

УДК 615.244:615.322

ДОСЛІДЖЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНИХ ТА МІКРОБІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ КРІОПОДРІБНЕНОЇ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ

Конюхов І.В., Чушов В.І., Солдатов Д.П.
Національний фармацевтичний університет
(61002, м. Харків, вул. Пушкінська 53, E-mail:
ikoniukhov@gmail.com)

В структурі хронічних гепатитів основну частину складають вірусні гепатити. На сьогодні відкрито та охарактеризовано 9 видів вірусного гепатиту – А, В, С, D, E, F, G, SEN, TTV [1-3]. У зв'язку з особливостями перебігу саме гепатит С привертає до себе більше уваги, ніж всі інші вірусні гепатити. Вірусом гепатиту С на теперішній час інфіковано біля 170 млн. людей (3% населення у світі) [4].

Причиною виникнення цього захворювання можуть бути також інші етіологічні фактори: токсичні агенти (лікарські засоби, алкоголь, промислові токсичні речовини), аутоімунні процеси.

Сучасна терапія хронічного гепатиту ґрунтується на протівірусному та патогенетичному лікуванні. Цього можна досягти шляхом включення в лікувальний комплекс препаратів гепатопротекторної дії рослинного походження.

Враховуючи надмірне накопичення вільних радикалів і продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), як один з провідних патогенетичних механізмів ураження гепатоцитів, сполучення гепатиту з холестазом, згущення жовчі, патологію жовчовивідних шляхів нашу увагу привернули такі лікарські рослини:

- плоди розторопші плямистої (*Silybum marianum L.*) - покращують метаболічні процеси в печінці;
- квітки нагідків (*Calendula officinalis L.*) - проявляють протизапальну активність, сприяють регенерації слизових оболонок;
- коріння кульбаби (*Taraxacum officinale Wed.*) - посилює секрецію слинних і травних залоз, збільшує жовчовиділення;
- листя м'яти (*Mentha piperita L.*) має жовчогінну властивість;
- трава бобівника (*Menyanthes trifoliata*) - посилює секрецію усіх залоз шлунково-кишкового тракту, покращує перистальтику шлунка і кишківника;
- трава рутки (*Fumaria officinalis*) - регулює секреторну діяльність печінки;
- трава реп'яшка (*Agrimonia eupatoria L.*) - регулює функції печінки, покращує травлення, має жовчогінну та протизапальну дію [5].

Класичні методи переробки лікарської рослинної сировини передбачають застосування екстракції з метою отримання настоек, рідких екстрактів або густих, сухих екстрактів, які використовуються як субстанції у технології готових лікарських форм. Цей процес має такий недолік, як багатостадійність, що потребує значну кількість одиниць обладнання та виробничих площ, біологічно активні речовини при цьому можуть руйнуватись.

Враховуючи вищенаведене, інтерес представляє кріоподрібнення лікарської рослинної сировини, яке зберігає біологічно активні речовини у незмінному вигляді.

Метою нашого дослідження було вивчення технологічних та мікробіологічних властивостей кріоподрібненої рослинної сировини гепатопротекторної дії, та обґрунтування її використання у технології виготовлення таблеток.

Матеріали і методи дослідження

Вихідну сировину з розміром частинок від 1 до 3 мм подрібнювали на кульовому кріомлині в Інституті проблем машинобудування ім. А. Н. Подгорного НАН України під керівництвом головного інженера Момот В. І.

За фармакопейними методиками були визначені такі технологічні параметри кріопорошків рослинної сировини: насипна густина та насипна густина після усадки, плинність, кут укошу, пресуємість за стійкістю таблеток до роздавлювання, вологовміст, вміст екстрактивних речовин (екстрагент – вода очищена) [6-8].

Оскільки актуальною проблемою використання лікарської рослинної сировини у фармацевтичній промисловості є її мікробіологічна забрудненість, досліджували мікробіологічну чистоту та антимікробну активність таких зразків:

1. Нагідок лікарських квітки (кріопорошок)
2. Нагідок лікарських квітки (вихідна сировина)
3. Кульбаби лікарської коріння (кріопорошок)
4. Кульбаби лікарської коріння (вихідна сировина)
5. Розторопші плямистої плоди (кріопорошок)
6. Розторопші плямистої плоди (вихідна сировина)
7. М'яти перцевої листя (кріопорошок)
8. М'яти перцевої листя (вихідна сировина)
9. Бобівника трилистого листя (кріопорошок)
10. Бобівника трилистого листя (вихідна сировина)
11. Реп'яшка звичайного трава (кріопорошок)
12. Реп'яшка звичайного трава (вихідна сировина)
13. Рутки лікарської трава (кріопорошок)
14. Рутки лікарської трава (вихідна сировина)

Дослідження мікробіологічної чистоти та антимікробної активності проведені в «Інституті мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України» зав. лабораторії біохімії мікроорганізмів та поживних середовищ, к. б. н., ст. н. с. Осолодченко Т.П.

Випробування на мікробіологічну чистоту проводили методом глибинного висівання та поверхневого висівання на чашки з поживним середовищем. Чашки з поживним агаром інкубували при температурі від 30°C до 35°C протягом 3 діб, чашки з Сауро агаром інкубували при температурі від 20°C до 25°C протягом 5 діб. Обчислювали загальне число аеробних мікроорганізмів (total aerobic microbial count ТАМС) на поживному агарі та загальне число дріжджових та плісневих грибів (total combined yeasts/moulds count ТУМС) на Сауро агарі у розрахунок на грам досліджуваних зразків.

Зразки були перевірені на антибактеріальну активність. Дослідження проводили методом дифузії в агар (метод «колодязів»).

У відповідності до рекомендацій ВООЗ для оцінки активності препаратів використовували тест-штами

Staphylococcus aureus ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 885/653. Мікробне навантаження складало 10^7 мікробних клітин на 1 мл середовища та встановлювалось за оптичним стандартом каламутності.

Використовували такі поживні середовища: середовище для контролю стерильності виробництва Московського НДІ вакцин та сироваток ім. І.І. Мечникова з додаванням пептону, натрію тіогліколяту, натрію мета бісульфіту, агар-агару (Дагестанський НДІ поживних середовищ).

Визначення на антибактеріальну активність зразків проводили на двох шарах щільного поживного середовища, розлитого у чашки Петрі. У нижньому шарі використовували не засіяні середовища (агар-агар, вода, солі). Нижній шар є підкладкою заввишки 10 мм, на яку точно горизонтально встановлюють 3 тонкостінні циліндри з неіржавіючої сталі діаметром 8 мм і заввишки 10 мм. Навколо циліндрів заливали поживне середовище (розплавлене, добре перемішане та охолоджене до 40°C) в яке вносили відповідний стандарт добової культури тест-мікроба. Після застигання циліндри стерильним пінцетом витягали і в утворені лунки вносили досліджувану речовину з урахуванням її об'єму.

Об'єм середовища для верхнього шару коливався від 14 до 16 мл. Чашки підсушували 30-40 хв. при кімнатній температурі та ставили до термостату на 18-24 години.

Для оцінки антибактеріальної активності експериментальних речовин використовували такі критерії:

- відсутність зон затримки росту мікроорганізмів навколо лунки, а також зони затримки до 10 мм вказують на те, що мікроорганізм не чутливий до внесеної у лунку досліджуваної речовини;
- зони затримки росту діаметром 10-15 мм вказують на невелику чутливість культури до досліджуваного зразка;
- зони затримки росту діаметром 15-25 мм оцінюють як показник чутливості мікроорганізму до зразка;
- зони затримки росту речовин, діаметр яких перевищує 25 мм, свідчать про високу чутливість мікроорганізмів до досліджуваних зразків.

Результати та обговорення

Проведено вивчення зразків та визначені технологічні параметри кріопорошків лікарської рослинної сировини наведені в таблиці 1.

Таблиця 1. Технологічні параметри кріопорошків лікарської рослинної сировини

Кріоподрібнена лікарська рослинна сировина	Насипна густина, г/мл	Насипна густина після усадки, г/мл	Плинність, г/с	Кут укусу, градуси	Пресеуємість, Н	Вологовміст, %	Вміст екстрактивних речовин, %
Нагідок лікарських квітки	0,37±0,02	0,47±0,03	-	38,5±4,9	-	7,13±0,08	45,62±0,30
Кульбаби лікарської коріння	0,48±0,01	0,58±0,01	-	39,2±3,9	-	7,62±0,05	70,91±0,38
Розторопші плямистої плоди	0,40±0,01	0,53±0,02	-	40,3±5,9	-	5,20±0,04	14,85±0,22
М'яти перцевої листя	0,40±0,03	0,56±0,02	-	39,8±8,0	-	7,31±0,09	33,50±0,25
Бобівника трилистого листя	0,37±0,02	0,57±0,01	-	37,5±9,9	-	7,12±0,11	42,32±0,32
Реп'яшка звичайного трава	0,38±0,01	0,53±0,03	-	37,2±8,2	-	6,35±0,03	29,61±0,27
Рутки лікарської трава	0,43±0,02	0,52±0,02	-	44,8±12,4	-	6,12±0,04	42,83±0,34

Примітка Р=95%, n=5

За насипною густиною кріопорошки відносять до легких. Жоден зразок не має плинності, тобто не висипається з воронки. Це підтверджується також великими значеннями кута природного укусу від 37,2±8,2 до

44,8±12,4°. Вологовміст сировини знаходиться у допустимих межах. Високий вміст екстрактивних речовин мають кульбаби лікарської коріння 70,91±0,38%, нагідок лікарських квітки 45,62±0,30%, рутки лікарської трава 42,83±0,34%, бобівника трилистого листя 42,32±0,32%.

Відсутність пресуємості вказує на необхідність застосування зв'язуючих речовин, а разом з невеликою насипною густиною та незадовільною плинністю – на доцільність використання грануляції з метою покращення вище перерахованих технологічних параметрів.

Дослідження глибинного та поверхневого висівання на чашках з середовищем Сабуро вказали на відсутність росту грибів. При культивуванні на поживному агарі було виявлено ріст мікроорганізмів. Дані представлені в таблиці 2.

Таблиця 2. Дослідження мікробіологічної чистоти експериментальних зразків

Зразки	Кількість мікроорганізмів за десятковим логарифмом ступеня росту при культивуванні на твердих поживних середовищах			
	Метод глибинного висівання 1 г препарату		Метод поверхневого висівання 1 г препарату	
	Поживний агар 35°C 3 доби	Сабуро 25°C 5 діб	Поживний агар 35°C 3 доби	Сабуро 25°C 5 діб
1	Ріст мікроорганізмів відсутній	Ріст грибів відсутній	Ріст мікроорганізмів відсутній	Ріст грибів відсутній
2	1,5±0,3	Ріст грибів відсутній	2,2±0,3	Ріст грибів відсутній
3	Ріст мікроорганізмів відсутній	Ріст грибів відсутній	1,9±0,4	Ріст грибів відсутній
4	2,1±0,7	Ріст грибів відсутній	2,5±0,6	Ріст грибів відсутній
5	1,8±0,5	Ріст грибів відсутній	Ріст мікроорганізмів відсутній	Ріст грибів відсутній
6	2,7±0,7	Ріст грибів відсутній	2,7±0,7	Ріст грибів відсутній
7	Ріст мікроорганізмів відсутній	Ріст грибів відсутній	1,6±0,5	Ріст грибів відсутній
8	1,8±0,5	Ріст грибів відсутній	2,3±0,4	Ріст грибів відсутній
9	Ріст мікроорганізмів відсутній	Ріст грибів відсутній	Ріст мікроорганізмів відсутній	Ріст грибів відсутній
10	1,5±0,4	Ріст грибів відсутній	1,7±0,5	Ріст грибів відсутній
11	Ріст мікроорганізмів відсутній	Ріст грибів відсутній	1,6±0,4	Ріст грибів відсутній
12	1,9±0,5	Ріст грибів відсутній	2,3±0,6	Ріст грибів відсутній
13	Ріст мікроорганізмів відсутній	Ріст грибів відсутній	Ріст мікроорганізмів відсутній	Ріст грибів відсутній
14	1,4±0,3	Ріст грибів відсутній	2,2±0,5	Ріст грибів відсутній

За даними таблиці 2, ріст грибів відсутній при дослідженні всіх 14 зразків. Кількість мікроорганізмів в 1 г препарату не перевищувало 10^3 КУО/г і відповідає вимогам Державної фармакопеї України (ДФУ). Ріст мікроорганізмів при дослідженні кріопорошків відсутній (нагідок лікарських квітки, розторопші плямистої плоди, бобівника трилистого листя, рутки лікарської трава) або

менший (кульбаби лікарської коріння, м'яти перцевої листя, реп'яшка звичайного трава), ніж у вихідній сировині при поверхневому висіванні.

Проведено вивчення антимікробної дії зразків, дані результатів дослідження антимікробної активності представлені в таблиці 3.

Таблиця 3. Антибактеріальна активність зразків ЛРС та кріопорошків

Зразки	Діаметри зон затримки росту, мм					
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida albicans</i> ATCC 885/653
1	14, 15, 15	13, 14, 14	12, 13, 14	12, 12, 13	17, 18, 17	13, 13, 13
2	13, 13, 12	12, 12, 13	ріст	ріст	13, 14, 15	ріст

3	14, 15, 16	14, 14, 15	ріст	ріст	16, 15, 17	ріст
4	14, 15, 14	ріст	ріст	ріст	14, 15, 15	ріст
5	16, 17, 17	14, 15, 14	12, 13, 13	ріст	17, 16, 17	13, 13, 13
6	13, 12, 13	ріст	ріст	ріст	ріст	ріст
7	15, 15, 15	14, 14, 13	ріст	ріст	12, 13, 13	ріст
8	12, 13, 13	ріст	ріст	ріст	ріст	ріст
9	14, 15, 16	14, 14, 13	13, 14, 13	12, 13, 12	18, 16, 17	12, 13, 13
10	13, 15, 13	12, 13, 14	14, 13, 13	12, 12, 13	16, 17, 17	13, 12, 13
11	16, 15, 16	14, 14, 14	14, 14, 13	13, 13, 13	18, 18, 17	13, 12, 13
12	14, 15, 14	13, 13, 12	ріст	ріст	16, 15, 16	ріст
13	14, 15, 15	13, 13, 13	ріст	ріст	14, 16, 15	ріст
14	13, 12, 13	ріст	ріст	ріст	ріст	ріст

Дані, представлені в таблиці, свідчать про чутливість *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 до кріопорошків всіх досліджуваних зразків; *Bacillus subtilis* ATCC 6633 – до кріопорошку нагідок лікарських квіток, кріопорошку та вихідної сировини кульбаби лікарської коріння, кріопорошку розторопші плямистої плодів, кріопорошку та вихідної сировини бобівника трилистого листя, кріопорошку та вихідної сировини реп'яшка звичайного трави, кріопорошку рутки лікарської трави.

Висновки

1. Відсутність плинності, пресуємості та невеликі значення насипної густини кріопорошків вказують на доцільність використання грануляції з метою покращення вище перерахованих технологічних параметрів.

2. Дослідження мікробіологічної чистоти кріоподрібненої сировини у порівнянні с ЛРС вказали, що ріст мікроорганізмів при дослідженні кріопорошків відсутній (нагідок лікарських квітки, розторопші плямистої плоди, бобівника трилистого листя, рутки лікарської трава) або менший (кульбаби лікарської коріння – $10^{1,9}$, м'яти перцевої листя – $10^{1,6}$, реп'яшка звичайного трава – $10^{1,6}$), ніж у вихідній сировині. Застосування кріоподрібнення призводить до зменшення мікробного забруднення лікарської рослинної сировини.

3. Мікробіологічна чистота досліджених зразків відповідає вимогам ДФУ.

4. Всі кріопорошки проявляють антимікробну активність відносно *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Bacillus subtilis* ATCC 6633 чутливі до кріопорошку Нагідок лікарських квіток, кріопорошку та вихідної сировини Кульбаби лікарської коріння, кріопорошку Розторопші плямистої плодів, кріопорошку та вихідної сировини Бобівника трилистого листя, кріопорошку та вихідної сировини Реп'яшка звичайного трави, кріопорошку Рутки лікарської трави.

5. Визначені технологічні параметри, мікробіологічна чистота, протимікробна дія, свідчать, що кріопорошки дослідженої лікарської рослинної сировини можуть бути використані у технології виготовлення таблеток.

References

1. Vovk A.D. Klinichni Problems treatment for ailments hronichny hepatitis C / A.D. Vovk // Therapia. Ukrainsky medichny visnik. - 2007. - № 1. - P. 50-53.
2. Yushchuk N.D. Viral Hepatitis A - an important general clinical problem / N.D. Yushchuk, G.N. Karetkina // Clinical Medicine - 2006. - № 5. - P. 19-24.
3. Perlstein J. Hepatitis and cirrhosis / J. Perlstein, M. W. Bowyer // Medical emergency. - 2007. - № 4. - P. 117-121.
4. Hepatitis C // World Health Organization. – 2011. – №164. – www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/
5. Konyukhov I. V. The urgency of developing an integrated hepatoprotective drug / I. V. Konyukhov, V. I. Chueshov, D.P. Soldatov // Farmatsiya of Ukraine. Looking to the Future: National materiali VII. Congress of Pharmacists (Kharkov, 15-17 september 2010 p.). In 2 vols - H.: pharmacy, 2010. - T. 1. - P. 488.
6. State Pharmacopoeia of the USSR. No. 1 General methods of analysis. - 11 th ed. - M.: Medicine, 1987. - 334 p.
7. Reigning Pharmacopoeia of Ukraine / / Reigning pidpriemstvo "Naukova-ekspertny Pharmacopoeial Center." - 1st appearance. - Kharkov: Riger, 2001. - 556 p.
8. Reigning Pharmacopoeia of Ukraine / / Reigning pidpriemstvo "Ukrainian Scientific Center Pharmacopoeias quality medicines." - 1st appearance. - Appendix 3. - Kharkov: Reigning pidpriemstvo "Ukrainian Scientific Center Pharmacopoeias drug quality", 2009. – 280 p.

УДК 615.244:615.322

ДОСЛІДЖЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНИХ ТА МІКРОБІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ КРІОПОДРІБНЕНОЇ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ

Конюхов І.В., Чусшов В.І., Солдатов Д.П.

Визначені технологічні параметри кріопорошків рослинної сировини: Нагідок лікарських квітки, Кульбаби лікарської коріння, Розторопші плямистої плоди, М'яти перцевої листя, Бобівника трилистого листя, Реп'яшка звичайного трава, Рутки лікарської трава. Досліджено мікробіологічну чистоту та антимікробну активність

кріопорошків та вихідної сировини. Встановлено, що застосування кріоподрібнення призводить до зменшення мікробного забруднення, кріопорошки дослідженої лікарської рослинної сировини можуть бути використані у технології таблеток.

Ключові слова: рослинна сировина, таблетки, кріоподрібнення, кріопорошок, кріомлин, технологічні властивості, мікробіологічні властивості, антимікробна активність, гепатопротектор.

УДК 615.244:615.322

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КРИОИЗМЕЛЬЧЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Конюхов И.В., Чуешов В.И., Солдатов Д.П.

Определены технологические параметры криопорошков растительного сырья: календулы цветки, одуванчика корни, расторопши пятнистой плоды, мяты перечной листья, вахты трехлистной листья, репешка трава, рутки трава. Исследовано микробиологическую чистоту и антимикробную активность криопорошков и исходного сырья. Установлено, что применение криоизмельчения приводит к уменьшению микробиологического загрязнения, криопорошки исследованного лекарственного растительного сырья могут быть использованы в технологии таблеток.

Ключевые слова: растительное сырье, таблетки, криоизмельчение, криопорошок, криомельница, технологические свойства, микробиологические свойства, антимикробная активность, гепатопротектор.

UDK 615.244:615.322

RESEARCH OF TECHNOLOGICAL AND MICROBIOLOGICAL PROPERTIES OF THE CRYOMILLED MEDICINAL PLANT RAW MATERIAL

Koniukhov I.V., Chueshov V.I., Soldatov D.P.

The technological parameters of the cryomilled plant raw material Calendula flowers, Taraxacum roots, Silybum fruit, Mentha leaves, Menyanthes grass, Agrimonia grass, Fumaria grass have been determined. Microbiological cleanliness and antimicrobial activity of cryopowders and input material have been researched. It is established that use of cryomilling lead to microbiological contamination decrease, cryopowders of researched medicinal plant raw material can be used in tablets technology.

Keywords: vegetable raw materials, tablets, cryogenic grinding, cryo powder cryo mill, operating characteristics, microbiological properties, antimicrobial activity, hepatic.