

# Mikrobiološka onečišćenja u (tradicionalnim) biljnim lijekovima

---

Ljoljić Bilić, Vanja; Marinović, Ivana; Samardžić, Ivana; Kosalec, Ivan

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2021, 77, 1 - 26**

**Journal article, Published version**

**Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:196865>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



# Mikrobiološka onečišćenja u (tradicionalnim) biljnim lijekovima

Vanja Ljoljić Bilić<sup>1</sup>, Ivana Marinović<sup>2</sup>, Ivana Samardžić<sup>2</sup>, Ivan Kosalec<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zavod za mikrobiologiju, Schrottova 39, 10 000 Zagreb

<sup>2</sup>Klinička bolnica Dubrava, Centralna bolnička ljekarna, Avenija Gojka Šuška 6, 10 000 Zagreb

## Uvod

Biljke su bogate širokim spektrom sekundarnih metabolita, kao što su tanini, terpenoidi, alkaloidi i flavonoidi za koje je utvrđeno da imaju određena terapijska svojstva. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. *World Health Organization*, WHO), ljekovita biljka je svaka biljka koja u jednom ili više svojih organa sadrži tvari koje se mogu koristiti u terapijske svrhe ili koje su prekursori za kemijsku farmaceutsku polusintezu (1). Proizvodi biljnog podrijetla mogu se svrstati u različite skupine proizvoda, a među njima je najčešća kategorija dodataka prehrani, zatim kozmetičkih proizvoda, medicinskih proizvoda, tradicionalnih biljnih lijekova te biljnih lijekova. Tržište biljnih lijekova sve je veće i predstavlja znatan dio globalnog tržišta lijekovima. Biljni lijekovi sve se više razmatraju kao alternativna terapija za kojom pacijent nerijetko poseže i bez znanja liječnika i/ili bez savjetovanja s ljekarnikom. Procjenjuje se da se oko 80 % svjetske populacije za primarnu zdravstvenu zaštitu oslanja na nekonvencionalne lijekove i suplemente biljnog podrijetla (2). Biljni lijekovi se često gledaju kao uravnoteženi i umjereni pristup liječenju. Također, često je percepcija u javnosti da su biljni lijekovi bolji ili manje opasni, međutim sa stručnog aspekta primjena biljnih lijekova također zahtijeva nadzor, znanstveni pristup, kontrolu kakvoće i standardizaciju kako bi se rizici primjene takvih lijekova sveli na najmanju moguću mjeru. Sigurnost primjene biljnih lijekova predstavlja veliki problem i brigu zdravstvenog sustava i javnosti (3).

Za razvoj biljnog lijeka, od najveće je važnosti kakvoća biljnih sirovina i/ili pripravaka. Mikrobiološka kontaminacija kao i prisutnost mikrobioloških rezidua (npr. mikotoksina) u nesterilnim farmaceutskim proizvodima može smanjiti ili čak inaktivirati terapijsku aktivnost proizvoda te na druge negativne načine utjecati na zdravlje pacijenta koji uzima takav biljni lijek.

Glede mikrobioloških onečišćenja, kategorija biljnog lijeka najzahtjevnija je unutar Europske farmakopeje (Ph. Eur.). Europska farmakopeja definira zahtjeve za njihovom mikrobiološkom kakvoćom kao i metode za provjeru iste. Izaзов u primjeni biljnih lijekova predstavlja uspostavljanje zajedničkih usuglašениh smjernica, regulatornih mjera i standardiziranog nadzora tijekom uzgoja, sakupljanja, prerade i izrade. Na temelju postojećih znanstvenih dokaza i važećih propisa o kakvoći, registrirani biljni lijekovi su farmakološki aktivne supstance i potrebno ih je tretirati slično uobičajenim lijekovima, što zahtijeva promjenu paradigme od strane zdravstvenih djelatnika, ali i šire javnosti.

### Zakonodavni okvir za (tradicionalni) biljni lijek

Kako bi se određeni proizvod plasirao na tržište u kategoriji lijek, svaki proizvod mora u potpunosti ispuniti sve važeće propise Republike Hrvatske i Europske unije na području lijekova. *Zakon o lijekovima* (Narodne novine br. 76/13) i *Pravilnik o davanju odobrenja za stavljanje lijeka u promet* (Narodne novine br. 83/13) usklađeni su sa Europskim direktivama (4). *Zakon o lijekovima* 76/13 i Europska Direktiva 2001/83/EC definiraju lijek kao svaku tvar ili kombinaciju tvari prikazanu sa svojstvima liječenja ili sprječavanja bolesti kod ljudi ili svaku tvar ili kombinaciju tvari koja se može upotrijebiti ili primijeniti na ljudima u svrhu obnavljanja, ispravljanja ili prilagodbe fizioloških funkcija farmakološkim, imunološkim ili metaboličkim djelovanjem ili za postavljanje medicinske dijagnoze (5,6). Lijekovi koji kao djelatne tvari sadrže biljne tvari (biljne droge<sup>1</sup>) i/ili biljne pripravke<sup>2</sup>, sukladno europskoj regulativi, u Republici Hrvatskoj mogu biti odobreni postupkom davanja odobrenja za stavljanje lijeka u promet kao biljni lijek, ili pojednostavljenim postupkom registracije kao tradicionalni biljni lijek. Prema Zakonu o lijekovima biljni lijek (uključujući i tradicionalni biljni lijek) je

---

<sup>1</sup> **Biljne droge** su cijele ili narezane biljke, dijelovi biljaka, alge, lišajevi, gljive, u osušenom ili svježem obliku te neobrađene izlučine biljaka (EMA/HMPC/95714/2013).

<sup>2</sup> **Biljni pripravci** su pripravci dobiveni različitim postupcima iz biljnih tvari (usitnjavanje, ekstrakcija, fermentacija, destilacija, pročišćavanje, koncentriranje, tiještenje) te obuhvaćaju usitnjene ili praškaste biljne tvari, tinkture, ekstrakte, eterična ulja, istisnute sokove i prerađene izlučine biljaka (EMA/HMPC/95714/2013).

definiran kao lijek koji kao djelatne tvari sadrži isključivo jednu ili više biljnih tvari ili jedan ili više biljnih pripravaka, ili jednu ili više biljnih tvari u kombinaciji s jednim ili više biljnih pripravaka (5). Tradicionalni biljni lijek je biljni lijek čiju je sigurnost primjene i djelotvornost moguće prepoznati na temelju tradicionalne uporabe i koji ispunjava uvjete također određene navedenim Zakonom. Razlike između kategorije tradicionalnog biljnog lijeka i biljnog lijeka česta su nepoznanica zdravstvenim radnicima i pacijentima. Zakonske osnove biljnih lijekova odnose se na inovativni biljni lijek (nova djelatna tvar ili poznata djelatna tvar s novom ili proširenom indikacijom) i biljni lijek provjerene medicinske uporabe u Europskoj uniji od najmanje deset godina (engl. *Well-established use*, WEU). Odobrenje za stavljanje inovativnog biljnog lijeka u promet temeljem čl. 26. Zakona (NN 76/13 i NN 90/14) koji odgovara čl. 8(3) Direktive 2001/83/EC, izdaje se na osnovi pozitivne ocjene priložene dokumentacije o djelotvornosti i sigurnosti primjene koju čine vlastita neklinička (toksikološka i farmakološka) i klinička ispitivanja proizvođača lijeka (ovisno o terapijskom području primjene lijeka) ili kombinacija vlastitih nekliničkih i kliničkih ispitivanja i literaturnih podataka. Prema hrvatskom, odnosno europskom zakonodavstvu WEU biljni lijek mora ispuniti zakonsku osnovu, a odnosi se na Odobrenje za stavljanje biljnog lijeka u promet temeljem čl. 34. Zakona (NN 76/13 i NN 90/14) koji odgovara čl. 10a Direktive 2001/83/EC, izdaje se na osnovi pozitivne ocjene priložene dokumentacije o djelotvornosti i sigurnosti primjene koju čine iscrpni literaturni podaci o provjerenjnoj medicinskoj uporabi djelatne tvari i lijeka u EU od najmanje deset godina (6). Tradicionalni biljni lijek u tijeku registracije prolazi jednostavniji postupak u odnosu na biljni lijek, a odobrenje za stavljanje lijeka u promet izdaje se na osnovu pozitivne ocjene dokaza tradicionalne primjene tijekom najmanje 30 godina u svijetu, od čega najmanje 15 godina u Europskoj uniji. Temeljem dokaza tradicionalne primjene pretpostavlja se sigurnost i djelotvornost lijeka, odnosno nema znanstvenih dokaza djelotvornosti i sigurnosti ili su podaci ograničeni (7). Postupak koji prethodi stavljanju biljnog lijeka i tradicionalnog biljnog lijeka na tržište je definiran zakonom i podzakonskim aktima, a ocjena sigurnosti i djelotvornosti u nadležnosti nacionalnih Agencija za lijekove i ključan je dio tog postupka. Zahtjevi za izdavanje odobrenja za stavljanje inovativnog biljnog lijeka u promet su rijetka u EU. Najčešće zakonske osnove primjenju se za WEU biljni lijek i tradicionalni biljni lijek.

Direktivom 2004/24/EC uvedena je skupina tradicionalnog biljnog lijeka te je po njezinom stupanju na snagu 2004. godine, određen prijelazni period od 7 godina kako bi se omogućilo da proizvođači mogu svoje biljne lijekove prilagoditi zahtjevima za registraciju po kriteriju tradicionalni biljni lijek (8).

Povjerenstvo za biljne lijekove (engl. *Committee on Herbal Medicinal Products*, HMPC) najmlađe je povjerenstvo pri Europskoj agenciji za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) i ima vrlo važnu ulogu u usklađivanju podataka i sudbini biljnih lijekova na području Europske Unije. Svaka zemlja članica EU ima svoga člana i zamjenika u Povjerenstvu (sveukupno 28 članova) (9). Prema članku 16h Direktive 2004/24/EC, HMPC priprema i objavljuje Monografije biljnih lijekova Europske unije (engl. *European Union Herbal Monograph*), koje su po strukturi vrlo slične sažetku opisa svojstava lijeka. Monografija sadrži sve podatke bitne za sigurnu primjenu (tradicionalnog) biljnog lijeka: kvalitativni i kvantitativni sastav, farmaceutski oblik, terapijsku indikaciju, doziranje i način primjene, te informacije koje se odnose na sigurnost primjene kao što su nuspojave, kontraindikacije i interakcije s drugim lijekovima. Cilj izrade monografija je harmonizacija na području biljnih lijekova i tradicionalnih biljnih lijekova u EU.

### Mikrobiološka onečišćenja

Kakvoća (tradicionalnog) biljnog lijeka te kakvoća polaznih biljnih sirovina (biljnih droga) i djelatnih tvari (biljnih pripravaka) mora udovoljavati zahtjevima propisanim u Zakonu o lijekovima, Pravilniku o davanju odobrenja za stavljanje lijeka u promet, smjernicama Europske agencije za lijekove i monografijama Europske farmakopeje odnosno Hrvatske farmakopeje. Ukoliko lijek nije obuhvaćen Hrvatskom farmakopejom niti Europskom farmakopejom, njegova kakvoća mora odgovarati farmakopeji priznatoj u EU ili drugim međunarodnim priznatim normama (5,10). Primjerice, list vinove loze folium (*Vitis vinifera* L., Vitaceae) tradicionalni je biljni lijek odobren u indikaciji kronična venska insuficijencija (11). Monografija lista vinove loze ne nalazi se u Hrvatskoj i Europskoj farmakopeji, a odgovara Francuskoj farmakopeji (*Pharm. Franc. X.*, 1996).

Važno je istaknuti, da prema Općoj uredbi EU o hrani (EC) br. 178/2002, dodaci prehrani koji također mogu sadržavati tvari biljnog podrijetla smatraju se prehranbenim proizvodima. Odgovornost za sigurnost ovih proizvoda snosi proizvođač koji proizvod stavlja na tržište. Referentno zakonodavstvo EU na području dodataka prehrani je Direktiva 2002/46/EZ kojom se utvrđuju usklađeni popisi tvari koji se koriste u proizvodnji dodataka prehrani i zahtjevi za označavanje istih, a primjenjuju se samo za vitamine i minerale u proizvodnji dodataka prehrani. Upotreba drugih tvari osim vitamina ili minerala u proizvodnji dodataka prehrani regulira se nacionalnim pravilima ili može biti podložna drugom posebnom zakonodavstvu EU-a. U Republici Hrvatskoj za kontaminaciju dodataka

prehrani primjenjuje se *Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani* (NN 146/12). Navedenim pravilnikom se preuzimaju odredbe Uredbe Komisije (EZ-a) br. 1881/2006 od 19. prosinca 2006. kojom se utvrđuju najveće dopuštene količine određenih kontaminanata u hrani (12). Mikroorganizmi mogu mijenjati fizičke karakteristike dodataka prehrani, uključujući razdvajanje slojeva emulzija, stanjivanje kreme, fermentaciju sirupa, te mogu stvarati zamućenost ili mirise i promjene boje. Ove promjene utječu na terapijski učinak proizvoda i doziranje. Međutim, u pogledu kvarenja posredovanog mikroorganizmima, čvrsti dozirni oblici (kapsule, tablete, dražeje) predstavljaju ozbiljniji problem zbog odsutnosti očiglednih znakova kvarenja. Stoga, rezultati istraživanja i podaci iz literature ukazuju na hitnu potrebu za uvođenjem specifičnih zakonskih propisa koji se odnose na mikrobiološku kvalitetu dodataka prehrani, definirajući kriterije i metode ispitivanja (13).

Mikrobiološka kontaminacija i kemijska kontaminacija mikrobnim produktima (mikotoksinima) sastavni je element područja kontrole i sigurnosti biljnih lijekova. Biljni lijekovi podložniji su mikrobiološkim onečišćenjima od kemijski dobro definiranog lijeka. Biljne ljekovite vrste mogu sadržavati značajno mikrobiološko opterećenje, mogu biti kontaminirane i/ili sadržavati mikotoksine (1). Iako se bakterijske endospore i gljivične (egzo)spore mogu smatrati dvjema dominantnim skupinama mikrobioloških kontaminanata povezanih s ljekovitim biljkama, velika raznolikost bakterijskih i gljivičnih stanica te virusa može se naći u biljnom materijalu ili na njemu. Važno je naglasiti da su biljni lijekovi nerijetko kompleksne biljne mješavine čiji sastav i mikrobiološka čistoća mogu značajno varirati ovisno o procesima uzgoja, sakupljanja, sušenja, transporta te formuliranja lijeka. Sigurnost (neškodljivost) primjene biljnih lijekova uvelike je uvjetovana kakvoćom izvorne biljne sirovine tj. biljne droge. Biljne droge su cijele ili narezane biljke, dijelovi biljaka, alge, lišajevi, gljive, u osušenom ili svježem obliku te neobrađene izlučevine biljaka. Mikrobiološko opterećenje biljaka može biti uzrokovano nizom različitih čimbenika. Po svom podrijetlu biljni lijekovi podliježu kontaminaciji mikroorganizmima iz tla, zraka i vode. Hidroponski uzgoj jedna je od novijih alternativnih metoda popularnom klasičnom načinu uzgoja raznih biljaka u zemlji, a predstavlja metodu uzgoja na hranjivim podlogama bez upotrebe tla s djelomično ili u potpunosti kontroliranim uvjetima u stakleniku ili plasteniku (14). Ovakav način proizvodnje pruža zaštitu od vanjskih, klimatskih i mehaničkih utjecaja. Na mikrobnu kontaminaciju biljaka mogu utjecati brojni okolišni čimbenici kao što su primjerice temperatura, vlaga i količina oborina, postupci rukovanja biljnom sirovinom (uključujući i antropogeni utjecaj) te uvjeti skladištenja i prerađivanja. Također, važno je

istaknuti da različiti vektori (prijenosnici) mogu posredovati u mikrobiološkom onečišćenju, na primjer ljudi, ptice, glodavci, insekti, zrak i voda. Sukladno navedenom vrlo je važno analizirati različite aspekte koji se odnose na uzgoj, berbu, skladištenje, proizvodnju i dekontaminaciju ljekovitih biljnih proizvoda (1).

Kako biološki izvor biljnog lijeka utjecajem različitih navedenih čimbenika može biti varijabilne kakvoće, potrebni su iznimni naponi kako bi se osigurala stalna i adekvatna kvaliteta. Za čistoću i sigurnost proizvoda, stoga je vrlo važno pridržavati se specifičnih higijenskih mjera i standardiziranih postupaka. Postupci i čimbenici obrade u velikoj mjeri određuju mikrobiološku kvalitetu konačnih proizvoda. Izvori kontaminacije su brojni, stoga biljna vrsta za dobivanje polazne biljne sirovine (biljne droge) mora biti uzgojena i sakupljena u skladu sa *Smjernicama za dobru agronomsku i sakupljačku praksu* (engl. *Good agricultural and collection practice for starting materials of herbal origin*, GACP), a biljni pripravnici i (tradicionalni) biljni lijekovi trebaju biti proizvedeni u skladu sa smjernicama *Dobre proizvođačke prakse* (engl. *Good manufacturing practice*, GMP). Svi proizvođači uključeni u postupak proizvodnje lijeka moraju raspolagati važećom proizvodnom dozvolom te potvrdom o provođenju dobre proizvođačke prakse (GMP certifikatom) (15,16). Zahtjevi kakvoće za biljne i tradicionalne biljne lijekove detaljnije su definirani smjernicama koje se mogu naći na mrežnoj stranici Europske agencije za lijekove u kategoriji *Quality Guidelines* (17,18)

### Onečišćenja mikroorganizmima

Onečišćenja mikroorganizmima su biološka onečišćenja, te u njih ubrajamo onečišćenja bakterijama i/ili njihovim endosporama, gljivama (kvasci, plijesni; egzospore plijesni) te rjeđe virusima i protozoama. Mikroorganizmi mogu utjecati na fizikalno-kemijska svojstva samog biljnog lijeka umanjujući na taj način njegovu kvalitetu i učinkovitost. Svakako najveću brigu mikrobiološke kontaminacije predstavlja izazivanje infektivne bolesti kod čovjeka. Kako sve veći globalni problem predstavlja rastuća rezistencija bakterija na antibiotike u kliničkoj praksi i nedostatan pronalazak novih antibiotika, kontaminacija rezistentnim bakterijskim sojevima predstavljaju poseban zdravstveni problem u primjeni biljnih lijekova (19).

Objavljeni podaci ukazuju na širok spektar bakterija i gljivica koje mogu kontaminirati biljnu sirovinu odnosno lijek. Iako se enterobakterije mogu pronaći u prirodi, prisutnost enterobakterija i vrste *Escherichia coli* odražavaju situaciju u vezi s onečišćenjem fekalijama. Zajedno sa skupom koliformnih oblika, može se uzeti kao pokazatelj nepoželjnih higijenskih uvjeta. U studiji provedenoj

u Nigeriji, koja je imala je za cilj procijeniti bakterijsku kontaminaciju, u prahu biljnih lijekova utvrđene su bakterijske vrste *Salmonella typhi*, *Shigella* spp., *E. coli* i *S. aureus* (20). Istraživanje provedeno 2008. godine pokazalo je da u 60 % biljnih uzoraka bila prisutna kontaminacija gljivicama, a plijesni vrste *Aspergillus flavus* i *Aspergillus fumigatus* bili su najčešći izolati (21). Još jedno istraživanje provedeno u Brazilu pokazalo je visoku učestalost gljivične kontaminacije ljekovitih biljaka. Ispitivanjem 91 uzorka utvrđeno je da je u 50 % uzoraka nadzemnih dijelova bila prisutna kontaminacija gljivicama. Rezultati su pokazali kako su prevladavajuće vrste bile (89,9 % izolata) iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium* budući da su ove vrste široko rasprostranjene u brazilskom ekosustavu. Sojevi iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium* proizvode različite mikotoksine. Kontaminirani biljni lijekovi poseban problem mogu biti za imunokompromitirane bolesnike, starije pacijente ili djecu, koji ih nerijetko primjenjuju kao dopunu ili zamjenu za standardnu farmakoterapiju (22). Kineman i sur. (23) analizirali su biljne proizvode koje su koristili HIV-pozitivni bolesnici te u njima izolirali slijedeće vrste: *Staphylococcus auricularis*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterobacter agglomeranti*, *E. intermedius*, *Klebsiella pneumoniae*, *Sphingomonas paucimobilis*, zatim kvasac *Rhodotorula mucilaginosa* te plijesan *Aspergillus niger*.

Ljekovite biljke i biljni proizvodi rijetko su prijavljeni kao izvor virusne infekcije. Istraživanje u Japanu objavilo je izvješća o akutnom hepatitisu E (imunoserološka dijagnoza), koja se povezuju s primjenom tradicionalnog kineskog biljnog medicinskog proizvoda (24).

### Onečišćenje sporama

Mikrobiološka onečišćenja također predstavljaju spore bakterija (endospore) i gljiva (poput konidija kod plijesni). Endospore stvaraju određene gram-pozitivne bakterije, primjerice iz rodova *Bacillus* i *Clostridium* te nastaju kada su bakterije izložene nepovoljnim uvjetima okoline kao npr. povišenoj temperaturi, isušivanju, zračenju ili nestašici hranjivih tvari. Općenito, veći broj spora se može utvrditi u suhim biljnim tvarima nego u vlažnim, posebno ako se koristi neprikladan proces sušenja (25). Bakterijske spore su visoko rezistentne na različite uvjete (sušenje, smrzavanje, vruća vodena para, povišeni tlak, UV zračenje, etanol). Bakterijske spore se mogu vratiti u vegetativno stanje kada se stvore povoljni uvjeti okoline. Spore mnogih vrsta *Bacillus* otporne su na toplinu, zračenje, dezinfekcijska sredstva i isušivanje, teško ih je eliminirati iz medicinskih i farmaceutskih materijala i čest su uzrok kontaminacije. Posebno opasne vrste iz porodice *Bacillaceae* su *B. anthracis* koji uzrokuje bedrenicu (antraks) i *B. cereus* koji uzrokuje trovanje hranom (alimentarne infekcije i intoksikacije).



## Onečišćenje mikotoksinima

Mikotoksini su sekundari metaboliti plijesni i mogu uzrokovati oštećenja na molekularnom, staničnom nivou i u organskim sustavima, ovisno o vrsti mikotoksina, koncentraciji i vremenu izloženosti te drugim čimbenicima. Spadaju u skupinu kemijskih onečišćenja uvjetovanih mikroorganizmima, a mogu nastati tijekom rasta biljke ili tijekom skladištenja. Nastanak mikotoksina ovisi o sposobnosti određene vrste plijesni za njihovu proizvodnju, vrsti substrata na kojem plijesan raste, vlažnosti, o prisutnom omjeru ugljikovog dioksida i kisika, prisutnosti drugih mikroorganizama te prisutnosti fungicida (26). Prema Ph. Eur. ističu se vrlo toksični i karcinogeni mikotoksini lipofilnih svojstava aflatoksini (aflatoksin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>) te okratoksin A (OTA). Kontaminacija plijesni vrste *A. flavus*, najpoznatijim proizvođačem aflatoksina, česta je primjerice u čaju ljekovitog bilja (24). Osim plijesni vrste *A. flavus* česti proizvođač aflatoksina je i *A. parasiticus*. Oko 13 različitih aflatoksina je poznato u prirodi, a među njima se najtoksičnijim smatra aflatoksin B<sub>1</sub> (25,27). Zemljopisno podrijetlo može imati znatan utjecaj na stupanj stvaranja aflatoksina jer mikroorganizmi koji stvaraju aflatoksin preferiraju povišene temperature i vlažne uvjete. Općenito, biljne tvari koje potječu od biljaka uzgajanih u (sub)tropskoj klimi mogu pokazati značajno više razine aflatoksina od onih koje se uzgajaju u hladnijim i suhim klimama (25). Aflatoksin B<sub>1</sub> se povezuje s hepatocelularnim karcinomima te s imunosupresijom. Prevalencija hepatocelularnog karcinoma kod pojedinaca izloženih aflatoksinu povećava se tijekom istodobne infekcije virusom hepatitisa B (28). OTA je nefrotoksičan, hepatotoksičan i imunitoksičan mikotoksin (26). Međunarodna agencija za istraživanje raka je ocijenila OTA-u kancerogenom (klasa 2B) (29). Okratoksin A stvaraju neke vrste iz porodice *Aspergillus* i *Penicillium*, kao npr. *A. ochraceus* i *P. verrucosum* (25). OTA je vrlo često prisutan kod korijena sladića, stoga je i farmakopejska metoda određivanja okratoksina A pokazana prikladnom za korijen sladića i ekstrakt korijena sladića (30). OTA je slabo topljiv u vodi. U istraživanju koje su 2014. objavili Shim i sur. (31), ispitivana je brzina prijenosa OTA iz biljnog lijeka u dekokt. Dekokti su pripremljeni vrenjem i autoklavanjem uz i bez natapanja u vodi. Analiza okratoksina je provedena primjenom HPLC (engl. *High-performance liquid chromatography*) tehnike. Rezultati su pokazali da je na povećanu brzinu prijenosa OTA-e utjecalo proces natapanja u vodi i autoklavanje. Rezultati su također pokazali da dekokti biljnih lijekova mogu predstavljati značajan zdravstveni rizik (31). U istraživanju koje je proučavalo brzinu prijenosa aflatoksina iz pet različitih materijala biljnih sirovina u njihove dekokte nakon inokulacije s plijesni *Aspergillus flavus*, pronađeni su aflatoksini B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i G<sub>2</sub> u pljesnivim uzorcima

s najvećim sadržajem aflatoksina B<sub>1</sub>. Nadalje, pokazano je kako su aflatoksini B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i G<sub>2</sub> imali veliku brzinu prijenosa iz biljnih lijekova u njihove dekokte, posebice aflatoksin G<sub>2</sub> (32).

Značajna skupina mikotoksina hidrofилnih svojstava koju treba spomenuti su i fumonizini. Najčešće ih proizvode plijesni vrste *Fusarium verticillioides* i *F. proliferatum*. Procjenjuje se da postoji 15 različitih tipova fumonizina, a najbitnijima se smatra fuminozini tipa B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, od kojih je fuminozin B<sub>1</sub> najučestaliji. Na istraživanim animalnim modelima utvrđeno je da je fuminozin B<sub>1</sub> hepatotoksičan i nefrotoksičan (33).

U određivanju koncentracije mikotoksina vrlo je važno pravilno uzorkovanje (34–36). Uzorkovanje biljnog materijala kompleksnije je u odnosu na prehrambeni materijal. Zbog specifične strukture biljnog materijala, onečišćenja mogu biti neravnomjerno raspoređena u uzorku putem tzv. točkaste kontaminacije. Određene jedinice materijala mogu biti visoko kontaminirane tzv. grozdovi mikotoksina (engl. *mycotoxin clusters*), dok ostali dijelovi mogu uopće ne sadržavati mikotoksine. Pri skupljanju uzorka za analizu može se dogoditi da se prikupe uzorak iz kontaminiranih jedinica ili dijelova koji uopće ne sadrže mikotoksine što može dovesti do netočnih krajnjih rezultata. Vrlo je važno da se kod uzorkovanja za mikrobiološku analizu prikuplja nasumično što više manjih pojedinačnih dijelova kako bi konačan uzorak bio reprezentativan. Biljni materijal zbog kompleksne strukture teže je analizirati standardnim metodama, koje su uglavnom više primjenjive na prehrambene uzorke. Navedeno ukazuje na potrebu razvijanja specifičnih i visoko osjetljivih metoda primjenjivih za određene biljne droge koje bi olakšale utvrđivanje mikotoksina u biljnim uzorcima (37, 38).

### Smanjenje mikrobiološkog onečišćenja

Izvori kontaminacije biljnih droga i biljnih pripravaka, te posljedično potencijalno i (tradicionalnih) biljnih lijekova višestruki su. Kontaminacija može biti primarna i sekundarna. Primarnu kontaminaciju uzrokuju prirodno prisutne mikrobne vrste (samonikle biljne vrste ili uzgojene monokulture), a na njih utječu tlo, zrak, gnojivo i drugi faktori. Sekundarnu kontaminaciju uzrokuje rukovanje biljnim materijalom (ljudska intervencija, proces sušenja, uvjeti ekstrakcije, proizvodna oprema, ventilacijski sustavi, transport, skladištenje) (17). Hidroponski uzgoj može pridonijeti manjoj mikrobiološkoj kontaminaciji u odnosu na uzgoj u zemlji (39).

U postizanju minimalno moguće mikrobiološke kontaminacije, prevencija ima prednost pred dekontaminacijskim postupcima (25). Stoga je važno osigu-

rati praćenje kako primarne tako i sekundarne kontaminacije (25). Već spomenute smjernice GACP i GMP upravo predstavljaju putokaz u tom procesu jer naglašavaju važnost kontinuiranog osiguravanja dobre kontrole kakvoće kroz proizvodni proces, od izvorne biljne sirovine do konačnog proizvoda (25).

### Prevenција mikrobiološkog onečišćenja

Osiguranjem odgovarajućih uvjeta uzgoja treba se spriječiti suvišna mikrobiološka kontaminacija biljnog materijala. U određenim slučajevima, kada je to opravdano, mogu se koristiti fungicidi kako bi se smanjila kontaminacija biljnih droga gljivicama. Vrlo važnu ulogu ima vrijeme prikupljanja biljnog materijala, kako bi se ograničila prisutnost vode u biljnom materijalu (25). Također, proces sušenja izrazito je važan, jer prisutna vlaga značajno utječe na mogući rast mikroorganizama te prisutnost mikotoksina. Sušenje se u osnovi definira kao smanjenje udjela vlage u biljkama, čiji je cilj sprječavanje enzimske i mikrobne aktivnosti, te posljedično očuvanje proizvoda za produljeni rok trajanja (40). Sušenje predstavlja najčešću, temeljnu metodu očuvanja ljekovitog bilja koja omogućava brzo očuvanje ljekovitih svojstava biljnog materijala na relativno jednostavan način. Optimizacija procesa sušenja pridonosi fizičkoj, kemijskoj i mikrobiološkoj stabilnosti biljnog materijala. Odabir uvjeta sušenja ovisi o sadržaju vlage, biljnim dijelovima koji se koriste i temperaturi koja je najprikladnija za očuvanje traženih sastojaka. Koristeći odgovarajuće sisteme i tehnike za sušenje ljekovitog bilja, moguće je optimizirati uvjete koji pogoduju adekvatnom uklanjanju vlage, a bez štetnih utjecaja na kvalitetu aktivnih sastojka (40). Studije o dugoročnoj stabilnosti osušenih biljnih čajeva i pripravaka su rijetke. Osušene biljne droge su higroskopne (lako apsorbiraju vlagu) i moraju se skladištiti pod kontroliranim uvjetima. Rehidracija može dovesti do raspada bioaktivnih metabolita enzimima iz mikroorganizama ili same biljne vrste.

Važni koraci u procesu proizvodnje biljnih pripravaka i biljnih lijekova su temperatura te vrsta i vrijeme ekstrakcije. Pored temperature ekstrakcije, izbor ekstrakcijskog otapala još je jedan važan faktor za sprječavanje mikrobne kontaminacije. Cilj postupka ekstrakcije trebao bi osigurati maksimalni prinos tvari i biti najviše kvalitete (koncentracija ciljnih spojeva i farmakološka snaga ekstrakata). Za ekstrakciju aktivnih fitokemijskih spojeva najčešće se koriste otapala metanol, etanol, heksan, kloroform i dietilni eter (41). Ekstrakcijska otpala u tradicionalnim biljnim lijekovima su najčešće etanol u različitim koncentracijama i voda (Ph.Eur). Pripravci i lijekovi koji su pripremljeni s vodom ili niskim koncentracijama etanola posebno su podložni mikrobiološkoj kontaminaciji (25). Moguće je dodavanje konzervansa, s tim da je izbor konzervansa i njegova

koncentracija prikladna i učinkovita za svaki pojedini slučaj te u skladu s postojećim farmakopejskim i drugim važećim propisima (42). Važno je istaknuti da primjena konzervansa treba biti opravdana te da ima svrhu prevencije mikrobnog rasta, a ne smanjivanje mikrobne kontaminacije. Mikrobiološka onečišćenja koja proizlaze iz vode, ekstrakcijskih otapala te ekscipijensa za standardizaciju trebali bi biti kontrolirani budući da oni pridonose ukupnoj mikrobiološkoj kontaminaciji u biljnom pripravku.

pH vrijednost jedan je od glavnih faktora koji utječu na kvalitetu lijeka. Ona kontrolira mnoge kemijske i mikrobiološke reakcije. Kada je pH vrijednost niska (prisutnost kiselih tvari), broj bakterija mogao bi biti nizak. Pri neutralnom do višem pH, razina mikrobiološke kontaminacije u biljnim pripravcima može biti veća u odnosu na niže vrijednosti pH. Ovo upućuje na to da je neutralan ili alkalni pH pogodan visokom stupnju onečišćenja biljnim pripravcima. To se slaže s opažanjem da je rast bakterija optimalan pri više ili manje neutralnom pH, u rasponu od 5 do 8,5.

Većina obrade biljnog materijala prije skladištenja, poput one koja uključuje sušenje, toplinu, hlađenje i pakiranje, može spriječiti propadanje biljnog materijala tijekom skladištenja (43). Skladištenje droga važan je dio proizvodnog procesa. Tijekom skladištenja, zbog čimbenika u okolišu i vlastitih fizičkih i kemijskih svojstava, postupno nastaju fizičke, kemijske i biološke promjene. Dugo skladištenje u slabo prozračenom skladištu obično povećava udio vlage u uzorku zbog kapaciteta izmjene topline, čineći ljekovito bilje osjetljivijim na rast plijesni i proizvodnju toksina. Svjetska zdravstvena organizacija preporučuje da se svježiji ljekoviti biljni materijal, kad god je to potrebno i moguće, čuva na odgovarajućim niskim temperaturama, u idealnom slučaju od 2 do 8 °C; a smrznuti proizvodi trebaju se čuvati na temperaturama nižim od -20 °C. Za odgovarajuću kakvoću biljnog lijeka važna je kakvoća korištenog izvornog biljnog materijala, ali i sam proizvodni proces. Smanjenje mikrobiološke kontaminacije prevencijom ključno je, jer mogućnosti naknadne dekontaminacije zapravo su vrlo ograničene (25).

### Dekontaminacijske metode

Dekontaminacijske metode, ukoliko su neophodne, trebaju se primijeniti što prije kako bi se što bolja mikrobiološka kvaliteta održala tijekom proizvodnog procesa te kako bi se onemogućio daljnji mikrobiološki rast (25). Primjena dekontaminacijske metoda ima za cilj povećati rok trajanja biljnog lijeka. Odabir različitih metoda dekontaminacije na ljekovito bilje i proizvode ovise o nizu faktora:

- ♦ opterećenjem mikroba (prirodom i količinom početne kontaminacije),
- ♦ sastavu biljaka / proizvoda (složenosti/omjeru kemijskih tvari u njima),
- ♦ fizičkom stanju (čvrsto, tekući oblik),
- ♦ uvjetima liječenja (vrijeme, doza, indikacija).

Važno je istaknuti da dekontaminacijska metoda nosi mogućnost gubitaka određene količine kemijskih/aktivnih spojeva. Stoga, odabirom odgovarajuće dekontaminacijske metode osim što je važno smanjiti mikrobnog opterećenje na propisane razine, važno je i osigurati da krajnji proizvod ima odgovarajuću kvalitetu, sigurnost i terapijsku učinkovitost (1).

Prema Ph. Eur., potrebno je dokazati da korišteni način dekontaminacije nema štetan utjecaj na biljni materijal te da nema zaostajanja rezidua/kontaminanata (44). S druge strane, korištenje nekih učinkovitih sredstava za dekontaminaciju zabranjeno je u Europskoj uniji Direktivom 89/365/EEC ili se općenito napušta u svijetu, upravo radi štetnog popratnog djelovanja (rezidua), što dodatno smanjuje izbor sredstava za dekontaminaciju (26). Tako je etilen oksid zabranjen kao sredstvo za dekontaminaciju biljnih tvari u Europi od 31. prosinca 1989. godine.

Prihvatljiv broj prisutnih mikroorganizama za nesterilne farmaceutske proizvode definiran je Europskom farmakopejom putem maksimalno dozvoljenog broja ukupnih aerobnih mezofila (engl. *Total aerobic microbial count*, TAMC) i ukupnog broja kvasaca i plijesni (engl. *Total combined yeasts/moulds count*, TYMC). Procjenu rizika izvodi proizvođač, a temelji se na početnoj razini kontaminacije i vrsti mikroorganizma.

Dekontaminacijski proces ne bi trebao biti zamjena za GACP ili GMP ili maskiranje niske mikrobiološke kakvoće biljnih droga, biljnih pripravaka ili (tradicionalnih) biljnih lijekova. Većina dekontaminacijskih metoda učinkovito djeluju na vijabilne mikroorganizme, samo neke smanjuju broj prisutnih spora, dok se prisutni bakterijski toksini i miktoksini vrlo teško uklanjaju iz biljnih uzoraka (25). Postoje različite dekontaminacijske metode i svaka od njih ima svoje specifičnosti. Izdvojene dekontaminacijske metode, karakteristike i specifičnosti prikazane su u tablici 1.

### Metode za određivanje mikrobiološke kakvoće

Farmaceutski preparati se prema mikrobiološkoj kakvoći mogu podijeliti u dvije skupine – sterilne i nesterilne. Skupina sterilnih lijekova nije predmet ovog rada, dok će za nesterilne biljne tvari/pripravke biti prikazani zahtijevani kriteriji prihvatljivosti i metode za provjeru mikrobiološke kakvoće prema Europskoj farmakopeji.

**Tablica 1.** ► Izdvojene dekontaminacijske metode i njihove karakteristike (preuzeto i prilagođeno iz EMA/HMPC/95714/2013).

<b>METODA DEKONTAMINACIJE</b>	<b>KARAKTERISTIKE METODE</b>
<b>ekstrakcija</b>	ovisi o nizu faktora (temperatura, izbor otapala, ekstrakcijska metoda, specifične karakteristike aktivnih sastojaka); novije ekstrakcijske metode (ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija) su robustnije i brže u odnosu na tradicionalne ekstrakcijske metode (maceracija, perkolacija ekstrakcija po Soxhlet-u, dekokcija)
<b>konzerviranje</b>	primjena konzervanasa i antioksidanasa sprječava rast gljivica, stvaranje slobodnih radikala i različitih sekreta mikotoksina
<b>primjena etanola</b>	primjena viših koncentracija etanola (60-95 %) ima baktericidan i fungicidan učinak, dok je primjena etanola neučinkovita na bakterijske spore
<b>primjena visokih temperatura</b>	primjenu vrlo visokih temperatura u svrhu uništavanja spora gram pozitivnih bakterija za posljedicu može imati negativan učinak na fizikalno-kemijska svojstva biljnog lijeka; metoda nije prikladna za ekstrakte koji sadrže smole u većoj količini, izrazito viskozne ekstrakte (sadržaj suhih zaostataka je viši od 50 %) te ekstrakte s termolabilnim i hlapljivim sastojcima
<b>fumigacija</b>	ne primjenjuje se često i preporuča se izbjeći je kada je to moguće tj. preporuka je upotrijebiti neki od drugih postupaka; primjenom etilen oksida nastaju kancerogeni spojevi zbog čega je ovaj postupak zabranjen u nekim zemljama; treba primijeniti u najranijoj mogućoj fazi proizvodnje
<b>ozračivanje</b>	ozračivanje se provodi samo ako drugi postupci nisu izvedivi
<b>sušenje smrzanjem</b>	prednjači pred drugim metodama sušenja, ali nije dovoljno istražena metoda te još uvijek nema dovoljno informacija kako utječe na sastojke biljnog materijala
<b>primjena visokog tlaka</b>	primjena tlaka 100-800 MPa u procesu uništavanja mikroorganizama i inaktivacije enzima, tlak se prenosi ravnomjerno i trenutačno zbog čega ne dolazi do deformacije i pregrijavanja uzorka; moguće je da proces samo ošteti stanicu mikroorganizama te da se stanica poslije ponovno oporavi; kako bi se poboljšala učinkovitost ovog procesa metodu je moguće kombinirati s primjenom visokih temperatura, primjenom visokog tlaka u ciklusima, ultrazvukom, izmjeničnom strujom.
<b>primjena alkalnih ili lužatih supstancija</b>	osim što smanjuje i mikrobiološku kontaminaciju smanjuje i broj spora; bazični i kiseli sastojci mogu značajno kemijski promijeniti biljne tvari/pripravke i zbog toga se ne primjenju često

Farmakopeja sadrži metode za (1) utvrđivanje prisutnosti, (2) određivanje broja i (3) identifikaciju prisutnih mikroorganizama te propisuje kriterije za prihvaćanje nesterilnih farmaceutskih proizvoda koji se temelje na određivanju TAMC i TYMC te ispitivanju odsutnosti specifičnih mikrobnih vrsta (45–49). Prikazane su i alternativne metode, koje se mogu koristiti u određivanju mikrobiološke kakvoće farmaceutskih pripravaka. S obzirom da standardne farmakopejske metode zahtijevaju relativno puno vremena za provedbu, prednost nekih alternativnih metoda je mogućnost dobivanja rezultata u stvarnom vremenu ili blizu stvarnog vremena (25, 49). Uz navedene metode, treba istaknuti i metode za određivanje mikotoksina u biljnim lijekovima (27, 30). Procjenu relevantnih čimbenika rizika provodi osoblje specijalizirano za mikrobiologiju i tumačenje mikrobioloških podataka (slika 1.).



**Slika 1.** ► Shematski prikaz nekih faktora rizika u procjeni mikrobiološkog onečišćenja biljnih droga, biljnih pripravaka i (tradicionalnih) biljnih lijekova.

### Kriteriji prihvatljivosti za mikrobiološku kakvoću

Definirane su tri kategorije mikrobiološke kakvoće (tradicionalnih) biljnih lijekova za oralnu primjenu i biljnih ekstrakata korištenih u njihovoj izradi, prikazanih u tablici 2. (50):

**Kategorija A.** Biljni lijekovi koji sadrže biljne droge, s ili bez ekscipijensa, namijenjeni za pripremu infuza ili dekokta koristeći kipuću vodu (primjerice biljni čajevi s ili bez dodatka dodatnih aroma).

**Kategorija B.** Biljni lijekovi koji, primjerice, sadrže biljne ekstrakte i/ili biljne droge, s ili bez ekscipijensa, gdje je postupak pripreme (primjerice ekstrakcija), ili gdje je primjenjivo, u slučaju biljnih droga, postupkom pripreme već smanjen broj mikroorganizama ispod granica navedenih u ovoj kategoriji.

**Kategorija C.** Biljni lijekovi koji, primjerice, sadrže biljne ekstrakte i/ili biljne droge, s ili bez ekscipijensa, za koje može biti pokazano da metoda postupka pripreme (primjerice ekstrakcija niskom postotnom otopinom etanola ili vodom koja nije kipuća), ili u slučaju biljnih droga, postupak pripreme ne smanjuje broj mikroorganizama ispod granica navedenih u kategoriji B.

**Tablica 2.** ► Mikrobiološka kakvoća (tradicionalnih) biljnih lijekova za oralnu primjenu i biljnih ekstrakata korištenih u njihovoj izradi (preuzeto i prilagođeno iz Ph. Eur. 5.1.8.).

	TAMC	TYMC	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> spp.	GNBOŽ
<b>Kategorija A</b>	10 <sup>7</sup> CFU g <sup>-1</sup> (max. 5x10 <sup>7</sup> CFU g <sup>-1</sup> )	10 <sup>5</sup> CFU g <sup>-1</sup> (max. 5x10 <sup>5</sup> CFU g <sup>-1</sup> )	10 <sup>3</sup> CFU g <sup>-1</sup>	Odsutnost u 25 g	ND
<b>Kategorija B</b>	10 <sup>4</sup> CFU g <sup>-1</sup> ili CFU ml <sup>-1</sup> (max. 5x10 <sup>4</sup> CFU g <sup>-1</sup> ili CFU ml <sup>-1</sup> )	10 <sup>2</sup> CFU g <sup>-1</sup> ili CFU ml <sup>-1</sup> (max. 5x10 <sup>2</sup> CFU g <sup>-1</sup> ili CFU ml <sup>-1</sup> )	Odsutnost u 1 g ili 1 ml	Odsutnost u 25 g ili 25 ml	10 <sup>2</sup> CFU g <sup>-1</sup> ili CFU ml <sup>-1</sup>
<b>Kategorija C</b>	10 <sup>5</sup> CFU g <sup>-1</sup> ili CFU ml <sup>-1</sup> (max. 5x10 <sup>5</sup> CFU g <sup>-1</sup> ili CFU ml <sup>-1</sup> )	10 <sup>4</sup> CFU g <sup>-1</sup> ili CFU ml <sup>-1</sup> (max. 5x10 <sup>4</sup> CFU g <sup>-1</sup> ili CFU ml <sup>-1</sup> )	Odsutnost u 1 g ili 1 ml	Odsutnost u 25 g ili 25 ml	10 <sup>4</sup> CFU g <sup>-1</sup> ili CFU ml <sup>-1</sup>

Legenda: TAMC – ukupan broj mezofilnih bakterija; TYMC – ukupan broj kvasaca i plijesni; GNBOŽ – gram-negativne bakterije otporne na žuč (engl. *Bile-tolerant gram-negative bacteria*); CFU g<sup>-1</sup> ili CFU ml<sup>-1</sup> – broj bakterijskih stanica kod TAMC, odnosno stanica gljivica kod TYMC po ml ili g uzorka (engl. *Colony forming unit*); ND – nije definirano.

Za biljne ekstrakte koji će biti korišteni u izradi farmaceutskih pripravaka za druge puteve primjene (osim oralne primjene) te druge biljne lijekove (osim onih za oralnu primjenu), vrijede propisi definirani u poglavlju Ph. Eur. 5.1.4.



(48), a kriteriji su navedeni u tablicama 3.a. i 3.b. No, treba uzeti u obzir da kriteriji prihvatljivosti mikrobiološke kakvoće djelatnih i pomoćnih tvari te samih lijekova mogu biti i stroži od preporučenih kriterija u Ph. Eur. 5.1.4 poglavlju.

**Tablica 3.a.** ► Kriteriji prihvatljivosti za mikrobiološku kakvoću nesterilnih farmaceutskih oblika (preuzeto i prilagođeno iz Ph. Eur. 5.1.4.).

PUT PRIMJENE	TAMC (CFU g <sup>-1</sup> ili CFU ml <sup>-1</sup> )	TYMC (CFU g <sup>-1</sup> ili CFU ml <sup>-1</sup> )	ODSUSTVO ODREĐENIH MIKROBIOLOŠKIH VRSTA
Rektalna primjena	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	–
Oromukozna, gingivalna, kutana, nazalna i aurikularna primjena	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	<i>S. aureus</i> (1 g ili 1 ml) <i>P. aeruginosa</i> (1 g ili 1 ml)
Vaginalna primjena	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	<i>S. aureus</i> (1 g ili 1 ml) <i>P. aeruginosa</i> (1 g ili 1 ml) <i>C. albicans</i> (1 g ili 1 ml)
Transdermalni flasteri	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	<i>S. aureus</i> (1 flaster) <i>P. aeruginosa</i> (1 flaster)
Inhalacija	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	<i>S. aureus</i> (1 g ili 1 ml) <i>P. aeruginosa</i> (1 g ili 1 ml) gram-negativne bakterije otporne na žuč (1 g ili 1 ml)

Legenda: TAMC – ukupan broj mezofilnih bakterija; TYMC – ukupan broj kvasaca i plijesni; CFU g<sup>-1</sup> ili CFU ml<sup>-1</sup> – broj bakterijskih stanica kod TAMC, odnosno stanica gljivica kod TYMC po ml ili g uzorka (engl. *Colony forming unit*).

**Tablica 3.b.** ► Kriteriji prihvatljivosti za mikrobiološku kakvoću nesterilnih tvari za farmaceutsku uporabu, tj. sirovina koje se koriste za izradu farmaceutskih pripravaka (preuzeto i prilagođeno iz Ph. Eur. 5.1.4.).

PUT PRIMJENE	TAMC (CFU g <sup>-1</sup> ili CFU ml <sup>-1</sup> )	TYMC (CFU g <sup>-1</sup> ili CFU ml <sup>-1</sup> )	ODSUSTVO ODREĐENIH MIKROBIOLOŠKIH VRSTA
Farmaceutske sirovine	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	–

Legenda: TAMC – ukupan broj mezofilnih bakterija; TYMC – ukupan broj kvasaca i plijesni; CFU g<sup>-1</sup> ili CFU ml<sup>-1</sup> – broj bakterijskih stanica kod TAMC, odnosno stanica gljivica kod TYMC po ml ili g uzorka (engl. *Colony forming unit*).

## Metode za određivanje ukupnog broja mikroorganizama – enumeracijske metode (TAMC, TYMC)

Kao već navedeno, ukoliko nije drukčije naznačeno, standardno ispitivanje mikrobiološke kakvoće biljnih droga, pripravaka iz biljnih droga i biljnih lijekova treba uključivati ispitivanje TAMC i TYMC te odsustvo pojedinih mikrobnih vrsta, ovisno o načinu primjene (45–47). Metode se odnose na konkretno određivanje ukupnog broja mezofilnih bakterija i gljivica koje rastu u aerobnim uvjetima, a predstavljaju mikrobiološko onečišćenje. Važno je napomenuti da je potrebno osigurati uvjete rada tijekom ispitivanja, koji će spriječiti dodatnu mikrobiološku kontaminaciju. Prije provođenja ispitivanja, potrebno je provjeriti prikladnost medija i odabrane metode za pojedini uzorak biljne droge/pripravka/lijeka uz pomoć standardnih mikrobioloških sojeva (45–47). Tijekom provjere prikladnosti, ukoliko sam pripravak/sirovina posjeduje antimikrobna svojstva, potrebno ih je ukloniti, odnosno neutralizirati na odgovarajući način prije samog ispitivanja. Način inaktivacije antimikrobnih svojstava ovisi o prirodi i svojstvima same tvari/pripravka, a neki od standardnih neutralizatora prema farmakopeji su primjerice glicin, lecitin, polisorbit (45). Ispitivani uzorak se priprema za ispitivanje na odgovarajući način, ovisno o fizikalnom stanju i o topivosti u hidrofilnom mediju, standardno razrjeđivanjem u omjeru 1:10. Standardno preporučeni mediji za razrjeđivanje uzoraka su peptonska voda (pH 7,0), otopina fosfatnog pufera (pH 7,2) i triptikaza-soja bujon. Kod lipofilnih uzoraka, ukoliko je potrebno, za olakšavanje postupka otapanja i razrjeđivanja u medij se može dodati primjerice polisorbit 80 (45).

## Membranska filtracija i nasađivanje membranskih filtera na krute hranjive podloge

Filtracija odgovarajuće količine prethodno pripremljenog uzorka (poželjno 1 g uzorka) provodi se na membranskom filteru (veličina pora ne veća od 0,45  $\mu\text{m}$ ) u duplikatu. Isprani filteri nanose se na odgovarajuće krute hranjive podloge – za određivanje TAMC koristi se triptikaza-soja agar (engl. *Casein soya bean digest agar*) te provodi inkubacija na 30–35 °C kroz 3–5 dana, dok se za određivanje TYMC koristi Sabouraud-dekstrozni agar te inkubacija na 20–25 °C, kroz 5–7 dana (45). Nakon inkubacije broje se porasle mikrobne kolonije i računa broj CFU/ml ili CFU/g u biljnom uzorku (CFU – engl. *Colony forming unit*, broj bakterijskih stanica kod TAMC, odnosno stanica gljivica kod TYMC po ml ili g uzorka).

### *Metoda brojenja poraslih kolonija na krutim hranjivim podlogama (engl. Plate count method)*

Serijalno razrjeđivanje uzorka može se provoditi na dva načina:

- (a) razrjeđivanje uzorka uklapanjem u krutu hranjivu podlogu – 1 ml prethodno pripremljenog uzorka pomiješa se sa 15–20 ml odgovarajućeg agara temperature do 45 °C za Petrijevu zdjelicu promjera 9 cm
- (b) nanošenje uzorka određenog stupnja razrjeđenja na površinu krutog agara – volumen agara je isti kao u prethodnom slučaju, a volumen uzorka koji se nanosi je 0,1 ml.

Za određivanje TAMC koristi se triptikaza-soja agar te provodi inkubacija na 30–35 °C kroz 3–5 dana, dok se za određivanje TYMC koristi Sabouraud-glukozni agar te inkubacija na 20–25 °C, kroz 5–7 dana (45). Radi jasnog razlučivanja pojedinih kolonija, brojenje kolonija provodi se na pločama na kojima je porast u slučaju TAMC ispod 250 kolonija, a u slučaju TYMC ispod 50 kolonija. Ispitivanja se provode najmanje u duplikatu, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost broja kolonija te računa broj CFU/ml ili CFU/g u biljnom uzorku.

### *Metoda najvjerojatnijeg broja (engl. The most-probable-number method; MPN), odnosno metoda serijskog razrjeđivanja u tekućim hranjivim podlogama*

Serijalno deseterostruko razrjeđenje uzorka provodi se u 3 koraka. Od svakog stupnja razrjeđenja uzima se alikvot od 1g ili 1 ml u triplikatu i dodaje triptikaza-soja bujonu. Dobivenih 9 epruveta inkubiraju se na 30–35 °C kroz 3–5 dana. Nakon inkubacije, promatra se broj epruveta sa zamućenim bujonom (odnosno mikrobim porastom) za svaki stupanj razrjeđenja uzorka, i određuje najvjerojatniji broj prisutnih mikroorganizama prema propisanoj tablici (Ph. Eur. 2.6.12.-3) (45). Ukoliko postoje nejasnoće pri očitavanju rezultata, može se provesti subkultivacija u istoj vrsti bujona ili na istoimenom agaru, inkubirajući kroz najviše 2 dana na istoj temperaturi. Preciznost i točnost ove metode najmanja je u odnosu na prethodne dvije metode, stoga se ova metoda koristi samo u slučaju nemogućnosti provođenja prethodnih metoda.

### **Ispitivanje prisutnosti specifičnih mikroorganizama**

Ovisno o putu primjene biljne tvari/pripravka/lijeka, važno je ispitati prisutnost, odnosno potvrditi odsutnost određenih mikrobioloških vrsta, kako bi ispitivani uzorak mogao zadovoljiti zahtjevima farmakopeje (Ph. Eur. 2.6.13) (46). U tablici 4. prikazan je sažeti pregled najčešćih mikrobioloških vrsta od interesa te koraci provedbe ispitivanja, iako se prema procjeni rizika mikrobiološke kontaminacije u ispitivanje po potrebi mogu uključiti i druge mikrobiološke vrste.

Ukoliko nema dodatnih zahtjeva, prema Europskoj farmakopeji provjera mikrobiološke kakvoće oralnih (tradicionalnih) biljnih lijekova i ekstrakata koji se koriste u njihovoj izradi podrazumijeva konkretno ispitivanje prisutnosti gram-negativnih bakterija otpornih na žuč, *E. coli* i *Salmonella* spp. (Ph. Eur. 2.6.31) (47).

**Tablica 4.** ► Sažeti pregled mikrobiološkog ispitivanja prisutnosti specifičnih mikroorganizama za ne-sterilne farmaceutske pripravke.

	Pred-inkubacija	Selekcija i subkultivacija	Interpretacija
<b>Gram-negativne bakterije otporne na žuč</b>	Miješanje u triptikaza-sojinom bujonu na 20–25 °C kroz 2–5 sati.	1. Uzgoj u Mossel bujonu za enterobakterije na 30–35 °C kroz 24–48 sati. 2. Subkultivacija na violet-crvenozučnom-glukoznom agaru na 30–35 °C kroz 18–24 sata.	Uzorak odgovara propisu ukoliko nema porasta kolonija.
	Kvantifikacija – metodom najvjerojatnijeg broja (Ph. Eur. 2.6.13. – 4.1.3; 2.6.31.-2.4.1) (46, 47)		
<b><i>E. coli</i></b>	Miješanje u triptikaza-sojinom bujonu na 30–35 °C kroz 18–24 sata.	1. Uzgoj na MacConkey bujonu na 42–44 °C kroz 24–48 sati. 2. Subkultivacija na MacConkey agaru na 30–35 °C kroz 18–72 sata.	Porast kolonija indikacija je za moguću prisutnost <i>E. coli</i> i zahtijeva provedbu specifičnih testova za konačnu identifikaciju. Uzorak odgovara zahtjevu ukoliko nema porasta kolonija ili ako su testovi identifikacije negativni.
	Kvantifikacija – metodom najvjerojatnijeg broja (Ph. Eur. 2.6.31. – 2.4.2) (47)		
<b><i>Salmonella</i> spp.</b>	Miješanje u triptikaza-sojinom bujonu (ili peptonskoj vodi) na 30–35 °C kroz 18–24 sata.	1. Uzgoj u Rappaport Vassiliadis <i>Salmonella</i> bujonu na 30–35 °C kroz 18–24 sata. 2. Subkultivacija na ksiloza-lizin-deoksikolatnom agaru na 30–35 °C kroz 18–48 sati.	Porast crvenih kolonija s ili bez crnog središta indikacija su na prisutnost <i>Salmonella</i> spp. i zahtijeva provedbu specifičnih testova za konačnu identifikaciju. Uzorak odgovara zahtjevu ukoliko nema porasta opisanih kolonija ili ako su testovi identifikacije negativni.
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	Miješanje u triptikaza-sojinom bujonu na 30–35 °C kroz 18–24 sata.	Subkultivacija na cetrimidnom agaru na 30–35 °C kroz 18–72 sata.	Porast kolonija indikacija je za moguću prisutnost <i>P. aeruginosa</i> i zahtijeva provedbu specifičnih testova za konačnu identifikaciju. Uzorak odgovara zahtjevu ukoliko nema porasta kolonija ili ako su testovi identifikacije negativni.

	Pred-inkubacija	Selekcija i subkultivacija	Interpretacija
<i>S. aureus</i>	Miješanje u triptikaza-sojnom bujonu na 30–35 °C kroz 18–24 sata.	Subkultivacija na manitol-slanom agaru na 30–35 °C kroz 18–72 sata.	Porast žutih/bijelih kolonija okruženih žutom zonom indikacija je za moguću prisutnost <i>S. aureus</i> i zahtijeva provedbu specifičnih testova za konačnu identifikaciju. Uzorak odgovara zahtjevu ukoliko nema porasta opisanih kolonija ili ako su testovi identifikacije negativni.
<i>Clostridium</i> spp.	Priprema uzorka u duplikatu – samo jedan uzorak se grije na 80 °C kroz 10 minuta, zatim naglo hladi.	1. Inkubacija oba uzorka u klostridia-mediju u anaerobnim uvjetima na 30–35 °C kroz 48 sata. 2. Subkultivacija iz oba uzorka na Columbia agaru i inkubacija u anaerobnim uvjetima na 30–35 °C kroz 48–72 sata.	Anaerobni porast bacila (neovisno o endosporama) koji daju negativnu reakciju na katalazu indikacija je za prisutnost klostridija i zahtijeva provedbu specifičnih testova za konačnu identifikaciju. Uzorak odgovara zahtjevu ukoliko nema porasta opisanih kolonija ili ako su testovi identifikacije negativni.
<i>Candida albicans</i>	Miješanje u Sabouraud-glukoznom bujonu na 30–35 °C kroz 3–5 dana.	Subkultivacija na Sabouraud-glukoznom agaru i inkubacija na 30–35 °C kroz 24–48 sati.	Porast bijelih kolonija indikacija je za moguću prisutnost <i>C. albicans</i> i zahtijeva provedbu specifičnih testova za konačnu identifikaciju. Uzorak odgovara zahtjevu ukoliko nema porasta opisanih kolonija ili ako su testovi identifikacije negativni.

## Mikotoksini

### Određivanje aflatoksina B<sub>1</sub> u biljnim lijekovima (Ph. Eur. 2.8.18)

Ukoliko u pojedinačnoj monografiji nije drukčije naznačeno, propisani limit za sadržaj aflatoksina B<sub>1</sub> u biljnim lijekovima iznosi 2 µg/kg, dok ukupan sadržaj aflatoksina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub> ne bi trebao prelaziti 4 µg/kg. Farmakopejska metoda ispitivanja aflatoksina pokazala se prikladnom za uzorke korijena vražje kandže (*Harpagophyti radix*), podanka đumbira (*Zingiberis rhizoma*) i plodova sene (*Sennae fructus acutifoliae*, *Sennae fructus angustifoliae*). Određivanje aflatoksina B<sub>1</sub> u biljnim uzorcima provodi se tekućinskom kromatografijom s imunoafinitetnom kolonom, koja sadrži antitijela za aflatoksin B<sub>1</sub> (Ph. Eur. 2.8.18) (27).

Ukratko, uzorak pulveriziranog lijeka dodaje se definiranoj smjesi vode i metanola i ekstrahira na ultrazvučnoj kupelji. Dobiveni filtrat prolazi daljnji analitički postupak pri definiranim kromatografskim uvjetima (mobilna faza, brzina protoka, fluorescentni detektor; 365 nm/435 nm), uz pripremu aflatoskin B1 standarda i kalibracijske krivulje (uobičajeni raspon koncentracija 1–8 µg/kg). Redoslijed eluiranja započinje s aflatoksinom G2, zatim slijede redom G1, B2 te B1. Radi pojačanja kromatografskog signala, preporuča se derivatizacija aflatoksina nakon ispiranja s kolone. Sadržaj aflatoksina B1 u biljnom lijeku dobiva se računski i izražava se u ng/g. Treba napomenuti da zbog toksičnosti i kancerogenosti s aflatoksinima treba raditi oprezno i s odgovarajućim sigurnosnim mjerama, te da su aflatoksini podložni razgradnji UV-svjetlom, stoga je potrebno osigurati odgovarajuće uvjete za vrijeme rada s otopinama aflatoksina.

#### Određivanje okratoksina A u biljnim lijekovima (Ph. Eur. 2.8.22)

Farmakopejska metoda ispitivanja okratoksina A pokazala se prikladnom za ispitivanje korijenja sladića (*Liquiritiae radix*; limit 20 µg/kg) i ekstrakta sladića (*Liquiritiae extractum siccum ad saporandum*; limit 80 µg/kg). Određivanje okratoksina A u biljnim uzorcima provodi se tekućinskom kromatografijom s imunoafinitetnom kolonom, koja sadrži antitijela za okratoksin A (Ph. Eur. 2.8.22) (30). Ukratko, uzorak pulveriziranog uzorka dodaje se definiranoj otopini natrij hidrogen karbonata i ekstrahira na ultrazvučnoj kupelji. Nakon centrifugiranja, dobiveni se supernatant dodatno pročišćava te prolazi daljnji analitički postupak pri definiranim kromatografskim uvjetima (mobilna faza, brzina protoka, fluorescentni detektor 330 nm/460 nm), uz pripremu okratoksina A standarda i kalibracijske krivulje (uobičajeni raspon koncentracija 0,5–250 µg/kg). Sadržaj okratoksina A u biljnom lijeku dobiva se računski i izražava se u ng/g. Treba napomenuti da zbog toksičnosti i kancerogenosti s okratoksinom A treba raditi oprezno i s odgovarajućim sigurnosnim mjerama.

#### Alternativne metode (Ph. Eur. 5.1.6.)

Unutar Europske farmakopeje poglavlje 5.1.6. nudi alternativne metode za kontrolu mikrobiološke kakvoće farmaceutskih tvari i pripravaka, koje mogu biti od pomoći pri odabiru dodatne metode tijekom standardnih ispitivanja, ili pak mogu u određenim uvjetima biti zamjena za konvencionalne metode (49). Neophodno je pokazati prikladnost odabrane metode te provesti postupak validacije (25). Metode su brojne i odnose se na ukupno tri glavne razine mikrobiološke kakvoće: (a) kvalitativno ispitivanje prisutnosti/odsutnosti mikroorganizama, (b) kvantitativno određivanje broja prisutnih mikroorganizama te (c)

testovi identifikacije. Sustavno su prikazani principi metoda, osvrtni na prednosti i nedostatke pojedine metode, potencijalna primjena u kontroli mikrobiološke kakvoće te smjernice postupaka validacije. Primjerice, predložene alternativne metode za kvantitativno određivanje (enumeraciju ili brojanje) mikroorganizama su autofluorescencija, protočna citometrija, izravna tehnika epifluorescentnog filtera (engl. *direct epifluorescent filter technique*, DEFT) te citometrija na krutoj fazi (engl. *solid phase cytometry*) (49).

## Zaključak

Ukoliko sadrže izvorne biljne sirovine, biljni lijekovi imaju veću vjerojatnost mikrobiološke kontaminacije u usporedbi s lijekovima sintetskog podrijetla. U postupku procjene rizika za mikrobiološku kontaminaciju (uključujući prisutnost endo- i egzospora i mikotoksina), važno je razmotriti sve relevantne čimbenike za pojedini slučaj. Europska farmakopeja definira kriterije prihvatljivosti broja i vrste mikroorganizama za biljne droge, biljne pripravke i (tradicionalne) biljne lijekove te metode za određivanje mikrobiološke kakvoće. Uz propise farmakopeje, prisutne su i važeće smjernice Europske agencije za lijekove (EMA) te moguće smjernice na nacionalnim razinama. Za postizanje odgovarajuće mikrobiološke kakvoće neophodno je implementiranje smjernica dobre agronomske i sakupljačke prakse te dobre proizvođačke prakse, koje uključuju određivanje onečišćenja i praćenje mikrobiološke kakvoće kroz sve korake nastanka konačnog lijeka/pripravka/droge. Preventivne mjere su ključan pristup na tom putu jer su dekontaminacijske metode relativno ograničene i donose nove izazove tijekom primjene (utjecaj na fitokemijski sastav, toksičnost, zaostajanje rezidua). Ukoliko nije drukčije naznačeno, provjera mikrobiološke kakvoće oralnih (tradicionalnih) biljnih lijekova i ekstrakata koji se koriste u njihovoj izradi podrazumijeva konkretno ispitivanje TAMC, TYMC te prisutnosti gram-negativnih bakterija otpornih na žuč, *E. coli* i *Salmonella* spp. Prema potrebi, može se ispitati prisutnost i drugih mikrobioloških vrsta. Osim standardnih enumeracijskih metoda koje uključuju membransku filtraciju, metodu brojenja poraslih kolonija na krutim hranjivim podlogama te metodu najvjerojatnijeg broja, opisane su i alternativne metode za određivanje mikrobiološke kakvoće. Također, važan aspekt mikrobiološke kakvoće je sadržaj mikotoksina, s posebnim naglaskom na određivanje aflatoksina B1 i određivanje okratoksina A. Neovisno o tome radi li se o biljnim lijekovima ili drugim puno dostupnijim biljnim pripravcima, treba obratiti pažnju na činjenicu da oni dijele jednak rizik moguće mikrobiološke kontaminacije, koja može uključivati oportunističke patogene, patogene, rezistentne mikrobne sojeve te mikotoksine koji značajno mogu utjecati na

zdravstveno stanje pacijenta, odnosno osobe koja ih konzumira. Sa sve većim globalnim interesom za primjenom biljnih pripravaka različitog podrijetla, neophodno je sustavno nastojanje osiguranja njihove neškodljivosti/sigurnosti tijekom primjene. Mikrobiološka kakvoća samo je jedan, no potencijalno vrlo rizičan aspekt sigurnosti primjene biljnih pripravaka svih kategorija.

**1-2**  
**2021**

## Microbiological contamination of (traditional) herbal medicinal products

V. Ljoljić Bilić, I. Marinović, I. Samardžić, I. Kosalec

**Abstract** Herbal substances, herbal preparations and herbal medicinal products, as well as traditional herbal medicinal products are of natural origin and have a higher risk of microbial contamination compared to chemical drugs. This review addresses microbial contaminants and chemical contaminants as products of microbial presence, referring mainly to mycotoxins. An overview is given on how to ensure suitable microbial quality, considering the importance of preventative measures, manufacturing processes and by applying decontamination processes in the frame of current regulatory aspects. Satisfactory quality regarding microbiological and mycotoxin contamination should be a result of mainly preventive measures, rather than interventions for decreasing the contamination. Evaluation should be based on a case-by-case risk assessment and usually includes tests and limits given in Ph. Eur. (for example TAMC, TYMC, absence of certain specified micro-organisms, testing on mycotoxins) in order to ensure a safe final product for the consumer or patient.

1. Ghisleni DD, Braga Mde S, Kikuchi IS, Braşoveanu M, Nemţanu MR, Dua K, Pinto Tde J. The Microbial Quality Aspects and Decontamination Approaches for the Herbal Medicinal Plants and Products: An in-Depth Review. *Curr Pharm Des.* 2016; 22(27):4264–4287.
2. Ekor M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Front Pharmacol.* 2014; 4:177.
3. Kunle OF, Egharevba HO, Ahmadu PO. Standardization of herbal medicines – A review. *Int J Biodivers Conserv.* 2012; 4:101–112.
4. Trumbetić D, Kosalec I. Europska regulativa biljnih i tradicionalnih biljnih lijekova. *Farm Glas.* 2019; 75:207–218.
5. Zakon o lijekovima. NN 76/13, 90/14, 100/18. <https://www.zakon.hr/z/399/Zakon-o-lijekovima>, datum pristupa: 2. 12. 2019.



6. Official Journal of the European Communities: Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use. Official Journal of the European Communities. 2001; L 311:67.
7. Heinrich M. Quality and safety of herbal medical products: regulation and the need for quality assurance along the value chains. *Br J Clin Pharmacol*. 2015; 80(1):62–66.
8. Official Journal of the European Union: Directive 2004/24/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 amending, as regards traditional herbal medicinal products, Directive 2001/83/EC on the Community code relating to medicinal products for human use. Official Journal of the European Union. 2004; L 136:36
9. European Medicines Agency (EMA), The Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC); Povjerenstvo za biljne lijekove. <https://www.ema.europa.eu/en/committees/committee-herbal-medicinal-products-hmpc>, datum pristupa: tijekom 2019.
10. Pravilnik o davanju odobrenja za stavljanje lijeka u promet. Narodne novine broj 83/13.
11. EMA/HMPC/464684/2016. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). European Union herbal monograph on *Vitis vinifera* L., folium [https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/final-european-union-herbal-monograph-vitis-vinifera-l-folium-first-version\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/final-european-union-herbal-monograph-vitis-vinifera-l-folium-first-version_en.pdf), datum pristupa: tijekom 2019.
12. Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani. Narodne novine broj 146/12.
13. Długaszewska J, Ratajczak M, Kamińska D, Gajecka M. Are dietary supplements containing plant-derived ingredients safe microbiologically? *Saudi Pharm J*. 2019; 27(2):240–245.
14. Mugundhan RM, Soundaria M, Maheswari V, Santhakumari P, Gopal V. »Hydroponics« – a novel alternative for geoponic cultivation of medicinal plants and food crops. *Int J Pharma Bio Sci*. 2011; 2(2):286–296.
15. EMA/HMPC/246816/2005: Guideline on good agricultural and collection practice (GACP) for starting materials of herbal origin.
16. European Commission Brussels. 1 September 2008. Volume 4; EU Guidelines to Good Manufacturing Practice. Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Annex 7: Manufacture of Herbal Medicinal Products.
17. European Medicines Agency (EMA): Human regulatory; Herbal products; Scientific guidelines; Quality guidelines. [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general\\_content\\_000497.jsp&mid=WC0b01ac0580033a9b#Quality](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000497.jsp&mid=WC0b01ac0580033a9b#Quality), datum pristupa: tijekom 2016.
18. Kroes BH., The legal framework governing the quality of (traditional) herbal medicinal products in the European Union. *J. Ethnopharmacol*. 2014; 158:449–453.
19. Brown JC, Jiang X. Prevalence of antibiotic-resistant bacteria in herbal products. *J Food Prot*. 2008; 71(7):1486–90.
20. Anyanwu, CU. Fungal contaminants of powdered herbal drugs sold in parts of Enugu State, Southeast, Nigeria. *Plant Prod Res J*. 2010; 14:46–50.
21. Alwakeel SS. Microbial and Heavy Metals Contamination of Herbal Medicines. *Res J Microbiol*. 2008; 3:683–691.

22. Bugno A, Almodovar AAB, Pereira ITC, Andreoli Pinto TJ, Sabino M. Occurrence of toxigenic fungi in herbal drugs. *Braz J Microbiol.* 2006; 37:47–51.
23. Kineman B, Nahikian-Nelms ML, Frazier C. A pilot investigation of the microbial contamination of herbal supplements: A potential risk for immunocompromised populations. *HIV Nutr Update.* 2002; 7:1–9.
24. Ishikawa K, Matsui K, Madarame T, Sato S, Oikawa K, Uchida T. Hepatitis E probably contracted via a Chinese herbal medicine, demonstrated by nucleotide sequencing. *J Gastroenterol.* 1995; 30:534–538.
25. EMA/HMPC/95714/2013: Reflection paper on microbiological aspects of herbal medicinal products and traditional herbal medicinal products, [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-microbiological-aspects-herbal-medicinal-products-traditional-herbal-medicinal\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-microbiological-aspects-herbal-medicinal-products-traditional-herbal-medicinal_en.pdf), datum pristupa: 26. 08. 2019.
26. Kosalec I, Cvek J, Tomić S. Contaminants of Medicinal Herbs and Herbal Products. *Arch Ind Hyg Toxicol.* 2009; 60(4):485–501.
27. Determination of aflatoxin B1 in herbal drugs (2.8.18.). Council of Europe. European Pharmacopoeia Online 9.5. pp. 289–290. <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>, datum pristupa: 26. 08. 2019.
28. Wu HC, Santella R. The Role of Aflatoxins in Hepatocellular Carcinoma. *Hepat Mon.* 2012; 12(10 HCC):e7238.
29. International Agency for Research on Cancer (IARC). Ochratoxin A. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. In: *Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans.* Vol. 56. Lyon: IARC, 1993. pp. 489–52.
30. Determination of ochratoxin A in herbal drugs (2.8.22.). Council of Europe. European Pharmacopoeia Online 9.5. pp. 294–295. <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>, datum pristupa: 26. 08. 2019.
31. Won-Bo Shim, Kwang-Soo Ha, Min-Gon Kim, Jeong-Sook Kim, and Duck-Hwa Chung. Evaluation of the Transfer Rate of Ochratoxin A to Decoctions of Herbal Medicines. *Food Sci Biotechnol.* 2014; 23(6):2103–2108.
32. Nian Y, Wang H, Ying G, Yang M, Wang Z, Kong W, Yang S. Transfer rates of aflatoxins from herbal medicines to decoctions determined by an optimized high-performance liquid chromatography with fluorescence detection method. *J Pharm Pharmacol.* 2018; 70(2):278–288.
33. International Agency for Research on Cancer (IARC). Summaries and evaluations fumonisin B1. In: *Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans.* Vol. 82. Lyon: IARC; 2002. pp. 301.
34. Whitaker TB, Springer J, Defize PR, de Koe WJ, Coker R. Evaluation of sampling plans used in the United States, United Kingdom, and The Netherlands to test raw shelledpeanuts for aflatoxin. *J. AOAC Int.* 1995; 78:1010–1018.
35. Whitaker TB, Truckess Mw, Johansson AS, Giesbrecht FG, Hagler Jr, WM, Bowman DT. Variability associated with testing shelled corn for Fumonisin. *J. AOAC Int.* 1998; 81:1162–1168.
36. Whitaker TB. Sampling Foods for Mycotoxins. *Food Addit Contam.* 2006; 23(1):50–61.

37. Zheng H, Yunliang Z, Lianjun L, Zengxuan C, Yiping R, Yongjiang W. An ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and M2 in traditional Chinese medicines. *Anal Chim Acta*. 2010; 664:165–171.
38. Ip SP, Che CT. Determination of aflatoxins in Chinese medicinal herbs by high-performance liquid chromatography using immunoaffinity column cleanup Improvement of recovery. *J Chromatogr A*. 2006; 1135(2):241–244.
39. Prasad A, Pragadheesh VS, Mathur A, Srivastava NK, Singh M, Mathur AK. Growth and centelloside production in hydroponically established medicinal plant – *Centella asiatica* (L.). *Ind Crops Prod*. 2012; 35:309–312.
40. Rocha RP, Melo EC, Radünz LL. Influence of drying process on the quality of medicinal plants: A review. *J Med Plants Res*. 2011; 5(33):7076–7084.
41. Castillo F, Hernández D, Gallegos G, Mendez M, Rodríguez R, Reyes A, Aguilar CN. *In vitro* antifungal activity of plant extracts obtained with alternative organic solvents against *Rhizoctonia solani* Kühn. *Ind Crops Prod*. 2010; 32:324–328.
42. Efficacy of antimicrobial preservation (5.1.3.). Council of Europe. European Pharmacopoeia Online 9.5. pp. 577–579. <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>, datum pristupa: 26.08.2019.
43. Fennel CW, Light ME, Sparg SG, Stafford GI, van Staden J. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: agricultural and storage practices. *J Ethnopharmacol*. 2004; 95:113–121.
44. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA). Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP), Committee for Veterinary Medicinal Products (CMVP). Note for guidance on limitations to the use of ethylene oxide in the manufacture of medicinal products. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/qwp/015901en.pdf>, datum pristupa: 20.09.2019.
45. Microbiological examination of non-sterile products: Microbial enumeration tests (2.6.12.). Council of Europe. European Pharmacopoeia Online 9.5. pp. 195–199. <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>, datum pristupa: 26.08.2019.
46. Microbiological examination of non-sterile products: Test for specified micro-organisms (2.6.13.). Council of Europe. European Pharmacopoeia Online 9.5. pp. 199–204. <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>, datum pristupa: 26.08.2019.
47. Microbiological examination of herbal medicinal products for oral use and extracts used in their preparation (2.6.31.). Council of Europe. European Pharmacopoeia Online 9.5. pp. 232–234. <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>, datum pristupa: 26.08.2019.
48. Microbiological quality of non-sterile pharmaceutical preparations and substances for pharmaceutical use (5.1.4.). Council of Europe. European Pharmacopoeia Online 9.5. pp. 579–580. <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>, datum pristupa: 26.08.2019.
49. Alternative methods for control of microbiological quality (5.1.6.). Council of Europe. European Pharmacopoeia Online 9.5. Council of Europe. European Pharmacopoeia Online 9.5. pp. 4339–4348. <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>, datum pristupa: 26.08. 2019.
50. Microbiological quality of herbal medicinal products for oral use and extracts used in their preparation (5.1.8.). Council of Europe. European Pharmacopoeia Online 9.5. pp. 591–592. <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>, datum pristupa: 26.08.2019.

*Primljeno 10. srpnja 2020.*