

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЫ И МИКОТОКСИНОВ В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ И МАСЛЯНЫХ ПРЕПАРАТАХ НА ЕГО ОСНОВЕ (НА ПРИМЕРЕ ПЛОДОВ ОБЛЕПИХИ КРУШИНОВИДНОЙ И ЛИСТЬЕВ КРАПИВЫ ДВУДОМНОЙ)

О. В. Тринеева, А. И. Сливкин, Дортгулыев Бабамырат

ФБГОУ ВПО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 03.11.2014 г.

Аннотация. Проведено определение микотоксинов и микробиологической чистоты лекарственного растительного сырья (на примере плодов облепихи крушиновидной и листьев крапивы двудомной) и масляных препаратов, полученных на его основе (на примере облепихового масла и масляного экстракта листьев крапивы двудомной). Выявлено несоответствие части изучаемых объектов по некоторым показателям. Микробные агенты не только могут вызвать неблагоприятные побочные эффекты и осложнения от применения зараженного сырья, но и являются одной из причин снижения количественного содержания действующих биологически активных веществ в процессе хранения. Необходимо проводить дальнейшие исследования по определению микотоксинов в лекарственном растительном сырье и жирных маслах фармацевтического назначения с целью обоснования включения данного показателя в современную нормативную документацию.

Ключевые слова: микотоксины, микробиологическая чистота, плоды облепихи крушиновидной, листья крапивы двудомной, облепиховое масло, масляный экстракт листьев крапивы.

Abstract. A determination of mycotoxins and microbiological purity of medicinal plants (for example, sea buckthorn fruits and leaves of nettle) and oil preparations obtained on the basis thereof (for example, sea buckthorn oil and oil extract of nettle leaves). Discrepancy some objects under study for some indicators. Microbial agents not only can cause adverse side effects and complications of the use of contaminated raw materials, but also is one of the reasons why the existing quantitative content of biologically active substances during storage. Further research is needed to determine mycotoxins in medicinal plants and fatty oils of pharmaceutical grade to justify the inclusion of this indicator in the modern regulatory documentation.

Keywords: mycotoxins, microbiological purity, the fruits of sea buckthorn, nettle leaves, sea buckthorn oil, oil extract of nettle leaves.

В последнее десятилетие в литературе все чаще встречаются публикации, посвященные микробной контаминации лекарственных средств и лекарственного растительного сырья (ЛРС). Согласно нормативной документации (НД) в настоящее время показатель «микробиологическая чистота» является обязательным при оценке доброкачественности ЛРС и полученных на его основе растительных масел (РМ) и масляных экстрактов (МЭ) [1-3]. Микотоксины

– вторичные метаболиты микроскопических плесневых грибов, обладающие выраженными токсическими свойствами. Микотоксины могут присутствовать в ЛРС даже без видимого роста плесени. Микотоксины обладают канцерогенным, мутагенным действием, подавляют иммунитет организма, поражают почки, печень, нервную и кровеносную системы, желудочно-кишечный тракт, вызывают заболевания крови, септическую ангину, дерматиты, судороги, острые боли, состояние тяжелого опьянения, нарушают гормональное равнове-

сие и функции воспроизводства. Микотоксины устойчивы к действию физических и химических факторов. Высокая температура (свыше 200 °С), замораживание, высушивание, воздействие ионизирующего и ультрафиолетового излучения не способствуют их разрушению. Понемногу накапливаясь в организме, микотоксины через десятилетия могут вызвать тяжелые заболевания, в том числе онкологические. В настоящее время хорошо известно, что различные группы микромицетов продуцируют обширный набор токсинов, в том числе афлатоксинов, продуцируемых, главным образом, *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus*. Для здоровья человека одни из наиболее опасных токсинов – афлатоксин и охратоксин (производные дифуранкумарина) (рис. 1). Потребление пищевых продуктов, содержащих 1,7 мг/кг афлатоксина, за короткий период времени может привести к необратимым повреждениям в печени, а 75 мг/кг – к смерти [4,5]. В настоящее время, в некоторых странах, определение микотоксинов в продуктах питания включено в систему мониторинга состояния окружающей среды как один из показателей ее экологической безопасности. Для практической работы хозяйств стран СНГ более приемлемыми считаются европейские допустимые нормы, согласно которым для афлатоксинов (B_1 в мг/кг) они находятся в пределах 0,005-0,010 [5].

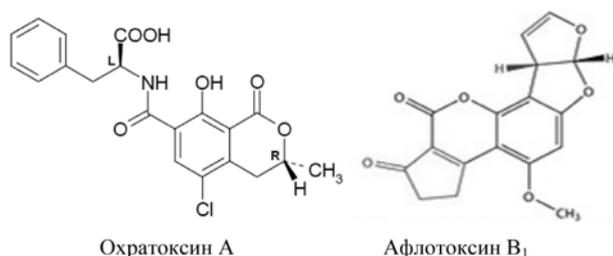


Рис. 1. Структурные формулы микотоксинов

В Российской Федерации для контроля пищевой продукции широко используют традиционные национальные схемы контроля (ГОСТы, СанПиН 2.3.2.1078-01 [6] и др., ГН 1.2.1323-03 и др.), а также применяют гармонизированные с международными требованиями (Codex Alimentarius, 96/23 ЕС) схемы контроля продукции на всех стадиях ее производства и реализации [4,5].

ЛРС, богатое жирными маслами, а также РМ и МЭ фармацевтического назначения, подобно сельскохозяйственным культурам, таким как кукуруза, соя, арахис, подсолнечник, могут быть за-

ражены микотоксинами. Одним из видов такого ЛРС являются плоды облепихи как свежие, так и высушенные, богатые жирным маслом [7]. Следовательно, полученное на его основе облепиховое масло, может содержать микотоксины. Кроме этого, используемые в фармацевтическом производстве, жирные масла также являются возможными носителями микотоксинов. Однако, данный показатель качества сырья не включен в современную НД. В связи с этим обнаружение микотоксинов представляет собой одно из приоритетных направлений развития фармакогнозии и фармацевтической экологии.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектами исследования являлись высушенное измельченное ЛРС крапивы двудомной отечественного производителя, свежие и измельченные высушенные плоды дикорастущего растения рода *Hippophaës*, собранные в Воронежской области согласно правилам заготовки ЛРС, а также МЭ листьев крапивы двудомной и облепиховое масло отечественных производителей, соответствующие требованиям НД.

Исследование образцов на микробиологическую чистоту проводили в соответствии с ОФС ГФ XII изд. «Микробиологическая чистота», а также ГОСТ 10444.15-94. Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАиФАМ) [8]; ГОСТ 10444.12-88. Продукты пищевые. Метод определения дрожжей и плесневых грибов [9]; ГОСТ Р 52816-2007. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (БГКП) (колиформных бактерий) [10]; ГОСТ Р 52815-2007. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и *Staphylococcus aureus* [11]; ГОСТ Р 52814-2007. Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella* [12]; ГОСТ 31653-2012. Метод иммуноферментного определения микотоксинов [13].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты исследования микробиологической чистоты изучаемых объектов приведены в таблице 1.

Предельно допустимое содержание микрофлоры для МЭ фармацевтического назначения не разработаны. На плоды облепихи крушино-

Таблица 1

Результаты исследования микробиологической чистоты ЛРС и полученных на его основе РМ и МЭ

Исследуемый объект	Результаты анализа					
	КМАиФАМ, КОЕ/г	БГКП (количественные формы) в 0,01 г	<i>S. aureus</i> в 0,1 г	Патогенны (в т.ч. сальмонеллы) в 25 г	Дрожжи, КОЕ/г	Плесени, КОЕ/г
Листья крапивы двудомной	$5.6 \cdot 10^3$	1	-	-	Менее 10	Менее 10
Плоды облепихи крушиновидной свежие	$1.1 \cdot 10^2$	-	-	-	$8.2 \cdot 10^4$	10
Плоды облепихи крушиновидной высушенные	Менее 10	-	-	-	Менее 10	Менее 10
МЭ листьев крапивы двудомной	$1.0 \cdot 10^2$	-	-	-	100	$2.8 \cdot 10^2$
Облепиховое масло	Менее 10	-	-	-	Менее 10	Менее 10

Таблица 2

Нормативы микробиологической чистоты по НД [5]

№ п/п	Нормируемый показатель	Требования по НД					
		КМАиФАМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются			Дрожжи, КОЕ/г, не более	Плесени, КОЕ/г, не более
			БГКП (количественные формы)	<i>S. aureus</i>	Патогенны (в т.ч. сальмонеллы)		
1	Допустимые нормы для ЛРС	$1 \cdot 10^4$	0.1	1.0	10	100	100
2	Допустимые нормы для РМ, БАД на основе РМ пищевого назначения	-	0.001	-	25	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^2$
3	Допустимые нормы для РМ для наружного применения	$1 \cdot 10^4$	0.01	-	25	50	50

видной отсутствует ФС. Для оценки их качества по показателю микробиологическая чистота могут быть использованы нормативы, рекомендованные СанПин 2.3.2.1078-01 [5] для БАД на растительной основе и для РМ и БАД на основе РМ (табл. 2).

Анализ результатов (табл. 1 и 2) свидетельствует о том, что МЭ листьев крапивы двудомной не соответствует требованиям НД по содержанию дрожжей и плесеней. Применение такого продукта, например в области волосистой части головы, может привести к развитию грибковых заболеваний кожи. Плоды облепихи свежие также не соответствуют требованиям НД по содержанию дрожжей. Свежие плоды подвержены заражению спорами грибов и дрожжей, так как являются хорошей питательной средой для роста и размножения микроорганизмов. В промышленных масштабах свежие плоды должны быть сразу после сбора переработаны в готовые лекарствен-

ные средства. Плоды облепихи крушиновидной высушенные могут быть рекомендованы к широкому использованию населением в пищевых и лечебных целях в народной и официальной медицине, так как, по результатам исследований, не подвержены загрязнению микроорганизмами при хранении. Следовательно, особенно актуальным является разработка проектов ФС на плоды облепихи свежие и высушенные, а также проекта ОФС «Масляные экстракты на основе лекарственного растительного сырья».

Облепиховое масло и листья крапивы двудомной, согласно действующей ОФС ГФ XII изд. «Микробиологическая чистота» и новым проектам для ГФ XIII изд. ФС «Крапивы двудомной листья» и ОФС «Масла жирные растительные», должны соответствовать нормативам, приведенным в таблице 3.

Анализ результатов (табл. 1 и 3) свидетельствует о полном соответствии облепихового масла

Таблица 3

Нормативы микробиологической чистоты по ГФ XII [1]

Объект	Требования по НД
<p>Категория 3 Б Для приема внутрь - из сырья природного происхождения, уровень микробной загрязненности которого невозможно снизить в процессе предварительной обработки, федеральный орган контроля качества ЛС допускает уровень микробной загрязненности более 10^3 жизнеспособных микроорганизмов в 1 г (мл). Исключение: лекарственные растительные средства (ЛРС), включенные в категорию 4</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Общее число аэробных бактерий не более 10^4 в 1 г или в 1 мл; - Общее число грибов не более 10^2 в 1 г или в 1 мл; - Энтеробактерий и других грамотрицательных бактерий не более 10^2 в 1 г или в 1 мл; - Отсутствие Escherichia coli в 1 г или в 1 мл; - Отсутствие Salmonella в 10 г или в 10 мл; - Отсутствие Staphylococcus aureus в 1 г или в 1 мл
<p>Категория 4 Лекарственные растительные средства, состоящие из одного вида сырья (фасованная продукция) или нескольких (сборы), а также растительное сырье «ангро»</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Общее число аэробных бактерий не более 10^7 в 1 г; - Общее число грибов не более 10^5 в 1 г; - Escherichia coli не более 10^2 в 1 г;
<p>Категория 4 А Лекарственные растительные средства или лекарственное сырье «ангро», применяемые в виде настоев и отваров, приготовленные с использованием кипящей воды</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Общее число аэробных бактерий не более 10^5 в 1 г; - Общее число грибов не более 10^4 в 1 г;
<p>Категория 4 Б Лекарственные растительные средства или лекарственное сырье «ангро», приготовленные без использованием кипящей воды</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Энтеробактерий и других грамотрицательных бактерий не более 10^3 в 1 г; - Отсутствие Escherichia coli в 1 г; - Отсутствие Salmonella в 10 г.

требованиям микробиологической чистоты (категория 3Б). Однако, исследуемый образец ЛРС крапивы двудомной по содержанию БГКП находится на верхнем уровне допустимого предела (категория 4А), а следовательно может быть опасен при приеме внутрь в виде настоя.

Результаты определения микотоксинов в изучаемых объектах приведены в таблице 4. Анализ данных таблицы 4, показывает, что все отобранные образцы ЛРС и масляных препаратов на его основе соответствуют требованиям НД [5].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено определение микотоксинов и микробиологической чистоты ЛРС и масляных препаратов, полученных на его основе. Выявлено несоответствие изучаемых объектов по некоторым

показателям (МЭ листьев крапивы и плоды облепихи свежие). Содержание микотоксинов не превышает рекомендуемых нормативов.

Таким образом, показатели микробиологической загрязненности играют важную роль в целостной оценке качества ЛРС и фитопрепаратов на его основе. Микробные агенты не только могут вызвать неблагоприятные побочные эффекты и осложнения от применения зараженного сырья, но и являются одной из причин снижения количественного содержания действующих биологически активных веществ в процессе хранения. Кроме того, необходимо проводить дальнейшие исследования по определению микотоксинов в ЛРС и жирных маслах фармацевтического назначения с целью обоснования включения данного показателя в современную НД.

Таблица 4

Результаты определения микотоксинов в ЛРС и полученных на его основе РМ и МЭ

Исследуемый объект	Микотоксин			
	Афлатоксин В ₁ , мг/кг		Охратоксин А, мг/кг	
	результат	Требования по НД	результат	Требования по НД
Облепиховое масло	Менее 0.002	Не более 0.005 для нерафинированных масел и масляных культур	-	Не нормируется
МЭ листьев крапивы двудомной	Менее 0.002		-	
Плоды облепихи крушиновидной высушенные	Менее 0.002		Менее 0.005	
Плоды облепихи крушиновидной свежие	Менее 0.002		Менее 0.005	

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Государственная фармакопея Российской Федерации XII изд. Часть 1. — М.: Изд-во: Научный центр экспертизы средств медицинского назначения, 2008. — 704 с.
2. Проект ФС «Крапивы двудомной листья» для ГФ XIII издания. (<http://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/11/materialy-po-deyatelnosti-deparatamenta/stranitsa-856/spisok-obschih-farmakoreynuh-statey>) (дата обращения 15.04.2015 г).
3. Проект ОФС «Масла жирные растительные» для ГФ XIII издания. (<http://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/11/materialy-po-deyatelnosti-deparatamenta/stranitsa-856/spisok-obschih-farmakoreynuh-statey>) (дата обращения 15.04.2015 г).
4. Артюх, В.П. Трихотеценовые микотоксины: определение в объектах окружающей среды / В.П. Артюх, О.С. Гойстер, Г.А. Хмельницкий, Н.Ф. Стародуб // Біополімери і клітина. — 2003. — Т.19. — №3. — С. 216-223.
5. Сеидова, Г.М. Контаминация афлотоксинами некоторых сортов чая и некоторых зерновых культур в Азербайджане / Г.М. Сеидова // Проблемы медицинской микологии. — 2007. — Т.9. — №4. — С.31-33.
6. СанПин 2.3.21078-01 «Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов» от 14.11.2001/22.03.02. [Электронный ресурс]. — Режим доступа: http://www.service-holod.ru/SanPiN2/SanPiN_2_3_2_1078_01.htm. — Загл. с экрана.
7. Богачева, Н.Г. Стандартизация лекарственного сырья облепихи крушиновидной / Н.Г. Богачева, Н.П. Кокушкина, Т.А. Сокольская // Фармация. — 2001. — №1. — С. 27-29.
8. ГОСТ 10444.15-94. Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов. — Введ. 1996-01-01. — М.: Изд-во стандартов, 2010. — 7 с.
9. ГОСТ 10444.12-88 с поправками и изменениями от 29.05.2009 г. Продукты пищевые. Метод определения дрожжей и плесневых грибов. — Введ. 1990-01-01. — М.: Изд-во стандартов, 2010. — 8 с.
10. ГОСТ Р 52816-2007 с поправками и изменениями от 29.05.2009 г. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий). — Введ. 2009-01-01. — М.: Изд-во стандартов, 2010. — 18 с.
11. ГОСТ Р 52815-2007 с поправками и изменениями от 29.05.2009 г. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и *Staphylococcus aureus*. — Введ. 2009-01-01. — М.: Изд-во стандартов, 2010. — 28 с.
12. ГОСТ Р 52814-2007/2007 с поправками и изменениями от 29.05.2009 г. Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*. — Введ. 2001-01-01. — М.: Изд-во стандартов, 2010. — 20 с.
13. ГОСТ 31653-2012. Метод иммуноферментного определения микотоксинов. — Введ. 2013-07-01. — М.: Изд-во стандартов, 2012. — 16 с.

Воронежский государственный университет

Тринева О. В., кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета

E-mail: trineevaov@mail.ru.

Voronezh State University

Trineeva O. V., candidate of pharmaceutical sciences, associate professor of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology of pharmaceutical faculty

E-mail: trineevaov@mail.ru.

Дортгулыев Б., студент 5 курса фармацевтического факультета

Dortgulyev B., 5rd year student of the faculty of pharmacy

Сливкин А. И., доктор фарм. наук, профессор, зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии, декан фармацевтического факультета

Slivkin A. I., doctor of pharmaceutical sciences, professor, manager chair of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology, dean of pharmaceutical faculty

E-mail: slivkin@pharmvsu.ru

E-mail: slivkin@pharmvsu.ru