Archive of SID

کنترل میکربی تعدادی از داروهای گیاهی ساخت داخل کشور

*دکتر رحیم بحری نجفی ، ** دکتر علیرضا قنادی، دکتر عفت رحیمی پور
* دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز
** دانشکده داروسازی ، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

خلاصه

داروهای گیاهی نیز همانند سایر فرآورده های داروئی ممکن است در فرآیند تهیه و ساخت به میکرو ارگانیسم ها آلوده شوند. توجه روزافزون برای مصرف داروهای گیاهی که به صورت اشکال داروئی عرضه می شوند، کنترل استانداردهای کیفیت آنها را امری ضروری نموده است. به طوری که همچون سایر اشکال داروئی اطمینان از کیفیت آنها از هر نظر باید مورد توجه قرار گیرد تا پزشك و بیمار به تجویز و مصرف این داروها علاقمند شوند. به همین جهت در این پژوهش یك بچ از داروهای گیاهی که با اشکال داروئی قرص و پودر و قطره در داروخانه ها عرضه شده اند از نظر تعداد و نوع میکروبهای زنده هوازی موجود در آنها بر اساس آزمایشات محدودیت میکربی (USP) مورد بررسی قرار گرفتند.

در فرآورده قرص و پودر تعداد میکرو ارگانیسم ها بیش از ۱۱۰۰ در هر گرم بر آورد شد. ولی در قطره هیچگونه میکربی یافت نشد. از نظر نوع میکروارگانیسم های غیر مجاز در فرآورده های داروئی ، پودر به سالمونلا ، اشریشیاکلی و قرص به اشریشیاکولی آلوده بود. ولی هیچ کدام به کاندیدا آلبیکانس آلوده نبودند.آلودگی های میکربی دیگر موجود در این فرآورده ها نیز مورد بررسی قرار گرفت و مشخص گردید که قرص به باسیلوس سیرکولانس که از میکروارگانیسمهای فرصت طلب است، آلوده می باشد.

کلمات کلیدی: میکروارگانیسم، داروهای گیاهی، آزمایشات محدودیت میکربی

مقدمه

داروهای گیاهی در کشور ما به دلیل تنوع و وسعت پراکندگی و سابقه طولانی مصرف آنها در طب سنتی، از اهمیت ویژه ای برخوردار هستند و علاقه برای مصرف داروهای گیاهی، به خصوص آنهائیکه به صورت اشکال داروئی و توسط کارخانه های داروسازی تولید و عرضه می شوند، اطمینان از کیفیت این فراورده ها را امری ضروری نموده است. داروهای گیاهی به دلیل اینکه از گیاهان تهیه می شوند، می توانند آلودگی مواد خام طبیعی از جمله باکتریهای گرم مثبت اسپورزا، کپکها و کلی فرمهائی چون اشریشیاکولی و سالمونلا و باکتریهای گرم منفی را داشته باشند . روشهای استخراج داروها از گیاهان ممکن است از جمعیت میکربی آنها کم کند ولی اغلب فاکتورهایی همچون جمعیت میکربی اولیه زیاد و متنوع و متفاوت بودن روشهای برداشت و نگهداری گیاه می تواند باعث آلوده شدن آنها شود(۵). بر همین اساس مقررات و ضوابط میکربی همچون سایر داروها، برای داروهای گیاهی وضع گردیده است. البته این ضوابط در کشورهای مختلف متفاوت است . در کشور ما نیز تعداد میکروارگانیسمهای زنده هوازی در محصولات داروئی غیر استریل نباید بیش از ۱۰۰ عدد در هر گرم یا میلی لیتر باشد که شامل ۹۰ باکتری و ۱۰ قارچ غیر بیماریزا و ارگانیسمهای غیر مجاز شامل استافیلوکوك اورئوس ، پسودوموناس آئروژینورا ، سالمونلا ، اشریشیا کولی و کاندیدا آلبیکانس می‌باشد (۳).

مواد وروشها

در انتخاب نمونه های دارویی، از فرآورده هایی که دارای پروانه ساخت از وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی بودند ده نمونه از هر یك از اشکال داروئی پودر ، قرص و قطره، از چندین داروخانه از سطح شهر تهیه گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه برداری از فرآورده ای که درب آن قبلاً باز نشده بود با رعایت شرایط آسپتیك در کنار شعله وبا استفاده از وسایل استریل به طوریکه هیچگونه آلودگی میکربی به فرآورده منتقل نشود، انجام گرفت (۱۰ گرم یا ۱۰ میلی لیتر از ۱۰ فرآورده). نمونه قرص و پودر پس از آسیاب کردن با عبور از الك ۶۰ مش به صورت پودر نرم در آورده شد و برای آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت. برای تعیین محتوای میکربی نمونه ها بر اساس آزمایشات محدودیت میکربی، ابتدا برای اطمینان از نبودن اثر ضد میکربی در فرآورده ها و امکان رشد میکروارگانیسمهای احتمالی، آزمایش مقدماتی محدودیت میکربی بر روی تمام نمونه ها با تلقیح میکرو ارگانیسمهای استافیلوکوك اورئوس، پسودوموناس آئروژینورا، سالمونلا، اشریشیاکولی و کاندیدا آلبیکانس انجام گرفت و برای شمارش تعداد میکروارگانیسمهای قرص و پودر از روش لوله و برای قطره از روش شمارش در پلیت استفاده شد. جهت تشخیص میکروارگانیسمهای ممنوع از محیطهای کشت افتراقی و آزمایشات توصیه شده توسط USP استفاده گردید(۸). برای تشخیص استافیلوکوك اورئوس از محیطهایی انتخابی آن (مانیتول سالت آگار ، بردپارکر آگار و وگل جانسون آگار Merck) و آزمایش تائیدی کوآگولاز، برای پسودوموناس از محیطهای انتخابی آن (سترمید آگار، پسودوموناس فلورسین، پسودوموناس پیوسانینDifco) و آزمایش تائیدی اکسیداز، برای سالمونلا از محیطهای مهاری تتراتیونات و سلنیت سیستین و محیطهای انتخابی آن (برلیانت گرین آگار ، گزیلوزلیزین دزوکسی کولات آگار، بیسموت سولفیت آگار و تریپل شوگرآیرون آگار Merck) و برای اشرشیاکولی از محیط های اختصاصی مك کانکی آگار و محیط کشت افتراقی لوین ائوزین متیلن بلو (Oxoid) استفاده شد. برای تشخیص آلودگیهای قارچی از محیط کشت سابوراد دکستروز آگار (Oxoid) استفاده گردید. یك لوپ استریل از نمونه های مورد آزمایش با رقت ۱:۱۰ در محیط سابوراد دکستروز براث تهیه شد و پس از ۲ هفته به طور مخطط بر روی محیط کشت سابوراد دکستروز آگار در پلیت کشت داده شد و پلیت ها به طور وارونه به مدت ۵-۳ روز در حرارت ۲۵-۲۲ درجه سانتی گراد در گرمخانه قرار گرفتند. همچنین برای شناخت دقیق پرگنه ها، کشت مجدد از آنها روی محیط سابوراد دکستروز آگار انجام شد و پس از گذاشتن به مدت ۴-۳ روز در حرارت ۲۵-۲۲ درجه سانتی گراد، پلیت ها هر روز از نظر رشد بررسی می شدند (۲). برای تشخیص آلودگی کاندیدا از پرگنه های رشد کرده در سا بوراد دکستروز آگارلام تهیه و یك بار با لاکتوفنل کاتن بلو و یك بار با رنگ آمیزی گرم زیر میکروسکوپ بررسی شدند. برای آزمایش رشد لوله ای شکل(Germ tube) از پرگته های مشکوك روی محیط سابوراد به لوله های آزمایش حاوی ۰/۵ میلی لیتر سرم خون انسان اضافه شد و لوله ها به مدت ۳-۲ ساعت در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. سپس قطره ای از آن در زیر میکروسکوپ برای وجود لوله های استوانه ای شکل چسبیده به سلولهای گرد یا بیضی شکل (Yeast) نشان دهنده کاندیدا، مطالعه شدند (۵) .

علاوه بر آزمایشات تشخیصی فوق که توسط USP توصیه شده بود آزمایش تشخیص باسیلوس انجام گرفت. پس از مشاهده رشد سطحی در لوله های آزمایش مربوط به قرص با استفاده از لوپ استریل از آن لام تهیه شد و در زیر میکروسکوپ با بزرگ نمائی ۴۰ ، اشکال میله ای منفرد متعلق به خانواده باسیلاسه مشاهده شد. برای تفکیك دو جنس کلستریدیوم و باسیلوس در این خانواده از دو آزمایش کاتالاز (با استفاده از آب اکسیژنه ۳٪ و مشاهده حباب) و رنگ آمیزی گرم استفاده شد. نتیجه آزمایش کاتالاز مثبت بود. در رنگ آمیزی گرم نیز باسیلهای گرم مثبت مشاهده شد که تائیدی بر وجود باسیلوس بود. در مرحله بعد آزمایشات تشخیصی باسیلوس ها انجام گرفت که شامل آزمایش سیترات (به وسیله لوپ از پرگنه های باسیلوس روی سطح محیط کشت نوترنیت آگار Merck بر روی سطح شیب دار و عمقی محیط کشت سیمون سیترات آگار Merck در لوله آزمایش کشت و

www.SID.ir

Archive of SID

در حرارت۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت قرار داده شد)، آزمایش تخمیر قند (افزودن یك پرگنه از باسیلوس به محیط نوترینت براث Merck که به آن ۰/۵ تا ۱ درصد قند و معرف فنل رد اضافه شده بود به مدت ۲۴ ساعت در حرارت ۳۲درجه)، آزمایش احیای نیترات به نیتریت (با افزودن ۰/۱ میلی لیتر معرف به محیط کشت ۲۴ ساعته میکروارگانیسم در محیط کشت مایع نیترات)، آزمایش ذوب ژلاتین (با استفاده از محیط کشت نوترینت براث حاوی ۱۲ درصد ژلاتین در لوله های آزمایش و کشت عمودی در داخل لوله ها با میله پلاتینی و گذاشتن در دمای ۲۲- ۲۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳ روز)، آزمایش هیدرولیز (با استفاده از محیط نشاسته آگار و کشت باکتری به صورت خطی بر روی آن)، آزمایش رشد در حرارتهای مختلف (با استفاده از محیط نوترینت براث و تلقیح میکروارگانیسم به آن و گذاشتن آن در دماهای ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ درجه به مدت ۲۴ ساعت)، آزمایش رشد در محیط کلرید سدیم ۷ درصد (با استفاده از محیط مایع حاوی ۰/۰۷ گرم کلریدسدیم و کشت میکروارگانیسم داخل آن و گذاشتن در گرمخانه در حرارت)، آزمایش وگس پروسکوئر (با کشت میکروارگنیسم در لوله حاوی محیط کشت متیل رد- وگس پروسکوئر و افزودن معرف)، آزمایش تشخیص حرکت (با استفاده از محیط SIM در لوله آزمایش و تلقیح میکروارگانیسم توسط سیم پلاتینی به صورت عمودی در آن) انجام گرفت.

نتایج

نتایج آزمایشات مقدماتی (جدول شماره ۱) نشان داد که رشد کلیه میکروارگانیسمهای ممنوع در هر سه نوع فرآورده امکان پذیر است و می توان آزمایشات محدودیت میکربی را با اطمینان ادامه داد . نتایج شمارش میکروارگانیسمها در فرآورده های قرص و پودر در جدول شماره ۲ آمده ولی درفرآورده قطره میکروارگانیسمی شمارش نشد. در آزمایشات تشخیص میکروارگانیسمهای ممنوع مشخص گردید که هیچکدام از فرآورده ها به استافیلوکوك اورئوس و پسودوموناس آئروژینوزا آلوده نمی باشند، ولی پرگنه های قرمز رنگ روی محیط مك کانکی در ناحیه مربوط به پودر و قرص دیده شد که با بردن پرگنه های قرمز رنگ بر سطح محیط لوین ائوزین متیلن بلو آگار و جلای فلزی پرگنه های روی این محیط وجود اشریشیاکلی در پودر و قرص تائید شد (جدول ۳) و در محیطهای تشخیص سالمونلا نمونه پودر در هر سه محیط (گزیلوزلیزین دزوکسی کولات آگار ، بیسموت سولفیت آگار و برلیانت گرین آگار) رشد کرده بود. در محیط گزیلوزلیزین دزوکسی کولات آگار نمونه مربوط به قرص نیز رشد کرده بود ولی پرگنه آن ویژگیهای سالمونلا را نداشت. با آزمایش بر روی محیط کشت سه قندی آهن دار وجود سالمونلا با تشکیل حلقه سیاه و زرد شدن قسمت عمقی و قرمز بودن قسمت شیب دار و تولید گاز در ته لوله در پودر محرز شد ولی در نمونه قرص محیط کاملاً زرد شد و گاز بسیار زیادی را نیز تولید کرده بود که نشان دهنده وجود اشر یشیاکلی در آن بود (جدول شماره ۴) . در آزمایشات تشخیص باسیلوس با انجام آزمایش بر روی محیط SIM، تحرك باکتری در آن دلیلی بر عدم وجود باسیل شاربن بود. نتایج آزمایشات شناسائی باسیلوس در جدول شماره ۵ آمده است شناسایی شده که با استفاده ازمنابع باسیلوس سیرکولانس می باشد(۴).

جدول شماره ۱- نتایج تلقیح سوسپانسیونهای میکربی به نمونه های دارویی در آزمایش مقدماتیUSP

ردیف	نمونه مورد آزمایش	استافیلوکوکوس آرئوس	پسودوموناس آئروژینوزا	اشریشیاکلی	سالمونلاتیفی	کاندیدا آلبیکنس	شاهد مثبت	شاهد منفی
۱	پودر	+	+	+	+	+	+	+
۲	قرص	+	+	+	+	+	+	+
۳	قطره	-	-	-	-	-	+	+

شاهد مثبت : محیط کشت و میکروارگانیسم مربوطه

شاهد منفی: محیط کشت و نمونه مورد آزمایش

(+) رشد

(-) عدم رشد

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲ : شمارش کلی میکروارگا نیسمها در فرآورده های مورد آزمایش (محتمل ترین تعداد (MPN))

تعداد آزمایشات	نمونه	مجموع لوله های هرسری که در آنها رشد دیده شد مقدار میلی گرم یا میلی لیتر از نمونه در هرلوله			تعداد یکروارگانیسمها در هر گرم یا میلی لیتر فرآورده با بیشترین احتمال	میانگین تعداد ارگانیسمها در هرگرم یا میلی لیتر فرآورده
		سری اول(۱۰۰)	سری دوم(۱۰)	سری سوم(۱)		
۱	پودر	۳	۳	۳	>۱۱۰۰	>۱۱۰۰
۲	پودر	۳	۳	۳	>۱۱۰۰	
۳	پودر	۳	۳	۳	>۱۱۰۰	
۱	قرص	۳	۳	۳	>۱۱۰۰	>۱۱۰۰
۲	قرص	۳	۳	۳	>۱۱۰۰	
۳	قرص	۳	۳	۳	>۱۱۰۰	

جدول ۳: نتیجهٔ بررسی آلودگی فرآورده های مورد آزمایش به اشر شیا کولی

ردیف	نمونه	مشاهده پرگنه اشریشیاکلی بر محیط مك کانکی	مشاهده پرگنه اشریشیاکلی بر محیط مك کانکیEMB
۱	پودر	+	+
۲	قرص	+	+
۳	قطره	–	–

(–) عدم رشد (+) رشد

جدول شماره ٤ نتیجهٔ بررسی آلودگی فرآورده های مورد آزمایش به گونه های سالمونلا

ردیف	نمونه	مشاهده کلنی سالمونلا بر روی محیطهای کشت			رشد در محیط سه قندی آهن دار
		پیسموت سولفیت آگار	برلیانت آگار	گزیلوز - لیزین دزاکسی کولات آگار	
۱	پودر	+	+	–	+
۲	قرص	–	–	–	+
۳	قطره	–	–	–	–

جدول شماره ٥- حداقل آزمایشها جهت تشخیص سویه باسیلوس

ردیف	آزمایش	نتیجه	ردیف	آزمایش	نتیجه
۱	کاتالاز	+	۹	تخمیر گلوکز	+
۲	سیمون سیترات	–	۱۰	تخمیر آرابینوز	+
۳	رشد بی هوازی	+	۱۱	تخمیر گزیلوز	+
۴	احیای نیترات	+	۱۲	تخمیر مانیتول	+
۵	هیدرولیز نشاسته	+	۱۳	رشد در ۳۰°C	+
۶	ذوب ژلاتین	+	۱۴	رشد در ۵۰° C	+
۷	ووگس پروسکوئر	–	۱۵	رشد در ۶۰° C	+
۸	حرکت	+	۱۶	رشد در ٪۷۰ NaCl	+

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

امروزه فرآورده های گیاهی کارخانه ای سهم قابل توجهی از داروها را تشکیل می دهند و لذا تهیه و توزیع این فرآورده ها باید تحت کنترل و نظارت قرار گیرد و کیفیت آنها از هر لحاظ بررسی شود. آزمایشات محدودیت میکربی یکی از آزمایشات کیفیت میکربی فرآورده های داروئی است که برای شمارش تعداد کل میکربهای زنده هوازی در فرآورده های غیر استریل و جستجو و تشخیص ارگانیسمهای ممنوع انجام می شود (۸). در این تحقیق آزمایشات مورد نظر بر روی سه شکل فرآورده گیاهی که شامل قرص، پودر و قطره خوراکی بود، انجام گرفت. از نظر شمارش در فرآورده قطره میکروارگانیسمی یافت نشد. علت آن می تواند غلظت بالای الکل در این فرآورده باشد که قادر است میکربها خصوصاً میکربهای بیماریزا را از بین ببرد. البته قطره مذکور حاوی اسانسهای فراز بود که اغلب اسانسها خاصیت آنتی سپتیك دارند و در گذشته از این خاصیت آنها برای نگهداری، جلوگیری از کپك زدن و خراب شدن مواد غذایی استفاده می کرده اند(۱). در تشخیص میکروارگانیسم ها در محیط بردپار کر آگار در نمونه قرص پرگنه مشاهده شد ولی ویژگیهای پرگنه های استافیلوکوکوس اورئوس پس از ۳۰ ساعت نگهداری در گرمخانه را نداشت، زیرا بیش از ۶۰ درصد سویه ها ی استافیلوکوکوس اورئوس پس از این مدت قادر به ایجاد پرگنه های سیاه همراه با هاله شفاف (در اثر تجزیه لستین) می باشند(۶). البته باید به این نکته اشاره کرد که پرگنه های باسیلوس قادر به رشدو تکثیر بر روی محیط کشت بردپارکر آگار می باشند که آزمایشات بعدی آن را نیز تائید نمود (۷). قرص و پودر هر دو به اشرشیاکولی آلوده بودند. آزمایش بر روی محیط کشت مك کانکی و لوین ائوزین متیلن بلو رشد اشریشیاکولی را نشان داد. وجود پرگنه های بی رنگ و شفاف در این محیط ها مربوط به سالمونلا می باشد زیرا سالمونلا قادر به تخمیر لاکتوز نبوده بنابراین پرگنه آن شفاف می ماند. نمونه پودر به سالمونلا آلوده بود. رشد پرگنه های سالمونلا بر روی سه محیط انتخابی سالمونلا دیده شد. انتخابی ترین محیط برای سالمونلا محیط بیسموت سولفیت آگار است زیرا رشد اشریشیاکولی در این محیط کاملاً متوقف می شود(۷). در این محیط نمونه های قرص و قطره هیچگونه رشدی نداشتند. روی دو محیط برلیانت گرین آگار، گزیلوز لیزین دزوکسی کولات ، رشد پرگنه در نمونه های قرص و پودر هر دو دیده شد و پرگنه مشکوك در این دو محیط با کشت روی محیط TSI مشخص شد که پودر به سالمونلا و قرص به اشرشیاکولی آلوده بودند زیرا اشرشیاکولی لاکتوز را تخمیر و تمام محیط را اسیدی و زرد رنگ نموده و به دلیل تولید گاز هیدروژن و دی اکسید کربن محیط کشت را از بخش تحتانی لوله آزمایش به وسط لوله می آورد. مراحل شناسایی باسیلوس به این دلیل پیگیری شد که باسیل شاربن می تواند از طریق گوارش بیماری خطرناکی را ایجاد نماید وباسیلوس سرئوس نیز قادر به ایجاد مسمومیت غذائی می باشد. البته باسیلهای دیگر این خانواده مشکلات جدی را به دنبال ندارند (۷).

مشابه این بررسی توسط Favert در سال ۱۹۹۲ انجام گرفت. وی با آزمایش بر روی تعدادی از داروهای گیاهی فرانسه گزارش داد که ۵٪ فرآورده گیاهی مورد آزمایش به اشرشیاکولی و ۱۵٪ نیز به استافیلوك اورئوس آلوده بود. آلودگی به سالمونلا اصلاً مشاهده نشد. چندین مورد آلودگی به پسودوموناس البته نه نوع آئروژینوزا دیده شد (۱). و در آزمایش دیگری که بر روی داروهای مختلف انجام شد بیشترین شمارش میکربی مربوط به محصولات خام طبیعی (گیاهی و حیوانی) بود که پروسه های مختصری جهت تمیز شدن آنها انجام شده بود و کمترین میزان آلودگی مربوط به مواد خامی بود که به طریقه شیمیایی سنتز شده بود (۵).

در پایان با توجه به نتایج این آزمایش، سازندگان داروهای گیاهی باید دقت بیشتری در کیفیت تهیه مواد اولیه گیاهی و مراحل لازم برای کاهش میکروارگانیسم ها و انجام آزمایشات کیفیت میکربی داشته باشند و مسئولین

www.SID

Archive of SID

آزمایشگاههای کنترل دارو و غذا نیز اهتمام بیشتری به این امرنموده و ضمن تدوین استانداردهای کیفیت میکربی برای این فرآورده ها، شرکتها را ملزم به رعایت آن نمایند.

منابع

۱. صمصام شریعت، ه.، معطر،ف. گیاهان داروئی و دارو های طبیعی (مفردات پزشکی)، جلد سوم، انتشارات دانشگاه اصفهان، ۱۳۷۰، ۲۶-۲۵

۲. عالم حبیب آبادی، م . کنترل میکروبیولوژیکی تعدادی از فرآورده های بهداشتی. پایان نامه دکترای داروسازی اصفهان ، سال ۱۳۶۹ .

۳. کمال، ف. کنترل کیفیت فرآورده های داروئی، جلد اول، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ۱۳۷۱، ۱۱۹-۱۰۷، ۲۰۴-۱۷۲.

۴. ناظم، م.، نادری نسب،م.، راشد، ط. باکتری شناسی پزشکی، چاپ چهارم، انتشارات آستان قدس رضوی، مشهد، ۱۳۷۱، ۱۰۶-۱۰۴

5. Denyer S. P., Barid R. M., Guide to microbiological control in pharmaceutical, Ellis Harwood, 1990, 54-57.

6. Favert J., 1992, Microbial contamination on twenty drugs of plant origin, Pharm. Acta. Helv., 67: 9-10

7. Parry J. M., Turn Ball P. C. B., Gibson J. R. A., Color Atlas of *Bacillus Species*, Wolofe Medical Publication ltd,1983, 19-23, 86-88.

8. The United States Pharmacopeia (USP), XXIII edition, Mack Publishing Co., Easton, 2000, 1681-1685.