

# ВЛИЯНИЕ УПАКОВКИ И УСЛОВИЙ ХРАНЕНИЯ НА КОЛИЧЕСТВЕННОЕ СОДЕРЖАНИЕ И АНТИМИКРОБНУЮ АКТИВНОСТЬ АЛКАЛОИДОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

Д.В. Моисеев

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»,  
210 602, Республика Беларусь, г.Витебск, пр.Фрунзе, 27, E-mail: www.ussr80@yandex.ru

Срок годности лекарственных средств, в том числе и на основе лекарственного растительного сырья, подтверждается данными о стабильности, полученными при долгосрочных испытаниях. Для стран Европейского региона долгосрочные испытания обычно проводятся при температуре  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  и влажности  $60\pm 5\%$  в течение периода не менее 12 месяцев [1]. Выбор первичной упаковки для растительного сырья, обеспечивающей защиту от внешних факторов, приобретает первостепенное значение. В зависимости от степени герметичности тароупаковочные изделия можно классифицировать от высокогерметичных (полимерные материалы, склеенные или термосваренные по всем краям) до практически негерметичных (ткань или бумага). Поэтому перед производителем остается открытым вопрос: какую упаковку предпочесть – бумажные пакеты, картонные коробки или упаковку из полимерных материалов?

**Задачей** настоящего исследования являлось сравнение данных о количественном содержании активных и маркерных компонентов, а также их фармакологической (антимикробной) активности в растительном сырье при долгосрочных и ускоренных испытаниях для обоснования выбора первичной упаковки.

**Методы исследования.** Растительное сырье (трава чистотела большого, лист маклеи сердцевидной, трава мачка желтого), содержащее изохинолиновые алкалоиды. Сырье заготавливалось в 2009, 2010 и 2011 годах в соответствии с рекомендациями GACP (Надлежащая практика сельскохозяйственного производства лекарственного растительного сырья) и отечественными рекомендациями [2]. Растительное сырье измельчали до размера крупного порошка (2000 мкм) и помещали в стеклянные контейнеры как допускающие газообмен с внешней средой, так и герметично закупоренные. При этом в герметично закупоренных контейнерах искусственно создавали влажность для сырья около 9%, 11-13% и 25%. Закладку на хранение осуществляли при температуре  $20-25^{\circ}\text{C}$  и в термостатах при  $40^{\circ}\text{C}$  и  $60^{\circ}\text{C}$ . Определение количественного содержания действующих веществ проводили по валидированным методикам с периодичностью раз в 3 месяца в течение первого года хранения, через 6 месяцев в течение второго года хранения при температуре  $20-25^{\circ}\text{C}$ . При повышенных температурах контроль количественного содержания веществ проводили через промежутки времени в соответствии с правилом Вант-Гоффа. Например, при  $60^{\circ}\text{C}$  одному году хранения соответствуют 23 дня, при  $40^{\circ}\text{C}$  – 92 дня. Контроль содержания компонентов осуществляли методом ВЭЖХ с фотодиодноматричным детектором по валидированным методикам [3].

Антимикробную активность суммы БАВ для трех видов растительного сырья до и после хранения в различных условиях исследовали на четырех видах микроорганизмов: грамотрицательные палочки факультативные анаэробы *Escherichia coli* (ATCC 16404) и аэробные *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), аэробные грамположительные палочки *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) и грамположительные кокки факультативные анаэробы *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), а также дрожжевых грибов *Candida albicans* (ATCC 10231) производитель «Microbiologics» (США). Антибактериальную активность определяли с использованием метода диффузии в агар [3]. Для исследования применяли чистые культуры микроорганизмов, которые предварительно выращивали при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 24 часов на скошенном мясо-пептонном агаре (МПА). Стандартную бактериальную суспензию готовили на стерильном 0,9 % растворе натрия хлорида. Для этого

бактериологической петлей вносили исследуемую культуру в стерильный флакон со стерильным физраствором и доводили концентрацию микроорганизмов до значения 0,5 единиц стандарта мутности по McFarland. Расплавленный и остуженный до 56°C МПА разливали в чашки Петри. На застывший агар с помощью автоматической пипетки в стерильных условиях в чашки Петри вносили по 1,0 мл соответствующей взвеси микроорганизмов. После равномерного распределения микроорганизмов по всей поверхности агара чашки инкубировали при комнатной температуре в течение 15-20 минут. Затем на чашке с микроорганизмами делали семь лунок диаметром 6,0 мм. Далее с помощью автоматической микропипетки в шесть лунок вносили по 20  $\mu$ л извлечений из растительного сырья в трех дозах, в одну лунку в качестве контроля вносили воду для инъекций, которую использовали для разведения проб. Для экстракции из растительного сырья использовали те же растворители, что и для количественного определения. Полученные экстракты упаривали досуха и суспендировали полученные сухие остатки в воде для инъекций при помощи ультразвука.

Пробы инкубировали при температуре 37°C в течение 16 часов (микроорганизмы) и 30°C для *Candida albicans* и оценивали рост микроорганизмов. Учет результатов проводили по наличию или отсутствию роста бактерий вокруг лунок с извлечением путем измерения диаметра зоны вокруг лунки в миллиметрах.

Для сравнительной оценки антимикробной активности растительных экстрактов использовали водные растворы четырех антибиотиков: гентамицин сульфат, цефотаксим, цефтриаксон и ципрофлоксацин. Для приготовления использовали антибиотики следующих производителей: гентамицина сульфата 4% раствор (ОАО «БЗМП», серия 170213), цефотаксим лиофилизированный порошок для инъекций 1,0 г (ОАО «БЗМП», серия 380512), цефтриаксон лиофилизированный порошок для инъекций 1,0 г (ОАО «БЗМП», серия 860812) и ципрофлоксацин капсулы 250 мг №20 (РУП «Белмедпрепараты», серия 111013). Из перечисленных антибиотиков готовили водные растворы концентрации 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 и 32 мкг/мл методом последовательного разведения исходных растворов. Гентамицин – аминогликозид широкого спектра действия с высокой активностью против стафилококков, некоторых штаммов стрептококка, многих грамотрицательных микроорганизмов; ципрофлоксацин – фторхинолон с высокой активностью против большинства грамотрицательных микроорганизмов, стафилококка, микроорганизмов, продуцирующих бета-лактамазу. Цефотаксим и цефтриаксон – цефалоспорины III-го поколения, высокоактивны в отношении грамотрицательных микроорганизмов, цефтриаксон активен еще и в отношении грамположительных микроорганизмов.

**Результаты исследования.** При определении сроков годности растительного сырья допускается снижение содержание активных веществ не более чем на 5% от исходного, а маркерных компонентов растительного сырья до 10% за весь период хранения [4, 5]. В герметичной упаковке относительное содержание алкалоидов за два года хранения в естественных условиях в измельченной траве мачка желтого снижается на 5,4%, при влажности 13% на 7,1%, при влажности 25% на 13,3%; в траве чистотела на 8,8%, на 39,5% и на 26,8%; в листьях маклеи на 28,3%, на 55,1% и на 78,3% при влажности сырья 9%, 13% и 25%, соответственно. При этом в негерметичной упаковке содержание алкалоидов через два года хранения снижается на 7,3% (мачок желтый), 35,7% (чистотел большой) и 55,6% (маклея сердцевидная).

Данные о стабильности активных веществ в ЛРС, полученные в ходе ускоренных испытаний (40 и 60°C) коррелированы с данными, полученными при хранения ЛРС в естественных условиях. Скорость химических реакций увеличивается в 2-3 раза при повышении температуры на каждые 10°C. Увеличение влажности сырья приводит к ускорению реакций деструкции активных компонентов.

Экспериментально установлено, что растворы гентамицина и ципрофлоксацина проявляют высокую активность в отношении *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и среднюю активность в отношении *Pseudomonas aeruginosa*. Растворы цефтриаксона

и цефотаксима активны в отношении *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, неактивны в отношении *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas aeruginosa*.

Свежесобранная трава чистотела большого высокоактивна против *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* (для разных доз сопоставима с концентрациями активных антибиотиков 8-32 мкг/мл). Антимикробная активность снижается при хранении сырья при 20 и 60°C, гидролиз (хранение при высокой влажности) практически не изменяет активность в отношении бактерий. Свежесобранные листья маклеи сердцевидной высокоактивны против *Bacillus subtilis* (эквивалентны гентамицину 2-16 мкг/мл, ципрофлоксацину 1-4 мкг/мл), среднеактивны против *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*. Длительное хранение в естественных условиях, особенно при повышенной влажности, приводит к снижению активности против всех исследованных бактерий (от средней до слабовыраженной). Листья маклеи также проявляют умеренную активность против дрожжевых грибов *Candida albicans*. Трава мачка желтого не обладает антимикробным эффектом в отношении изученных микроорганизмов, проявляя слабую активность против дрожжевых грибов *Candida albicans*. При хранении в различных условиях активность травы мачка незначительно снижается.

**Заключение.** Для сырья, содержащего алкалоиды, при промышленном производстве с целью максимальной защиты действующих веществ от деструкции и сохранения фармакологической активности необходимо применение герметичной упаковки. Цифровые показатели об изменении содержания активных веществ в растительном сырье, содержащем алкалоиды, при хранении при повышенной температуре можно использовать для прогнозирования сроков годности и повышения стабильности за счет первичной упаковки.

#### Литература

1. WHO Technical Report Series, No. 953: «Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products», Женева, 2009.
2. ТКП 450-2012 (02041) Производство лекарственных средств. Надлежащая практика выращивания, сбора, хранения лекарственного растительного сырья, Минск, 2012.
3. Государственная фармакопея Республики Беларусь. Т.1. Общие методы контроля качества лекарственных средств / Центр экспертиз и испытания в здравоохранении // Под общ. ред. А.А. Шерякова. – Молодечно: «Победа», 2012. – 1220 с.
4. ТКП 451-2012 (02041) Производство лекарственных средств. Требования к качеству лекарственных средств растительного происхождения, Минск, 2012.
5. ТКП 454-2012 (02041) Производство лекарственных средств. Спецификации: методы испытаний и критерии приемлемости для лекарственного растительного сырья, продуктов из лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения, Минск, 2012.

### INFLUENCE OF VARIOUS TYPES OF PACKAGING AND LOSS ON DRYING IN CONTAINING AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ALKALOIDS IN MEDICINAL PLANTS

D. V. Moiseev

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

The chemical stability and antimicrobial activity of alkaloids of Yellow hornpoppy, Greater Celandine and Macleaya heart during of period of storage are discussed. The expiration dating period of the active substances in the herbal substances obtained in the accelerated testing (40° and 60°C) correlate with the data obtained from storage at 25±2°C and 60±5% RH. The speed of chemical reactions are increased in 2-3 times with a temperature increase every 10°C. The increase of loss on drying leads to the acceleration of the reactions of decomposition of active components. For herbal substances containing alkaloids, industrial

production for maximum protection active substances it is necessary to use a sealed packaging. Antimicrobial activities during of period of storage are decreased. Thus, digital indicators on changes in the content of active substances in the herbal substances stored at high temperatures can be used to predict the shelf life and stability at the expense of immediate packaging.