silufol», используя растворы стандартов. Для ВЭЖХ применяли жидкостной хроматограф с насосом высокого давления, обеспечивающий работу в режиме градиентного элюирования, оборудованный спектрофотометрическим детектором с переменной длиной волны и системой для сбора и обработки хроматографических данных Мультитхром. Условия хроматографического разделения: колонка

Zorbaх ODS, 5 мкм, 250×4,6 мм, предколонка – ODS, 5 мкм, 20×4,6 мм, объем петли инжектора 20 мкл. Подвижная фаза: градиент метанол – 1,5%, уксусная кислота от (20:80) до (40:60) за 60 мин, скорость потока 1 см³/мин, температура колонки 45 градусов. УФ-детектор, длины волн: 275 нм для обнаружения ликвирина и 375 нм для обнаружения глицирризина. Время выхода 10 и 25 мин соответственно.

2.4. Получение фракций неомыляемых веществ из БАД на основе масел зародышей пшеницы и определение в них фитостеринов с помощью ВЭЖХ

Экстрагирование неомыляемых веществ из образцов проводили диэтиловым эфиром с последующей отгонкой растворителя. 20 мг полученной неомыляемой фракции снова растворяли в небольшом количестве диэтилового эфира (около 50 мкл) и дозировали в газовый хроматограф с масс-хроматографическим детектированием для идентификации основных компонентов фракций. Остаток неомыляемой фракции образцов количественно переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл с помощью смеси метанол/хлороформ 1:1 и доводили до метки этой же смесью. Хроматографический анализ проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Beckman System Gold с УФ-детектором на колоке Luna 4,6×150 мм (размер частиц сорбента 5 мкм) с предколонкой длиной 20 мм, наполненной аналогичным сорбентом в условиях изократического элюирования. В качестве элюента использовали ацетонитрил. Длина волны детектирования составляла 206 нм. Дозируемый объем образцов – 20 мкл, расход элюента – 1,0 мл/мин. Обработку данных проводили с помощью компьютерной программы GOLDDV402.

Использование ВЭЖХ для анализа фитостеринов широко известно, но должно проводиться с учетом следующих моментов [130,136]:

- относительно высокая гидрофобность фитостеринов требует выбора элюентов с высоким содержанием органических растворителей;

– из хромофоров в молекулах фитостеринов могут присутствовать только двойные связи $C=C$ (обычно несопряженные), что при использовании УФ-детекторов обуславливает выбор длин волн детектирования в диапазоне не более 200–210 нм, либо применение рефрактометрических или масс-спектрометрических систем.

Главная проблема использования метода ВЭЖХ связана с ограниченными возможностями идентификации неизвестных органических веществ. Индексы удерживания R_I известны лишь для относительно небольшого числа соединений, а их межлабораторная воспроизводимость существенно уступает воспроизводимости этих параметров в газовой хроматографии. По этой причине в качестве основного способа идентификации фитостеринов в настоящее время рассматривают совпадение параметров удерживания аналитов с параметрами удерживания заведомых (реперных) соединений. Ограниченные возможности такого подхода обусловлены недостаточным числом доступных стандартных образцов [109,122].

Учитывая изложенные причины, для идентификации фитостеринов нами предложен новый метод, основанный на оценке параметров гидрофобности характеризуемых соединений значениями $\log P$ (логарифмы распределения в стандартной системе 1-октанол/вода) по экспериментально измеряемым временам удерживания с последующим их сравнением с теоретическими оценками, полученными с использованием программного обеспечения ACD.

Часть соединений рассматриваемого класса была зарегистрирована в составе неомыляемых фракций масел в ходе их хромато-масс-спектрометрического анализа. Однако эти данные можно было использовать только на качественном уровне, так как количественная обработка параметров хроматографических пиков фитостеринов, имеющих максимальные времена удерживания, связаны с большими погрешностями. Вследствие этого, результаты количественного анализа неомыляемых фракций на содержание фитостеринов нельзя было считать надежными.

С учетом выявленных особенностей количественного определения фитостеринов, для обработки данных предложен алгоритм, основанный на совместной интерпретации данных анализа неомыляемых фракций методом ВЭЖХ и ГХ-МС. Количественное определение фитостеринов проводили только по данным ВЭЖХ, после чего проводили оценку содержания всех остальных компонентов с помощью ГХ-МС. Такой подход позволяет получить наиболее надежные данные по содержанию отдельных компонентов различной химической природы в составе анализируемых образцов.

Подход к оценке параметров (индексов) удерживания органических соединений в обращенно-фазовой ВЭЖХ по значениям их факторов гидрофобности ($\log P$) известен [44], хотя и не может считаться универсальным для любых по химической природе объектов анализа. Наиболее принципиальным моментом представляется не только сам факт возможности корреляции хроматографических параметров с величинами $\log P$, сколько выявление тех групп органических соединений, в пределах которых зависимости $\log P = f(tR)$ могут обеспечить приемлемую точность результатов. Одну из таких групп образуют фитостероиды, характеризующиеся незначительными вариациями углеродного скелета молекул и числом двойных связей $C=C$.

Программное обеспечение ACD, используемое для расчета $\log P$, представляет собой модифицированную аддитивную схему, учитывающую поправки на взаимное влияние различных фрагментов структуры молекул.

Идентификацию эргостерина, кампестерина и ситостерина («реперных» соединений, используемых в качестве препаратов сравнения) проводили по расчетным временам удерживания с использованием стандартных образцов этих соединений. Идентификацию остальных стерина (фукостерина и других минорных компонентов) проводили по рассчитанным значениям коэффициентов распределения рассматриваемых соединений в системе 1-октанол/вода ($\log P$, оценки с помощью программного обеспечения ACD) с использованием зависимости $t_{\text{вр. удерж.}} = f(\log P)$.

Для определения карбонильных соединений в БАД на основе МЗП отбирали навеску 5 г исследуемого образца, добавляли 2 мл холодного (минус 4°C) 1%-го раствора NaCl в 0,1н водном растворе HCl и смешивали. К образовавшейся эмульсии добавляли 10 мл диэтилового эфира и энергично встряхивали в течение 10 мин. Оставляли для разделения фаз на 5 мин., затем отделяли фазу с диэтиловым эфиром и осторожно упаривали под током азота до объема 1 мл. Полученный экстракт использовали для исследования на газовом хроматографе HP 6980 с масс-селективным детектором HP 5972A. Исследование проводили с использованием капиллярной колонки HP-5MS 30 м × 0,25мм × 0,25 мкм при следующих условиях хроматографического анализа: инжектор-режим splitless, температура – 300°C, объем вводимой пробы – 5 мкл. Термостат колонки –35°C в течение 4 мин, нагрев 8°C/мин. до 100°C, далее 15°C/мин. до 300°C, 300°C в течение 5 мин. Масс-селективный детектор: температура интерфейса – 250°C, задержка регистрации – 0,9 мин, диапазон сканирования 35–300 а.е.м.

2.5. Определение органических загрязнителей в липидах рыб и морских млекопитающих методом ГХ-МС

Подготовка образцов к анализу

2,5 г масла растворяли в 3–5мл хлористого метилена и наносили на колонку, заполненную силикагелем и силикагелем, смешанным с концентрированной серной кислотой. Элюировали 30–40 мл гексана, затем 20–30 мл хлористого метилена. Элюаты объединяли и концентрировали до объема 0,5–1 мл.

Условия проведения анализа

Анализ проводили на хроматомасс-спектрометре Pegasus 4D фирмы LECO. Энергия ионизации – 70 эВ, капиллярная силиконовая колонка DB-5MS (30м), температурный режим: 40°C (2 мин.) – 10°C/мин – 290°C (10 мин.), сканируемые массы 28–450 дальтон. В качестве внутренних стандартов использовали perdeйтерированные нафталин и фенантрен [121,137,139].

2.6. Тестирование на мутагенность по Эймс

Приготовление S9 фракции

Индукцию синтеза микросомных ферментов печени самцов белых беспородных крыс производили внутрибрюшинной инъекцией 0,5 мл раствора Aroclor 1254 в оливковом масле из расчета 100 мг на 1 кг веса животного. Через 12 часов крыс, получавших все это время только воду, декапитированием.

Печень извлекали, взвешивали, промывали стерильным раствором 0,1 М KCl, измельчали гомогенизатором «Politron». При гомогенизации печень заливали 5 объемами 0,1М KCl, содержащего 1 мкМ ионола (для предотвращения перекисного окисления липидов) и 1 мг БСА (фракция IV для связывания свободных жирных кислот). Все операции проводили на холоде.

Гомогенат центрифугировали при 9 000 g в течение 10 мин. и разливали надосадочную жидкость (S9 фракция) аликвотами по 1–2 мл в пластмассовые пробирки, после чего сразу использовали в опыте или быстро замораживали на сухом льду и хранили до использования при -70°C на протяжении 3–4 мес.

В 1 мл приготовленной таким образом фракции с концентрацией белка около 40 мг/мл содержатся микросомы из 250 мг печени.

Приготовление микросомной активирующей смеси (непосредственно перед опытом).

Фракцию S9 размораживали при комнатной температуре, ставили на лед и использовали в течение дня. Образцы фракции следует проверять на бактериальное загрязнение и, в случае необходимости, перед использованием профильтровать через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

В 1 мл активирующей смеси содержит S9 фракцию (0,04–0,1 мл) и предварительно простерилизованные MgCl_2 (8 мкМ), KCl (33 мМ), глюкозо-6-фосфат (5 мкМ), NADPH.H (4 мкМ) и Na-фосфатный буфер (pH= 7,4).

Приготовление минимальной питательной среды M 56

Состав: $\text{NaHPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ – 8,2 г, KH_2PO_4 – 2,7 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,0 г, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25 мг, 1,5% агара и дистиллированная вода – 1 л, pH 7,2. Автоклавирова-

ние – 15 мин. при 121°C. Непосредственно перед разливом в чашки Петри после охлаждения среды до температуры около 50°C добавляли на 1 л стерилизованные: $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1 г, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – 5 мг, глюкозу – 10 мг. Смесь разливали приблизительно по 30 мл в чашки Петри и после застывания переворачивали чашки вверх дном.

Приготовление агара верхнего слоя

Готовили из исходного раствора агара с добавлением В-гистидина (HCl) и биотина до конечной концентрации 0,05 мМ и 0,5 мМ соответственно, разливали по 2 мл в пробирки, стерилизовали автоклавированием 15 мин. при 121°C и хранили до использования. В процессе опыта в пробирки с жидким агаром ($t = 45^\circ\text{C}$) вносят бактериальную культуру, тестируемый образец и микросомную активирующую смесь. Благодаря присутствию небольшого количества гистидина бактериальные клетки, в которых возникли мутации к прототрофности под действием присутствующих в пробе мутагенов, способны несколько раз поделиться и образовать через два дня колонии.

Приготовление бактериальной культуры

Клетки тестерных штаммов сальмонеллы культивировали в бульоне OXOID (2,5%) в течение суток, отделяли от среды центрифугированием и разводили в физиологическом растворе до концентрации 5 000 000 клеток/мл.

Постановка теста Эймса

При постановке опыта в пробирки с жидким агаром верхнего слоя ($t=45^\circ\text{C}$) добавляли 0,1 мл проинкубированной в течение ночи в бульоне Oxoид культуры штамма (TA98 или TA100) соответственно. К этим компонентам добавляли 200 мкл испытуемого вещества и при необходимости 0,5 мл S9 фракции.

Получившуюся смесь сразу же перемешивали вращением пробирки между ладонями. Содержимое выливали на поверхность находящегося в чашке минимального агара с глюкозой.

Покачивая осторожно чашку, равномерно распределяли верхний слой агара. После застывания агара чашку переворачивали вверх дном и инкубировали

в темноте при 37°C. Через 2 дня подсчитывали колонии гистиридиновых ревертантов сальмонеллы в разных вариантах опыта.

В эксперименте помимо опытных вариантов ставили и контрольные, содержащие или только культуру бактерий с растворителем (ДМСО) в присутствии (+МА) или без S9 фракции (–МА), или бактерии с известными мутагенами и промутагенами соответственно с или без S9 фракции.

Подсчет и обработка результатов по тесту Эймса

В таблицах представлены результаты тестирования растворителя, экстрактов тканей и положительный контроль на мутагенность – стандартный промутаген 2-аминоантрацен. Увеличенное по сравнению с контролем число колоний his⁺-ревертантов сальмонеллы свидетельствует о наличии мутагенного эффекта.

Для облегчения оценки результатов опыта в таблицах приводятся величины, представляющие отношение числа his⁺ – ревертантов колоний сальмонеллы, выросших в присутствии исследуемой пробы, к таковым в контрольных испытаниях (опыт/ДМСО). Если значение отношения приближается к 2 (1,7–2,0), то мутагенный эффект считается слабо положительным. В случае превышения отношения опыта к контролю в 10 раз имеется мутагенный эффект средней выраженности и при увеличении в 100 и более раз – сильный мутагенный эффект [45, 46].

2.7. Биотестирование на планариях

Исследования проводили на гидробионте – планарии *Dugesia tigrina*. Метод регистрации действия веществ на планарии основан на измерении темпа регенерации головного конца тела животных после декапитации. Регистрировали прирост бластемы (отрастающей части тела) методом прижизненной компьютерной морфометрии. Сравнивали прирост бластемы у контрольных и подопытных животных [84], при этом опытные планарии содержались в воде с растворенными в ней изучаемыми соединениями, а контрольные – в чистой воде.



Рисунок 2.2. Интактная планария
Dugesia tigrina

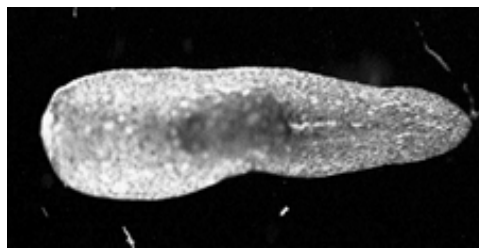


Рисунок 2.3. Регенерирующая планария
Dugesia tigrina

Для получения стандартных изображений регенерирующих планарий использовали экспериментальную установку (рис. 2.4), включающую видеокамеру VAT 127-LH, смонтированную на окуляре бинокулярного микроскопа МБС-2, и компьютер IBM PC 486 AT с состыкованные с помощью видеогrabбера DigitEye DE-15 («Candela», Москва).



Рисунок 2.4. Общий вид экспериментальной установки для тестирования

Аналоговый сигнал с видеокамеры поступает на видеогrabбер, смонтированный на материнской плате персонального компьютера.

С помощью специального пакета программ Plana 4.1 определялась общая площадь тела животного и площадь бластемы. Для оценки регенерации были выбраны следующие показатели: общая площадь животного, площадь отрастающей бластемы. В качестве количественного показателя регенерации использован так называемый «критерий роста», представляющий собой отношение площади бластемы к общей площади планарии [85,86]. Он вычисляется по формуле: $R=s/S$, где s – площадь бластемы, S – площадь всего тела регенеранта в данный момент времени. Каждое из измеряемых значений R как в опыте, так и в контроле является результатом усреднения измерений на 20–32 животных. Изменение индекса регенерации в эксперименте по сравнению с контролем определялась по формуле (2)

$$\Delta R = \frac{(R_{\text{э}} - R_{\text{к}}) \pm (\delta_{\text{э}} + \delta_{\text{к}})}{R_{\text{к}}} 100\% , \quad (2)$$

где ΔR – разница (%) между величинами индекса регенерации в экспериментальных $R_{\text{э}}$ и контрольных $R_{\text{к}}$ образцах, $\delta_{\text{э,к}}$ – стандартные ошибки измерений в опыте и контроле. Ошибка в определении R в каждой выборке не превышала 5%. Определяли среднее значение критериев регенерации для всей экспериментальной группы животных на 3-й день регенерации и сравнивали с подобным критерием у контрольной группы животных по критерию t Стьюдента.

Для графического представления данных и оценки достоверности полученных результатов применялись программа Microsoft Graph 2000 и пакет статистического анализа данных программы Microsoft Excel 2000 [87].

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Минорные компоненты пищи в составе БАД как индикаторы их качества

Товарное предложение БАД в весьма специфических отечественных условиях характеризуется известными «болезнями роста», а именно – недостаточно высоким качеством продукции, необоснованностью рекламных аргументов, отступлением от правил этикетирования и т.п. Все это приводит к разочарованию многих потребителей, к дискредитации несомненно актуальной идеи – повышению уровня жизни населения и сохранения здоровья за счет регулярного приема БАД.

Основным отличием БАД от лекарственных средств (ЛС) является то, что ЛС всегда стандартизированы по содержанию действующего начала в препарате, что зафиксировано в фармакопейной статье с указанием методов его качественного и количественного определения. У многих БАД содержание действующего начала не нормируется и, естественно, не определяется. К тому же, в настоящее время сложилась ситуация, когда на рынке существуют ЛС и БАД, изготовленные из одного и того же лекарственного и пищевого растительного сырья. Это, например, препараты на основе гинко билоба, зверобоя, йохимбина, эхинацеи, женьшеня и некоторых других растений.

Обычно в своей основе БАД, особенно БАД-парафармацевтики, имеют природные пищевые вещества растительного (очень редко – животного) происхождения, обладающие специфической фармакологической активностью. Они исторически получали самое разнообразное наименование – вторичные метаболиты, фитохемотректоры, минорные соединения, микрокомпоненты пищевых продуктов.

Выделяют более 20 классов таких веществ (например, биофлавоноиды, полифенолы, некоторые амины, фитоэстрогены и т.п.), которые в дальнейшем, в отличие от более широкого класса биологически активных веществ (БАВ), мы

будем называть минорными компонентами пищи (МКП). Несмотря на то, что их химическая природа и характер действия на организм недостаточно известны, появляется все больше доказательств необходимости потребления этих компонентов диеты для нормального функционирования всех систем человека, т.е. они признаются незаменимыми факторами питания.

Так, например, флавоноиды растительного происхождения не образуются в организме человека, а поступают в него с пищей или лекарствами. Биологическую роль флавоноидов связывают с их способностью образовывать хелатные комплексы с ионами металлов; взаимодействовать со свободными радикалами; участвовать в транспорте электронов, связываться с различными ферментами. Для флавоноидов установлено около 40 различных эффектов, из которых наиболее изучены капилляроукрепляющие, антиоксидантные, противовоспалительные, гепатопротекторные, антиаллергические, противовирусные, противоопухолевые.

В нашей работе преследовалась цель – определить содержание МКП действующего начала в нескольких группах БАД сходного назначения и сырьевого происхождения для изучения возможности использования МКП не только для идентификации БАД и их происхождения, но и как индикаторов качества и эффективности биодобавок. Для этого исследовались популярные марки БАД, изготовленные из чеснока, плодов черники, масла зародышей пшеницы.

Основанием для выбора именно этих объектов явились результаты поиска по фитохимической и этноботанической базе данных [115] и идентификации растений, содержащих эффективные биологически активные вещества в достаточном количестве.

У целого ряда широко распространенных и достаточно эффективных БАД минорные компоненты действующего начала до сих пор окончательно не идентифицированы, хотя круг таких соединений примерно очерчен. Это в значительной мере относится и к БАД на основе чеснока [5].

В этой связи отметим, что в настоящее время хорошо изучено антиатеросклеротическое действие чеснока. Полученные в этом направлении результаты можно разделить на две группы:

- 1) данные о непрямом антиатеросклеротическом действии (влияние на факторы риска атеросклероза);
- 2) данные о прямом воздействии чеснока на атеросклеротические поражения сосудов.

Доказано и антиоксидантное действие чеснока. Серосодержащие компоненты чесночного экстракта (и, в первую очередь, аллицин) снижают степень пероксидации липидов и дают выраженный гепатопротекторный эффект как результат первичной редукции свободного глутатиона путем снижения активности глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы.

Подавляя окисление липопротеидов низкой плотности, чеснок тем самым минимизирует повреждение клеток. Аджоен способен индуцировать апоптоз в лейкемических клетках человека – гибель клеток наступает в результате фрагментации ДНК.

Между тем, вариабельность биологических эффектов, обусловленная многокомпонентным составом БАД, существенно степени затрудняет получение воспроизводимых результатов в опытах *in vivo* и *in vitro*. В этой связи предполагалось, что лишь предварительное исследование биологической активности индивидуальных компонентов экстрактов чеснока может дать достоверную информацию для последующего изучения возможности экспертизы БАД на основе чеснока.

Выбор нами аллицина, аллиина (предшественника аллицина) и аджоена в качестве индикаторов качества БАД был осуществлен на основании проведенных рядом авторов медико-биологических исследований влияния компонентов чеснока на адаптационные способности экспериментальных животных [5].

В частности, во фракции экстракта чеснока, характеризующиеся наивысшей антиатеросклеротической и антиатерогенной активностью, были иденти-

фицированы серосодержащие аминокислоты и сульфоксиды, а именно аллиин, аллицин, аджоен и S-аллилцистеин [128].

Образцами для исследования при проведении экспериментов являлись БАД на основе чеснока как с подтвержденной в клинических исследованиях эффективностью (в том числе награжденные РАЕН медалью Мечникова), так малоизученные в медико-биологических опытах: Алисат, Алликор, Каринат (производитель – компания «ИНАТ-ФАРМА»), Виратон («ДИОД»), Кардипан («Экко-Плюс»), Вита-Чеснок («Вита-Лайн»), таблетки «Чесночные» («Леовит-Нутрио»), Garlic Caps Calivita Int., («Витамакс», США).

Все образцы соответствовали требованиям нормативных документов, кроме того, суточная дозировка их приема, в соответствии с рекомендациями производителей, является примерно одинаковой. Отметим специально, что сроки хранения (начиная с момента изготовления) всех использованных образцов не превышали одного месяца (для импортной БАД – двух месяцев).

В табл. 3.1 представлены данные по содержанию индикаторных соединений (аллицина, аллиина и аджоена) во всех 8 БАД, экстракты которых анализировались методом ВЭЖХ.

Таблица 3.1. Содержание индикаторных соединений в БАД на основе чеснока

Разновидность БАД на основе чеснока	Наличие доказанной эффективности	Содержание индикаторных соединений в БАД (мг/г)	
		Аллицин/ Аллиин	Аджоен
Алисат	Есть	3,21	4,48
Алликор	Есть	3,25	4,60
Каринат	Есть	2,80	4,18
Виратон	Есть	3,11	4,10
Кардипан	Нет	1,19	2,14
Вита-Чеснок	Нет	1,65	2,21
Garlic Caps Calivita Int.	Нет	3,10	4,01
Таблетки «Чесночные»	Нет	1,23	1,99

Как следует из полученных результатов, содержание аджоена в чесночных БАД, как правило, превышало содержание аллицина/аллиина (определяются одновременно и совместно как структурно сходные соединения, дающие один пик), что согласуется с литературными данными. Но более важным оказалось другое.

БАД с подтвержденной эффективностью (прошедшие экспертизу по результатам представленных протоколов клинических исследований и/или награжденные Золотой или Серебряной медалью Мечникова, учрежденной РА-ЕН) характеризовались более высокой суммарной концентрацией всех трех индикаторных соединений (МКП), чем остальные БАД. Исключение составляют лишь американские таблетки Garlic Caps Calivita Int., производители которых не представляли протоколы клинических испытаний или свою продукцию для экспертной оценки. Из этого следует, что целесообразность использования аллицина/аллиина и аджоена в качестве индикаторных соединений для суждения о качестве и эффективности БАД весьма высока.

В следующей серии экспериментов МКП анализировались в коммерческих образцах БАД на основе черники, предназначенных, в соответствии с рекомендациями производителей, для поддержания функций органов зрения.

Из многочисленных экспериментальных данных известно, что МКП действующего начала черники представляют собой водорастворимые пигменты – антоцианины (входят в состав обширной группы биофлавоноидов). Для последних, помимо антиоксидантного действия, показаны сосудопротекторные эффекты, способность снижать тромбообразование и т.п. Антоцианины содержатся и в других окрашенных плодах (вишне, черешне, черноплодной рябине), но их благотворное действие на зрительный аппарат человека гораздо ниже.

Результаты количественного и качественного определения антоцианинов в 13 БАД на основе черники, представленные в табл. 3.2, можно кратко охарактеризовать следующим образом:

– содержание антоцианинов черники в образцах БАД «Окулист» (Завод экопитания «Диод»), «Глазки» («Грин Фарм»), «Зоркий глаз» («Фарматоп»),

«Витамины для глаз» («Фора-Фарм»), «Черника+Селен» («Камелия НПП») и «Лютеин – комплекс» («Экомир») соответствует указанному производителем;

– в биологически активной добавке к пище «Визион» (Труффини и Редже Фармачеутичи С.р.л., Италия) содержание антоцианинов черники ниже указанного производителем (50 мг/г);

– в образцах БАД Живые витамины «Чернега» («Курортмедсервис»), «Черника» («Экко Плюс»), «Сплат № 1 Зрение» (ФГУП ЦНКБ) и «Черника форте» («Эвалар») антоцианины есть в достаточном количестве, но не черники. Это значит, что для производства данных препаратов черника не использовалась;

– в биодобавках «Оковит для детей» («Фитора») и «Ключи жизни» (НПФ «Висэл-СВ») антоцианинов не обнаружено.

Таблица 3.2. Количественный и качественный состав БАД на основе черники, рекомендуемых для поддержания функции зрения

Торговая марка БАД	Присхождение антоцианинов	Соответствие содержания антоцианинов указанному на этикетке
Окулист	Черника	Соответствует
Глазки	Черника	Соответствует
Зоркий глаз	Черника	Соответствует
Витамины для глаз	Черника	Соответствует
Черника + Селен	Черника	Соответствует
Лютеин-комплекс	Черника	Соответствует
Визион	Черника	Не соответствует (ниже указанного)
Живые витамины «Чернега»	Другие плоды	Соответствует
Черника	Другие плоды	Соответствует
Сплат № 1 Зрение	Другие плоды	Соответствует
Черника Форте	Другие плоды	Соответствует
Оковит для детей	-	Антоцианины не обнаружены
Ключи жизни	-	Антоцианины не обнаружены

Таким образом, и эти опыты указывают на целесообразность качественно-го и количественного контроля МКП (антоцианинов черники) как индикаторных соединений происхождения и полноценности большой группы БАД российского производства и сходного функционального назначения.

Наконец, аналогичным испытаниям были подвергнуты БАД с высоким содержанием растительных липидов. Соединения класса фитостеринов относятся к минорным компонентам растительных масел и, наряду с витаминами и полиненасыщенными жирными кислотами, в наибольшей степени определяют их фармакологическую активность [25]. Известно, что стероидные компоненты масла зародышей пшеницы (МЗП) – фитостерины – оказывают тонизирующее действие на мужскую репродуктивную систему, тормозят развитие гиперплазии предстательной железы, нормализуют функции тестикул [101].

Роль соединений этой группы в организме продолжает выясняться, так, например, получены данные о том, что употребление растительных стероидов, конкурирующих со стеринами животного происхождения, уменьшает накопление холестерина в организме [77]. Неудивительно, что ряд ученых считает, что именно фитостерины определяют, в основном, фармакологическую активность БАД на основе МЗП.

На начальном этапе работы было установлено, что массовые доли неомыляемой фракции для трех разных БАД на основе МЗП были почти одинаковы и колебались в пределах 4,7–4,8%, и лишь для масла ростков пшеницы (МРП) эта величина была несколько ниже (3,6%).

В составе образцов методом хромато-масс-спектрометрии обнаружено большое число веществ разных классов, в том числе карбоновые кислоты (включая непредельные), спирты (в том числе изопреноидные спирты – фитол и изофитол), а также сквален и карбонильные соединения. Общее сопоставление образцов по суммарному содержанию соединений разных классов характеризует табл. 3.3.

Таблица 3.3. Общая сводка данных по результатам анализа состава неомыляемых фракций

Образец БАД	Суммарное содержание соединений различных химических групп, % от массы неомыляемой фракции			
	Карбоновые кислоты	Сквален	Изопреноидные соединения всех классов (фитол/изофитол)	Карбонильные соединения
«Виардо»	27,4	1,3	43,0 (31,9)	13,1
БАД МЗП «Особое»	33,8	0,8	40,9 (25,2)	11,6
Масло ростков пшеницы	30,8	—	44 (32)	—
БАД МЗП «Молодильное»	23,7	2,2	31,7 (11,5)	13,6

В целом неомыляемые фракции образцов обнаружили значительное сходство по составу и содержанию сквалена, фитола и изофитола, суммы изопреноидов и карбонильных соединений.

В составе изученных образцов МЗП, помимо трех компонентов, доступных также как образцы сравнения (ситостерина, кампестерина и эргостерина), было дополнительно идентифицировано от трех до семи фитостеринов, причем максимальное их число было зафиксировано в образце «Виардо» (табл. 3.4).

Анализ данных, приведенных в таблице, показывает, что БАД «Виардо», по сравнению с другими образцами, заметно обогащена непредельными фитостеринами, содержащими несколько двойных связей $C=C$ в молекуле (эргостерин, неоэргостерин, дегидроэргостерин). При этом в ней отсутствуют заметные количества эпистерина, найденные в других образцах. Подобная особенность состава представляется весьма интересной, но ее детальная интерпретация в настоящее время затруднительна. Как отмечалось выше, биологическая роль фитостеринов слабо изучена. Тем более трудно интерпретировать тонкие структурные различия, касающиеся более высокой непредельности ряда соединений этого класса.

Таблица 3.4. Содержание фитостеринов в образцах различных БАД на основе масла зародышей пшеницы, мг% (в скобках указано содержание фитостеринов в неомыляемой фракции, %)

Фитостерины	«Виардо»	БАД МЗП «Особое»	БАД МЗП «Молодильное»	Масло ростков пшеницы
Дегидроэргостерин**	42±4 (0,89)	–	12,0±1,7(0,33)	–
Неоэргостерин**	152±5 (1,1)	148±18 (4,0)	54±4 (1,5)	–
Эргостерин	127±23 (2,8)	80±40 (3,7)	120±21 (3,3)	71±0,2 (0,06)
Зимостерин*	249±19 (5,6)	–	117±9 (3,2)	20,4±1,5 (0,9)
Эпистерин*	–	83±16(5,1)	63±8(2,3)	100±10 (4,6)
Брассикастерин*	325±29 (7,4)	270±70 (4,4)	300±70 (8,2)	28±7 (1,3)
Кампестерин	470±50 (8,7)	380±40 (6,1)	280±30 (7,9)	20,2±2,1 (0,9)
Фукостерин*	13,2±3,5 (0,2)	39±15 (0,63)	4,8±1,9 (0,12)	23±9 (1,05)
Ситостерин	960±150 (17,0)	1110±145(17,9)	700±90 (19,3)	73±10 (3,3)
Сумма идентифицированных фитостеринов	2150±20 (44,7)	2278±84(36,7)	1640±60(45,45)	317±12 (14,4)
Тритерпеновые спирты*	–	–	–	1340±50 (60,5)

* в пересчете на ситостерин

** в пересчете на эргостерин

Однако, если принять во внимание предположение об участии фитостеринов в последующих биохимических трансформациях в организме с образованием других метаболитов (в частности, гормонов, витаминов группы Д), то, при прочих равных структурных факторах, соединения с большим числом двойных связей должны оказываться намного более реакционноспособными. Следовательно, прием препаратов с большим содержанием непредельных фитостеринов (в том числе БАД «Виардо») должен приводить к более выраженным физиоло-

гическим эффектам. Здесь также уместно отметить, что по результатам экспертизы протоколов клинических исследований «Виардо» награждена медалью Мечникова, утвержденной РАЕН.

По количественному содержанию наиболее гидрофильных фитостеринов (первых четырех в табл. 3.4.) характеризуемый препарат «Виардо» (570 мг%) превосходит все остальные образцы БАД на основе МЗП (360–480 мг%). Содержание фитостеринов этой же группы в МРП существенно меньше (около 20 мг%).

В качестве традиционных характеристик изученных БАД приведены основные показатели качества (перекисное, кислотное, омыления и йодное числа) в сочетании с данными по массовой доле неомыляемых веществ и содержанию каротиноидов (табл. 3.5.).

Таблица 3.5. Физико-химические показатели качества БАД на основе масла зародышей пшеницы

Образец	Перекисное число (Р), ммоль/кг	Кислотное число, мг (КОН)	Число омыления, мг (КОН)	Йодное число, г/100г	Содержание неомыляемых веществ, % масс	Содержание каротиноидов, мг %
«Виардо»	1,3	4,7	195	112	4,8	9,45
БАД МЗП «Особое»	2,4	4,2	174	108	6,2	8,30
Масло ростков пшеницы	2,2	2,8	182	109	3,6	3,84
БАД МЗП «Молодильное»	2,7	5,1	219	89	2,2	7,9

Как видно из этой таблицы, и по «интегральным» физико-химическим характеристикам БАД Виардо не имеет выраженных отличий от остальных образцов БАД на основе МЗП.

Таким образом, и для группы БАД растительного происхождения с высоким содержанием липидов продемонстрирована возможность контроля качества продукции по индикаторным соединениям – фитостеринам с ненасыщенными связями.

Обсуждая результаты проделанных экспериментов, следует, на наш взгляд, остановиться на следующем. Нормативные документы, регламентирующие производство и оборот БАД в России, неизбежно будут видоизменяться под влиянием введенного в действие в 2003 г. ФЗ «О техническом регулировании». В частности, это приведет к созданию Технических Регламентов (обеспечение пищевой и экологической безопасности продукции, ее идентификация) и развитию систем добровольной сертификации (подтверждение качества и эффективности продукции).

Представляется вероятным, что при разработке Технических Регламентов на БАД за основу будут приняты существующие в настоящее время требования к их безопасности по СанПиН 2.3.2.1078–01.

Гораздо более сложной видится проблема выбора критериев для проведения добровольной сертификации БАД на эффективность.

Так, например, в рамках этой процедуры Институт питания РАМН предлагает следующий алгоритм проведения оценки эффективности БАД: Определение действующего вещества.

- Определение показателей безопасности.
- Исследование динамики обеспеченности биологически активными веществами. Динамики биохимических показателей.
- Динамики иммунологических показателей.
- Динамики показателей антиоксидантного статуса.
- Динамики физиологических показателей.

Помимо этого, проводится оценка органолептических свойств БАД и их переносимости, анализ пищевого статуса с использованием методов нутриметаболомики и клинико-функциональная оценка эффективности БАД (клинические показатели; показатели инструментальных методов исследования, харак-

теризующие функциональное состояние различных органов и систем; антропометрические показатели (масса тела, индекс массы тела, окружность плеча, талии, бедер, толщина кожной складки); лабораторные показатели (общий анализ мочи, крови и др.).

Совершенно очевидно, что такой подход является труднореализуемым на практике и не заострен на клиническую эффективность БАД.

Как уже указывалось выше, одним из способов добровольной сертификации БАД является химико-аналитический, основанный на подтверждении наличия (и количественного содержания) в БАД классических микронутриентов (витаминов и минералов) и МКП, тем более что и существующие сейчас «Свидетельства о государственной регистрации» должны отражать способность БАД являться носителями (дополнительным источником) тех или иных биологически активных веществ.

Таким образом, контроль качества (и, как следствие, эффективности БАД) может приближаться к процедурам, характерным для фармакологии, где выявляется стандартное вещество (субстанция), которое, по представлениям разработчиков, определяет фармакологическую активность препарата, и по эталону далее выясняют эффективность: достаточно этого эталонного вещества в препарате – эффективен, недостаточно – неэффективен, превышена доза – препарат опасен.

С одной стороны, в наших опытах, действительно, подтверждена такая возможность для трех довольно обширных групп БАД. Однако практической реализации химико-аналитического подхода препятствует целый ряд обстоятельств.

Так, например, из трех использованных в экспериментах групп БАД содержание МКП (антоцианинов) указывается производителями только для биодобавок, предназначенных для поддержания функции зрения.

При изучении нами всех доступных источников информации, включая описание характеристик состава и механизмов действия БАД их разработчиками и производителями, удалось установить, что микронутриенты и МКП действующего начала известны и регламентированы по концентрации в матрице-носителе примерно для 87% БАД, зарегистрированных в настоящее время в России.

Однако для проведения процедуры добровольной сертификации БАД этого недостаточно. В аккредитованных для проведения сертификации лабораториях или испытательных центрах такая процедура должна быть основана на применении официальных, стандартизированных методов анализа по отношению к перечню нутриентов, перечисленных в МР 2.3.1. 1915–04 «Рекомендуемые уровни потребления пищевых и биологически активных веществ». Отметим попутно, что эти методические рекомендации могут позволить реализовать как качественный аспект сертификации (идентификация происхождения БАД по индикаторным соединениям), так и ее количественный аспект (достаточность содержания индикаторных соединений в БАД по отношению к их адекватному уровню потребления в составе БАД).

Официальные методы в настоящее время изложены в документе Государственной системы санитарно-эпидемиологического нормирования РФ и Минздрава России – Р 4.1.1672–03 «Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище» [70,71].

Однако в первом документе из проанализированных нами МКП представлен только аллицин (чесночные БАД), антоцианины (БАД на основе черники), а во втором – нет официальных методов определения всех МКП из БАД на основе как чеснока, так и МЗП.

При распространении аналогичного подхода ко всей совокупности БАД (100%) выявляется следующая картина. Как уже указывалось выше, для 87% БАД компоненты действующего начала (микронутриенты и «миноры») в некотором приближении известны. Суточные нормы потребления МКП, содержащихся в этих БАД, регламентированы для 64% содержащих их биодобавок («миноры» остальных БАД пока не включены в МР 2.3.1. 1915–04), и только для примерно половины из них (37%) утверждены официальные методы контроля МКП (рис. 3.1)

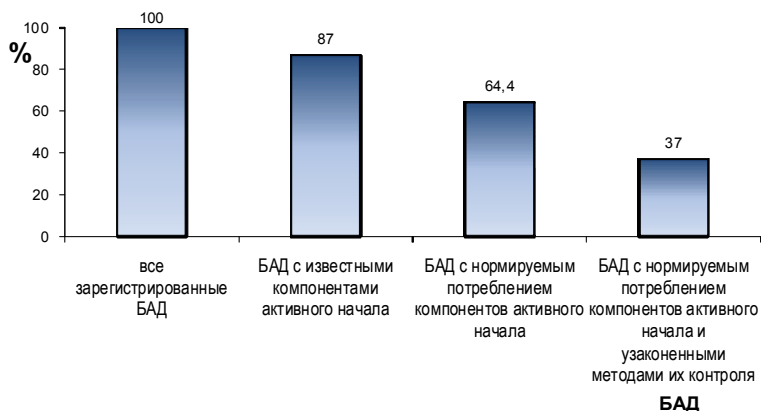


Рисунок 3.1. Выделение доли БАД, добровольная сертификация которых может быть осуществлена на основании нормативных документов Государственной системы санитарно-эпидемиологического нормирования Российской Федерации

Таким образом, возможность проведения добровольной сертификации БАД химико-аналитическим путем, по аналогии с экспертизой лекарственных препаратов, существует в настоящее время только для третьей части всех зарегистрированных БАД, и для расширения количества БАД, подлежащих сертификации на эффективность и качество, оба нормативных документа Государственной системы санитарно-эпидемиологического нормирования Российской Федерации нуждаются в существенной доработке. Более того, следует принять во внимание тот факт, что в МР 2.3.1. 1915–04 «Рекомендуемые уровни потребления пищевых и биологически активных веществ» при расчете адекватных уровней потребления МКП не учитывается вес потребителя.

3.2. Минорные компоненты пищи и качество растительного сырья для производства БАД

Важным условием, обеспечивающим качество БАД как конечной продукции, является высокое качество сырья (главным образом растительного), используемого для их производства. Вряд ли на сегодняшний день можно считать достаточно совершенными как нормативную документацию на сырье, так и

практикуемые процедуры его контроля. В частности, при анализе существующей НД на пищевое растительное сырье обнаружены такие ее недостатки, как практически полное отсутствие физико-химических показателей, характеризующих биологически активные вещества, которые станут основой для формирования действующего начала получаемых препаратов.

Проведенные нами экспертные опросы свидетельствуют о слабом контроле за качеством растительного сырья, используемого для производства БАД, на российских предприятиях. Как правило, сырье не выдерживается на карантине, не подвергается лабораторной перепроверке, а органолептический контроль проводится поверхностно. Чаще всего при наличии сопроводительной документации на сырье (удостоверения о качестве и безопасности, санэпидзаклучения, сертификата или декларации соответствия) никаких дополнительных испытаний не проводится. В то же время эксперты указывают на проблему вариабельности качества сырья (в том числе лекарственного), обострившуюся в последние годы.

В этой связи в начальной серии экспериментов нами анализировалось содержание минорных компонентов пищи (МКП) в сырье для получения БАД (Алликора и Лакрината, «ИНАТ-Фарма»), а именно в высушенных чесноке и солодке. Определяемыми МКП, исходя из собственных и литературных данных, служили аллицин, аллиин и аджоен (чеснок); ликвирицин и глицирризин (солодка).

На первой стадии экспериментов использовалась флюидная экстракция биологически активных веществ с помощью диоксида углерода, находящегося в сверхкритическом состоянии (СКЭ) как наиболее совершенный метод полного извлечения компонентов из природного сырья (экспериментально показано, что CO_2 -экстракция позволяет извлечь из исходного растительного сырья биологически активные соединения в составе, наиболее полно отвечающем нативному составу растения).

Обработке подвергались коммерческие образцы продукции, приобретенные у разных фирм-поставщиков сырья для производства БАД (по 5 образцов для каждого вида сырья, причем по одному образцу чеснока и солодки было получе-

но с помощью сублимационной сушки). В полученных таким образом экстрактах и определялись хроматографическими методами указанные выше МКП.

Как видно из данных, представленных в табл. 3.6, изученное растительное сырье оказалось весьма вариабельно в отношении содержания МКП, что, по всей вероятности, не может не сказаться на качестве и эффективности получаемой из него конечной продукции (БАД).

Таблица 3.6. Содержание МКП в высушенных чесноке и солодке как сырье для производства БАД

№ образца	Содержание МКП (мг/г)			
	Чеснок		Солодка	
	Аллицин/ Аллиин	Аджоен	Ликвирицин	Глицирризин
Образец 1	0,67	1,25	0,97	2,11
Образец 2	1,11	2,08	1,78	3,09
Образец 3	1,76	3,41	1,18	4,82
Образец 4 (X)	1,47	2,87	3,01	5,86
Образец 5	0,89	1,55	1,65	2,31

Примечание: X – образец, полученный с помощью сублимационной сушки

Сублимационная сушка сырья приводила к более существенному накоплению МКП в сырье только для солодки.

Для следующей серии экспериментов были отобраны по два коммерческих образца чеснока и солодки, из которых экстрагировались МКП как с помощью СКЭ, так и водно-спиртовой смесью. В этих опытах проверялась способность извлечения МКП из растительного сырья более дешевым, чем СКЭ, способом.

Из данных, представленных в табл. 3.7, видно, что МКП из разных видов сырья при экстрагировании двумя способами не ведут себя сходным образом. Если потери чесночных МКП при использовании водно-спиртовой смеси дос-

таточно велики, то извлекаемость МКП из солодки водно-спиртовой смесью и при СКЭ примерно одинакова.

Таблица 3.7. Извлекаемость МКП из высушенных чеснока и солодки водно-спиртовой смесью по сравнению с СКЭ

№ образца	Вид сырья			
	Чеснок		Солодка	
	Извлекаемость МКП (%)			
	Аллицин/Аллиин	Аджоен	Ликвирицин	Глицирризин
Образец 1	72	61	91	89
Образец 2	67	54	95	97

Примечание: извлекаемость МКП при СКЭ экстракции принята за 100%

Таким образом, информированность о поведении МКП в разных системах растворителей может повысить экономическую эффективность производства товарных форм БАД, получение которых предполагает проведение экстракции.

В литературных источниках по фармакогнозии можно встретить такое высказывание «При разработке и пересмотре НД ставится задача предусмотреть оценку качества сырья по количественному содержанию основных биологически активных и экстрактивных веществ. При этом используются современные физико-химические методы анализа природных соединений» [57].

К сожалению, в реальной практике такое состояние дел пока не достигнуто, поэтому, на наш взгляд, описанные выше данные представляют существенный интерес.

В частности, находит свое объяснение феномен, почему достаточно часто одни и те же торговые марки БАД обладают разной эффективностью. Как представляется автору, при наличии достоверных данных о МКП, входящих в состав действующего начала БАД, их содержание целесообразно контролировать и в исходном сырье, если и не с использованием утвержденных НД (их разра-

ботка всегда будет отставать по времени), то хотя бы выборочно, характеризуя продукцию того или иного поставщика сырья.

Кроме того, наши эксперименты показали, что при переработке сырья (получении из него настоек, вытяжек и т.п.) не всегда рационально использование дорогостоящих методов экстракции (например, СКЭ), поскольку ряд МКП достаточно устойчивы при обработке растворителями и хорошо извлекаются из сырья и более простыми способами.

3.3. Минорные компоненты пищи и обоснование сроков хранения БАД

Характерной особенностью подавляющего числа зарегистрированных в России БАД, как следует из сопроводительной документации и информации этикеток, является довольно длительный срок хранения – как правило, от одного до трех лет. В то же время научная обоснованность таких сроков вызывает определенные сомнения, так как технические условия на БАД содержат в большинстве случаев немногочисленные физико-химические показатели качества, по которым трудно судить об изменении полноценности БАД в процессе хранения. Более того, благодаря усилиям и проверкам Роспотребнадзора, в последние годы обнаружены многочисленные нарушения оптимальных режимов хранения БАД, что также указывает на актуальность более тщательного исследования вопросов, связанных с их хранением.

В серии экспериментов в нашей работе проверялась гипотеза о возможности контроля изменения качества БАД при хранении посредством определения содержания в них МКП действующего начала препаратов как индикаторных соединений.

С этой целью хранению в контролируемых условиях (соответствующих рекомендациям производителей, как правило, при температуре около 10 °С в неосвещенном месте) сроком до 1 года подвергались наиболее качественные БАД из тех групп, эксперименты с которыми были описаны выше (Алликор, Алисат, «Окулист», «Глазки», Виардо, МЗП «Особое»), а также БАД «Лакри-

нат», произведенная из солодки компанией ИНАТ-Фарма. На хранение закладывались свежеприготовленные препараты БАД (до месяца со дня изготовления), качество которых соответствовало требованиям соответствующих ТУ и СанПиН 2.3.2.1078–01, т.е. их показатели не превышали допустимых уровней окислительной порчи, пределов содержания токсичных элементов, пестицидов, полихлорбифенилов и радионуклидов (по результатам Санэпидзаключений).

В течение всего срока хранения для анализа на содержание индикаторных МКП отбирались пробы через каждые два месяца. Полученные результаты представлены в табл. 3.8–3.11.

Таблица 3.8 Изменение содержания индикаторных соединений в БАД на основе чеснока при длительном хранении

БАД на основе чеснока	Срок хранения, мес.	Содержание индикаторных МКП (мг/г)	
		Аллиин / Аллицин	Адjoен
Алисат	0	3,21	4,48
	2	3,11	4,32
	4	3,01	4,28
	8	2,93	4,18
	10	2,91	3,98
	12	2,34	2,81
Алликор	0	3,25	4,50
	2	3,25	4,45
	4	3,16	4,21
	8	3,08	3,95
	10	2,98	3,89
	12	2,35	3,40

Для чесночных БАД (Алликор, Алисат) обнаружено сохранение (или незначительное изменение) уровня МКП (аллицин/аллиин, адjoен) в течение 10 мес. с последующим снижением содержания МКП к 12-му месяцу хранения. Анало-

гичная закономерность обнаружена для полученного из солодки Лакрината, где контролировались уровни ликвирицина и глицирризина (табл. 3.9).

Таблица 3.9. Изменение содержания индикаторных соединений в Лакринате при длительном хранении

БАД на основе солодки ЛАКРИНАТ	Срок хранения, месяцы	Содержание индикаторных МКП (мг/г)	
		Ликвирицин	Глицирризин
Образец 1	0	2,8	4,9
	2	2,8	4,8
	4	2,7	4,8
	6	2,6	4,7
	8	2,6	4,6
	10	2,5	4,5
	12	1,9	3,8
Образец 2	0	2,1	4,1
	2	2,1	4,0
	4	2,1	4,0
	6	2,0	3,9
	8	1,9	3,8
	10	1,9	3,8
	12	1,5	3,1

Менее устойчивыми при хранении оказались МКП биодобавок, предназначенных для поддержания функции зрения. Содержание в них антоцианинов черничного происхождения существенно снижалось уже к 6-му месяцу хранения, причем количество индикаторных МКП продолжало снижаться и далее, составляя к концу срока хранения только 15–20% от исходного уровня (табл. 3.10).

Таблица 3.10. Изменение содержания индикаторных соединений в БАД на основе черники при длительном хранении

Срок хранения, мес.	Содержание антоцианинов (мг/г)			
	Окулист	Черника + Солодка	Лютеин-комплекс	Витамины для глаз
0	15,1	18,7	16,9	12,2
2	12,2	15,5	15,1	10,5
4	9,3	12,6	13,7	8,9
6	7,2	10,3	11,4	5,9
8	6,1	7,9	9,2	4,1
10	5,2	5,8	4,9	3,7
12	3,9	3,8	3,4	2,3

Наконец, следует указать на особое поведение МКП (фитостеринов) БАД растительного происхождения с высоким содержанием липидов. На протяжении всего срока хранения исследуемых образцов количество и качество фитостеринов в них практически не изменялось (табл. 3.11).

Таблица 3.11. Изменение содержания индикаторных соединений в БАД на основе масла зародышей пшеницы при длительном хранении

Вид образца	Срок хранения, мес.	Содержание МКП (мг%)	
		Суммарные фитостерины	Ненасыщенные фитостерины
1	2	3	4
«Виардо»	0	2150	350
	4	2148	344
	6	2145	345
	8	2144	342
	12	2131	341

Окончание таблицы 3.11

1	2	3	4
БАД МЗП «Особое»	0	2270	223
	4	2267	221
	6	2261	219
	8	2260	219
	12	2249	218
БАД МЗП «Молодильное»	0	1641	181
	4	1642	180
	6	1639	178
	8	1631	178
	12	1630	169

Измеренные через 12 мес. хранения стандартные показатели качества жиров (кислотное и перекисное числа и т.п.) также оказались в пределах требований СанПиН 2.3.2.1078–01, хотя их величина возросла по сравнению с исходными значениями (табл. 3.12).

Таблица 3.12. Нормативные показатели качества липидов для БАД на основе МЗП и их величина к концу срока хранения

Показатели окислительной порчи	Допустимые уровни, не более	Фактические показатели в образцах			
		«Виардо»	БАД МЗП «Особое»	Масло ростков пшеницы	БАД МЗП «Молодильное»
Кислотное число	4,0	3,9	3,8	4,0	2,9
Перекисное число	10,0	9,0	8,2	9,9	4,2

С учетом более высоких аналитических возможностей хромато-масс-спектрометрии и литературных данных о неадекватности таких показателей, как перекисное и кислотное числа, для контроля безопасности липидов нами

было также проведено количественное и качественное определение продуктов окисления липидов БАД (карбонильных соединений) методом ГХ-МС при хранении Виардо и МЗП «Особое» (табл. 3.13).

Таблица 3.13. Изменение количества карбонильных соединений (мкг/кг) в исследуемых образцах БАД на основе МЗП при хранении

Соединение	Сроки хранения, мес.							
	«Виардо»				МЗП «Особое»			
	0	4	6	12	0	4	6	12
Додеканаль	11	19	45	71	14	18	59	89
Этилтетрадеканоат	–	19	33	67	5	14	45	76
Тетрадеканаль	–	5	7	8	–	11	21	32
Изопропилмиристат	–	11	28	31	5	13	54	61
Этилизопентадеканоат	23	56	67	81	28	49	77	89
Пентадеканаль	–	6	15	46	8	21	43	67
Этилпентадеканоат	–	4	16	44	7	13	18	47
Гексадецен-9-аль	19	30	42	54	21	37	62	79
Метилпальмитат	–	11	19	31	–	18	32	45
Этилизопальмитат	–	3	11	22	–	7	14	39
Гесадиген-11-аль	12	20	34	45	11	24	45	49
Этилпальмитат	12	23	31	44	16	29	56	67
Гексадеканаль	–	9	19	29	–	17	31	39
Этилгептадеканоат	–	4	14	15	–	8	19	31
Этилолеат	–	19	28	43	–	23	45	57
2,4-Диметил-2,4-гептадиеналь	–	3	11	18	–	7	14	19

В табл. 3.13 представлены обнаруженные нами в образцах соединения, образующиеся, как правило, при деструкции жиров (альдегиды, карбоновые кислоты, сложные эфиры как продукты переэтерификации). Эти соединения, оче-

видно, изменяют свойства БАД, причем можно предположить, что они не только влияют на органолептические свойства, но и на степень пищевой безопасности БАД, что требует дополнительного исследования, например, с использованием биотестирования окислившихся липидов таких БАД на мутагенность.

Таким образом, нами получено еще одно подтверждение того факта, что такие простые показатели, как к.ч. и п.ч., не в полной мере отражают степень окислительной деструкции жировых компонентов БАД.

В то же время, несмотря на неизменность содержания фитостероидов при длительном хранении БАД, что, вероятно, обеспечивает их физиологическую активность, безопасность окисляющихся липидов требует более тщательного контроля, чем осуществляемый в настоящее время по ТУ и СанПиН 2.3.2.1078–01, и это следует принять во внимание при разработке Технических Регламентов на БАД с высоким содержанием жиров.

Подводя общий итог проведенной серии экспериментов, следует отметить, что для БАД растительного происхождения (нелипидных) при хранении характерно изменение содержания МЗП, в существенной степени определяющих их биологическую активность. В этой связи можно констатировать, что при определении научно обоснованных сроков хранения таких БАД (особенно БАД-парафармацевтиков) следует контролировать их качество с учетом снижения содержания индикаторных МКП, а для БАД на основе сырья с высокой концентрацией липидов целесообразно учитывать степень накопления сложных продуктов перекисного окисления липидов.

В соответствии с требованиями существующих нормативных документов, эффективные БАД должны являться дополнительным источником микронутриентов и МКП в количестве не менее 30–40% от их суточной нормы потребления. Поэтому, если считать исходное количество микронутриентов и МКП (перед началом хранения) близким к этой величине, падение их содержания на 30% и более означает утрату биодобавками основных полезных свойств и, следовательно, превышение предельного срока хранения.

С этих позиций предельный срок хранения БАД на основе чеснока (Алли-

кора, Алисата) и Лакрината на основе солодки – не более полутора лет, а не 2 года, как указано на этикетке. Предельный срок хранения БАД с высоким содержанием липидов – не более года при комнатной температуре.

Основные отличия установления сроков и условий хранения БАД и ЛС состоят в следующем. Для ЛС предоставление протоколов проведения испытаний при хранении являются необходимым звеном при регистрации препаратов, для БАД такая обязательность не предусмотрена.

Для ЛС нормируется термин «ЗНАЧИТЕЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ». Это понятие используют при оценке результатов изучения стабильности. В отношении активных субстанций «значительные изменения» означают выход за пределы спецификаций (их должно быть «не менее...»). Применительно к готовым продуктам такие изменения могут отмечаться в пределах установленных норм качества. В первую очередь это относится к показателю количественного содержания активных субстанций (аналог МКП в БАД), понижение которого на 5% от исходного значения уже рассматривается как «значительные изменения».

Как ту, так и другую особенность изучения ЛС можно было бы взять на вооружение производителями и регистраторами БАД, установив уровень «значительных изменений» содержания МКП и микронутриентов (в связи со сложностью состава БАД) как примерно 15–20% по сравнению с исходным.

3.4. Использование клеточных моделей и планарий как тест-систем для предварительной оценки эффективности БАД

Как уже неоднократно отмечалось в литературном обзоре и других разделах данной работы, проблема оценки качества и эффективности БАД на сегодняшний день весьма далека от своего решения. Критическое отношение к БАД чаще всего основано не на сомнениях в их безопасности, а на отсутствии уверенности в их полезности для здоровья, что, в свою очередь, часто связывают с необязательностью клинических исследований и трудностями определения МКП [85].

Однако клинические исследования весьма длительны и высокочувствительны, что делает их малодоступными для многих производителей БАД. В этой связи перспективным представляется, особенно для БАД-парафармацевтиков, такой методический подход к обнаружению биологической (фармакологической) активности, как биотестирование.

В нашей работе изучались возможности одного из наиболее многообещающих методов – биотестирования на планариях *D.tigrina* выявлять наиболее эффективные (следовательно, качественные) БАД в течение трехсуточного низкочувствительного эксперимента [87].

Предварительная серия исследований была проведена на группе фармпрепаратов и включала сравнительное изучение действия этих лекарственных средств на планарий, крыс и мышей в институте экспериментальной и теоретической биофизики РАН [53]. Были использованы препараты: ортофен, пиперазин, проксодолол, антрасенин, тромбовар, тетриндол, глибутид, фторфеназин. В других исследованиях были протестированы ряд стероидных гормонов и нейропептидов: соматостатина, вазопрессина, далагина.

Все исследования выявили высокую чувствительность модели, основанной на регенерации планарий. Так, в опытах с далагином (аналогом энкефалина, активно заживляющим язву двенадцатиперстной кишки человека) наблюдался стимулирующий эффект при разведении пептида до концентрации 10^{-11} М, а в опытах с люлиберином было обнаружено влияние на регенерацию при концентрации пептида 10^{-15} М.

Сводные данные по действию на планарий БАД разного происхождения, с доказанной и недоказанной эффективностью и содержащих разные количества МКП (см. раздел 3.1) представлены в табл. 3.14.

Как видно из таблицы, наиболее сильными стимуляторами регенерации являются Алисат, Алликор, Каринат (БАД чесночного происхождения), Окулист (БАД черничного происхождения) и Виардо (БАД на основе масла зародышей пшеницы). С учетом ранее полученных данных по содержанию в этих БАД «минов», эффективные концентрации МКП этих препаратов были 10^{-7} – 10^{-9} М

(1 мг/л) в тест-системе. Это позволяет говорить о весьма высокой чувствительности тест-системы к БАД-парафармацевтикам.

Таблица 3.14. Действие биологически активных добавок на регенерацию планарий

Действие БАД на основе чеснока		Действие БАД на основе черники		Действие БАД на основе масла зародышей пшеницы	
БАД	Эффект	БАД	Эффект	БАД	Эффект
Алисат	++	Окулист	++	«Виардо»	++
Алликор	++	Глазки	+	БАД МЗП «Особое»	+
Каринат	++	Зоркий глаз	+	БАД МЗП «Молодильное»	+
Кардипан	0	Оковит для детей	0		
Вита-Чеснок	0	Ключи жизни	0	Масло ростков пшеницы	0
Таблетки «Чесночные»	0	Черника Форте	0		

Условные обозначения:

++ – выраженный эффект стимулирования роста (статистически достоверный по критерию Стьюдента)

+ – незначительный эффект стимулирования роста

0 – отсутствие влияния на репарацию планарий

Незначительный эффект стимулирования обнаружен для таких БАД, как Глазки, Зоркий глаз, МЗП «Особое» и МЗП «Молодильное», тогда как остальные исследованные БАД не влияли на репарацию планарий.

Поскольку, как показано в других разделах исследования, основное отличие между БАД первой группы и остальных двух состоит в содержании МКП, с которыми связывают физиологическую активность БАД, можно с большой степенью вероятности утверждать, что использование биотестирования на планариях целесообразно использовать для предварительной оценки эффективности и качества биодобавок. Более того, этот биотест обладает весьма высокой чув-

ствительностью, которая не только не уступает, но и существенно превышает чувствительность химико-аналитических методов контроля.

Вообще говоря, биотестирование находит свое применение главным образом в экологическом мониторинге, для обнаружения потенциально опасных и загрязняющих окружающую среду соединений. Тем не менее, в русле проведенных нами экспериментов находятся данные по биотестированию регуляторных белков, проявляющих биологическую активность в сверхмалых дозах (СМД). В этой работе биотестирование осуществляется с помощью оригинального адгезиометрического метода [78]. В основе этого метода лежит оценка экспериментально определяемого параметра, отражающего вязкоупругие свойства ткани, которые, в свою очередь, зависят от состояния таких макроструктур клетки и ее микроокружения, как ультраструктуры специализированных межклеточных контактов, плазматическая мембрана (ПМ), цитоскелет. Известно, что взаимодействие рецепторов ПМ с компонентами микроокружения клетки вызывает перестройку пространственной организации не только ПМ, но и цитоскелета. Таким образом, мембранотропное действие специфических лигандов способно вызывать развитие каскадных перестроек в организации основных макромолекулярных структур клетки и ее микроокружения, которые вносят значительный вклад в вязкоупругие свойства ткани. Известна исключительно важная роль углеводов в процессах межклеточной адгезии и «узнавания». В цитируемой работе было изучено мембранотропное действие ряда углеводсодержащих веществ с целью выявления зависимости «структура молекулы – биологическая активность в СМД». Были исследованы: α -метилманнозид, α -метилгалактозид, α -метилглюкозид, сахароза, а также такие гликопротеины, как $\alpha 1$ -кислый гликопротеин сыворотки крови (оросомукоид), овальбумин, фибронектин, сывороточный альбумин. В состав всех изучаемых гликопротеинов входили маннозсодержащие гликаны различного строения. В проведенных экспериментах было установлено, что мембранотропное действие оказывали

только α -метилманнозид, α -метилгалактозид и фибронектин, причем эти вещества проявляли в этих экспериментах биологическую активность в СМД.

Последние достижения в биомедицинских дисциплинах, геномике, протеомике, биоинформатике дали фармацевтической и биотехнологической индустрии новые инструменты для лечения различных заболеваний: открытие и выбор лекарственных мишеней, снижение токсичности и неэффективных компонент на более ранних стадиях исследования, разработку средств индивидуализации терапии. Научная информация, возникающая сегодня, должна трансформироваться в интегрированную предсказательную модель, способствующую направленной разработке фармпрепаратов и БАД и оценке их эффективности.

Что касается БАД, то некоторые авторы предлагают многоэтапную и, как представляется, малоэффективную программу создания новых препаратов [90].

В частности, определяются дефициты основных БАВ в организме, связанные с патологическими процессами. Затем происходит предварительное конструирование первого эскиза (рецепта) будущего продукта, который мог бы восполнять тот или иной дефицит. На более поздних стадиях определяются необходимые ингредиенты будущего продукта, и выбирается сырье для его изготовления. Анализируются также сведения об экологическом состоянии регионов произрастания этого растительного, как правило, сырья.

При создании оригинального рецепта будущего продукта учитываются взаимоусиление и взаимодополнение положительных эффектов основных ингредиентов, устранение и смягчение нежелательных эффектов одних ингредиентов другими. Наконец, выбираются соответствующие технологии производства, которые определяются особенностями ингредиентного состава будущего продукта и базируются на результатах анализа достижений и возможностей современных высоких технологий производства БАД в мире.

Проводится и анализ современных результатов клинической апробации основных ингредиентов продукта, которые имеются к настоящему времени в отечественной и зарубежной специальной литературе, а также проведение собственных исследований по оценке клинической активности.

Таким образом, длительной и затратной процедуре «исследований по оценке клинической активности» (которые вполне могут дать и отрицательный результат) предшествует в основном теоретическое выявление связи между патологией и дефицитом микронутриентов, что вряд ли эффективно.

БАД могут обладать более широким спектром эффектов, чем лекарственные препараты, оказывая влияние на ряд факторов риска, то есть, осуществляя, помимо прямого, не прямое воздействие. Как следствие, в настоящее время нелекарственные препараты на основе компонентов растительного происхождения и других натуральных продуктов привлекают все большее внимание исследователей.

Тем не менее, активное изучение таких важных эффектов БАД, как кардиопротекторные по-прежнему ограничивается воздействием на факторы риска ССЗ, причем главное внимание привлекает снижение уровня холестерина в крови и регуляция артериального давления [110, 138, 142]. Понятно, что при такой методике оценки терапевтического потенциала нелекарственных натуральных препаратов они явно проигрывают современным лекарственным средствам.

До недавнего времени не существовало методологических подходов к оценке антиатеросклеротического потенциала натуральных веществ. Впрочем, такая ситуация характерна и для лекарственных средств. Главная проблема разработки патогенетической терапии ССЗ, особенно на ранних субклинических стадиях их развития, заключается в отсутствии адекватных патофизиологических моделей, а также в отсутствии цельного алгоритма разработки лекарственных и нелекарственных средств прямого действия.

Клеточный культуральный тест представляется наиболее оптимальным и адекватным способом моделирования ранних процессов ССЗ [146]. С использованием клеточного теста представляется возможным проведение серийных испытаний, необходимых для потокового скрининга лекарственных средств и БАД, обладающих эффектом *in vitro*.

Ключевым (инициирующим) моментом и основной патоморфологической характеристикой такого ССЗ, как атеросклероз, является избыточное накопле-

ние липидов (главным образом, холестерина и его эфиров) в гладкомышечных клетках интимального слоя артерий. Источником накапливающихся в клетках липидов являются модифицированные липопротеиды низкой плотности, и избыточное накопление внутриклеточного холестерина с образованием так называемых «пенистых» клеток, заполненных жировыми отложениями, является своеобразным триггерным механизмом, индуцирующим другие механизмы прогрессирования атеросклероза, такие, как избыточный синтез компонентов соединительнотканного матрикса, пролиферацию, миграцию клеток гематогенного происхождения, локальную воспалительную реакцию. Процесс атерогенеза, как правило, завершается образованием атеросклеротических бляшек, которые и определяют наличие клинических проявлений атеросклероза, таких, как инфаркт миокарда, сердечно-сосудистая недостаточность, инсульт и т.д.

Каким образом происходит накопление внутриклеточных липидов, приводящее к образованию таких клеток? Ответив на этот вопрос, можно определить именно те точки приложения для БАД, которые окажутся способными предотвращать клеточный липоидоз, а значит, препятствовать развитию атеросклероза на самом раннем этапе. Цели воздействия можно сформулировать следующим образом:

1. Предотвращение атерогенной модификации липопротеидов низкой плотности. Нативные липопротеиды не вызывают накопления внутриклеточных липидов – их метаболизм на клеточном уровне четко регулируется с участием механизмов обратной связи. Чтобы липопротеиды низкой плотности стали атерогенными, они должны подвергнуться некоей химической модификации. Открыт каскад модификационных изменений липопротеидов, приводящий к появлению у них атерогенных свойств. Также установлен новый, ранее не описанный, фермент в плазме крови человека (транс-сиалидаза), осуществляющий атерогенную модификацию липопротеидной частицы – десалирование.

2. Предотвращение поступления липидов в клетку. Модифицированные липопротеиды низкой плотности взаимодействуют с клеткой не через обычные рецепторы к апобелку, а через нерегулируемые неспецифические пути, включающие захват частиц скэвенджер-рецептором и фагоцитоз агрегатов модифи-

цированных липопротеидов. Предотвращение агрегации модифицированных липопротеидов представляется наиболее перспективным способом подавления неконтролируемого накопления внутриклеточных липидов.

3. Активация процессов липидного обмена в клетках. Существует два основных внутриклеточных фермента, ответственных за метаболизм холестерина. Холестеринэстераза способствует гидролизу накапливающихся эфиров холестерина, а ацилкоэнзим А-холестерин-ацилтрансфераза (АХАТ) стимулирует синтез новых эфиров холестерина. В этом плане перспективными являются воздействия, повышающие активность холестеринэстеразы и подавляющие активность АХАТ; в итоге должно происходить уменьшение количества эфиров холестерина в клетке.

4. Активация механизмов обратного транспорта холестерина. Избыток холестерина уходит из клеток благодаря липопротеидам высокой плотности. Поэтому повышение количества таких частиц в крови и усиление их акцепторной способности должно приводить к снижению уровня холестерина в клетках, и, следовательно, торможению процессов атерогенеза.

При оценке влияния какого-либо внешнего воздействия, лекарственного или нелекарственного, на начальные проявления атеросклероза на клеточном уровне, изучение вышеперечисленных механизмов воздействия на содержание липидов в клетках является весьма трудоемким процессом. Тем не менее, можно напрямую оценивать интегральный эффект подобного воздействия, измеряя уровень внутриклеточных липидов, не затрагивая более глубоких механизмов, лежащих в основе антиатерогенного действия препаратов.

В этой связи неудивительно, что уже разработана клеточная тест-система для изучения процессов атерогенеза на клеточном уровне [142]. Это – первичная культура клеток, выделенных из интимального слоя аорты человека. Если клетки выделены из непораженных атеросклерозом участков, то они характеризуются нормальным содержанием внутриклеточных липидов, низкой пролиферативной активностью, низкой скоростью синтеза компонентов соединительнотканного матрикса. Такая культура – удобная модель для изучения ранних

стадий атерогенеза, а именно, процессов внутриклеточного накопления липидов и следующих за ним патологических процессов. Кроме того, в условиях такой клеточной тест-системы можно оценивать антиатерогенный потенциал различных веществ, то есть их способность предотвращать накопление холестерина в клетках. Напротив, если клетки выделены из областей атеросклеротических поражений, они разительно отличаются от нормальных клеток, прежде всего, по содержанию внутриклеточных липидов, и являются прекрасной моделью для изучения эффективности антиатеросклеротических воздействий, которые по определению должны приводить к снижению уровня холестерина, уже накопленного в клетках.

Два интегральных показателя (атерогенность сыворотки крови и содержание внутриклеточных липидов) дали возможность разработки тест-системы для оценки проатерогенных или антиатерогенных свойств лекарственных и нелекарственных средств (так называемой модели исследований *ex vivo*). Сущность этой модели состоит в следующем. Человек с известной атерогенностью сыворотки крови однократно принимает исследуемый препарат (например, БАД), и у него через определенные интервалы времени после приема препарата берут кровь на исследование. Сыворотку крови добавляют в клеточную культуру и оценивают, насколько прием препарата изменил ее атерогенные свойства, то есть в какой степени изменяется индуцированное сывороткой крови накопление холестерина в клетках после приема препарата по сравнению с исходными показателями атерогенности. Этот подход позволяет не только установить направленность эффекта препарата, но также оценить его выраженность и длительность.

При использовании этого подхода изучено влияние множества препаратов, как лекарственных, так и нелекарственных, на атерогенные свойства сыворотки крови [63, 21]. Так, было установлено, что многие средства обладают прямым антиатерогенным действием.

Среди них – статины, ингибиторы АХАТ, антагонисты кальция, простациклины, ингибиторы липоксигеназы, антиоксиданты, полиненасыщенные жирные

кислоты, экстракты высших грибов, и, что очень важно, биологически активные компоненты чеснока и ряда других растений, в том числе лекарственных.

В наибольшей степени оказались интересными природные БАВ, обладающие антиатерогенным действием, поскольку именно они стали материальной основой для разработки БАД, предназначенных для патогенетической профилактики атеросклероза.

Таким образом, с учетом массовой распространенности субклинического атеросклероза решается задача разработки БАД для антиатерогенной и антиатеросклеротической терапии, основанной на подавлении процессов внутриклеточного накопления холестерина в сосудистой стенке. В клеточных моделях *in vitro* и *ex vivo* был проведен скрининг биологически активных веществ натурального происхождения и растительных препаратов. Из растений, обладающих антиатерогенным действием, наибольшее внимание привлек чеснок (*Allium sativum*).

На модели была оценена антиатерогенная активность 16 натуральных продуктов с высоким содержанием изофлавоноидов [60]. Четыре из них: экстракт виноградных косточек, чесночный порошок, лист зеленого чая и шишки хмеля, подходящие по содержанию и составу изофлавоноидов, обладали высокой антиатерогенной активностью. Эти 4 продукта были выбраны в качестве натуральных компонентов БАД Каринат. Каринат предназначен для менопаузальных женщин. Изофлавоноиды, входящие в состав Карината, рассматриваются как альтернатива заместительной гормональной терапии, способные снизить симптоматику климактерия. Антиатеросклеротическая активность Карината должна снизить риск сердечно-сосудистых заболеваний, повышенный у постменопаузальных женщин. Кроме того, в клинических исследованиях Каринат снижал риск онкологических заболеваний.

Разработаны также и клеточные модели для поиска БАД прямого антиатеросклеротического действия, основанного на оттоке холестерина из клеток сосудистой стенки. Отток холестерина, являющийся составной частью механизма обратного транспорта холестерина в организме – это обратная сторона накоп-

ления холестерина в артериальных клетках. Именно накопление внутриклеточного холестерина и его отток определяют, произойдет ли ретенция (удержание) холестерина в сосудистой стенке. Стимуляция оттока холестерина не менее важна для устранения риска развития атеросклероза, чем предотвращение накопления внутриклеточного холестерина. На клеточном уровне отток холестерина – это проявление регрессии атеросклероза.

Полученные данные позволяют с оптимизмом рассматривать возможность применения разработанных моделей для создания новых антиатеросклеротических БАД и для изучения механизмов их действия.

3.5. Биотестирование БАД на мутагенность и идентификация потенциально опасных соединений

Безопасность пищевых продуктов (включая БАД) контролируется по номенклатуре показателей, представленных в нормативных документах «Санитарные Правила и Нормы» (СанПиН 2.3.2.1078–01), утвержденных Министерством Здравоохранения РФ. В пищевых продуктах нормируется содержание основных химических загрязнителей, представляющих опасность для здоровья человека. Так, например, п. 3.11 СанПин гласит: «Во всех видах продовольственного сырья и пищевых продуктов контролируются пестициды: гексахлорциклогексан (альфа, бета, гамма-изомеры), ДДТ и его метаболиты. В зерне и продуктах переработки контролируются также ртутьорганические пестициды, 2,4-Д кислота, ее соли и эфиры.

В рыбе и продуктах переработки контролируется также 2,4-Д кислота, ее соли и эфиры», а п. 3.13 констатирует, что «Санитарно-эпидемиологическая экспертиза продовольственного сырья и пищевых продуктов, содержащих пестициды, осуществляется в соответствии с действующими гигиеническими нормативами содержания пестицидов в объектах окружающей среды». Однако, например, рыбохозяйственные ПДК разработаны для многих классов пестицидов, тогда как в СанПиН 2.3.2.1078-01 входят только некоторые из них.

Кроме пестицидов, из органических загрязнителей СанПиН контролируют полихлорированные бифенилы. Бенз(а)пирены контролируются в копченых рыбе и рыбопродуктах.

В табл. 3.15 приводятся допустимые нормы содержания органических загрязнителей в рыбе, тканях морских животных, в печени рыб, а также в жирах и БАД, полученных из рыб и морских животных.

Таблица 3.15. Допустимые уровни содержания органических загрязнителей в рыбе, нерыбных объектах промысла и в продуктах, вырабатываемых из них

1.3.1.* Рыба живая, сырец, охлажденная, мороженая, фарш, мясо морских млекопитающих		
Нормируемые соединения	Допустимые уровни, мг/кг, не более	Вид продукта, в котором нормируется данное соединение
1	2	3
Нитрозамины: сумма НДМА и НДЭА	0,003	***
Пестициды **		
Гексахлорциклогексан альфа, бета, гамма-изомеры	0,2	Морская рыба, мясо морских животных
Гексахлорциклогексан альфа, бета, гамма-изомеры	0,03	Пресноводная рыба
ДДТ и его метаболиты	0,2	Морская рыба, мясо морских животных
ДДТ и его метаболиты	0,3	Пресноводная рыба
ДДТ и его метаболиты	2,0	Осетровые, лососевые, сельдь жирная, балычные изделия
2,4-D кислота, и ее соли и эфиры	не допускается	***
Полихлорированные бифенилы	2,0	***
Бенз(а)пирен	0,001	Копченая рыба

Окончание таблицы 3.15

1	2	3
1.3.5. Печень рыб и продукты из нее		
Гексахлорциклогексан альфа, бета, гамма-изомеры	1,0	***
ДДТ и его метаболиты	3,0	***
Полихлорированные бифенилы	5,0	***
1.7.8. Жир пищевой из рыбы и морских млекопитающих, использующийся в качестве диетического и профилактического питания.		
Гексахлорциклогексан (альфа, бета, гамма-изомеры)	0,1	***
ДДТ и его метаболиты	0,2	***
Полихлорированные бифенилы	3,0	***
1.10.9. БАД на основе рыбы, морских беспозвоночных ракообразных, моллюсков и др. морепродуктов, растительных морских организмов (водоросли и пр.)		
Гексахлорциклогексан (альфа, бета, гамма-изомеры)	0,2	***
ДДТ и его метаболиты	2,0	***
Гептахлор	не допускается	***
Алдрин	не допускается	***

* – Цифрами обозначены разделы СанПиН 2.3.2.1078–01.

** – Необходимо контролировать остаточные количества и тех пестицидов, которые были использованы при производстве продовольственного сырья.

*** – В том случае, если графа не заполнена, нормирование производится для всех указанных выше продуктов и БАД.

С позиций сегодняшнего дня представляется, что перечень органических загрязнителей не включает целый ряд канцерогенных и мутагенных соединений. Однако, присутствие в БАД мутагенных и канцерогенных соединений представляет серьезную опасность, с учетом того, что эти продукты могут при-

ниматься на протяжении длительного периода и даже всей жизни и, следовательно, возможно накопление мутагенных и канцерогенных соединений в различных тканях человека до критических концентраций (см. Обзор литературы).

С другой стороны, в биологических объектах, в первую очередь, в тканях промысловых рыб, регистрируют все возрастающее накопление опасных для человека загрязнителей [8].

БАД нередко производят с помощью выделения и концентрирования активных веществ из биологических тканей, в том числе и из растений, водорослей, промысловых рыб, морских животных. Естественно, что в ходе получения БАД возможно их загрязнение токсикантами, содержащимися в этих гидробионтах.

Таким образом, в реальных условиях загрязнения среды в продукты питания (к которым законодательно относятся и БАД) могут попадать десятки и сотни токсичных веществ, часть из которых, к тому же, может трансформироваться в организме с образованием еще более опасных соединений, чем исходные (например, в системе метаболической активации цитохрома Р-450).

Проблема усугубляется еще и тем, что в основе большинства официальных методов контроля безопасности пищевых продуктов лежит принцип целевого определения, ориентированного на анализ конкретных веществ, в то время как из окружающей среды в пищу попадают самые различные токсиканты, которых особенно много в морских продуктах. Следовательно, современные СанПиН не учитывают присутствия в продуктах питания потенциально опасных, но ненормируемых веществ.

Для определения возможного присутствия в БАД мутагенных и канцерогенных соединений мы провели испытание в тесте Эймса *Salmonella*/микросомы с системой метаболической активацией из печени крыс таких БАД, как «Алисат» и «Алликор», а также двух образцов рыбьего жира (включая одну БАД) и одного образца жира тюленя, полученных из различных источников (см. раздел «Материалы и методы»).

Экстракты «Алисата» и «Алликор» не проявляли мутагенного эффекта ни на одном из штаммов сальмонеллы (табл. 3.16). Более того, были продемонст-

рированы антимутагенные свойства экстрактов в присутствии стандартного мутагена аминокантрацена.

Таблица 3.16. Испытание в тесте Эймса Сальмонелла/микросомы БАД «Алисат» и «Алликор»

Образец	Штаммы сальмонеллы			
	ТА-98		ТА-100	
	+ МА	- МА	+ МА	- МА
ДМСО	1	1	1	1
2-аминоантрацен	13	1,1	7	0,8
Алисат	0,9	0,8	1,1	1,2
Алликор	1,1	0,9	1,2	1,1
Алисат+ 2- аминокантрацен	5,7	–	3,4	–
Алликор +2-аминоантрацен	4,2	–	5,7	–

Примечание: в табл. 3.16 приведены средние данные трех опытов в виде отношения количества колоний на чашке в опыте к контролю (ДМСО). +МА – в присутствии, – МА без системы метаболической активации. Достоверное превышение числа колоний ревертантов над контролем $p < 0,01$ выделено.

По-видимому, антимутагенный эффект связан со способностью биологически активных веществ чеснока связывать мутагенные соединения, снижая таким образом их генотоксичность. Анализ мутагенности экстрактов трех образцов жира приведен в табл. 3.17.

Как видно из табл. 3.17, практически все экстракты жира обладали генотоксичностью. При этом мутагенный эффект проявлялся как на штамме ТА 100, так и на штамме ТА 98, что говорит о присутствии мутагенов, вызывающих мутации типа сдвига рамки считывания и мутации типа замены оснований. Мутагенный эффект проявлялся только в присутствии фракции S9 (система метаболической активации из печени, индуцированная Арохлором 1254).

Таблица 3.17. Испытание в тесте Эймса Сальмонелла/микросомы экстрактов рыбьего жира и покровного сала тюленя

Образец	Штаммы сальмонеллы			
	ТА-98		ТА-100	
	+ МА	- МА	+ МА	- МА
ДМСО	1	1	1	1
2-аминоантрацен	13	1,1	7	0,8
Жир из печени макруруса	2,9	0,8	3,1	1,2
Жир из покровного сала тюленя	5,7	0,9	2,2	1,1
БАД из жира печени трески	3,2	1,4-	3,4	0,8

Таким образом, в образцах рыбьего жира выявлены промутагенные соединения, т.е. загрязнители, мутагенный эффект которых проявляется после метаболической активации в системе цитохрома Р-450. К таким соединениям относится ряд полициклических ароматических углеводородов (например, бенз(а)пирен, антрацен, аминифлуорен и др., а также некоторые хлорорганические соединения, пестициды).

Наиболее сильно выраженный мутагенный эффект проявили образцы жира тюленя. Это согласуется с рядом ранее полученных данных, свидетельствующих о значительном загрязнении тканей морских млекопитающих мутагенными и канцерогенными соединениями [33,148].

Для выяснения химической структуры генотоксикантов, проявивших мутагенный эффект в тесте Эймса, мы провели анализ экстрактов этих образцов жира методом ГХ-МС.

Результаты анализа представлены в виде сводной табл. 3.18.

Во всех трех образцах определено около ста соединений природного происхождения. В образцах жира обнаружены хлорсодержащие органические соединения – изомеры три-, тетра-, пента- и гексахлорбифенилов, а также пестицид ДДТ и его метаболиты ДДЭ и ДДД.

Таблица 3.18. Приоритетные загрязняющие веществ в экстрактах рыбьего жира и покровного сала тюленя

Соединение	Концентрация (мкг/кг) в образцах БАД		
	Жир из печени макруруса	Жир из покровного сала тюленя	БАД из жира печени трески
ДДТ	5,4	1,3	1,4
ДДЭ	53,8	3,8	29,5
ДДД	10,9	0,1	2,9
Нитротолуол	—	130	—
Нафталин	101,3	80	62,5
Диметилнафталины	26,9	32,1	33,4
Метилнафталин	13,5	11,8	16,6
Метилбифенил	—	3,4	—
Дигидронафталины	2234	2628,5	8354,3
Фенантрен	72,8	112,4	185,9
Антрацен	—	1,0	—
Дибензофуран	—	—	—
Диметилфталат	—	—	—
Бифенил	13,2	11,9	17,4
Диэтилфталат	—	—	—
Изобутилфталат	—	45,5	—
Дибутилфталат	505,4	164,8	—
Бис(2-этилгексил)фталат	—	—	—
Диоктилфталат	—	—	—
Нафтены	9472,1	903,6	5105,2
Алкилбензолы	6565,3	2337,9	6379,4
Трихлорбифенил (4 изомера)	6,2	17,0	13,5
Тетрахлорбифенил (9 изомеров)	19,0	13,2	18,4
Пентахлорбифенил (8 изомеров)	25,9	6,6	18,7
Гексахлорбифенил (8 изомеров)	18,8	3,4	17,3

Примечание: в таблице выделены соединения, обладающие выраженным мутагенным эффектом в тесте Эймса.

В каждом из образцов присутствуют углеводороды нефтяного происхождения: полициклические ароматические углеводороды, бифенилы, тетрагидронафталины, индены, алканы нормального и разветвленного строения, алкилбензолы, нафтенy. В образце жира из покровного сала тюленя обнаружены два изомера нитротолуола.

В каждом из образцов обнаружены фталаты, которые используются в качестве пластификаторов. Максимальные количества фталатов обнаружено в жире из печени трески. Это можно объяснить большей загрязненностью жировых тканей рыбы северных морей, в которых накапливаются органические экотоксиканты [33].

Особое внимание следует уделить обнаруженным в пробах полициклическим ароматическим углеводородам. Судя по всему, они поступают в водные экосистемы с нефтепродуктами и продуктами нефтепереработки, включая дизельное топливо. Среди ПАУ мы склонны обратить особое внимание на антрацен и фенантрен, так как эти соединения обладают выраженным мутагенным эффектом в тесте Эймса, являясь промутагенами и проканцерогенами. Кроме этого, за мутагенный эффект в тесте Эймса может быть ответственен ДДЦ, генотоксичность которого доказана в ряде тестов [148].

Следует отметить, что ГХ-МС не выявляет всех возможных соединений, обладающих мутагенным эффектом, так как проводящийся на основе существующих библиотек стандартов анализ включает только около 80 % потенциальных загрязнителей.

Тем не менее, исходя из полученных данных, можно предположить, что за мутагенный эффект, зарегистрированный в экстрактах жира, отвечают метаболиты ДДТ, ПАУ и, возможно, нитротолуол. Сравнительное сопоставление содержания нормируемых токсикантов в экстрактах исследуемых жиров с данными СанПиН на рыбий жир приведено в табл. 3.19.

Таблица 3.19. Сравнение концентраций органических загрязнителей, содержащихся в жире рыб и жире тюленя, с допустимыми уровнями по СанПиН 2.3.2.1078–01 (раздел 1.3.1)

Соединения	Концентрация (мг/кг) в образцах рыбьего жира			
	Допустимые уровни	Жир из печени макруруса	Жир из покровного сала тюленя	Жир из печени трески
ДДТ и его метаболиты	0,2	0,071	0,0052	0,038
Гексахлорциклогексан	0,1	—	—	—
Полихлорированные бифенилы	3,0	0,699	0,402	0,679

Из этой таблицы видно, что по нормируемым токсикантам все образцы соответствуют требованиям СанПиН 2.3.2.1078–01. Действительно, использованная в наших экспериментах продукция, как следует из сопроводительной документации, соответствовала требованиям нормативной документации по показателям допустимых уровней окислительной порчи, пределов содержания токсичных элементов, пестицидов, полихлорбифенилов и радионуклидов.

Тем не менее, в образцах рыбьего жира были обнаружены не прямые мутagens, вызывающие генные мутации двух видов. Масс-спектрометрия подтвердила присутствие в экстрактах жира потенциально опасных соединений, в том числе обладающих мутагенными и канцерогенными свойствами.

Несмотря на то, что концентрации обнаруженных ненормируемых токсикантов сравнительно невелики, а концентрации обнаруженных нормируемых токсикантов не превышают допустимых уровней, тем не менее, суммарное содержание загрязнителей довольно велико, а проявление мутагенного эффекта экстрактов жиров в тесте Эймса говорит о потенциальной опасности длительного приема таких продуктов для человека.

Полученные результаты ставят вопрос о необходимости более тщательного контроля пищевых продуктов и БАД как методами биотестирования, так и

современными химико-аналитическими методами (в первую очередь – методом МС-ГХ). По-видимому, в связи с ростом загрязнения морских экосистем органическими токсикантами представляется целесообразным расширить их перечень в требованиях СанПиН и включать тесты, позволяющие обнаруживать мутагенные соединения, в систему контроля безопасности БАД, получаемых из гидробионтов.

Действительно, Статья 3.30. СанПиН гласит «Биологически активные добавки к пище являются источниками пищевых, минорных, про- и пребиотических природных (идентичных природным) биологически активных веществ (компонентов) пищи, обеспечивающими поступление их в организм человека при употреблении с пищей или введении в состав пищевых продуктов. Биологически активные вещества, компоненты пищи и продукты, являющиеся их источниками, используемые при изготовлении биологически активных добавок к пище, должны обеспечивать их эффективность и не оказывать вредного воздействия на здоровье человека». И далее: «Биологически активные вещества, компоненты пищи, и продукты, являющиеся их источниками, представляющие по данным современных научных исследований опасность для жизни и здоровья человека при использовании их в составе биологически активных добавок к пище, не допускаются к использованию при изготовлении биологически активных добавок к пище».

При разработке СанПиН в ряде случаев используется тест Эймса для определения мутагенной активности отдельных соединений, однако БАД, получаемые из тканей морских животных, до последнего времени в тесте Эймса не анализировались.

В то же время нельзя не отметить, что последние усилия Роспотребнадзора как основного органа, контролирующего безопасность БАД, направлены на совершенствование процедуры их регистрации (Постановления №2 от 17.01.2013 г. «О надзоре за биологически активными добавками к пище»). В данном документе указывается, что Роспотребнадзор не будет регистрировать БАД, которые содержат ингредиенты, включенные в государственную фарма-

копею, и другие ингредиенты природного происхождения, не имеющие традиций пищевого применения. Однако запрет регистрации целой группы БАД противоречит как действующим нормативным документам Таможенного союза – Единым санитарно-эпидемиологическим и гигиеническим требованиям к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю), так и национальным документам (СанПиН 2.3.2.1290–03, СанПиН 2.3.2.1078–01, МР 2.3.1.1915–04). Таким образом, на сегодняшний день изменения в действующее законодательство Таможенного союза еще не внесены, а в России уже введены ограничения по регистрации БАД, содержащих, например, растительные ингредиенты.

В Постановлении говорится о дифференцировании системы регистрации и обращения БАД, но очевидно существенное ограничение количества ингредиентов, которые до настоящего момента на законном основании можно было использовать при разработке и производстве БАД. Открытым остается вопрос, что делать с традиционными пищевыми ингредиентами, включенными в государственную фармакопею, а таких немало: фенхель, черника, мята, рыбий жир и т.п. Подобные инициативы напрямую противоречат мировой практике.

ВЫВОДЫ

1. В экспериментах с БАД, изготовленными из разных видов растительного сырья (чеснока, черники, масла зародышей пшеницы), показана целесообразность анализа содержания минорных компонентов пищи (МКП) как индикаторных соединений для контроля качества и подтверждения подлинности биодобавок. При этом определяемыми МКП для БАД сходного назначения являлись аллиин, аллицин, аджоен (чесночные БАД), антоцианины (черничные БАД) и непредельные фитостерины (БАД из масла зародышей пшеницы).

2. Широкомасштабному использованию контроля МКП в биодобавках для их добровольной сертификации препятствуют в настоящее время два фактора: недостаточная изученность действующего начала БАД (неполная идентификация МКП) и несовершенство нормативных документов, регулирующих как нормы потребления МКП, так и применение официальных методов их анализа.

3. При изучении высушенного растительного сырья для производства БАД (чеснока и солодки), в том числе полученного с помощью сублимационной сушки, обнаружена вариабельность содержания в нем МКП (аллиина, алличина и аджоена в чесноке, ликвирицина и глицирризина в солодке), что следует принимать во внимание при контроле качества закупаемого сырья и организации его переработки в конечную продукцию.

4. Установлено, что при переработке растительного сырья (сушке, концентрировании, получении настоек, вытяжек и т.п.) не всегда рационально применение дорогостоящих методов экстракции (например, сверхкритической экстракции углекислым газом), поскольку некоторые МКП достаточно устойчивы и извлекаются из сырья практически без потерь более простыми способами.

5. При определении научно обоснованных сроков хранения БАД, особенно БАД-парафармацевтиков, следует учитывать изменение содержания в них индикаторных МКП при хранении, а для БАД на основе сырья с высокой концентрацией липидов необходимо учитывать степень накопления сложных продук-

тов их превращений (альдегидов и кетонов, карбоновых кислот, сложных эфиров), образующихся в процессе перекисного окисления липидов.

6. Биотестирование на планариях целесообразно использовать для предварительной оценки эффективности и качества биодобавок. Этот экспресс-метод обладает весьма высокой чувствительностью, которая не уступает чувствительности аналитических методов контроля. Перспективными для скрининга и изучения механизмов действия БАД являются и тест-системы на основе клеточных культур.

7. В БАД и жировом сырье из рыб и морских млекопитающих обнаружены непрямые мутагены, вызывающие генные мутации двух видов. Масс-спектрометрия подтвердила присутствие в изученных образцах потенциально опасных соединений, в том числе обладающих мутагенными и канцерогенными свойствами. В связи с ростом загрязнения морских экосистем органическими токсикантами, представляется целесообразным расширить их перечень в требованиях СанПиН и включать тесты, позволяющие обнаруживать мутагенные соединения, в систему контроля безопасности БАД, получаемых из гидробионтов.

4. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антанович Е.А., Седокур Л.К. Качество продуктов питания в условиях химизации сельского хозяйства. – М., 1990 – С.238.
2. Арский Ю.М. Диоксины. Супертоксиканты XXI века. Медико-биологические проблемы // Москва, 1998. – №4 – С.10–17.
3. Аханова В.М., Романова Е.В. Гигиена питания. – Ростов-на-Дону: Феникс, 2000. – С.384–385.
4. БАД-Бизнес. Ежемесячный оперативный информационный бюллетень. – 2012. – №5. – С. 1–8.
5. Барсегян Г.Г., Бутенко О.Б., Залепугин Д.Ю., Королев В.Л., Тилькунова Н.А. Влияние компонентов сверхкритических экстрактов чеснока на различные виды адаптивного поведения //II Всерос. конф. «Химия и технология растительных веществ», Казань. – 2002. – С. 282–290.
6. Беляев Е.Н., Иванов А.А., Чибураев В.И. Государственный санитарно-эпидемиологический надзор за оборотом биологически активных добавок к пище // Мат-лы IV Междунар. симпоз. «Биологически активных добавок к пище: XXI век». – М.: Vip Publishing, 2000 – С.144.
7. Беспалов В.Г., Некрасова В.Б. Биологически активные добавки к пище // Питание и здоровье. Биологически активные добавки. – 2000. – №1. – С. 38–44.
8. Биогенные компоненты воды и экологическая безопасность рыбной продукции / Н.В. Попова, Л.Н. Маркова // Сб. тр. междунар. науч.-практ. конф. – Якутск: Сфера, 2010. – С.139–142.
9. Богатырев А.Н., Тутельян В.А., Применение биологически активных добавок в пищевых продуктах // Ваше питание. – 2010. – №1. – С.17–20.
10. Бочкарев А.В., Кондратьев В.П., Краснова В.С. и др. Семь нот менеджмента: настольная книга руководителя / Под ред. В.С. Красновой и А.Н.Привалова. – М.: ЗАО «Эксперт», 1998. – С.124.
11. Брагинский Л.П., Л.А. Сиренко. Всесторонний анализ токсикологической опасности поверхностно – активных веществ для гидробионтов // Гидробиологический журнал. – 2003. – т. 39. – № 3. – С. 115–118.
12. Брехман И.И. Человек и биологически активные вещества. – М.: Наука, 1980. – 120 с.
13. Винтер Гриффит. Справочник. Витамины, травы, минералы и пищевые добавки. – М.: Торговый Дом Гранд, 2000.
14. Волгарев М.Н., Тутельян В.А. Питание и здоровье населения России // Биологически активные добавки – нутрицевтики и их использование с профи-

лактической и и лечебной целью при наиболее распространенных заболеваниях / Мат-лы III Междунар. симпозиума. Тюмень, 1997. – С.3–7.

15. Гигиенические требования по применению пищевых добавок: Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы (СанПиН 2.3.2.1293–03). М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2003. – 79 с.

16. Гичев Ю.П. О биологически активных добавках к пище и их важной роли в поддержании здоровья // Российский рынок БАД. – 2001. – №5. – С. 8–10.

17. Гичев Ю.Ю., Гичев Ю.П. Руководство по микронутриентологии. Роль и значение биологически активных добавок к пище. М.: Триада-Х, 2006. – 312 с

18. Гнускина А.А. Кризис: бренд или тренд? // Фармацевтический вестник. 2009. – № 19 (551). – С.82.

19. Головенко И.А. Карасева Н.И. Сравнительная биохимия чужеродных соединений. – Киев: Наукова думка, 1983. – С. 201.

20. Горбачева Н.Ю. Качество, эффективность и безопасность. Право на информированность // Рынок БАД. – 2004. – №12. – С. 20–25.

21. Горчакова Т.В., Супрун И.В., Собенин И.А., Орехов А.Н. Применение натуральных продуктов в антицитокиновой терапии // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2007. – Т. 143. – С. 284–288.

22. Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 1998 г.»

23. Григорьев Д.К. Анализ рынка биологически активных добавок // Бизнес-медицина. – 2005. – № 8–9. – С. 34–36.

24. Гришко С.М. Исследование потребительских предпочтений // Бизнес-информ.– 1997.– № 23.– С. 72–75.

25. Дегтярева Т.Д., Привалова Л.И. с соавт. Использование некоторых БАД в комплексе средств биологической профилактики профессиональных экологически обусловленных интоксикаций. Биологически активные добавки к пище: XXI век: Мат-лы IV Междунар. симпозиума.– М., 2000. – С.74–75.

26. Демин В.Ф., Ключников С.О., Болдырев В.Б. Биологически активные добавки к пище. Проблемы и перспективы применения в педиатрии // Тезисы докл. науч.-практич. конф. «Биокорректоры: возможности, опыт, перспективы». Челябинск, 2005. – С. 18.

27. Донченко Л.В., Надикта В.Д. Безопасность пищевой продукции. – М.: Пищепромиздат, 2001. – 528 с.

28. Древаль Р. Рынок БАД. Состояние и перспективы развития рынка БАД России в 2004–2006 гг. // Рынок БАД. – 2005. – №12. – С. 9–12.

29. Дубинин Н.П. Генетический результат загрязнения окружающей среды. – М.: Наука, 1977. – С. 3–20.

30. Егоров Н.Н., Шипулин Ю.К. Особенности загрязнения подземных вод и грунтов нефтепродуктами // Водные ресурсы. – 1998. – Вып. 5. – С.598–602.
31. Егорова Г.К., Иванов А.А., Пилат Т.Л. Классификатор биологически активных добавок к пище // Новая аптека. – 2000. – №8. – С.31–36.
32. Емельянова Т.П. Витамины и минеральные вещества: Полная энциклопедия // СПб.: ИД «ВЕСЬ», 2001. – С.72–76.
33. Загрязнения Арктики: Доклад о состоянии окружающей среды Арктики АМАП Программа Арктического мониторинга и оценки. – СПб., 1998. – 71 с.
34. Капков В.И. Водоросли как биомаркеры загрязнения тяжелыми металлами морских прибрежных экосистем: Автореф. дис. ...д-ра биол. наук. – М., 2000. – 26 с.
35. Карагодин В.П. Биодобавки на российском рынке // Новая аптека. – 2011. – №12. – С. 23–27.
36. Карагодин В.П. Комплексное исследование российского рынка биологически активных добавок к пище // Ремедиум. – 2009. – № 6. – С. 28–35
37. Карагодин В.П. Настоящее и будущее биологически активных добавок // REMEDIUM. – 2001. – №11. – С. 17–23.
38. Карагодин В.П. Основные показатели рынка БАД в России // Провиант. – 2012. – №1. – С. 49–53.
39. Карагодин В.П. Планирование как синоним успеха // Фармацевтический вестник. – 2002. – № 25(264). – С. 4.
40. Карагодин В.П. Роль вузовской науки в формировании цивилизованного российского рынка биологически активных добавок к пище // Альтернативная медицина. – 2010. – №8. – С.17–19.
41. Ключин Д.А., Петунин Ю.И. Доказательная медицина. Применение статистических методов. – М.: Диалектика, 2007. – 320 с.
42. Княжев В. А., Большаков О.В., Тутельян В.А. К вопросу о здоровом питании// Ваше питание. – 2000 – №1. – С. 5–9.
43. Косова И.Н. Потягова Н.В. БАД на рынке России // Фармацевтический вестник. – 2010. – № 6.– С.7–9.
44. Котелевцев С.В., Козлов Ю.П. Экологический мониторинг методами физико- химической биологии // Биол.науки., 1986. – №1. – С. 19–30.
45. Котелевцев С.В., Стволинский С.Л., Бейм А.М. Экологотоксикологический анализ на основе биологических мембран. – М.: Изд-во МГУ, 1986 – С. 103.
46. Котелевцев С.В., Степанова Л.И. Биотестирование канцерогенных и мутагенных компонентов в водных экосистемах //Журнал Российского химического общества. – 1994. – N 1. – С. 87–93.

47. Котелевцев С.В. и др. Эколого-токсикологический анализ на основе биологических мембран. – М.: Изд-во МГУ, 1986. – С.40–47.
48. Крылов А.А., Череватая Е.Н. Анализ рынка и потребителей биологически активных добавок // ФАРМ-индекс. – 2005. – № 196. – С. 13–17.
49. Крылов А.А., Череватая Е.Н. Анализ рынка биологически активных добавок // Рынок БАД. – 2005. – № 4(24). – С. 45–49.
50. Мельников А.Ю. Эти загадочные пищевые добавки // REMEDIUM. – 1998. – №1. – С. 20–21.
51. Методические рекомендации МР 2.3.1. 1915–04. Рекомендуемые уровни потребления пищевых и биологически активных веществ. – М., 2004.
52. Мировые эксперты: Российский рынок БАД — самый динамично развивающийся в мире // Фармацевтический вестник. – 2009. – № 6(28). – С.42.
53. Морфологическая активность регуляторных нейропептидов и регенерация планарий / Под. ред. И.М. Шейман, Н.Д. Крещенко // Биомедицина. – 2008. – №1. – С. 79–87.
54. МУК 2.3.2.721–98. Определение безопасности и эффективности биологически активных добавок к пище. – М., 1999.
55. МУК 2.3.2.971–00. Порядок санитарно-эпидемиологической экспертизы технических документов на пищевые продукты. – М., 2000.
56. МУК 4.2.727–99. Гигиеническая оценка сроков годности пищевых продуктов. – М., 2000.
57. Муравьева Д. А., Самылина И. А., Яковлев Г. П.. Фармакогнозия. – М.: Медицина, 2002. – 656 с.
58. Недоговорова А.К. Динамика развития региональных рынков за 2003–2005 гг. // Рынок БАД. – 2005. – №08. – С. 20–25.
59. Нейман И.М. Канцерогены и пищевые продукты. М. – Медицина, 1972. – С.182.
60. Никитина Н.А, Собенин И.А, Мясоедова В.А, и др. Антиатерогенный эффект флавоноидов винограда в модели *ex vivo* // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2006. – Т. 141. – С. 660–663.
61. Орехов А. БАД: кому и зачем они нужны? // 9 месяцев. 2005. – №03. – С. 42–46.
62. Орехов А.Н. Мировой опыт. БАД в США: клинические исследования под контролем государства // Доктор Эд. 2007. – №4. – С. 46–48.
63. Орехов А.Н., Собенин И.А., Орехова В.А., и др. Клеточные модели для поиска веществ, способствующих обратному транспорту холестерина // Проблемы и перспективы современной науки. – 2011. – Т. 3. – С. 98–103.

64. Петрунec Э.А. БАД в профилактике и лечении желчнокаменной болезни // Тезисы докл. науч.-практич. конф. «Биокорректоры: возможности, опыт, перспективы». Челябинск, 2005. – С. 28.
65. Петтерман С.В. Китай. Нормативно-правовое регулирование и рынок в переходный период // Рынок БАД. – 2006. – №2(28). – С. 52–56.
66. Пища и пищевые добавки. Роль БАД в профилактике заболеваний / Под. ред. Ренсли Дж.: Пер. с англ. – М.: Мир, 2004. – 312 с.
67. Позняковский В.М., Австриевских А.Н., Вековцев А.А. Пищевые и биологически активные добавки. Кемерово.: Издат. объединение «Российские университеты», 2005. – 275 с.
68. Покровский А.А. Метаболические аспекты фармакологии и токсикологии пищи // М.: Медицина, 1997. – С. 90–94.
69. Покровский А.А. Метаболические аспекты токсикологии пищи. –М., 1979. – С.184.
70. Полторак В.А. Маркетинговые исследования: методы и технология.– Днепропетровск: Арт-Пресс, 1998. –136 с.
71. Постановление Госанэпиднадзора РФ от 15.09.1997 №21 «О государственной регистрации биологически активных добавок к пище».
72. Пронина Н. Б. Использование биоиндикаторов и биомаркеров в исследованиях растений и почв. – М., 2000. – С. 131–145.
73. Пронина Н.Б. Докл. ТСХА / Моск. с.-х. акад. им. Тимирязева, 2000. – Вып. 272. – С. 31–35.
74. Региональные особенности потребления БАД в России в 1-м полугодии 2006 г. // Фармэксперт. – 2006. – №10.
75. Результаты апробации пребиотика «Алликор» в условиях оздоровительной программы по профилактике респираторных и сердечнососудистых заболеваний / С.А. Сурнин, И.А. Собенин, В.П.Карагодин, А.Н. Орехов // Проблемы и перспективы современной науки. – 2011. – Т. 3. – С. 76–78.
76. Роева Н.Н. Безопасность продовольственного сырья и продуктов питания. – М., 2000. – С. 140–145.
77. Руженцова Т. А. Фитостерины в профилактике и лечении сердечно-сосудистых заболеваний //Лечащий врач. – 2010. – № 7. – С. 45.
78. Рыбакова Е.Ю. О возможном механизме, лежащем в основе метода биотестирования *in vitro* регуляторных белков, проявляющих биологическую активность в сверхмалых дозах / Конф. молодых ученых ИБР РАН. – 2004.
79. Савинова Т.Н. Химические загрязнения северных морей. – М., 1990. – С.145.

80. Симкалова Л.М. Добровольная сертификация как поступательное развитие нормативной базы биологически активных добавок к пище// Рынок БАД. – 2005. – №09. – С. 5–8.

81. Стволинский С.Л., Бейм А.М. Эколого-токсикологический анализ на основе биологических мембран. – М.: Изд-во МГУ, 1986. – С.106.

82. Таблетки раздора // Коммерсантъ-Деньги. – 2009. – № 45 (750).

83. Тиран А.И. Совершенствования технологии получения биологически активных веществ из растительного сырья с использованием газожидкостных и электрофизических методов // Автореф. дис. ... канд. техн. наук. – Краснодар, 2001. – 23 с.

84. Тирас Х.П., Лукьянов С.А., Лакирев А.В., Белоусов Л.В. Влияние головного активатора пресноводной гидры на регенерацию морских гидроидных полипов // Онтогенез. – 1986. – Т.17. – №1. – С.84–87.

85. Тирас Х.П., Сахарова Н.Ю. Прижизненная морфотерапия регенерации планарий// Онтогенез. – 1984. – Т. 15. – №1. – С. 41–47.

86. Тирас Х.П., Хачко В.И. Регенерация головного конца тела планарий: прижизненный компьютерный анализ // Простые нервные системы. – Л.: Наука, 1988. – С. 305–309.

87. Тирас Х.П., Шейман И.М. Морфогенетическая функция пептидов // Физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 1989. – №5. – С.618–626.

88. Туровская К.А. Административно-правовое регулирование общественных отношений в сфере обращения биологически активных добавок: Автореф. дис. ... канд. юр. наук. – Хабаровск, 2012. – 21 с.

89. Тутельян В.А. Биологически активные добавки в профилактическом и лечебном питании. Эволюция взглядов и подходов // Мат-лы 5-го междунар. симпозиума. – Красноярск, 2001. – С. 3–5.

90. Тутельян В.А. Биологически активные добавки – прорыв в медицине или большая авантюра? // Наука и жизнь. – 2006. – №6. – С. 30–35.

91. Тутельян В.А., Суханов В.А. БАД: пища или лекарство? // Фармацевтический вестник. – 2000. – № 30. – С. 18–19.

92. Уколов Р.К. Как в аптеке? // Профиль. 2010. – № 12 (663). – С. 18–20

93. Федеральный закон «О качестве и безопасности пищевых продуктов» от 2.01.2000 г. – М., 2000.

94. Федеральный Закон «О техническом регулировании», принятый Государственной Думой РФ 15.12.02. – М., 2002.

95. Федеральный реестр биологически активных добавок к пище. Изд.2, исправленное и дополненное. – М., 2002.

96. Фомин И.В. Биологически активные добавки к пище. Действие, классификация, сравнение // Тез. Регион. науч.-практич. конф. по результатам при-

менения БАД отечественного производства в комплексном лечении различных заболеваний. – Нижний Новгород: Нижегородская региональная медицинская ассоциация., 1998. – С.7.

97. Чемодуров Н. БАД ползучий // Коммерсантъ-Деньги. 2007. – № 17 (623). – С. 84.

98. Чепмен Дж. Практическая органическая масс-спектрометрия. – М.: Мир, 1988. – С. 129.

99. Чибураев В.И., Иванов М.А., Егорова Г.К. Нормативно-правовое регулирование рынка БАД. Проблемы. Перспективы // Рынок БАД. – 2002. – №2а. – С. 5–7.

100. Шабров А.В., Дадали В.А., Макаров В.Г. Биохимические основы действия микрокомпонентов пищи. – М.: Аввалон, 2003. – 184 с.

101. Шубина О.Г., Карпухин Д.Г., Кочеткова А.А. Фитостерины, их физиологические преимущества и возможности использования в пищевых системах // Пищевые ингредиенты: сырье и добавки. – 2004. – № 2. – С. 26–29

102. Шустов Е.П. Анализ каналов распространения БАД. Аптечный канал распространения // ФАРМ-индекс. – 2006. – № 211. – С. 14–16.

103. Шустов Е.П. Потребители БАД: характеристика // ФАРМ-индекс. – 2010. – № 205. – С. 23–27.

104. Эванс Дж.Р., Берман Б. Маркетинг: Пер. с англ./ Авт.предисл.и науч.ред.А.А.Горячева. – М.: Экономика, 1993. – С. 200.

105. Эллер К.И., Балусова А.С., Комарова Е.Л. Оценка подлинности растительных экстрактов, как сырья для БАД // Рынок БАД. – 2005. – №5. – С. 25–29.

106. Эллер К.И., Соловьва О.И. Аналитические подходы к определению действующих веществ и подлинности биологически активных добавок к пище // Биологически активные добавки к пище и проблемы здоровья семьи: Мат-лы V междунар. симп. – Красноярск, 2001. – С.282– 284.

107. Buser H.R. Health perspect. // Anal. Chem. – 1977. – №48. – 1553–1557. – P. 91–92.

108. Buser H.R. // Chromatogr. – 1975. – Vol.96.– №12. – P. 107.

109. Buser H.R. // Chromatogr. – 1976. – Vol.195. – P. 95–108.

110. Chagan L., Ioselovich A., Asherova L., Cheng J.W. Use of alternative pharmacotherapy in management of cardiovascular diseases // Am. J. Manag. Care. – 2002. – V.8. – №3. – P.270–285.

111. Chapman J.R., Int. // Mass Spec. Ion Phys. – 1982. – Vol.5. – P. 45.

112. Cochrane W.P., Singh J., Miles W., Wakeford B. // Chromatogr. – 1981. – Vol.16. – №1– P. 217.

113. Dahl S.G., Johnsen H., Lee C.R. // Biomed. Mass Spectrom. – 1982. – Vol.121. – №9.– P.534.

114. Davis B.A., Durden D.A., Boulton A.A. // *Chromatogr.* – 1982. – Vol.142. – №3. – P.219.
115. Duke J.A. *The Green Pharmacy Herbal Handbook: Your Comprehensive Reference to the Best Herbs for Healing*. Emmaus // Rodale Press. – 2000. – Vol.21. – P.114.
116. Eiceman G.A., Viau A.C., Karasek F.W. // *Anal.Chem.* – 1979. – Vol.19. – P. 52.
117. Elvidge D.A. // *Analyst.* – 1971. – Vol.71. – №11. – P. 96.
118. Erk S.D., Taylor M.L., Tiernan T.O. // *Chemosphere.* – 1979. – Vol.77. – №9. – P. 7–14.
119. Facchini F. et al. // *American Journal of Clinical nutrition.* – 1996. – Vol.136. – P.63–49.
120. Finlay E.M., Gaskell S.J. // *Clin. Chem.* – 1981. – Vol.161. – №7. – P. 27.
121. Gaskell S.J., Finlay E.M., Harper M.E. // *Biomed. Mass Spectrom.* – 1979. – Vol.211. – P. 113.
122. Gross M.L., Chess E.K., Lyon P.A., Crow F.W., Evans S., Tudge H., Int. // *Mass Spec. Ion. Phys.* – 1982. – Vol.123. – P. 42.
123. Hakata H., Tanabe S., Tatsukawa R., Amano M., Miyazaki N., Petrov E. Bioaccumulation profiles of polychlorinated biphenyls including coplanar congeners and possible toxicological implications in Baikal seal // *Environmental Poll.* – 1997. – Vol.95. – No 1. – P.57–65.
124. Harvan D.J., Hass J.R., Schroeder J.L., Corbett B.J. // *Anal. Chem.* – 1981. – Vol.121. – №4. – p. 53.
125. Harvan D.J., Hass J.R., Wood D. // *Anal. Chem.* – 1982. – Vol.31. – P. 54.
126. Harvey D.J., Leuschner J.T., Paton W.D. // *Chromatogr.* – 1980. – Vol.129. – №6. – P.202.
127. IADSA (Международная федерация ассоциаций производителей диетических/пищевых добавок). URL: www.iadsa.org (Дата обращения: 29.05.2011).
128. Intake of Garlic and Its Bioactive Components / H. Amagase, B.L. Petesch, H. Matsuura, S. Kasuga, Y. Itakura // *Journal of Nutrition.* – 2001. – Vol. 131. – P. 955–962.
129. Jones D., Curvall M., Abrahamsson L., Kazemi-Vaala E., Enzell C. // *Biomed. Mspectrom.* – 1982. – Vol.131. – №2 – P. 9.
130. Knekt P. et al. // *British Medical Jornal.* – 1996. – Vol.16. – P.312.
131. Kondrat R.W., Coors R.G. // *Anal.Chem.* – 1978. – Vol.91. – P. 50.
132. Kondrat R.W., VcClusky G.A., Coors R.G. // *Anal.Chem.* – 1978. – Vol.141. – P.50.

133. Kotelevtsev S. V., Stepanova L. I., Glaser V. M., Biomonitoring of Genotoxicity in Coastal Water. In book Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries / Kramer, K.J.M. ed. // CRC Press Inc. – 1993. – Vol.127. – №11. – P. 227–245.
134. Kucklick J.R., Bidleman T.F., McConnell L.L., Walla M.D. & Ivanov G.P. Organochlorines in the Water and Biota of Lake Baikal, Siberia. // Environ.Sci.Technol. – 1994. – Vol.81. – №6. – P.28, 31–37.
135. Kucklick J.R., Harvey H.R., Ostrom P.H., Ostrom N.E. & J Baker J.E. Organochlorine dynamics in the pelagic food web of Lake Baikal // Environ. Technol. Chem. – 1996. – Vol.15. – N.8. – P.138–140.
136. Lamparski L.L., Nestrick T.J. // Anal.Chem. – 1980. – Vol.136. – P.53.
137. Langhorst M.L., Shadoff L.A. // Anal.Chem. – 1980. – Vol.121. – P. 82.
138. Mansoor G.A. Herbs and alternative therapies in the hypertension clinic // Am. J. Hypertens. – 2001. – V.14. – №9. – P.971–975.
139. Mes J., Campbell D.S., Robinson R.N., Davies D.J.A. // Bull. Environ. Contam Toxicol. – 1979. – V.17. – P.196.
140. Millington D.S., Buoy M.E., Brooks G., Harper M.E., Griffiths K. // Bio-med. Mass Spectrom. – 1975. – Vol.154. – №6. – P. 219.
141. Millington D.S., Parr V.C., Hall K. // Annali di Chimica. – 1979. – Vol.124. – P. 69.
142. Morelli V., Zoorob R.J. Alternative therapies: Part I. Depression, diabetes, obesity // Am. Fam. Physician. – 2000. – V.62. – №5. – P.1051–1060.
143. National Institutes of Health Office of Dietary Supplements (ODS). URL: <http://ods.od.nih.gov> (Дата обращения: 19.05.2011).
144. Olie K., Vermeulen P.L., Hutzinger O. // Chemosphere. – 1977. – Vol.14. – №9. – P. 455–459.
145. Orekhov A.N., Tertov V.V. In vitro effect of garlic powder extract on lipid content in normal and atherosclerotic human aortic cells // Lipids. – 1997. – Vol.32. – P. 1055–1060.
146. Orekhov A.N., Tertov V.V., Kudryashov S.A., Khashimov Kh.A., Smirnov V.N. Primary culture of human aortic intima cells as a model for testing antiatherosclerotic drugs. Effects of cyclic AMP, prostaglandins, calcium antagonists, antioxidants, and lipid-lowering agents // Atherosclerosis. – 1986. – V.60. – №4. – P.101–110.
147. Oswald E.O., Albro P.W., McKinney J.D. // Chromatogr. – 1974. Vol.114. – №10. – p.98, 363–448.
148. Poliakova O.V. et al. Accumulation of persistent organic pollution in the food chain of Lake Baikal // Toxicological and environmental chemistry. – 2000. Vol.15. – № 3. – P. 75.

149. Prome D., Lacave C., Roussel J., Prome J.C. // Biomed. Mass Spectrom. – 1982. – Vol.124. – №2. – P. 9.
150. Safe S., Hutzinger O. Mass Spectrometry of Pesticides and Pollutants // Grc Press, Cleveland Ohio. – 1973. – Vol.181. – №8. – P.113–121.
151. Schaller H.C. Isolation and characterisation of a low-molecularweight substance, activating head and bud formation in hydra // Embryol. exp. Morphol. – 1973. – Vol. 29. – N1. – P.27–38.
152. Seymour M.P., Jefferies N.M., Floyd A.J., Notarianni L.J. // Anal.Chem. – 1987. – V.59. – №7 – P.247.
153. Shadoff L.A., Hummel R.A. // Biomed. Mass Spectrom. – 1978. – Vol.1. – №8. – P. 5–7.
154. Smith D.H., Djerassi C., Maurer K.H., Rapp U. // Am. Chem.Soc. – 1974. – Vol.18. – №5. – P. 96.
155. Spelling V.R., Janssen D., Wulf T., Frezenius Z. // Anal. Chem. – 1985. – Vol.91. – №12. – P.320.
156. Tarasova E.N, Mamontov A.A., Mamontova E.A., Klasmeier J., McLachlan M.S. Polichlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in Baikal seal. // Chemosphere. – 1989. – Vol.34. – No.11. – P.2419–2427.
157. Tou J.C., Zakett D., Caldecourt V.J. Tandem Mass Spectrometry (Ed. F.W. McLafferty) // Wiley. – 1983. – Vol.172. – №8. – P. 435–450.
158. US Environmental Protection Agency // Fed.Regis. – 1980. – V.45 – №9 – P.3290.
159. Veith G.D., Kuehl D.W., Rosenthal J. / Anal. Chem. – 1975. – Vol.135. – №2. – P.58.
160. Voyksner R.D., Hass J.R., Sovocool G.W., Bursey M.M. // Anal. Chem. – 1983. – Vol.131. – №8. – P.744.
161. Warburton G.A., Zumberge J.E. // Anal. Chem. – 1983. – Vol.127. – №7. – P. 55.
162. Webb K.S., Gough T.A., Carrick A., Hazelby D. // Anal. Chem. – 1979. – Vol.119. – №16. – P.51.
163. Williams D.T., Benoit F.M. // Bull. Environm. Contam. Toxicol. – 1979. – Vol.3. – №8. – P.21, 179–184.
164. Youssefi M., Cooks R.G., McLaughlin J.L. //Am. Chem. Soc. – 1979. – Vol.11. – №10. – P.101.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

МКП – минорные компоненты пищи
БАВ – биологически активные вещества
БАД – биологически активные добавки к пище
НД – нормативные документы
СКЭ – сверхкритическая экстракция
ДМСО – диметисульфоксид
ДС – добровольная сертификация
СГР – свидетельство о государственной регистрации
ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания
ПДК – предельно допустимые концентрации
ПАУ – полициклические ароматические углеводороды
ДДТ – дихлордифенилтрихлорметилметан
ДДЭ – Дихлордифенилдихлорэтилен
ДДД – дихлордифенилдихлорэтан
2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота
ПХБ – полихлорированные бифенилы
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ГХ-МС – газовая хроматография-масс-спектрометрия
ЛС – лекарственное средство
МЗП – масло зародышей пшеницы
МРП – масло ростков пшеницы
ПХДД – дибензодиоксины
ПХДФ – дибензофураны
ТХДД – тетрахлордибензодиоксин
ПМ – плазматическая мембрана
ТСХ – тонкослойная хроматография

Приложение 1

Важнейшие группы биологически активных веществ природного происхождения (минорных компонентов пищи) и их сырьевые источники

Биологически активные минорные компоненты пищи	Традиционные пищевые продукты и продовольственное сырье как источники «миноров»	Альтернативные источники биологически активных минорных компонентов пищи
1	2	3
Гидрохинон	Черника, анис, чабер, груша, брусника	Эспарцет месхетский, корень (<i>Onobrychis meschetica</i>); груша листья; толокнянка обыкновенная, листья (<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>); бадан толстолистный, листья (<i>Bergenia crassifolia</i>)
Арбутин	Клюква, груша	Толокнянка обыкновенная, побеги, листья (<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>); зимолюбка зонтичная, растение (надземная часть) (<i>Chimaphila umbellata</i>); груша, листья; подорожник большой; лист и семена (<i>Plantago major</i>); бадан толстолистный, листья (<i>Bergenia crassifolia</i>); черника, лист (<i>Vaccinium myrtillus</i> L.); брусника, лист (<i>Vaccinium vitis-idaea</i>)
Гидроксикоричные кислоты (цикорисвая, кафтаровая, хлорогеновая, феруловая, кофейная)	Яблоко, груша, айва, виноград, манго, земляника, черника, клюква, брусника, капуста, сладкий перец, томаты, щавель, сельдерей, чабер, ревень, портулак, чай, кофе, шоколад, семена масличных	Эхинацея, цветы, корень (<i>Echinacea purpurea</i>); ромашка аптечная, цветки (<i>Matricaria inodora</i>); одуванчик лекарственный, «вики, корень (<i>Taraxacum officinale</i>); лопух большой, листья, плод (<i>Arctium lappa</i>); Melissa, листья (<i>MeiisM officinalis</i>)); мора лиственницы, ели, каштана, дуба; гребни винограда, гречиха татарская, листья (<i>Fagopyrum tataricum</i>)

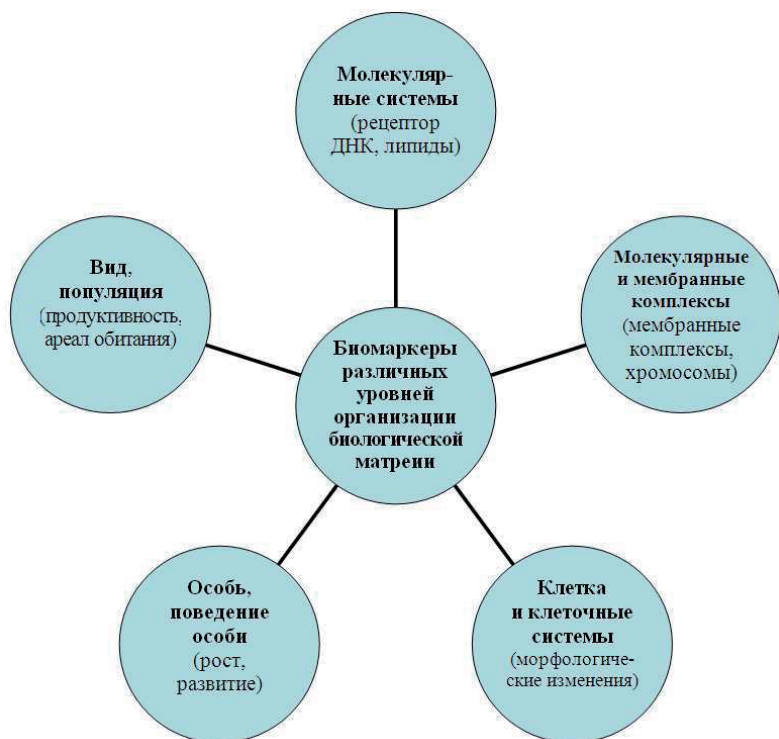
1	2	3
Галловая, п-оксибензойная	Малина, клубника, клюква, сок красного винограда, брусника, черника, чай, шоколад, вино, щавель, ревень	Солодка голая, корень (<i>Glycyrrhiza glabra</i>); виноградные косточки
В т.ч. флавонолы и их глнкозиды (кверцетин, кемферол, мирицетин, изорамнетин, рутин)	Яблоко, абрикос, персик, слива, манго, цитрусовые, смородина, клубника, черника, голубика, вишня, шиповник, брусника, клюква, облепиха, виноград, терн, лук, капуста белая, красная, цветная, брокколи, сладкий перец, сельдерей, кориандр, пастернак, петрушка, зеленый салат, томаты, редис, репа, ревень, щавель, морковь, свекла, хрен, чай зеленый и черный, красное вино	Гинкго двулопастного, листья (<i>Ginkgo biloba</i>); ясень обыкновенный, лист, почки (<i>Fraxinus Excelsior</i>); боярышник мелколистный, лист, цветки (<i>Crataegus microphylla</i>); пустырник пятилопастный, растение (надземная часть) (<i>Leonurus quinquelobatus</i>); володушка круглолистная, корень, растение (надземная часть), лист, цветки (<i>Valeriana rotundifolium</i>); горец птичий (спорыш), растение (надземная часть) (<i>Polygonum aviculare</i>), клевер, лист, стебли, цветы (<i>Trifolium pretense</i>); актинидия коломикта, лист (<i>Actinidia kolomikta</i>); фисташка настоящая, лист (<i>Pistacia vera</i>)
В т.ч. флавоны (лютеолин, апигенин, ак-ацетин, диосметин) или флавояогликозиды (витексин, изовитексин, ориентин, изоориентин)	Лимон, апельсин, грейпфрут, рябина черноплодная, морковь, сельдерей, репа, петрушка, фасоль, красный перец, морковь, горох, тимьян, шафран	Ромашка аптечная, цветы (<i>Matricaria recutita</i>); одуванчик лекарственный, корень (<i>Taraxacum officinale</i>); ферула персидская, растение (надземная часть) (<i>Ferula persica</i>); виснага моркововидная плод (<i>Visnaga daucoides</i>); пижма обыкновенная, цветы (<i>Tanacetum vulgare</i>); коровяк медвежье ушко, листья (<i>Verbascum thapsus</i>); хризантема садовая, цветки (<i>Chrysanthemum morifolium</i>); бодяк полевой, лист (<i>Cirsium arvense</i>) и др.

1	2	3
В т.ч. флаваноны (нарингенин, гесперитин, эриодиктиол или флаванонгликозиды (нарингин, геспередин)	Лимон, апельсин, мандарин, грейпфрут, слива, земляника, рябина черноплодная, клюква, вишня, калина, боярышник, актинидия, жимолость, томаты, петрушка, щавель, мята	Зверобой, продырявленный, растение (надземная часть) (<i>Hypericum perforatum</i>); лигустикум шотландский, корневища (<i>Ligusticum scoticum</i>); курильский чай, листья, цветки (<i>Pentaphylloides fruticosa</i>); липа сердцевидная, цветки (<i>Tilia cordata</i>); коровяк медвежье ухо, растение (надземная часть) (<i>Verbascum thapsus</i>); расторопша пятнистая, плоды (<i>Silybum marianum</i>); черемуха, древесина, плоды (<i>Padus sibirica</i> Schneid)
В т.ч. дигидрофлавонолы (дигидрокверцетин, дигидрокемпферол)	Орехи арахиса	Кора лиственницы сибирской (<i>Larix sibirica</i>); ели сибирской (<i>Picea abies</i>); сосны сибирской, приморской (<i>Pinus sibirica</i> , <i>P. Maritima</i>)
В т.ч. проантоцианидины	Яблоко, красный виноград, клюква, голубика, черника, миндаль, арахис, ячмень, кукуруза, шоколад (какао), авокадо, кола	Гребни, кожура и косточки винограда, лист черники (<i>Vaccinium myrtillus</i> L.); кора сосны приморской (<i>Pinus maritima</i>)
В т.ч. флаван-3-олы (катехины) (катехин, эпикатехин, галлокатехин, эпигаллокатехин)	Яблоко, айва, клубника, малина, красный виноград, облепиха, кизил, крыжовник, абрикос, черника, голубика, зеленая фасоль, чай зеленый и черный, шоколад (какао), красное вино, фисташка, каштан, лавровый лист, ревень, щавель, миндаль, боярышник	Виноградные косточки; расторопша пятнистая, плоды (<i>Silybum marianum</i>); горец змеинный, растение (надземная часть) (<i>Polygonum bistorta</i>); эвкалипт шариковидный, кора (<i>Eucalyptus globulus</i>); боярышник мелколистный, лист (<i>Crataegus microphylla</i>); вишня кустарниковая, кора (<i>Cerasus fruticosa</i>); черника обыкновенная, лист (<i>Vaccinium myrtillus</i>); облепиха крушиновая, лист (<i>Hippophae rhamnoides</i>)

1	2	3
В т.ч. антоцианы	Яблоко, черная смородина, черника, голубика, терн, лимонник китайский, жимолость, черемуха, базилик, вишня, брусника, красный виноград, капуста красная, лук красный, бобы красные, морковь, какао, красное вино	Кожица винограда красного; зверобой продырявленный, растение (надземная часть) (<i>Hypericum perforatum</i>); первоцвет многоцветковый, растение (надземная часть), подземная часть (<i>Primula x polyantha hort</i>); рис посевной, лист (<i>Oryza sativa</i>); водяника черная, плод, надземная часть (<i>Empetrum nigrum</i>)
Флаволигнаны (силибин, силидианин, силихристин и др.)	Плоды лимонника китайского, семена кунжута	Расторопша пятнистая, плоды, надземная часть (<i>Silybum marianum</i>); лен посевной, семя (<i>Linum usitatissimum</i> L.); лопух большой надземная часть (<i>Arctium lappa</i>); коровяк обыкновенный, растение (надземная часть) (<i>Verbascum thapsus</i>)
Изофлавоны (гинистеин, дайдзеин, глицистеин) или изофлавоногликозиды (генистин, дайдзин, глицитин)	Соя, фасоль	Клевер луговой, полевой, лист (<i>Trifolium pratense</i> T. <i>Campestre</i>); софора японская, плод (<i>Sophora japonica</i>); каян индийский, кора (<i>Cajanus cajan</i>); пуэрария тумберга, цветы (<i>Pueraria thunbergiana</i>), хмель обыкновенный, шишки (<i>Humulus lupulus</i>); псоралея лецинолистная, лист, семена (<i>Psoralea corylifolia</i>)

Приложение 2

Биомаркеры различных уровней организации биологической материи



Приложение 3

Факторы окружающей среды, действующие на различные биомаркеры

Радиоактивное облучение. Радионуклиды	Неорганические загрязнители. Тяжелые металлы. SO ₂ CO CO ₂	Ксенобиотики ПАУ ПХБ	Высокомолекулярные соединения. Пыль. Вирусы. Бактерии
↓	↓	↓	↓
Мембранные системы Липиды (ЛПО) Генетический аппарат Система клеток крови Иммунная система	Мембранные системы Генетический аппарат Система клеток крови Система хеморецепции Иммунная система	Система детоксикации и метаболической активации Генетический аппарат Система хеморецепции	Иммунная система
ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ ХРОМОСОМНЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ ФОРМЕННЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ КРОВИ	МЕТАЛЛОТИОНИНЫ ФОТОСИНТЕЗ ХЕМОРЕЦПЦИЯ МУТАГЕНЕЗ	ЦИТОХРОМ Р-450 ФЕРМЕНТЫ КОНЬЮГАЦИИ МУТАГЕНЕЗ КАНЦЕРОГЕНЕЗ ТЕРАТОГЕННЫЙ ЭФФЕКТ	КИСЛОРОДНЫЙ ВЗРЫВ УРОВЕНЬ АТФ В ФОРМЕННЫХ ЭЛЕМЕНТАХ КРОВИ АНТИТЕЛА АКТИВАЦИЯ МАКРОФАГОВ АЛЬВЕОЦИТОВ



MoreBooks!
publishing



yes **i want morebooks!**

Покупайте Ваши книги быстро и без посредников он-лайн – в одном из самых быстрорастущих книжных он-лайн магазинов! окружающей среде благодаря технологии Печати-на-Заказ.

Покупайте Ваши книги на
www.more-books.ru

Buy your books fast and straightforward online - at one of world's fastest growing online book stores! Environmentally sound due to Print-on-Demand technologies.

Buy your books online at
www.get-morebooks.com



VDM Verlagsservicegesellschaft mbH

Heinrich-Böcking-Str. 6-8
D - 66121 Saarbrücken

Telefon: +49 681 3720 174
Telefax: +49 681 3720 1749

info@vdm-vsg.de
www.vdm-vsg.de

