ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Medicine tradizionali ayurvedica e cinese: qualità e sicurezza di alcune preparazioni

A cura di
Sergio Costantini (a), Gabriela Mazzanti (b)
e Francesca Menniti-Ippolito (c)

(a) Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(b) Dipartimento di Farmacologia delle Sostanze Naturali e Fisiologia Generale, Università "La Sapienza", Roma
(c) Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

ISSN 1123-3117
Rapporti ISTISAN
04/33

Istituto Superiore di Sanità
Medicina tradizionale ayurvedica e cinese: qualità e sicurezza di alcune preparazioni.
A cura di Sergio Costantini, Gabriela Mazzanti e Francesca Menniti-Ippolito
2004, iii, 51 p. Rapporti ISTISAN 04/33

I prodotti a base di piante medicinali sono generalmente considerati sicuri, mentre numerose evidenze indicano che il loro utilizzo può comportare rischi dipendenti sia dal loro cattivo impiego sia da fattori connessi alla scarsa qualità. Considerando il crescente interesse nei Paesi occidentali per i prodotti naturali, si è ritenuto utile valutare la qualità di alcuni preparati erboristici ayurvedici e cinesi, scelti tra quelli di maggior impiego in Italia. Sono stati eseguiti saggi di identificazione, determinazione dei pesticidi, delle ceneri totali, dei metalli pesanti e della carica microbica. Sulla base dei risultati ottenuti i prodotti ayurvedici considerati non sembrano mostrare rischi tossicologici correlati alla loro qualità. Diversamente, alcune delle preparazioni cinesi esaminate presentavano sofisticazioni, deterioramento e contenuto di metalli pesanti superiore ai limiti accettabili. Tali risultati sottolineano la necessità di controlli di qualità sui prodotti a base di piante medicinali per garantirne la sicurezza d'impiego.

Parole chiave: Qualità, Sicurezza, Prodotti erboristici, Medicina tradizionale cinese, Preparazioni ayurvediche, Contaminazione microbica, Metalli pesanti, Pesticidi

Istituto Superiore di Sanità
Traditional Ayurvedic and Chinese medicine: quality and safety of some herbal preparations.
Edited by Sergio Costantini, Gabriela Mazzanti and Francesca Menniti-Ippolito
2004, iii, 51 p. Rapporti ISTISAN 04/33 (in Italian)

Herbal remedies are generally considered safe, but a growing evidence shows that their use can be harmful for consumers' health. Risks from herbal products may depend either on misuse or lack of quality. Considering the increasing interest for herbal medicine in Western countries, a quality assessment of some Ayurvedic and Chinese herbal products was carried out. Samples were chosen among those most commonly used in Italy and were evaluated using pharmacognostic and chemical assays; particularly, morphological examination, chemical identification, and determination of pesticides, total ash, heavy metals and microbial contamination were performed. On the basis of our results Ayurvedic products tested do not show risks for consumers' health; conversely, in some Chinese herbal preparations, sophistications, deteriorations and content of heavy metals higher than that accepted, were found. These results underline the need of quality control on herbal products to assure their safety.

Keywords: Quality, Safety, Herbal remedies, Chinese traditional medicine, Ayurvedic preparations, Microbial contamination, Heavy metals, Pesticides

Per informazioni rivolgersi a: sercos@iss.it.

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione*: Paola De Castro, Sara Modigliani* e *Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2004

Hanno contribuito alla stesura di questo rapporto:

Istituto Superiore di Sanità, Roma
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria
Graziella Amendola
Laura Ciaralli
Maria Ciprotti
Sergio Costantini
Sonia D'Ilio
Alfondo Di Muccio
Rosa Giordano
Pietro Rossi
Alessandra Sepe

Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari
Elisabetta Delibato
Mario Di Pasquale
Leucio Orefice
Beatriz Pasolini
Francesco Scalise
Laura Toti
Fabiana Vanni

Università degli Studi "La Sapienza", Roma
Dipartimento di Farmacologia delle Sostanze Naturali e Fisiologia Generale,
Lucia Battinelli
Claudia Daniele
Maria Grazia Evandri
Gabriela Mazzanti

Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma
Istituto per lo Studio degli Ecosistemi
Antonio De Marco
Margherita Owczarek

Unione Nazionale Erboristi (Unerbe)
Enrico Volpones

Consulente per la medicina specialistica ayurvedica
Mylador Nancy

INDICE

Introduzione 1

Preparazioni erboristiche utilizzate nella medicina ayurvedica 3
Materiali e metodi 3
Contaminazione chimica e microbiologica 4
Campionamento 4
Risultati 7
Proprietà chimico fisiche 7
Determinazione dei metalli 9
Livelli di sicurezza dei metalli pesanti 11
Determinazione di pesticidi 12
Indagini microbiologiche 13
Test di tossicità 15
Considerazioni finali 16

Preparazioni erboristiche utilizzate nella medicina cinese 17
Materiali e metodi 17
Selezione dei prodotti da esaminare e campionamento 17
Esame morfologico 19
Riconoscimento chimico 20
Determinazione della contaminazione microbica 20
Conta totale dei microrganismi aerobi vivi: batteri e funghi 20
Enterobatteri, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. 20
Determinazione dei metalli pesanti 21
Risultati 22
Presentazione dei prodotti 22
Esame morfologico 22
Saggi chimici 22
Determinazione delle ceneri totali 23
Determinazione della carica microbica 24
Determinazione del contenuto di metalli pesanti 25
Considerazioni finali 27

Bibliografia 28

Appendice A
Concentrazioni di metalli nei preparati analizzati e confronto tra le due campionature di prodotti della medicina ayurvedica 29

Appendice B
Riconoscimento chimico sui campioni di preparazioni erboristiche utilizzate nella medicina cinese 41

INTRODUZIONE

Negli ultimi decenni si è assistito nei paesi occidenti ad un notevole incremento del ricorso alle terapie non convenzionali. In particolare, la diffusione della medicina cinese e di quella ayurvedica, che rappresentano due sistemi di medicina largamente praticati da millenni, è stata favorita anche dal crescente interesse verso pratiche meditative orientali e, più in generale, da un interesse verso l'intero background culturale e filosofico che sta alla base.

Questa crescente diffusione dell'uso di prodotti fitoterapici cinesi e ayurvedici ha parallelamente aperto il problema del controllo della sicurezza d'impiego di tali preparati. Il problema tossicologico deriva sia dal fatto che il consumatore spesso considera il prodotto erboristico "naturale" come sinonimo di "innocuo", e quindi non associa alla sua assunzione potenziali effetti collaterali, sia dal fatto che questi prodotti sono generalmente venduti liberamente senza obbligo di prescrizione medica. Inoltre, i prodotti erboristici non vengono sottoposti ad indagini scientifiche con lo stesso rigore richiesto per i farmaci convenzionali e non sono soggetti ad approvazione da parte delle organizzazioni sanitarie. Una vasta letteratura internazionale riporta come l'uso incontrollato di prodotti erboristici sia risultato talvolta responsabile di gravi effetti avversi (1-10).

I rischi legati all'uso dei prodotti erboristici in generale possono dipendere da componenti naturalmente presenti nella droga di partenza o da fattori che intervengono durante il processo di preparazione o dalle modalità d'impiego del prodotto. I lattoni sesquiterpenici e le furanocumarine contenuti in piante appartenenti alle famiglie *Asteraceae* e *Apiaceae* possono indurre fenomeni allergici. Reazioni allergiche si possono verificare anche con droghe contenenti mucillagini come l'Ispaghul (*Plantago ovata*) e lo Psillio (*Plantago psyllium*). Gli alcaloidi pirrolizidinici, contenuti in piante medicinali come la Tussilagine (*Tussilago farfara*) e la Consolida maggiore (*Symphytum officinale*), possono essere epatotossici e cancerogeni a livello epatico.

La pianta già al momento della raccolta, dopo la raccolta e durante la lavorazione può subire diverse alterazioni, volontarie e involontarie, che possono comprometterne la qualità e causare effetti tossici. La sostituzione, in miscele utilizzate a scopo dimagrante, della radice di *Stephania tetrandra* con l'*Aristolochia fangchi* contenente acidi aristolchici, ha provocato numerosi casi di nefrotossicità. Effetti tossici possono anche derivare dalla contaminazione della droga con metalli pesanti. Questa adulterazione è stata riscontrata in diversi prodotti erboristici provenienti dalla medicina tradizionale cinese e ayurvedica. Altri tipi di contaminazione possono riguardare la presenza di residui di pesticidi o di tossine come le aflatossine, prodotte da muffe durante la conservazione. In alcuni preparati erboristici, infine, sono stati individuati anche farmaci di sintesi come antinfiammatori non steroidei, cortisonici, antistaminici e ipoglicemizzanti orali (11-14).

In alcuni casi, le problematiche tossicologiche sono risultate strettamente legate alla presenza di metalli pesanti quali arsenico, antimonio, cromo, piombo e mercurio. Per quanto riguarda quest'ultimo metallo, solitamente addizionato sotto forma di ossido o solfuro, esso è stato riscontrato in concentrazioni talvolta superiori di alcune centinaia di volte alla dose tossicologicamente accettabile; mentre da una parte è noto che il mercurio reppresenta un potenziale tossico a livello di organi quali reni, milza e del sistema nervoso centrale (SNC), dall'altra la tradizione ayurvedica, ad esempio, lo utilizza ampiamente nei preparati insieme allo zolfo, quale stimolante del sistema enzimatico e rigeneratore dei tessuti. E ancora, parlando del piombo – elemento notoriamente tossico con effetti sull'uomo che vanno dall'alterazione della sintesi dell'eme per inibizione di alcune attività enzimatiche, alla anemia, fino all'encefalopatia

nei casi più gravi – esso viene utilizzato nella tradizione ayurvedica quale curativo delle malattie della pelle, per le perdite vaginali, gonfiori, gonorrea e diabete. Quindi, il problema principale della presenza di metalli pesanti nei preparati erboristici di provenienza orientale, può risiedere proprio nel fatto che questi metalli vengono intenzionalmente aggiunti durante la preparazione del prodotto. Tuttavia, un aspetto non trascurabile, peraltro difficilmente codificabile, è costituito dalla presenza di metalli non appositamente aggiunti ma naturalmente presenti nelle piante le quali possono agire talvolta da sequestranti per alcuni elementi, o derivanti da contaminazione accidentale durante cicli effettuati su linee di produzione contaminate da precedenti lavorazioni. Non ultimo, la potenziale presenza di sostanze antiparassitarie derivanti dalle piante e/o la presenza di contaminazione biologica, richiedono per i prodotti erboristici indagini volte a verificarne la sicurezza d'impiego.

Pertanto l'aspetto del controllo di qualità assume, per un prodotto erboristico, un particolare significato. Tra i vari parametri che devono essere considerati (identificazione macroscopica e microscopica, caratterizzazione fitochimica, caratterizzazione di potenziali adulteranti, ecc.), l'aspetto della contaminazione, sia di tipo chimico che biologico, assume una particolare rilevanza. In funzione del fatto che non sempre è possibile ottenere informazioni sulla qualità delle materie prime e dei processi produttivi, è necessario effettuare una serie di controlli sul prodotto finito.

La presente indagine è stata pertanto rivolta alla valutazione della qualità di alcuni prodotti fitoterapici, riconducibile ad aspetti di sicurezza, sia dal punto di vista dell'identificazione, sia dal punto di vista della contaminazione chimica e microbiologica. Nella prima parte dello studio sono stati analizzati campioni di preparati fitoterapici della medicina ayurvedica, mentre nella seconda parte lo studio ha riguardato droghe vegetali e preparati fitoterapici appartenenti alla medicina tradizionale cinese.

La molteplicità delle specializzazioni richieste per le indagini ha ovviamente caratterizzato la composizione dell'unità operativa, che ha visto nel suo insieme personale appartenente a diversi Dipartimenti e reparti dell'Istituto Superiore di Sanità (Reparto Bioelementi e Salute e Reparto Antiparassitari del Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria; Reparto Pericoli Microbiologici Connessi agli Alimenti del Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari; Reparto Farmacoepidemiologia del Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute), ad un istituto del Consiglio Nazionale delle Ricerche, al Dipartimento di Farmacologia delle Sostanze Naturali e Fisiologia Generale dell'Università "La Sapienza" di Roma, nonché la collaborazione di esperti del settore specifico considerato.

PREPARAZIONI ERBORISTICHE UTILIZZATE NELLA MEDICINA AYURVEDICA

Il presente lavoro ha lo scopo di indagare la qualità di alcune preparazioni erboristiche presenti sul mercato nazionale allo scopo di evidenziare eventuali rischi per la salute degli utilizzatori.

Materiali e metodi

Le ricerche effettuate hanno riguardato:

– *Proprietà chimico fisiche*
  - solubilità in acqua
  - solubilità in alcol
  - solubilità in HCl 1N
  - perdita di acqua a 105 °C
  - perdita di acqua a 180 °C
  - ceneri

– *Determinazione di metalli pesanti di interesse tossicologico*
  - arsenico
  - cadmio
  - cromo
  - manganese
  - mercurio
  - nickel
  - piombo

– *Determinazione di elementi essenziali, ma suscettibili di tossicità in funzione della loro concentrazione*
  - ferro
  - rame
  - zinco

– *Determinazione di antiparassitari*
  - pesticidi clorurati
  - metaboliti di pesticidi clorurati
  - pesticidi organofosforati

– *Indagini microbiologiche*
  - determinazione della carica microbica
  - ricerca dei coliformi
  - ricerca dei clostridi
  - ricerca di germi patogeni: stafilococchi enterotossici e *Salmonella*
  - ricerca di micotossine
  - ricerca per la tossicità aspecifica mediante prove biotossicologiche

– *Test di genotossicità*
  - test dei micronuclei in apici radicali di *Vicia faba*

Contaminazione chimica e microbiologica

Dal punto di vista chimico, oltre alla presenza dei metalli, particolare importanza riveste, nei preparati erboristici ayurvedici, la potenziale contaminazione da pesticidi. Questi ultimi sono composti usati nella maggior parte delle produzioni agricole in particolare nelle colture di piante medicinali. A seconda delle categorie di azione si hanno:

- *Insetticidi contro organismi animali, insetti, nematodi, acari, afidi*
  Composti organoclorurati:
  - lindano (γ-HCH)
  - clorociclodienici (aldrin, dieldrin, eptacloro, eptacloroepossido, endosulfan)
  - DDT
  - clordano
  - metossicloro

  Composti organofosforati:
  - dimetoato, malation, clorpirifos, pirimifos, fention

  Composti piretroidi:
  - permetrina, deltametrina, cypermetrina, fenvalerate

  Composti N-metilcarbammici:
  - aldicarb, carbofurano, carbaryl, propoxur, carbosulfan
- *Fungicidi contro malattie fungine*
  Sono costituiti da numerose classi di composti che mostrano diversa selettività per diverse categorie di funghi:
  - Ditiocarbammati: zineb, mancozeb, tiram
  - Ftalimmidici: folpet, captan, captafol
  - Dicarbossimmidici: procymidone, iprodione, vinclozolin, clorolinate
  - Acilalanine: metalaxyl, benalaxyl, oxadixyl
- *Erbicidi contro erbe infestanti*
  Sono costitutiti da numerose classi di composti dotati di diversa selettività per diverse categorie di erbe infestanti:
  - Diclorofenossiacidi: 2,4D; 2,4DB; 2,4,5T; MCPA, MCPB
  - Triazinici: atrazina, simazina, terbutilazina
  - Ureici: linuron, metoxuron, metobromuron
  - Ionici: paraquat, diquat, glifosate

Per quanto riguarda l'aspetto microbiologico, particolare importanza riveste la ricerca delle micotossine, per il fatto che i prodotti di origine vegetale sono soggetti per loro natura (sia durante la coltivazione su campo, sia quando vengono conservati nei silos) all'attacco di miceti che possono causare il deterioramento del prodotto per formazione e sviluppo di muffe e presenza di micotossine nel prodotto finito. Lo studio della tossicità acuta è inoltre utile per la conoscenza dell'effetto di dosi massicce di un alimento o di una sostanza, ed è mirato soprattutto ad evidenziare eventuali effetti sfavorevoli e a fornire utili indicazioni per successivi studi di tossicità cronica. Esso viene condotto somministrando la più alta quantità della sostanza in esame ad animali da esperimento, che vengono tenuti in osservazione per un periodo stabilito, ponendo attenzione alla comparsa di eventuali comportamenti anomali. Tale saggio, pur essendo aspecifico, è particolarmente utile quando non siano disponibili informazioni sicure circa la natura delle sostanze in esame. Infine, i test di genotossicità rappresentano un parametro da non trascurare nella valutazione tossicologica di un prodotto poiché permettono di saggiarne la potenziale capacità di indurre danni al DNA anche in assenza di effetti tossici evidenti.

Campionamento

Il campionamento ha riguardato 39 preparazioni erboristiche utilizzate nella medicina ayurvedica. Per l'indagine sono stati selezionati prodotti di due ditte indiane presenti sul mercato italiano, ovvero Himalaya e Ayurveda Maharishi. Relativamente alla presenza di metalli, le due serie di prodotti campionati potevano presentare aspetti diversi in funzione di differenti filosofie di preparazione adottate dai due fabbricanti, ovvero l'aggiunta o meno di una parte minerale alla miscela di erbe. I campioni sono stati acquistati presso una farmacia per avere la certezza di esaminare un prodotto regolarmente importato e che riflettesse la reale situazione in cui si trova il consumatore. Come criterio adottato nella individuazione dei preparati, si è tenuto conto della loro frequenza di impiego e delle potenziali applicazioni terapeutiche. I prodotti campionati sono riportati nelle Tabelle 1 e 2.

Tabella 1. Campionamento dei prodotti Himalaya

Prodotto	N. confezioni	Lotto	Data preparazione	Data scadenza
Abana	5	01201-E	dicembre 2000	novembre 2003
Amritalia	5	00702-E	luglio 2000	giugno 2003
Bonnisan	5	00902	settembre 2000	agosto 2003
Cystone	5	01109-E	novembre 2000	ottobre 2003
Diarex	5	E-91202	dicembre 1999	novembre 2002
Gasex	2	E-00303	marzo 2000	febbraio 2003
Herbolax	5	01101-E	novembre 2000	ottobre 2003
Koflet	5	00201	febbraio 2000	gennaio 2003
Liv 52	5	00409-E	aprile 2000	marzo 2003
Liv 52 DS	4	01103-E	novembre 2000	ottobre 2003
Lukol	5	00401-E	aprile 2000	marzo 2003
Mentat	5	01103-E	novembre 2000	ottobre 2003
Rumalaya	2	01102-E	novembre 2000	ottobre 2003
Speman	2	E-90403	aprile 1999	marzo 2002
Styplon	5	00602-E	giugno 2000	maggio 2003

Tabella 2. Campionamento prodotti Ayurveda Maharishi

Prodotto	N. confezioni	Lotto	Data scadenza
MAK 4	5	gennaio 2001	2003
MAK 5	4	gennaio 2001	2003
MA 14	5	gennaio 2001	2003
MA 102	5	gennaio 2001	2003
MA 104	5	gennaio 2001	2003
MA 125	5	gennaio 2001	2003
MA 154	5	gennaio 2001	2003
MA 174	5	maggio 2000	2002
MA 208	5	agosto 2000	2003
MA 209	5	dicembre 2000	2003
MA 229	5	gennaio 2001	2003
MA 232	5	gennaio 2001	2003
MA 251	5	dicembre 2000	2003
MA 252	5	marzo 2001	2003
MA 321	5	gennaio 2001	2003
MA 328	5	marzo 2001	2003
MA 572	5	dicembre 2000	2007
MA 579	5	gennaio 2001	2003
MA 592	5	novembre 2000	2002
MA 649	5	marzo 2001	2003
MA 687	5	gennaio 2001	2003
MA 939	4+1	settembre 2000	2002
Lady Rasayana	5	dicembre 2000	2005
Men Rasayana	5	dicembre 2000	2003

Nella Tabella 3 sono descritte brevemente le indicazioni terapeutiche relative ai prodotti analizzati.

Tabella 3. Indicazioni terapeutiche dei prodotti analizzati

Prodotto	Indicazione
Himalaya	
Abana	agisce favorevolmente sulla funzione del muscolo cardiaco
Amritalia	sistema nervoso centrale: stress, recupero fisico, controllo emozionale
Bonnisan	coadiuvante dello sviluppo e crescita dei bambini
Cystone	protezione apparato urinario, disgregazione piccoli calcoli
Diarex	aumenta le difese naturali a livello del duodeno, colon, retto
Gasex	tonico della funzione fisiologica dello stomaco
Herbolax	agisce sulle funzioni intestinali
Koflet	apparato respiratorio, stimola le difese contro le irritazioni
Liv 52	agisce sulla cellula epatica, inattiva sostanze tossiche
Liv 52 DS	trattamento disordini epatici, previene la perossidazione lipidica
Lukol	apparato genitale femminile, ciclo mestruale
Mentat	congiuntiviti allergiche e infettive, infiammazioni oculari
Rumalaya	tessuto cartilagineo e osseo, facilita eliminazione acido urico
Speman	agisce favorevolmente sulla ghiandola prostatica, fertilità maschile
Styplon	agisce favorevolmente sul processo di coagulazione del sangue
Ayurveda Maharishi	
MAK 4	tonico generale, rinforza il sistema nervoso, arteriosclerosi
MAK 5	tonico generale, utilizzato in combinazione con MAK 4
MA 14	depurativo, obesità, ipercolesterolemia, diabete
MA 102	ipertensione, ansia iperemotiva
MA 104	emicrania, cefalea
MA 125	malattie della pelle (eczema, acne)
MA 154	problemi digestivi, intolleranze alimentari, problemi pancretici
MA 174	colite ulcerativa, azione cicatrizzante sulla mucosa intestinale
MA 208	ipercolesterolemia, obesità, funzionalià epatica e pancreatica
MA 209	dolori articolari e muscolari, ripristina l'integrità cartilaginea
MA 229	cardiotonico, aritmia, scompensi, post-infarto
MA 232	disuria, infezioni urinare, prostatite, leggero diuretico
MA 251	prevenzione dei problemi respiratori, asma, afinia, acufeni, rinite
MA 252	asma, febbre da fieno, broncospasmo
MA 321	anemia per carenza di ferro, promuove l'emopoiesi
MA 328	stitichezza
MA 572	artrite reumatoide, osteoartrite, dolori articolari, gotta
MA 579	epatiti acute e croniche, cirrosi, prevenzione della calcolosi biliare
MA 592	prevenzione e trattamento della paradentosi. problemi gengivali
MA 649	osteoporosi, dentizione, problemi di fabbisogno di calcio
MA 687	infezioni acute e croniche del tratto respiratorio, asma
MA 939	pre-menopausa, menopausa
Lady Rasayana	rafforza la fisiologia femminile
Men Rasayana	rafforza la fisiologia maschile

Risultati

Proprietà chimico fisiche

Nella Tabella 4 sono mostrati i dati relativi alla determinazione di umidità, ceneri e solubilità.

Tabella 4. Valori di umidità, ceneri e solubilità

Prodotto	% di Umidità		% Ceneri	Solubilità (g/L)		
	105 °C	180 °C	450 °C	H_20	HCl 1N	Alcol 95°
Himalaya						
Abana	5,1	16,3	22,2	2,9	4,0	1,5
Amritalia	5,5	17,3	14,0	8,1	3,9	0,3
Bonnisan	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cystone	6,2	20,1	14,1	3,2	4,1	1,4
Diarex	5,7	19,0	12,9	4,3	5,3	1,2
Gasex	7,5	14,7	22,7	1,8	3,2	0,2
Herbolax	6,7	18,8	9,4	3,6	3,9	0,9
Koflet	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Liv 52	5,9	21,2	14,8	2,6	3,4	1,1
Liv 52s	8,9	21,0	14,6	2,8	3,1	1,1
Lukol	6,8	17,4	24,9	4,6	4,7	0,3
Mentat	6,4	22,6	14,2	2,9	3,9	1,1
Rumalaya	6,8	22,7	14,6	4,2	4,7	1,3
Speman	8,1	17,1	20,4	0,1	2,7	0,7
Styplon	6,2	14,1	41,4	4,2	7,0	1,9
Ayurveda Maharishi						
MAK 4	nd	nd	nd	9,1	9,2	4,8
MAK 5	7,0	18,4	6,7	3,9	3,7	1,0
MA 14	6,1	24,8	4,4	5,8	5,6	4,8
MA 102	9,4	20,3	8,6	1,5	1,9	1,9
MA 104	6,5	22,4	30,1	7,0	6,5	2,9
MA 125	7,1	18,1	8,6	3,1	3,5	1,4
MA 154	5,8	15,3	28,4	3,9	4,9	1,4
MA 174	5,8	16,0	61,9	3,6	6,0	0,9
MA 208	5,5	14,2	8,5	2,3	2,8	1,3
MA 209	5,9	17,2	18,2	1,7	2,8	0,9
MA 229	5,8	16,3	21,2	1,3	3,8	0,2
MA 232	6,3	17,0	8,7	2,5	2,9	1,6
MA 251	6,6	19,8	7,4	2,9	2,9	2,8
MA 252	5,9	18,2	8,8	3,7	3,7	3,2
MA 321	5,6	25,1	21,7	6,0	6,1	4,5
MA 328	8,4	25,1	7,1	5,3	5,1	2,2
MA 572	5,5	22,0	4,4	5,3	5,5	1,4
MA 579	7,6	19,5	9,2	2,1	2,8	1,2
MA 592	2,1	6,4	69,1	2,0	2,2	1,7
MA 649	2,5	5,2	83,7	1,4	7,1	0,2
MA 687	7,0	17,3	9,9	2,4	2,4	2,0
MA 939	7,4	22,5	9,0	3,8	4,9	2,6
Lady Rasayana	6,6	20,3	28,7	4,9	5,9	2,8
Men Rasayana	7,8	21,3	12,4	4,1	4,6	1,2

nd = non determinabile

Le Figure 1, 2 e 3 mostrano l'andamento di questi parametri per l'intera campionatura.

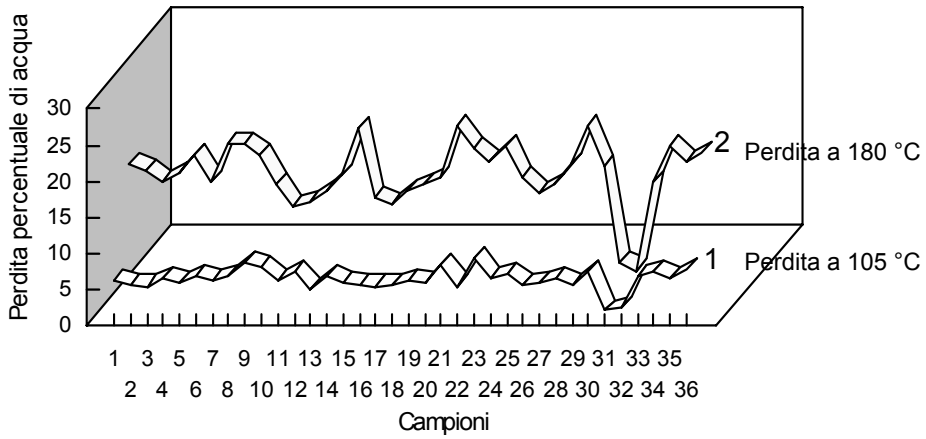


Figura 1. Andamento dell'umidità

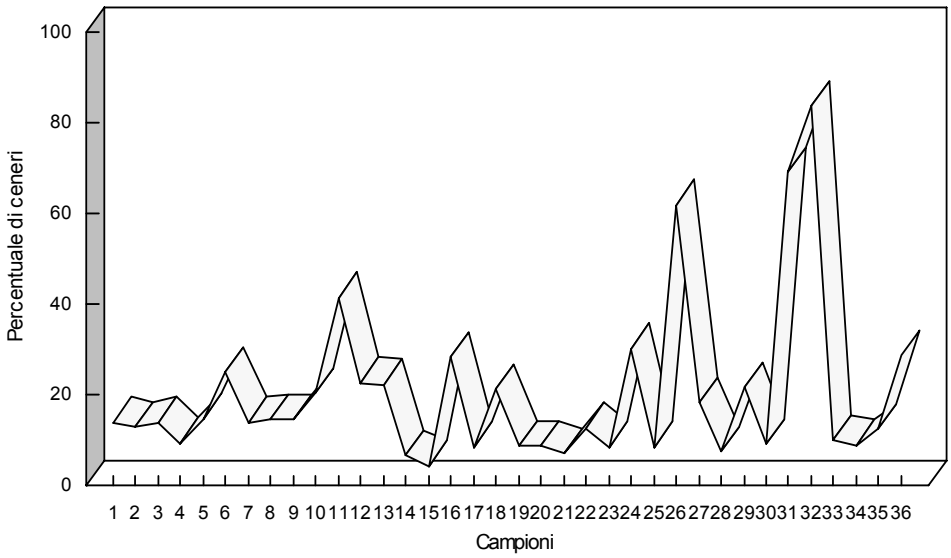


Figura 2. Andamento delle ceneri

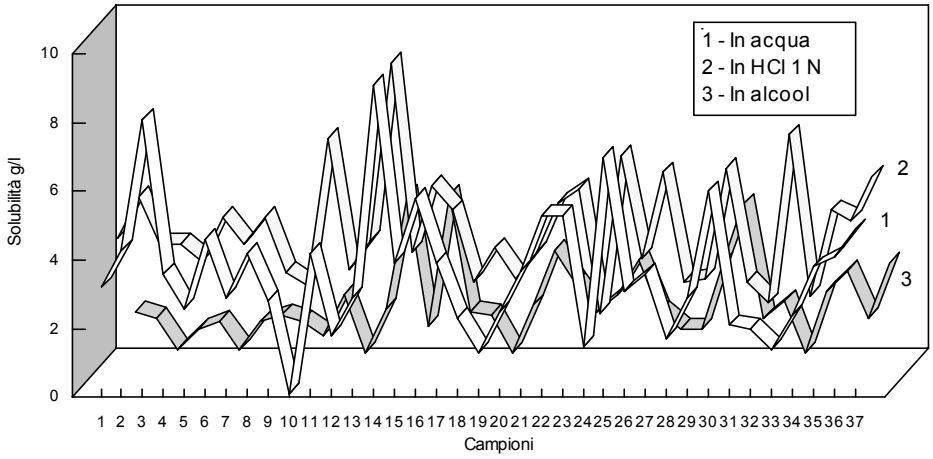


Figura 3. Andamento della solubilità

La perdita di acqua a 105 °C è risultata scarsa e abbastanza costante per tutti i campioni, con valori compresi tra 2,1 e 9,4%. Valori più alti sono stati evidenziati per la perdita a 180 °C, riferibile all'acqua più intimamente legata.

La solubilità è risultata generalmente bassa; fra i tre tipi di solubilità determinate (solubilità in acqua, solubilità in acido cloridrico 1N, solubilità in alcol), quella in HCL 1N ha fornito in generale valori leggermente più elevati rispetto all'acqua, probabilmente in funzione dell'attacco esercitato dall'acido sulla parte minerale del prodotto. La solubilità in alcol è risultata in generale inferiore rispetto al mezzo acquoso.

Per quanto riguarda la presenza di residuo a 450 °C (ceneri), i dati percentuali ottenuti si presentano dispersi (20,1±18,3), in funzione di alcuni alti valori di ceneri presenti in alcuni prodotti; ciò, a dimostrazione di un differente contenuto minerale all'interno della campionatura.

Determinazione dei metalli

Le determinazioni dei metalli nei preparati è stata effettuata dopo un opportuno trattamento dei campioni che ha previsto una iniziale macinazione del prodotto in mulino con giara e sfere di agata, e una successiva digestione acida effettuata con un sistema a microonde ad alta pressione. Sono state utilizzate, divise per gruppi di elementi, le seguenti strumentazioni:

- Assorbimento atomico Perkin Elmer 5100 Z;
- Assorbimento atomico Perkin Elmer Aanalyst 800;
- Assorbimento atomico Varian 300 Z;
- FIMS Perkin Elmer 100 Mercury Analyzer;
- AMA 254 FKV Mercury Analyzer.

Nella Tabella 5 sono riportate le concentrazioni di arsenico (As), cadmio (Cd), cromo (Cr), ferro (Fe), mercurio (Hg), manganese (Mn), nichel (Ni), piombo (Pb), rame Cu) e zinco (Zn) riscontrate rispettivamente nei prodotti esaminati. In generale le concentrazioni sono risultate basse e per alcuni elementi talvolta prossime o inferiori ai limiti di rivelabilità del metodo.

Tabella 5. Concentrazione di elementi nei preparati

Prodotto	As mg/kg	Cd mg/kg	Cr mg/kg	Fe mg/kg	Hg µg/kg	Mn mg/kg	Ni mg/kg	Pb mg/kg	Cu mg/kg	Zn mg/kg
Himalaya										
Abana	0,56	0,14	30,3	4731	159	128	35,7	2,9	10,5	26,5
Amritalia	<0,54	0,05	4,8	1529	27,5	84,1	2,8	2,2	9,3	127
Bonnisan	<0,54	<0,014	<0,16	<20	0,4	<7,7	<0,42	<0,18	<0,80	<2,6
Cystone	<0,54	0,05	3,1	1177	15,5	69,5	2,4	1,5	6,5	17,0
Diarex	0,76	0,02	12,6	6009	82,5	100	5,9	2,6	8,3	122
Gasex	<0,54	0,06	5,9	1637	322	110	2,6	3,4	10,5	29,7
Herbolax	<0,54	0,02	4,5	1157	73,5	97,9	2,5	1,5	9,0	25,6
Koflet	<0,54	<0,014	<0,16	<20	0,4	<7,7	<0,42	<0,18	<0,80	<2,6
Liv 52	<0,54	0,17	75,1	2482	59,3	91,8	5,6	2,1	36,9	25,3
Liv 52s	<0,54	0,16	8,4	2524	35,7	102	4,2	2,4	41,3	26,4
Lukol	<0,54	0,04	4,7	2426	139	100	2,6	2,1	8,9	31,1
Mentat	<0,54	0,08	4,9	1628	56,5	105	3,1	2,0	9,6	35,6
Rumalaya	<0,54	0,04	3,3	1321	41,5	692	2,5	2,3	8,5	17,4
Speman	<0,54	0,04	7,0	2675	105	106	3,8	3,4	14,6	27,4
Styplon	0,56	0,13	7,4	817	61,2	67,8	3,5	1,0	3,1	649
Ayurveda Maharishi										
MAK 4	<0,54	<0,014	1,7	65,9	0,8	8,0	0,9	<0,18	1,0	<2,6
MAK 5	<0,54	0,02	3,9	420	8,1	32,6	1,5	0,7	6,3	24,0
MA 14	<0,54	0,02	3,5	167	3,0	15,1	1,8	0,8	4,3	8,6
MA 102	<0,54	0,04	10,0	1305	10,9	57,2	9,9	1,5	9,4	22,5
MA 104	0,66	0,03	3,0	466	24,0	30,0	1,6	3,1	3,8	5,2
MA 125	<0,54	0,03	3,7	757	18,3	46,8	2,2	1,8	9,6	28,4
MA 154	<0,54	<0,014	2,4	343	15,0	85,5	1,5	1,5	8,5	37,6
MA 174	0,58	0,13	20,4	6362	2,2	835	9,8	0,4	52,8	132
MA 208	<0,54	0,15	9,1	467	70,0	43,1	8,7	0,35	9,0	21,6
MA 209	<0,54	0,06	2,8	227	8,7	14,2	1,7	0,7	5,6	26,1
MA 229	<0,54	0,04	5,6	857	27,5	68,5	2,8	2,1	7,0	16,0
MA 232	<0,54	0,03	25,6	838	7,4	41,2	17,6	1,6	11,8	17,2
MA 251	<0,54	0,03	3,5	652	10,0	27,1	2,1	0,9	2,0	16,2
MA 252	<0,54	<0,014	5,0	850	11,0	24,8	2,9	1,3	9,5	14,2
MA 321	1,22	0,03	33,1	14713	13,5	118	19,6	5,5	15,8	40,1
MA 328	<0,54	0,04	4,3	254	4,6	34,1	2,6	0,7	7,8	19,7
MA 572	0,79	0,07	4,1	440	6,8	92,6	4,2	0,9	7,9	20,1
MA 579	<0,54	0,11	8,1	771	14,8	78,4	4,4	1,9	6,9	28,8
MA 592	1,84	0,33	40,6	26911	70,3	138	8,2	10,5	17,3	36,2
MA 649	0,66	0,04	4,1	353	2,4	85,0	1,8	3,8	18,9	12,0
MA 687	0,47	0,02	6,0	3467	6,8	30,4	3,3	3,2	9,5	14,2
MA 939	0,66	0,03	9,0	1098	12,5	38,4	5,2	3,9	15,3	14,8
Lady Rasayana	1,81	0,04	23,1	72973	11,9	94,4	18,5	1,9	12,2	24,8
Men Rasayana	<0,54	0,05	5,6	611	15,0	139	5,5	1,3	8,4	22,9

Le distribuzioni delle concentrazioni per ogni elemento e il confronto tra le due campionature di prodotti sono illustrati nella Appendice A. Non è stato possibile riportare su di un unico grafico tutti gli andamenti in quanto i differenti intervalli di concentrazione e in alcuni casi le differenti unità di misura avrebbero appiattito eventuali differenze tra un campione e l'altro.

Alcuni *spike* di elementi conosciuti come essenziali per l'uomo, osservati in qualche prodotto, possono essere messi in relazione alla indicazione terapeutica dello stesso. Ad esempio, il campione Rumalaya, nel quale è stata riscontrata una maggiore concentrazione di manganese rispetto agli altri, trova indicazione terapeutica nella medicina ayurvedica in alcune

alterazioni della struttura ossea e del tessuto cartilagineo. Anche nella letteratura occidentale è però riportato che deficienze di manganese possono essere associate a problemi di scheletro e cartilagine. Simili considerazioni possono essere fatte per la presenza di cromo nel campione Liv 52, un prodotto utilizzato per migliorare la funzionalità epatica. L'utilità della presenza di questo elemento nel preparato potrebbe infatti essere riferita alle funzioni che esso esplica in molti sistemi enzimatici che coinvolgono la cellula epatica.

In generale si può dire che i livelli di elementi riscontrati sono rassicuranti, anche in considerazione del fatto che alcuni di questi prodotti erano già stati da noi analizzati alcuni anni or sono, in seguito a sequestri cautelativi effettuati dai NAS (Nuclei Antisofisticazioni e Sanità dell'Arma dei Carabinieri), esibendo talvolta alti contenuti di piombo e mercurio. In quel caso, la nostra valutazione tossicologica era stata nei confronti del prodotto ovviamente negativa. Pertanto, il nostro campionamento ha volutamente incluso alcuni di questi preparati, in quanto importanti per diffusione di uso. Negli attuali campioni, gli stessi elementi sono risultati presenti a concentrazioni basse, ad indicare come le pressioni esercitate sui produttori e le vicende giudiziarie che hanno coinvolto alcuni importatori abbiano fornito un buon risultato per il consumatore, migliorando sotto il profilo della sicurezza la qualità del prodotto.

Per quanto riguarda eventuali differenze tra i preparati delle due case produttrici, sulla base dei dati disponibili non è possibile effettuare un vero e proprio confronto, in quanto le indicazioni terapeutiche dei prodotti esaminati sono differenti. Comunque, per qualche metallo (es. Pb), una leggera tendenza a valori più alti sembra essere abbastanza evidente in una delle due distribuzioni.

Livelli di sicurezza dei metalli pesanti

Questo punto riveste carattere di particolare importanza per vari aspetti: attualmente un organo di controllo (ASL, ISS), dopo aver eseguito le analisi, deve necessariamente esprimere un giudizio sui livelli degli elementi riscontrati e, non esistendo una normativa specifica, dispone unicamente di linee guida elaborate da JECFA (*Joint FAO/WHO Food Standard Programme Codex Committee on Food Additives and Contaminants*) e da altri Organismi internazionali (Tabella 6).

Tabella 6. Limiti raccomandati per l'assunzione dei metalli con la dieta (valori riferiti ad individuo di 60 kg di peso corporeo)

Elemento	Dose	Periodo	Riferimento
Arsenico (PTWI)	0,9 mg	settimana	JECFA
Cadmio (PTWI)	0,42 mg	settimana	JECFA
Cromo (RDA*-PMTDI**)	50-200 µg	giorno	NAS° (USA)
Ferro (PMTDI)	48 mg	giorno	JECFA
Mercurio (PTWI)	300 µg	settimana	IARC°°
Manganese (PMTDI)	10 mg	giorno	CSAU§
Piombo (PTWI)	1,5 mg	settimana	JECFA
Rame (RDA-PMTDI)	3-30 mg	giorno	JECFA
Stagno (PTWI)	840 mg	settimana	JECFA
Zinco (PMTDI)	60 mg	giorno	JECFA

* RDA = Recommended Daily Amount;
** PMTDI = Provisional Maximum Tolerable Daily Intake;
° National Academy of Science - USA;
°° International Agency for Research on Cancer;
§ Comitato Scientifico Alimentazione Umana - EEC.

Tuttavia, i valori proposti si riferiscono ad assunzioni complessive da varie fonti (acqua, dieta, farmaci, ecc.) pertanto queste indicazioni possono risultare utili solo quando le concentrazioni riscontrate nel prodotto risultino abbastanza alte o quando, in funzione della posologia dichiarata o presunta, da soli saturano la quantità consentita considerando tutte le fonti

di esposizione. Sulla base di queste considerazioni e a solo titolo di semplice esercizio, sono state calcolate le concentrazioni massime accettabili in un preparato per non superare i limiti proposti nella Tabella 6, considerando una assunzione media di 4 compresse giornaliere e differente peso della pasticca o tavoletta. Tali concentrazioni sono state calcolate considerando un contributo di metalli proveniente esclusivamente dall'assunzione di preparati erboristici (Tabella 7).

Tabella 7. Ipotesi di concentrazioni massime consentite

Elemento	Peso della pasticca o tavoletta (mg)		
	300	400	500
As	107 mg/kg	80 mg/kg	64 mg/kg
Cd	50 mg/kg	37,5 mg/kg	30 mg/kg
Cr	167 mg/kg	125 mg/kg	100 mg/kg
Cu	25 g/kg	18,8 g/kg	15 g/kg
Fe	40 g/kg	30 g/kg	24 g/kg
Hg	35,7 mg/kg	26,8 mg/kg	21,4 mg/kg
Mn	8,3 g/kg	6,3 g/kg	5,0 g/kg
Pb	178 mg/kg	134 mg/kg	107 mg/kg
Sn	100 g/kg	75 g/kg	60 g/kg
Zn	50 g/kg	37,5 g/kg	30 g/kg

Ovviamente, i valori calcolati non possono essere considerati gli effettivi limiti di sicurezza consentiti, in quanto vi è da considerare che normalmente l'assunzione di questi elementi avviene anche per altre vie, principalmente con la dieta. Quindi, nei casi in cui si riscontrano concentrazioni superiori o prossime a quelle indicate, un giudizio di non idoneità del prodotto può risultare anche facile; quando invece le concentrazioni sono più basse, la formulazione di un giudizio risulta più complessa e spesso soggettiva, in quanto vi è da stimare in quale proporzione, rispetto a fonti più importanti, ad esempio l'alimentazione, possano contribuire i preparati alla assunzione totale. Pertanto, individuare, almeno per gli elementi più pericolosi, limiti di sicurezza e tentare di proporli è importante e porterebbe chiarezza scientifica nei vari dibattimenti in sede giudiziaria.

Determinazione di pesticidi

La determinazione dei pesticidi ha riguardato un gruppo di 20 campioni, ovvero: Cystone, Dyarex, Amritalia, Herbolax, Koflet, Liv 52, Lukol, Mentat, Rumalaya, MAK 4, MAK 5, MA 14, MA 154, MA 208, MA 229, MA 232, MA 252, MA 328, MA 572, MEN Rasayana, sui quali sono stati ricercati i seguenti 56 composti organofosforici:

Acephate	*Diazinon*	*Fenthoate*	*Parathion-ethyl*
Azinphos-ethyl	*Diazoxon*	*Fonofos*	*Parathion-methyl*
Azinphos-methyl	*Dichlofenthion*	*Formothion*	*Phosalone*
Bromophos (methyl)	*Dimethoate*	*Fosfamidone*	*Pirimiphos-methyl*
Bromophos ethyl	*Dioxathion*	*Fosmet*	*Pyrazophos*
Cadusafos	*Disulfoton*	*Heptenophos*	*Pyridafenthion*
Chlorfenvinphos	*Ethion*	*Isofenphos*	*Quinalphos*
Chlormephos	*Ethoprophos*	*Malathion*	*Sulfotep*
Chlorpyriphos (ethyl)	*Etrimfos*	*Mecarbam*	*Terbufos*
Chlorpyriphos-methyl	*Fenamiphos*	*Methacriphos*	*Tetrachlorvinphos*
Chlorthiophos	*Fenchlorphos*	*Methamidophos*	*Thrichlorfon*
Coumaphos	*Fenitrothion*	*Methidathion*	*Tolclofos-methyl*
DDVP	*Fenthion*	*Monocrotophos*	*Triazophos*
Demeton-S-methylsulfone	*Fenthion sulfoxide*	*Omethoate*	*Trithion*

Quanto sopra ha richiesto la messa a punto di un metodo miniaturizzato basato su estrazione diretta con acetonitrile e purificazione "in linea" attraverso cartuccia SPE-C18 e determinazione gas cromatografica su colonna capillare con rivelatore a fotometria di fiamma selettivo per composti organofosforati (FPD-P) (Figura 4).

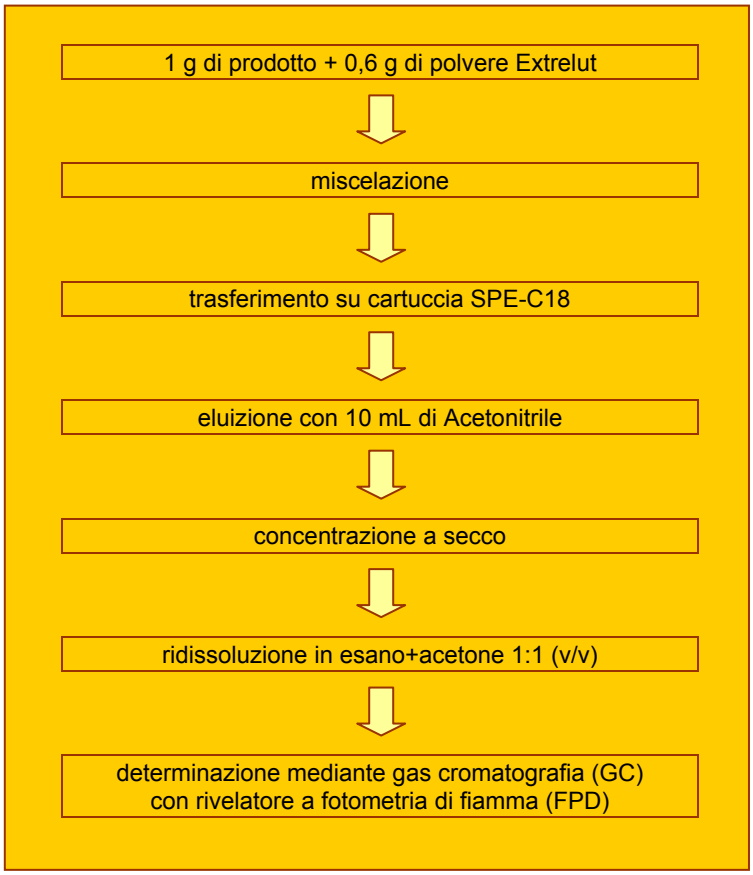


Figura 4. Metodo analitico sviluppato per residui di pesticidi OP nei preparati ayurvedici

In tutti i campioni esaminati, i composti ricercati sono risultati assenti al Limite di Rivelabilità (LOD, Limit Of Detection) di 0,02-0,05 mg/kg (a seconda dei composti).

Indagini microbiologiche

È noto che molti prodotti vegetali contengono sulla loro superficie microrganismi che possono permanere vitali anche dopo aver subito un processo di essiccamento. In genere si tratta di germi capaci di sopportare condizioni ambientali avverse e bassi tenori di acqua libera. È altresì noto che le spezie e gli aromi vegetali possono fungere da vettori di *Salmonella*, costituendo un rischio quando vengono aggiunti ad altri ingredienti che permangono a lungo a temperatura ambiente prima di essere utilizzati.

Al di là dei risultati clinici ottenibili con i trattamenti a base di prodotti erboristici e nonostante le difficoltà nella valutazione della loro efficacia e sicurezza d'uso, sono stati qui presi in esame gli aspetti igienico-sanitari relativi alla *facies* microbiologica con lo scopo di verificare che le sostanze impiegate non avessero evidenti effetti negativi secondari correlabili

alla presenza di microrganismi potenzialmente patogeni e/o tossine. Ciò avvalendosi anche di metodiche di biologia molecolare. Questa parte dello studio ha dunque avuto lo scopo di fornire un ulteriore contributo alla conoscenza dei possibili rischi per la salute e di evidenziare l'utilità delle tecniche analitiche più recenti per l'accertamento della salubrità di questi prodotti.

Negli esperimenti sono stati presi in considerazione 20 preparati erboristici (Tabella 8), reperibili in commercio nel nostro Paese, utilizzati nella medicina ayurvedica e provenienti da alcune ditte indiane, allo scopo di definirne il profilo microbiologico. I preparati, impiegati per differenti tipi di patologie, sono stati selezionati in base alle differenti caratteristiche terapeutiche e alla composizione in erbe, in modo che fossero rappresentativi di diverse tipologie.

I parametri da accertare prescelti concernevano sia la flora microbica presuntivamente tipica, sia quella potenzialmente contaminante (ifomiceti, lieviti, bacilli, clostridi e alcune coccacee). Sono stati presi in considerazione microrganismi appartenenti alle suddette categorie sia in quanto indicatori di un livello generale di contaminazione del prodotto, sia perché appartenenti a specie potenzialmente patogene. Si è quindi focalizzata l'attenzione sulla carica microbica mesofila totale, sul contenuto in miceti, sul contenuto in clostridi solfito-riduttori e sulla presenza dello *Staphylococcus aureus*. Inoltre è stata valutata anche la presenza di coliformi e di *Salmonella*, in quanto rappresentativi di una possibile contaminazione fecale. Tali microrganismi possono anche resistere a processi di essiccamento, tra l'altro con frequenti successive difficoltà di sviluppo e quindi di evidenziazione, adottando le normali metodiche di laboratorio.

L'obiettivo di un'ulteriore sezione delle indagini microbiologiche è stato pertanto lo sviluppo di un metodo rapido, sensibile e di facile esecuzione per la determinazione di *Salmonella* nelle preparazioni a base di erbe (essiccate o comunque trattate), mediante una tecnica di arricchimento-estrazione del relativo DNA e successiva amplificazione (PCR, *Polymerase Chain Reaction*). È stato affrontato anche il fatto che la complessa composizione delle matrici organiche può inibire la PCR o ridurne il livello di sensibilità. Considerate le particolari condizioni delle preparazioni in esame, con questa tecnica in alcuni casi possono essere evidenziati anche quei microrganismi non coltivabili o comunque non più vitali al momento dell'analisi ma che potrebbero aver contaminato i campioni, segnalando comunque una condizione di scarsa igienicità. Infatti il reperimento di una contaminazione, non più efficace nel provocare un pericolo per il consumatore, può comunque mettere in allarme sulla affidabilità dei processi di produzione e delle materie prime impiegate per ottenere i preparati erboristici.

L'esame microbiologico condotto secondo metodiche convenzionali ha fornito per i campioni esaminati valori di carica microbica aerobia a 30 °C relativamente accettabili, oscillanti tra poche unità per grammo e circa $1x10^6$ UFC (unità formanti colonie) (Tabella 8).

L'esame microscopico-morfologico di un'aliquota rappresentativa delle colonie sviluppatesi sui terreni per la conta microbica, ha permesso di riferire le stesse a Bacillacee (con una notevole presenza di sporigeni, prevalentemente non riferibili a clostridi) e, in minor misura, a Coccacee di diverse forme e dimensioni. Il riscontro di una prevalenza di Bacillacee è in accordo con le aspettative, essendo questi microrganismi abbastanza resistenti all'essiccamento e relativamente frequenti nelle materie prime fresche.

Gli ifomiceti e i lieviti hanno fatto rilevare valori massimi dell'ordine di $6x10^4$ UFC/g. L'esame microscopico-morfologico di alcune delle colonie sviluppate, ha permesso di riferire in molti casi la maggior parte di esse ai generi *Aspergillus* e *Penicillium*.

I clostridi solfito-riduttori sono stati riscontrati in due campioni (10%) a un livello non molto elevato. I coliformi ed *E.coli* sono stati riscontrati in un solo campione (5%). In tutti i campioni non è stata invece riscontrata presenza di patogeni alimentari quali *S. aureus* e *Salmonella* sp. La mancanza del riscontro di *Salmonella* è stata confermata anche mediante una metodica

biomolecolare. Nella ricerca di *Salmonella*, è stata infatti anche adottata la tecnica della PCR, in cui i *primers* utilizzati (ST11 e ST15) sono stati prescelti in base alla loro capacità di riconoscere e amplificare una specifica regione di 429 paia di basi particolarmente conservata.

La metodica messa a punto ha permesso di rilevare la presenza di DNA di *Salmonella* in campioni a matrice analoga a quella dei campioni oggetto dello studio e artificialmente contaminati con il sierotipo sperimentato (campioni di riferimento), fino a concentrazioni del microrganismo comprese tra 10^2 e 10^3/g di campione, nel caso in cui l'estrazione mediante bollitura era stata fatta precedere dalla separazione-concentrazione immunomagnetica (*Dynabeads*). Gli altri metodi di estrazione, considerando concentrazioni realisticamente basse di contaminazione ($<10^5$/g) non hanno fornito risultati utili. In definitiva, il pattern microbiologico, contrariamente ad alcune possibili supposizioni iniziali, è risultato nel complesso soddisfacente, in particolare relativamente alla presenza di ifomiceti, lieviti e clostridi, i quali, notoriamente, tendono ad essere favoriti nella sopravvivenza, rispetto ad altre specie microbiche, nei campioni caratterizzati da un basso tenore di acqua libera.

Per quanto concerne la carica microbica totale, essa è risultata più spesso contenuta in limiti accettabili e solo in qualche caso ha ecceduto di non più di un logaritmo decimale i valori di riferimento della farmacopea ufficiale per prodotti contenenti erbe essiccate. Non è stata infine rilevata presenza di patogeni alimentari, in particolare di *Salmonella*, neppure con la metodica di rilevazione del DNA, appositamente messa a punto.

Test di tossicità

In un'altra fase dello studio si è posta attenzione alla potenzialità tossica della complessa miscela di sostanze presenti in alcune preparazioni erboristiche, con lo scopo di verificare che le sostanze stesse non avessero effetti negativi secondari correlabili alla presenza di tossici generici e/o sostanze mutagene.

In primo luogo è stata saggiata la tossicità aspecifica delle stesse preparazioni di cui alla Tabella 8, utilizzando metodiche biotossicologiche che fanno uso di animali da laboratorio. Tutti gli animali (topi, cavie) trattati per cinque giorni con gli estratti dei campioni non hanno presentato evidenti e significativi disturbi rispetto al gruppo di controllo. La somministrazione dei preparati agli animali da esperimento non ha fornito quindi informazioni tali da far ritenere questi prodotti responsabili di tossicità acuta.

Inoltre, al fine di evidenziare l'eventuale potenziale genotossico di tali preparazioni, è stato effettuato il test dei micronuclei su cellule di apici radicali di *Vicia faba*, saggio mediante il quale è possibile identificare i danni al materiale genetico attraverso l'individuazione di figure anatelofasiche irregolari o di frammenti di DNA extranucleari (micronuclei). Tale test è stato preferito ad altri saggi in quanto, oltre ad essere poco costoso, risulta essere di semplice impiego ed è sufficientemente sensibile. Ciò permette un suo esteso impiego come saggio preliminare di genotossicità, limitando l'uso di test su sistemi animali. In questo lavoro, piantine di *Vicia faba* sono state trattate in idrocultura per 1 ora con tre differenti concentrazioni dei preparati da saggiare, in particolare sono state utilizzate, effettuando le opportune correzioni, quantità superiori alle dosi giornaliere consigliate. Le piantine, in seguito al trattamento, sono state trasferite in terreno sabbioso e fissate dopo 3 giorni. Alcune di esse sono state sottoposte, in seguito al contatto con i prodotti ayurvedici, ad un trattamento con un potente mutageno, l'idrazide maleica, al fine di verificare se il trattamento stesso potesse conferire alle piantine una certa protezione nei confronti del mutageno. I risultati ottenuti indicano, anche con le dosi più alte del prodotto, assenza di genotossicità; in alcuni casi, anzi, si è osservato un modesto grado di riduzione del danno indotto dall'idrazide. Pur non potendosi formulare considerazioni definitive, questo aspetto appare interessante ai fini dello sviluppo di ulteriori indagini. I risultati

ottenuti, indicano, anche con le dosi più alte del prodotto, assenza di genotossicità; in alcuni casi, anzi, si è osservato un modesto grado di riduzione del danno indotto dall'idrazide. Pur non potendosi formulare considerazioni definitive, questo aspetto appare interessante ai fini dello sviluppo di ulteriori indagini.

Tabella 8. Determinazioni microbiologiche

Campione	Mesofili aerobi UFC/g	Coliformi MPN°/g			*St. aureus* UFC/g	Lieviti e Ifomiceti UFC/g	*Salmonella* in 2 g	Clostridi Solfito Riduttori UFC/g
		totali	fecali	*E. coli*				
Amritalia	<10	-	-	-	-	10	-	-
Cystone	20	-	-	-	-	30	-	-
Diarex	30	-	-	-	-	<10	-	-
Herbolax	<10	-	-	-	-	<10	-	-
Koflet	50	-	-	-	-	<10	-	-
Liv.52	<10	-	-	-	-	<10	-	-
Lukol 3	$7x10^2$	-	-	-	-	500	-	-
MA14	$1,4x10^4$	-	-	-	-	500*	-	-
MA154	$1x10^3$	-	-	-	-	100*	-	300
MA208	$9,5x10^5$	>1100/g	>1100/g	460/g	-	$6x10^4$	-	10
MA229	$1x10^3$	-	-	-	-	300∗	-	-
MA232	$1x10^5$	-	-	-	-	320	-	-
MA252	$2,5x10^5$	-	-	-	-	$1x10^3$*	-	-
MA328	$8,5x10^4$	-	-	-	-	$4x10^4$	-	-
MA572	$1,2x10^5$	-	-	-	-	<10	-	-
MAK4	$9x10^3$	-	-	-	-	260	-	-
MAK5	$6x10^5$	-	-	-	-	600#	-	-
Men. Ras.	$3,8x10^4$	-	-	-	-	10	-	-
Mentat	$1x10^2$	-	-	-	-	100#	-	-
Rumalaya	<10	-	-	-	-	<10	-	-

° MPN = Most Probable Number
- negativo
∗ prevalenza di *Aspergillus*
prevalenza di *Penicillium*

Considerazioni finali

In riferimento ai risultati ottenuti e in condizione di normale utilizzazione, i campioni di preparazioni erboristiche esaminate non hanno evidenziato, sia dal punto di vista della contaminazione chimica (presenza di metalli, presenza di pesticidi) che microbiologica, situazioni di potenziale pericolo per il consumatore.

PREPARAZIONI ERBORISTICHE UTILIZZATE NELLA MEDICINA CINESE

Il presente lavoro ha avuto lo scopo di valutare la qualità dei prodotti vegetali cinesi presenti sul mercato nazionale mediante l'esecuzione di saggi su preparati erboristici scelti tra quelli più largamente impiegati in Italia.

Materiali e metodi

Selezione dei prodotti da esaminare e campionamento

I prodotti da esaminare sono stati scelti in base a due criteri:

1. *Diffusione del loro impiego sul territorio nazionale*
   Sono stati individuati le droghe vegetali e i preparati già formulati (formulazioni) più largamente utilizzati in Italia avvalendosi dell'esperienza di medici e operatori sanitari, italiani e cinesi, esperti di medicina tradizionale cinese.
2. *Presenza dei preparati nella Farmacopea Ufficiale Cinese* (15) al fine di avere dei riferimenti per il controllo di qualità.

I campioni da esaminare sono stati ottenuti da tre diverse fonti commerciali, indicate con le lettere A, B, e C. A e C sono grandi aziende che distribuiscono i loro prodotti a livello nazionale mentre B è una erboristeria cinese.

Di seguito viene riportato l'elenco generale dei 15 campioni selezionati:

- Droghe vegetali

  Radix Ginseng
  Radix Astragali membranacei
  Rizoma Coptidis
  Rizoma Atractylodis macrocephalae
  Radix Bupleuri
  Radix Rehmanniae glutinosae
  Radix Paeoniae lactiflorae
  Pericarpium Citri reticulatae
  Radix Polygalae tenuifoliae
  Radix Salviae miltiorrhizae

- Formulazioni

  Bazhen wan
  Liuwei dihuang wan
  Longdan xiegan wan
  Erchen wan
  Tian wang buxin wan

Nelle Tabelle 9 e 10 sono stati riportati, per ogni singola droga, il nome botanico, il nome cinese, le principali indicazioni di utilizzo e la composizione chimica secondo quanto previsto dalla Farmacopea Ufficiale Cinese.

Tabella 9. Droghe vegetali saggiate e loro indicazioni

Nome latino	Nome cinese	Indicazioni principali
Radix Ginseng (*Panax ginseng* radice)	*Ren shen*	Diminuita funzione della milza con perdita di appetito; tosse e dispnea dovuta a ridotta funzione dei polmoni; sete dovuta a diminuzione dei fluidi corporei; diabete causato da calore interno; debolezza generale; irritabilità; insonnia; impotenza; frigidità; insufficienza cardiaca; *shock* cardiogeno.
Radix Astragali membranacei (*Astragalus membranaceus* radice)	*Huang qi*	Deficienza del *qi* con perdita di forza, anoressia, diarrea cronica; caduta del *qi* della milza che si manifesta con prolasso del retto,emorragie uterine; sudorazione spontanea; edema dovuto alla deficienza del *qi*; ascessi; anemia; diabete causato da calore interno; albuminuria nella nefrite cronica; diabete mellito.
Rizoma Coptidis (*Coptis chinensis* rizoma)	*Huang lian*	Attacchi di calore umido che si manifestano con mancanza d'aria, sensazione di gonfiore all'addome, dissenteria acuta, itterizia; febbre alta accompagnata da perdita di coscienza; insonnia e nervosismo dovuto al fuoco esuberante; infiammazione agli occhi, rigurgito acido; mal di denti; diabete; carbonchio; piaghe; eczema e altre malattie della pelle con essudazione; perdite purulente dell'orecchio.
Rizoma Atractylodis macrocephalae (*Atractylodes macrocephala* rizoma)	*Bai zhu*	Ipofunzionalità della milza con anoressia, distensione addominale e diarrea; vertigini e palpitazione dovute a ritenzione di fluidi; edema; sudorazione spontanea; minaccia d'aborto.
Radix Bupleuri (*Bupleurum chinense* radice)	*Chai hu*	Influenza o comune raffreddore con febbre; alternanza di febbre e brividi come nella malaria; dolore nel petto e nella regione degli ipocondri; disordini mestruali; prolasso dell'utero; prolasso del retto.
Radix Rehmanniae glutinosae (*Rehmannia glutinosa* radice)	*Sheng di huang*	*Radice fresca*: indebolimento dello *yin* nelle malattie febbrili caratterizzato da sete e lingua rossa; eruzioni cutanee e macchie cutanee; epistassi; mal di gola. *Radice non trattata*: malattia febbrile con lingua rossa e sete; deficienza dello *yin* con calore interno; diabete causato da calore interno, eruzioni e macchie cutanee; epistassi. *Radice trattata*: deficienza dello *yin* del fegato e dei reni caratterizzata da dolore e debolezza della regione lombare e dei fianchi, febbre, sudorazione notturna ed emissione seminale; diabete causato da calore interno; anemia, palpitazioni cardiache, disordini mestruali; saguinamento uterino; vertigini; tinnito; prematuro ingrigimento dei capelli.
Radix Paeoniae lactiflorae (*Paeonia lactiflora* radice)	*Bai shao yao*	Mal di testa e vertigini; dolore nella regione costale, addominale e lombare; anemia; disordini mestruali; sudorazione spontanea e notturna.
Pericarpium Citri reticulatae (*C.reticolata* pericarpo)	*Qing pi*	Sensazione di gonfiore nell'addome e nello stomaco con anoressia, vomito, diarrea; tosse con espettorato.
Radix Polygalae tenuifoliae (*Polygala tenuifolia* radice)	*Yuan zhi*	Insonnia, disturbi del sonno e del sogno, amnesie, palpitazioni, tosse con espettorazione difficoltosa; dolore; foruncoli; infiammazione e dolore al petto.
Radix Salviae miltiorrhizae (*Salvia miltiorrhiza* radice)	*Dan shen*	Disordini mestruali, amenorrea, dismenorrea; formazione di masse nell'addome; dolore nel petto e nell'addome; dolore nell'artrite e nelle infezioni subcutanee; insonnia; angina pectoris; epatosplenomegalia.

Tabella 10. Formulazioni saggiate e loro indicazioni

Nome cinese	Composizione	Indicazioni principali
Ba zhen wan	*Radix Codonopsis Pilosulae; Rhizoma Atractylodis Macrocephalae; Poria; Radix Glycyrrhizae; Radix Angelica Sinensis; Radix Paeoniae Alba; Rhizoma Chuanxiong; Radix Rehmanniae* (trattata con vapore).	Deficienza del *qi* e del sangue con anoressia, mancanza di forza ed eccessivo flusso mestruale.
Liu wei di huang wan	*Radix Rehmanniae* (trattata con vapore); *Fructus Corni* (trattata); *Cortex Moutan; Rhizoma Dioscoreae; Poria; Rhizoma Alismatis.*	Deficienza dello *yin* del rene caratterizzata da vertigini, tinnito, dolore nella regione lombare e nelle ginocchia, febbre, sudorazione notturna, emissione seminale, diabete.
Long dan xie gan wan	*Radix Gentianae; Radix Bupleuri; Radix Scutellaria; Fructus Gardeniae; Rhizoma Alismatis; Caulis Aristolochia Manshuriensis; Semen Plantaginis* (trattata con sale); *Radix Angelicae Sinensis* (trattata con vino); *Radix Rehmanniae*; *Radix Glycyrrhizae* (trattata con miele).	Calore umido nel fegato e nella cistifellea caratterizzato da vertigini, congestione oculare, tinnito, dolore alle orecchie, nella regione degli ipocondri, minzione dolorosa, leucorrea.
Er chen wan	*Pericarpium Citri Reticulati*; *Rhizoma Pinelliae* (trattata); *Poria*; *Radix Glycyrrhizae*.	Tosse con copiosa espettorazione, sensazione di mancanza d'aria, nausea e vomito.
Tian wang bi xin dan	*Radix Salviae Miltiorrhizae*; *Radix Angelicae Sinensis*; *Rhizoma Acori Graminei*; Radix *Codonopsis Pilosulae; Poria; Fructus Schisandrae; Radix Ophiopogonis; Radix Asparagi; Radix Rehmanniae; Radix Scrophulariae; Radix Polygalae* (trattata); *Semen Ziziphi Spinosae; Semen Biotae; Radix Platycodi; Radix Glycyrrhizae; Cinnabaris.*	Deficienza dello *yin* del cuore caratterizzato da palpitazioni cardiache, insonnia, e disturbi del sonno, costipazione.

Per ciascun campione è stato effettuato un esame preliminare delle informazioni riportate in etichetta e successivamente sono stati eseguiti i seguenti saggi:

1. Esame morfologico
2. Riconoscimento chimico
3. Determinazioni delle ceneri totali
4. Determinazione della contaminazione microbica
   - Conta totale aerobi vivi: batteri e funghi
   - Determinazione Enterobatteri, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp.
5. Determinazione del contenuto di metalli pesanti.

Per l'esecuzione dell'esame morfologico, dei saggi chimici di riconoscimento e della determinazione delle ceneri totali si è fatto riferimento ai metodi riportati nella Farmacopea Ufficiale Cinese. Per la determinazione della contaminazione microbica è stato eseguito il metodo riportato nella Farmacopea Ufficiale Italiana (16) relativo ai prodotti non obbligatoriamente sterili. Il contenuto dei metalli pesanti è stato determinato secondo il metodo riportato nel primo capitolo del presente rapporto.

Esame morfologico

È stata innanzitutto osservata la forma di presentazione dei prodotti in esame. Poi, al fine di verificarne l'identità e la qualità, tutti i campioni sono stati sottoposti ad un'analisi

farmacognostica. L'esame morfologico è stato effettuato sui campioni di droga per verificare l'integrità del prodotto, lo stato di conservazione, l'eventuale contaminazione di parassiti, l'eventuale sostituzione con altre parti della droga stessa o con altre droghe (sofisticazione).

Riconoscimento chimico

Il riconoscimento chimico è stato effettuato secondo le indicazioni riportate nella Farmacopea Ufficiale Cinese per i seguenti campioni:

Radix Ginseng
Rizoma Coptidis
Rizoma Atractylodis macrocephalae
Radix Bupleuri
Radix Paeoniae lactiflorae
Pericarpium Citri reticulatae
Radix Polygalae tenuifoliae
Radix Salviae miltiorrhizae
Tian wang bi xin dan

Nella Appendice B vengono riportate le schede relative a ciascun campione.

Determinazione della contaminazione microbica

Conta totale dei microrganismi aerobi vivi: batteri e funghi

- *Preparazione del campione:*
  è eseguita nello stesso modo sia per la conta totale dei batteri che per quella dei funghi: a 4 g del campione da esaminare sono aggiunti 36 mL di soluzione fisiologica; tale sospensione è impiegata per effettuare tre diluizioni 1:10.
- *Preparazione delle piastre:*
  1 mL di ciascuna diluizione viene depositato su una piastra Petri contenente 15 mL di terreno selettivo; le prove sono effettuate in doppio. Vengono utilizzati due tipi di terreno di coltura:
  - terreno agarizzato B per la determinazione dei batteri;
  - terreno agarizzato C + supplemento di cloramfenicolo per la determinazione dei funghi.
  Per la determinazione dei batteri l'incubazione delle piastre avviene a 37 °C per 48 h, mentre per la determinazione dei funghi a 25 °C per 5 giorni. Per verificare la sterilità dei terreni di coltura sono preparate due piastre contenenti solo terreno di coltura.
- *Lettura delle piastre:*
  trascorso il periodo di incubazione viene effettuata la conta delle colonie sviluppate considerando solo le piastre aventi più di 30 colonie e meno di 300 per la conta totale, e quelle aventi più di 15 colonie e meno di 150, per la conta dei funghi. La carica microbica, espressa come UFC, è calcolata effettuando la media aritmetica dei conteggi e moltiplicando per l'inverso del fattore di diluizione, secondo la seguente formula:

$$\text{UFC} = \text{n. di colonie contate X (1/fattore di diluizione)}$$

Enterobatteri, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.

La preparazione del campione è eseguita nello stesso modo per la determinazione di tutti e tre i tipi di saggi: a 4 g del campione da esaminare sono aggiunti 36 mL di terreno di coltura liquido D.

– ***Enterobatteri***
10 mL del campione sono incubati per 2 h a 37 °C, quindi sono aggiunti 100 mL di terreno liquido di arricchimento E e nuovamente incubati a 37 °C per 48 h. Dopo l'incubazione 1 mL di sospensione è depositato su una piastra Petri contenente 15 mL di terreno agarizzato F; la sottocoltura così allestita viene incubata a 37 °C per 24 h. Nel caso in cui si osservi crescita di colonie, occorre effettuare il saggio per la determinazione quantitativa degli Enterobatteri. Tale saggio viene effettuato come segue: a 4 g del campione da esaminare vengono aggiunti 36 mL di terreno liquido D; la sospensione viene incubata per 2 h a 37 °C quindi viene diluita due volte 1:10 con lo stesso terreno. 10 mL di ciascuna diluizione vengono poi addizionati a 100 mL di terreno liquido di arricchimento E e incubati per 48 h a 37 °C. Dopo le 48 h 1 mL di sospensione viene depositata su una piastra Petri contenente 15 mL di terreno agarizzato F. La sottocoltura così allestita viene incubata a 37 °C per 24 h dopodiché viene effettuata la lettura. Il saggio risulta positivo quando si osserva crescita di colonie ben sviluppate, generalmente rosse o rossastre. La determinazione del numero probabile dei batteri viene calcolata in base alla Tabella 11.

Tabella 11. Determinazione del numero probabile di batteri per grammo di prodotto

Risultato per quantità di prodotto			Numero probabile di batteri per grammo di prodotto
0	**0,1 g**	**0,01 g**	
+	+	+	Superiore a 102
+	+	-	Inferiore a 102 e superiore a 10
+	-	-	Inferiore a 10 e superiore a 1
-	-	-	Inferiore a 1

– ***Escherichia coli***
10 mL del campione sono aggiunti di 100 mL di terreno liquido G e incubati a 44 °C per 24 h. Dopo le 24 h 1 mL di sospensione viene depositato su una piastra Petri contenente 15 mL di terreno agarizzato H. La sottocoltura così allestita viene incubata a 44 °C per 24 h dopodiché viene effettuata la lettura. La presenza di *Escherichia coli* è indicata dalla crescita di colonie rosse generalmente non mucose.
– ***Salmonella* spp.**
10 mL del campione sono incubati a 37 °C per 24 h quindi aggiunti di 100 mL di terreno liquido I e nuovamente incubati a 44 °C per 24 h. Dopo le 24 h viene allestita una sottocoltura in due differenti terreni agarizzati:
- 1 mL del campione viene depositato su una piastra Petri contenente 15 mL di terreno agarizzato J;
- 1 mL dello stesso campione viene depositato su una piastra Petri contenente 15 mL di terreno agarizzato L.

Le sottocolture così allestite vengono incubate a 37 °C per 24 h quindi viene effettuata la lettura.

Determinazione dei metalli pesanti

La determinazione dei metalli pesanti è stata effettuata sui 15 campioni in formulazione per Cd, Pb, Cr, Fe, Mn, Ni e Hg e sui 30 campioni di droghe per Pb, Cd e Hg. Per i metodi analitici si rimanda alla parte di questo rapporto dedicata ai prodotti ayurvedici.

Risultati

Presentazione dei prodotti

Le informazioni riportate in etichetta per le droghe vegetali esaminate sono riportate in Tabella 12.

Tabella 12. Indicazioni riportate sulla confezione delle droghe cinesi esaminate

Informazioni riportate in etichetta	Fonte commerciale A	B	C
Nome cinese	+	+	+
Nome latino	+	+	-
Tipo di taglio	-	+	-
Paese di origine	-	+	-
Certificato fitosanitario	-	+	-
Lotto di lavorazione	+	+	-
Data di confezionamento	-	+	-
Data di scadenza	+	+	-
Indirizzo ditta fornitrice	+	+	-
Modalità di conservazione	-	+	-

+ indicato, - non indicato

Esame morfologico

Dall'esame morfologico è risultato che i prodotti delle ditte A e B non presentavano sofisticazioni o sostituzioni ed erano in buono stato di conservazione.

Per quanto riguarda i prodotti della ditta C due campioni (*Radix Ginseng* e *Radix Astragali membranacei*) erano contaminati da parassiti vermiformi; il campione di *Pericarpium citri reticulatae* è risultato sofisticato con *Pericarpium citri reticulatae viride*.

In tutte le droghe analizzate sono stati individuati gli elementi caratteristici di riconoscimento riportati nelle singole monografie della Farmacopea Ufficiale Cinese.

Saggi chimici

Per la maggior parte delle droghe i saggi di riconoscimento sono risultati positivi, solo per due di esse (*Radix Bupleuri* e *Radix Polygalae tenuifoliae*, entrambe della ditta C) il saggio è risultato negativo. Per la tipologia dei saggi effettuati vedere Appendice B.

I risultati sono riportati nella Tabella 13.

Determinazione delle ceneri totali

La determinazione delle ceneri ha messo in evidenza nei campioni *Radix Polygalae tenuifoliae* della ditta C, *Radix Rehmanniae glutinosae* della ditta A e *Radix Bupleuri* delle ditte A e B, un contenuto di ceneri superiore ai limiti previsti, contenuto che nel caso di *Radix Rehmanniae glutinosae* superava il 200%.

I risultati sono riportati in Tabella 14.

Tabella 13. Riconoscimento chimico di prodotti erboristici cinesi

Droga	Risultati dei saggi	Osservazioni
Radix Ginseng	positivo	
Radix Coptidis	1: positivo per A, B, C 2: positivo per A, B, C	Nel SAGGIO 1 la soluzione finale assume una colorazione arancione anziché rossa per tutti e tre i campioni.
Rizoma Atractylodis Macrocephalae	1: positivo per A, B, C 2: positivo per A, B, C	Nel SAGGIO 1 la colorazione viola si osserva soprattutto sul bordo della provetta dove si formano goccioline rosa dovute probabilmente alla presenza di composti volatili.
Radix Bupleuri	1: positivo per A, B negativo per C 2: positivo per A, B, C	Nel SAGGIO 1 il campione della ditta C non forma schiuma. Nel SAGGIO 2 la soluzione di partenza è debolmente gialla, dopo aggiunta di H_3PO_4 si ha una decolorazione poi continuando a riscaldare e ad agitare si ottiene una colorazione rossa con intensità diverse a seconda dei campioni: B = colorazione rosata A = colorazione rosata tendente al giallo C = colorazione rosso porpora
Radix Paeonia Lactiflora	positivo per A, B, C	
Pericarpium citri reticulatae	positivo per A, B, C	
Radix Polygalae tenuifoliae	positivo per A, B, negativo per C	La quantità di schiuma che si forma è diversa per tutti e tre i campioni: B = si forma una schiuma (5 mL) bianca e fitta che persiste per più di 1 ora A = si forma una schiuma (4 mL) bianca e fitta persistente C = si forma una schiuma (1 mL) bianca che scompare subito
Radix Salviae Miltiorrizhae	1: positivo per A, B, C 2: positivo per A, B, C	Nel SAGGIO 1 il prodotto della ditta A dà una fluorescenza più intensa
Tian wang bi xin dan	positivo per A, B, C	

Tabella 14. Contenuto di ceneri totali (%p/p) nei campioni esaminati

Campione	Contenuto ammesso	Contenuto rilevato		
		A	B	C
Radix Polygalae tenuifoliae	<6	4	3	7
Rizoma Atractylodis macrocephalae	<5	4	3	3
Rizoma Coptidis	<5	3	3	4
Radix Astragali membranacei	<5	3	3	3
Radix Rehmanniae glutinosae	<6	13	5	3
Radix Ginseng	np	4	3	3
Radix Salviae miltiorrhizae	np	6	5	5
Radix Bupleuri	<8	10	8	5
Radix Paeoniae lactiflorae	np	3	3	3
Pericarpium Citri reticulatae	np	4	4	5

np = non previsto nella Farmacopea cinese

Determinazione della carica microbica

La determinazione della carica microbica ha rilevato per tutti i campioni un numero di UFC per i batteri aerobi entro i limiti ammessi. Anche per i miceti è il numero di UFC/g è risultato entro i limiti per tutti i campioni. I saggi specifici per *Escherichia coli* e *Salmonella* sono risultati sempre negativi mentre quelli per gli Enterobatteri sono risultati positivi per due campioni in formulazione (*Angel Eight* e *Six Form* entrambi della ditta C). Sui campioni risultati positivi per gli Enterobatteri l'entità della carica microbica era comunque nei limiti consentiti.

I limiti previsti dalla Farmacopea e i relativi risultati dei saggi sono riportati nelle Tabelle 15 e 16.

Tabella 15. Carica microbica (UFC/g) dei campioni di droghe vegetali cinesi

Campione	Fonte	Batteri aerobi*	Lieviti*	*E. coli**
Radix Ginseng	A	$4x10^5$	nd	-
	B	$2x10^3$	nd	-
	C	$2x10^3$	nd	-
Radix Astragali	A	$7x10^3$	nd	-
	B	$5x10^3$	nd	-
	C	$3x10^3$	nd	-
Rizoma Coptidis	A	nd	$9x10^2$	-
	B	$2x10^5$	$1x10^3$	-
	C	nd	$4x10^3$	-
Rizoma Atractylodis Macrocephalae	A	$6x10^2$	nd	-
	B	nd	nd	-
	C	$3x10^2$	nd	-
Radix Bupleuri	A	$2x10^2$	nd	-
	B	$3x10^2$	$4x10^2$	-
	C	$6x10^3$	nd	-
Radix Rehmanniae	A	$7x10^6$	nd	-
	B	$7x10^4$	nd	-
	C	$3x10^2$	nd	-
Radix Paeoniae Alba	A	nd	nd	-
	B	nd	nd	-
	C	nd	nd	-
Pericarpium Citri Reticulatae	A	$5x10^3$	nd	-
	B	$5x10^3$	nd	-
	C	$9x10^4$	nd	-
Radix Polygalae	A	$1x10^5$	nd	-
	B	$6x10^3$	nd	-
	C	$1x10^3$	$4x10^2$	-
Radix Salviae Milthiorrhizae	A	nd	nd	-
	B	$4x10^3$	nd	-
	C	$4x10^4$	$3x10^4$	-

* Limiti (UFC/g) (Farmacopea Ufficiale Italiana X Ed.) (16) per prodotti non obbligatoriamente sterili il cui uso prevede un trattamento al calore: batteri aerobi 10^7; lieviti 10^5; *Escherichia coli* 10^2

nd = non determinabile (<30 colonie per batteri aerobi; <15 colonie per lieviti)

- = assente

Tabella 16. Carica microbica (UFC/g) dei campioni di droghe vegetali cinesi in formulazione

Campione	Fonte	Batteri aerobi*	Lieviti*	Enterobatteri, *E. coli*, *Salmonella* spp.*
Bazhen Wan	A	nd	nd	-
Angelica and Ginseng 8	B	$5x10^2$	nd	-
Angel Eight	C	nd	nd	Enterobatteri >10<10^2
Liuwei Dihuang Wan	A	nd	nd	-
Rehmannia 6	B	$7x10^2$	nd	-
Six Form	C	nd	nd	Enterobatteri >10<10^2
Longdan Xiegan Wan	A	nd	nd	-
Gentiana 9	B	$1x10^3$	nd	-
Gentiana Form	C	nd	nd	-
Erchen Wan	A	nd	nd	-
Citrus and Pinellia	B	$3x10^2$	nd	-
Er Chen Wan	C	nd	nd	-
Tianwang Buxin Wan	A	nd	nd	-
Rehmannia and Ziziphus	B	$3x10^3$	nd	-
Cardiotonic Form	C	nd	nd	-

* Limiti (UFC/g) (Farmacopea Ufficiale Italiana X Ed.) (16) per prodotti non obbligatoriamente sterili il cui uso non prevede un trattamento al calore: batteri aerobi 10^3; lieviti 10^4; Enterobatteri 10^3; *Escherichia coli* assente in 1 g; *Salmonella* spp. assente in 10 g

nd = non determinabile (<30 colonie per batteri aerobi; <15 colonie per lieviti)

\- = assente

Determinazione del contenuto di metalli pesanti

Il contenuto di metalli pesanti nei preparati in formulazione e nelle droghe è riportato in Tabella 17. In 14 dei 15 campioni in formulazione i valori erano nei limiti, mentre *Cardiotonic Form* della ditta C è risultato contenere 1,11mg/kg di Hg.

Tale preparato nella formulazione originale contiene HgS (*Cinnabaris*) che però non viene generalmente aggiunto nei prodotti destinati all'esportazione; va inoltre sottolineato che in etichetta non è dichiarata la presenza del composto. Considerando che il preparato *Cardiotonic Form* viene somministrato in dosi di circa 3 g al giorno, l'*intake* settimanale di Hg relativo al preparato risulterebbe di circa 78 μg/ settimana. Poiché per il Hg il limite massimo settimanale di assunzione è di 300 μg (17), tale valore appare sicuramente elevato.

In 29 dei 30 campioni di droghe, tutti i valori dei metalli pesanti determinati erano nei limiti mentre in uno (*Rizoma Coptidis* della ditta B) è stata trovata una quantità di Pb pari a 8,84 mg/kg, tale contenuto è di circa tre volte superiore ai limiti previsti per tale metallo dalla Farmacopea Ufficiale Italiana X Edizione (16).

Tabella 17. Contenuto di metalli pesanti (mg/kg) in campioni di droghe vegetali cinesi e delle formulazioni

Campione	Fonte	Metalli		
		Cd	Pb	Hg
Radix Ginseng	A	0,096	0,57	0,025
	B	0,113	≤0,36	0,072
	C	0,090	≤0,36	0,004
Radix Astragali	A	0,020	0,44	0,004
	B	0,014	0,27	0,013
	C	0,024	0,22	0,003
Rizoma Coptidis	A	0,110	0,32	0,005
	B	0,046	8,84	0,010
	C	0,280	1,34	0,010
Rhizoma Atractylodis Macrocephalae	A	0,060	0,30	0,015
	B	0,455	1,00	0,030
	C	0,347	0,92	0,005
Radix Bupleuri	A	0,071	1,86	0,028
	B	0,032	1,30	0,027
	C	0,045	1,33	0,023
Radix Rhemmanniae	A	0,032	1,11	0,012
	B	0,023	0,46	0,016
	C	0,026	0,42	0,018
Radix Paeoniae Alba	A	0,039	≤0,36	0,009
	B	0,041	≤0,36	0,019
	C	0,048	≤0,36	0,038
Pericarpium Citri Reticulatae	A	0,017	1,55	0,025
	B	0,021	0,79	0,013
	C	0,023	0,54	0,008
Radix Polygalae	A	0,060	0,94	0,018
	B	0,030	0,54	0,007
	C	0,186	1,27	0,014
Radix Salviae Miltiorrhizae	A	0,022	0,60	0,009
	B	0,013	0,35	0,034
	C	0,015	0,29	0,004
Bazhen Wan	A	0,008	0,90	0,050
Angelica and Ginseng 8	B	≤0,003	≤0,36	0,010
Angel Eight	C	0,040	0,77	0,060
Liuwei Dihuang Wan	A	0,009	0,43	0,060
Rehmannia 6	B	≤0,003	≤0,36	0,020
Six Form	C	≤0,003	≤0,36	0,020
Longdan Xiegan Wan	A	0,140	0,96	0,040
Gentiana 9	B	≤0,003	≤0,36	0,010
Gentiana Form	C	≤0,003	≤0,36	0,030
Erchen Wan	A	≤0,003	≤0,36	0,060
Citrus and Pinellia	B	≤0,003	≤0,36	0,020
Er Chen Wan	C	≤0,003	≤0,36	0,020
Tianwang Buxin Wan	A	≤0,003	≤0,36	0,070
Rehmannia and Ziziphus	B	0,006	≤0,36	0,020
Cardiotonic Form	C	≤0,003	0,47	1,110

Considerazioni finali

In questo studio sono stati effettuati alcuni saggi di qualità su campioni di prodotti erboristici cinesi presenti sul mercato italiano; i risultati ottenuti vengono di seguito riassunti:

- Per quanto riguarda le informazioni in etichetta queste sono risultate abbastanza esaurienti per una sola ditta (B) che riporta, oltre al nome cinese, il nome botanico, il paese di origine, il certificato fitosanitario, il lotto di lavorazione, la data di confezionamento e di scadenza, l'indirizzo della ditta fornitrice e le modalità di conservazione. All'opposto la ditta C riporta solo il nome cinese. Due dei prodotti forniti dalla stessa ditta (C) erano mal conservati in quanto contenevano parassiti, risultando inutilizzabili.
- I prodotti esaminati sono risultati in qualche caso sofisticati, come nel caso di *Pericarpium Citri reticulatae* (provenienza C) sostituito con *Pericarpium Citri reticulatae viridae* in cui la droga è costituita anziché dal solo pericarpo, dall'intero frutto immaturo, quindi probabilmente richiede un minor tempo di preparazione e fornisce una maggiore resa, ma sicuramente contiene una minore quantità di flavonoidi e olio essenziale che rappresentano i componenti caratteristici, quindi è di qualità inferiore.
- Due droghe (*Radix Bupleri* e *Radix Polygalae tenuifoliae*, entrambe di provenienza C) hanno dato un saggio chimico negativo. Il saggio in questione si basa sulla presenza di saponine, componenti caratteristici di queste due droghe; la negatività del saggio implica, se non una sofisticazione quanto meno che la droga è di scarsa qualità, in quanto quasi priva dei componenti caratteristici.
- Alcuni prodotti (*Radix Polygalae tenuifoliae*, provenienza C, *Radix Rhemanniae glutinosae,* provenienza A, e *Radix Bupleuri*, provenienza A e B) avevano un contenuto di ceneri superiore ai limiti previsti, nel caso di *Rehmannia glutinosae* di oltre il 200% superiore; questo fatto può indicare una contaminazione con terriccio o sabbia o altro materiale inorganico e quindi, quanto meno una scarsa cura nella lavorazione.
- La presenza di microrganismi è risultata entro i valori limite, in particolare va sottolineato che le droghe, in cui talvolta sono stati rinvenuti Enterobatteri, per il modo di commercializzazione sono destinate ad un trattamento con acqua bollente che implica una riduzione della carica microbica.
- Infine la determinazione dei metalli pesanti ha evidenziato in un campione in formulazionela presenza di mercurio a livelli che sicuramente possono comportare un rischio tossicologico, e in una droga una quantità di Pb di circa tre volte superiore ai limiti previsti dalla Farmacopea Ufficiale Italiana.

In conclusione la nostra indagine ha messo in evidenza che i prodotti erboristici cinesi da noi esaminati sono di qualità variabile; in particolare sono risultati migliori quelli di provenienza A e B, acquistati presso una farmacia mentre sono risultati di qualità decisamente inferiore quelli di provenienza C, acquistati presso una erboristeria cinese. Al di là dei problemi di scarsa qualità va sottolineata la presenza in un campione di residui di mercurio che pone una seria problematica di tossicità e sottolinea la impellente esigenza di un maggiore controllo sui prodotti erboristici, soprattutto considerando che essendo questi impiegati generalmente per patologie minori, il loro uso deve essere assolutamente privo di rischi.

BIBLIOGRAFIA

1. But PP, Tomlinson B, Lee KL. Hepatitis related to the Chinese medicine *Shou wu pian* manufactured from Polygonum multiflorum. *Veterinary and Human Toxicology* 1996;38(4):280-2.
2. Chan TYK, Critchley AJH. Usage and adverse effects of Chinese herbal medicines. *Human and Experimental Toxicology* 1996;15:5-12.
3. Chan TYK. Monitoring the safety of herbal medicines. *Drug Safety* 1997;17(4);209-15.
4. De Smet PAGM. Health risks of herbal remedies. *Drugs Safety* 1995;13:81-93.
5. De Smet PAGM. An introduction to herbal Pharmacovigilance. In: De Smet PAGM, Keller K, Hansel R (Eds.). *Adverse Effects of Herbal Drugs* Berlino: Springer-Verlag; 1997. p. 1-13.
6. Ernst E. The rise and fall of complementary medicine. *Journal of the Royal Society of Medicine* 1998;91(5):235-6.
7. Ernst E. Harmeless Herb? A review of the Recent Literature. *American Journal of Medicine* 1998;104:170-8.
8. Fugh Berman A. Herb drug interactions. *Lancet* 2000;35:134-8.
9. Grant KL. Patient education and herbal dietary supplements. *American Journal of Health-System Pharmacy* 2000;57(21):1997-2003.
10. Tomlinson B, Chan TY, Chan JC, Critchley JA, But PP. Toxicity of complementary therapies: an Eastern perspective. *Journal of Clinical Pharmacology* 2000;40(5):451-6.
11. But PP. Herbal poisoning caused by adulterants or erroneous substitutes. *Journal of Tropycal Medicine and Hygene* 1994;97(6):371-4.
12. Gertner E., Marshall PS, Filandrinos D, Potek AS, Smith TM.. Complications resulting from the use of Chinese herbal medications containing undeclared prescription drugs. *Arthritis and Rheumatism* 1995;39(2):354-5.
13. Huang FS, Wen KC, Hsiao ML. Adulteration by synthetic therapeutic substances of traditional Chinese medicines in Taiwan. *Journal of Clinical Pharmacology* 1997;37(4):344-50.
14. Vander Stricht BI, Parvais OE, Vanhaelen-Fastre RJ, VanhaelenMH, Quertinier D. Sfer use of traditional remedies. Remedies may contain cocktail of active drugs. *British Medical Journal* 1994, 308(6937);1162.
15. The State Pharmacopoeia Commission of the People's Republic of China. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China.* English Edition. Bejging: Chemical Industries Publisher; 1998.
16. *Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana X Edizione.* Roma: Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato; 1998.
17. International Agency for Research on Cancer, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry*. Geneva: IARC, World Health Organization; 1993 (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, v. 58).

APPENDICE A

Concentrazioni di metalli nei preparati analizzati: confronto tra le due campionature di prodotti della medicina ayurvedica

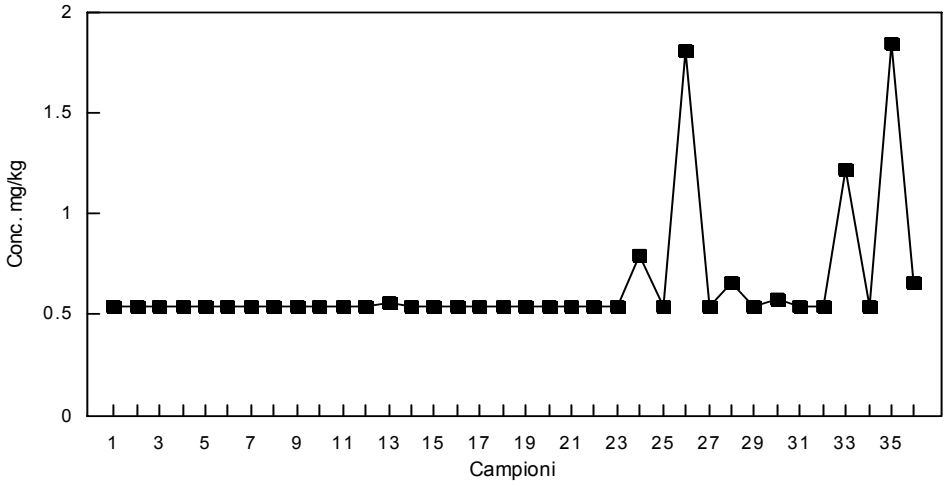


Figura A1. ARSENICO: distribuzione nei campioni

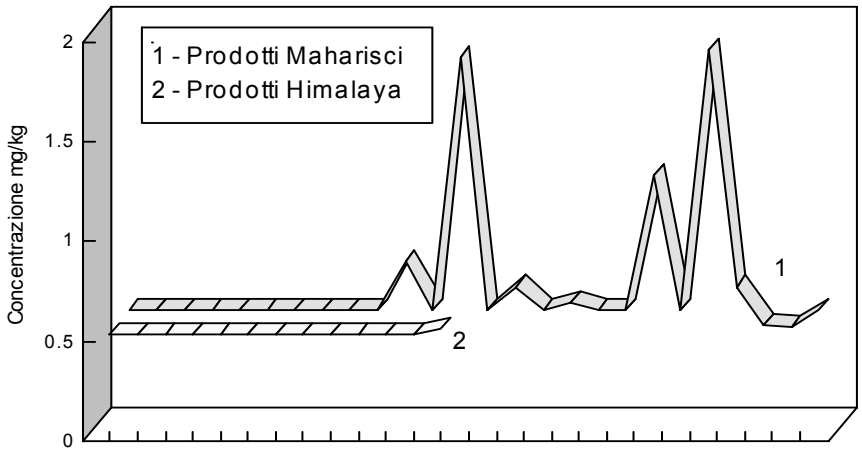


Figura A2. ARSENICO: confronto tra due serie di prodotti

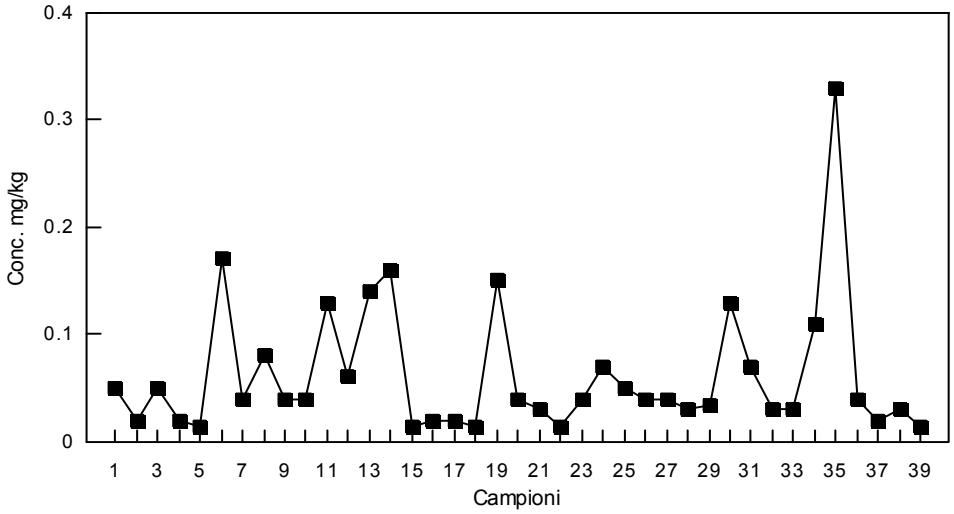


Figura A3. CADMIO: distribuzione nei campioni

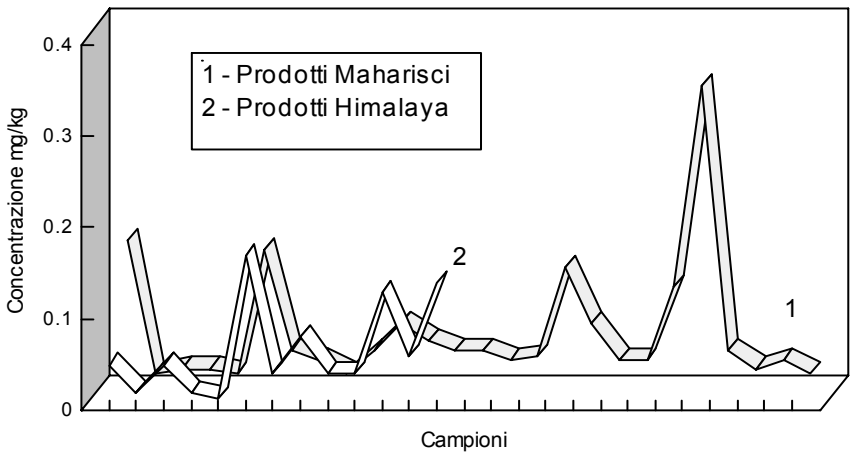


Figura A4. CADMIO: confronto tra due serie di prodotti

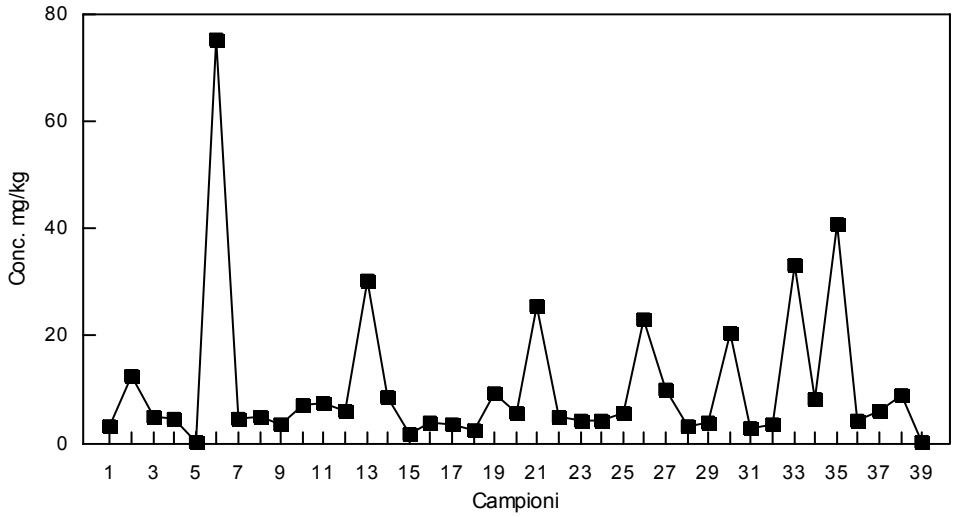


Figura A5. CROMO: distribuzione nei campioni

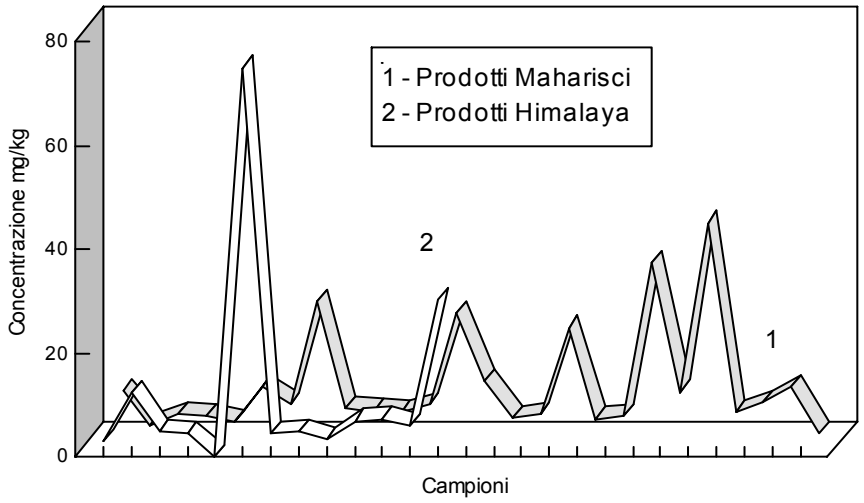


Figura A6. CROMO: confronto tra due serie di prodotti

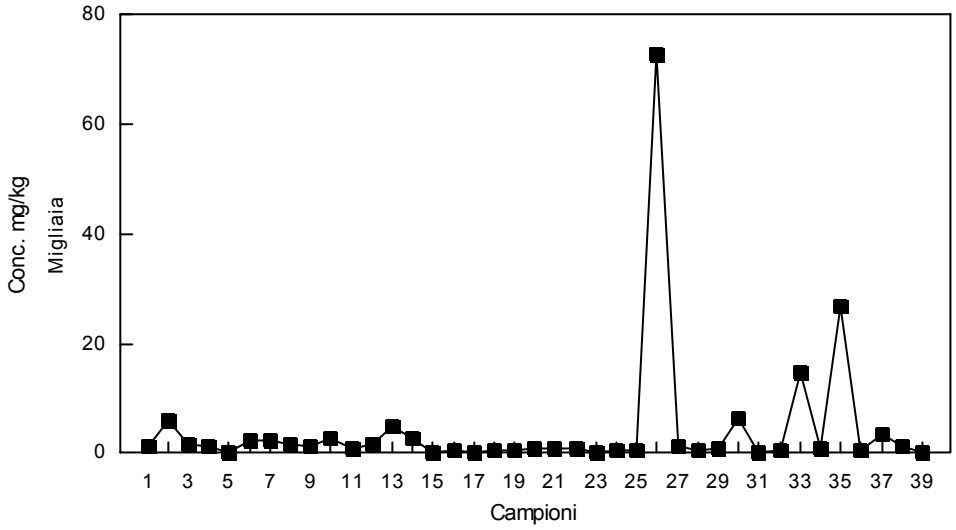


Figura A7. FERRO: distribuzione nei campioni

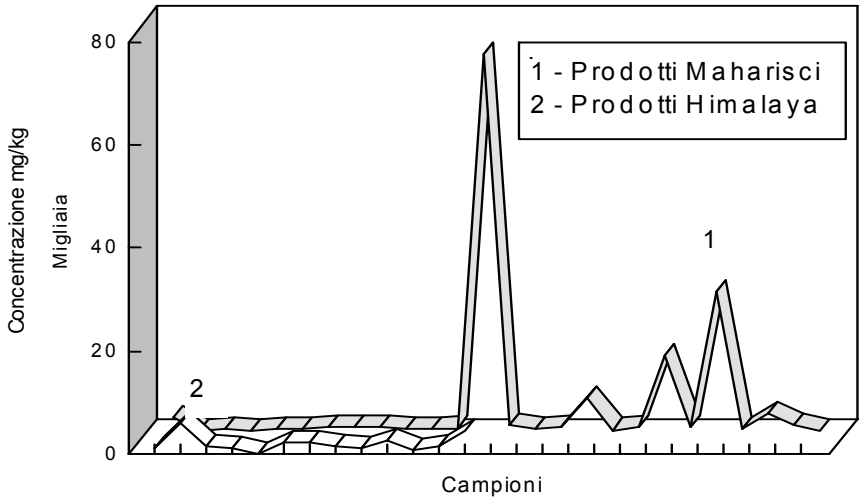


Figura A8. FERRO: confronto tra due serie di prodotti

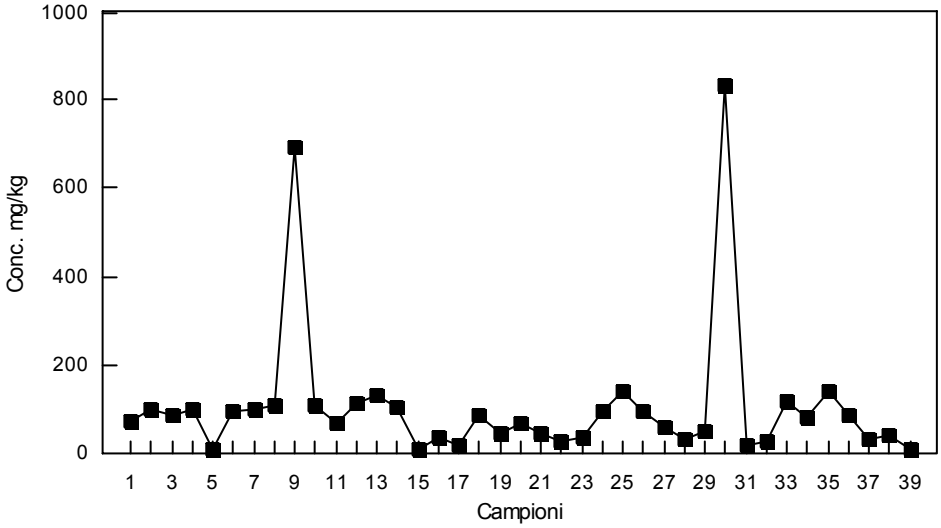


Figura A9. MANGANESE: distribuzione nei campioni

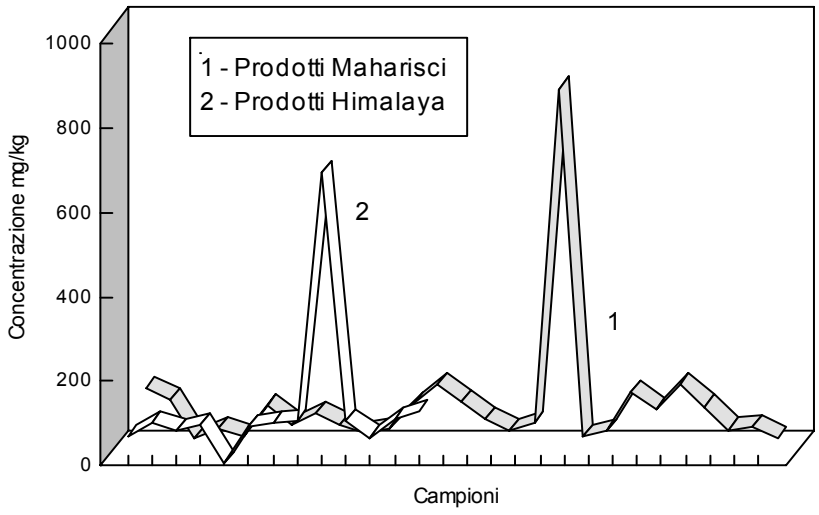


Figura A10. MANGANESE: confronto tra due serie di prodotti

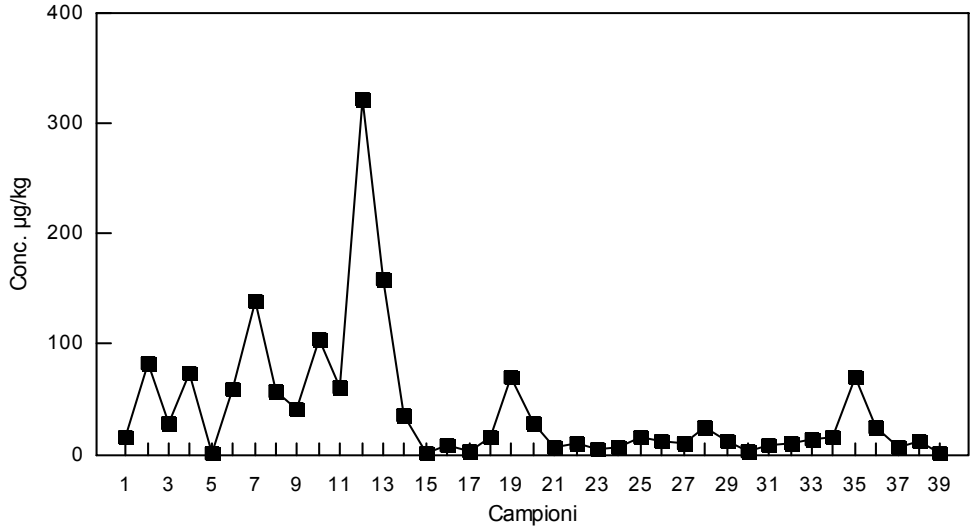


Figura A11. MERCURIO: distribuzione nei campioni

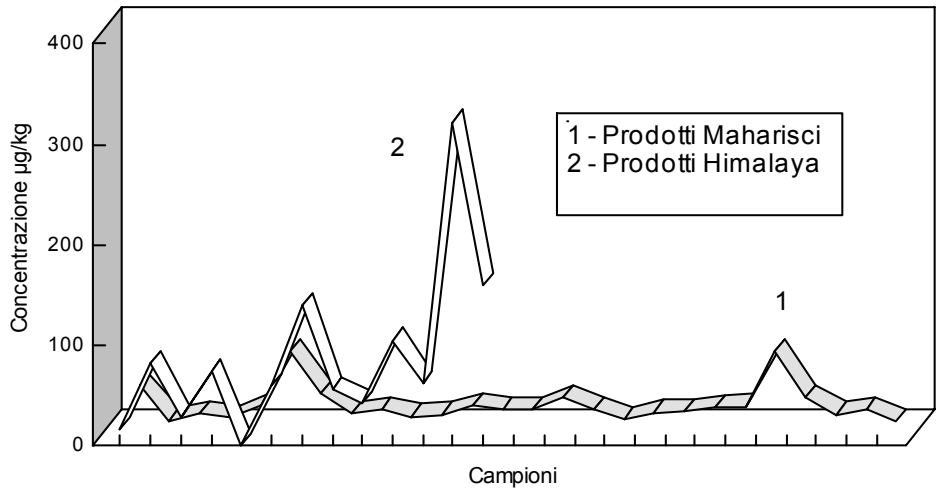


Figura A12. MERCURIO: confronto tra due serie di prodotti

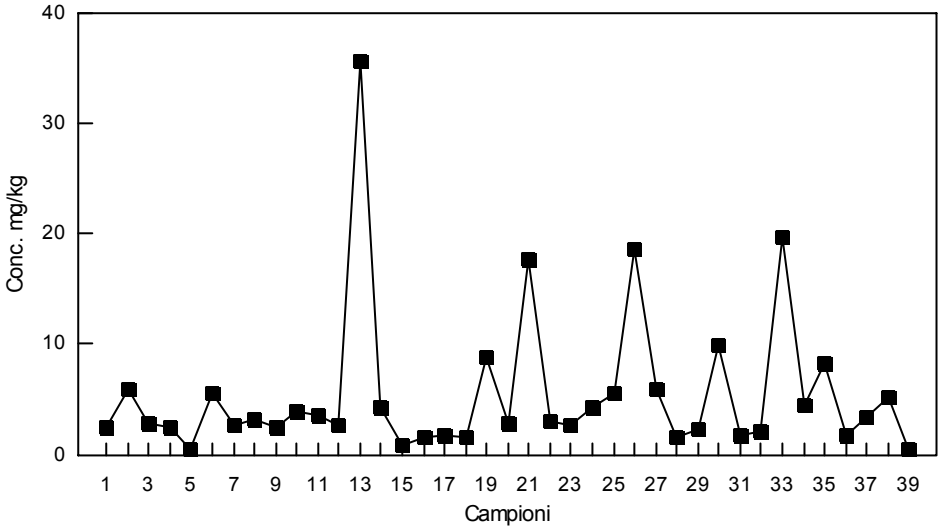


Figura A13. NICHEL: distribuzione nei campioni

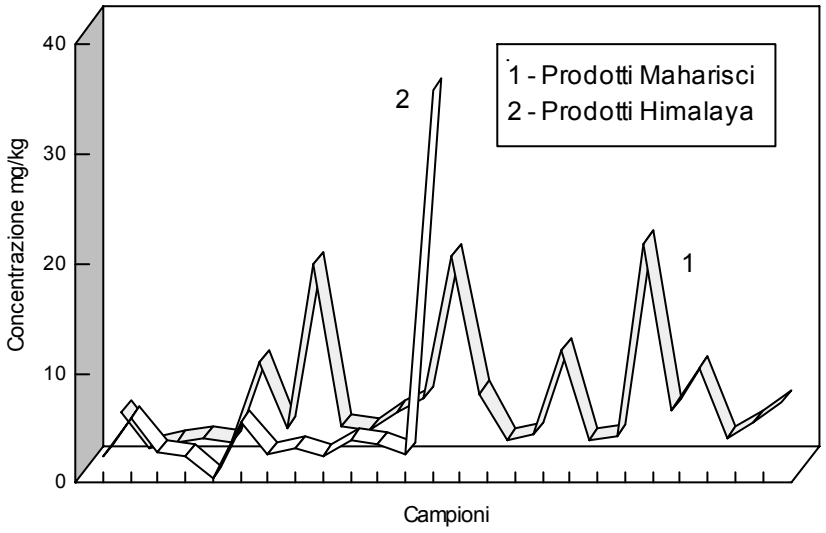


Figura A14. NICHEL: confronto tra due serie di prodotti

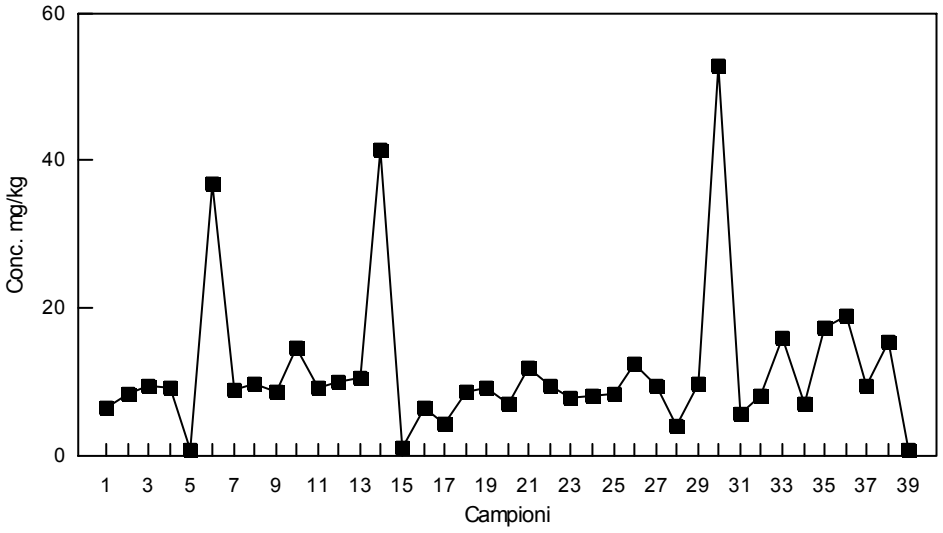


Figura A15. PIOMBO: distribuzione nei campioni

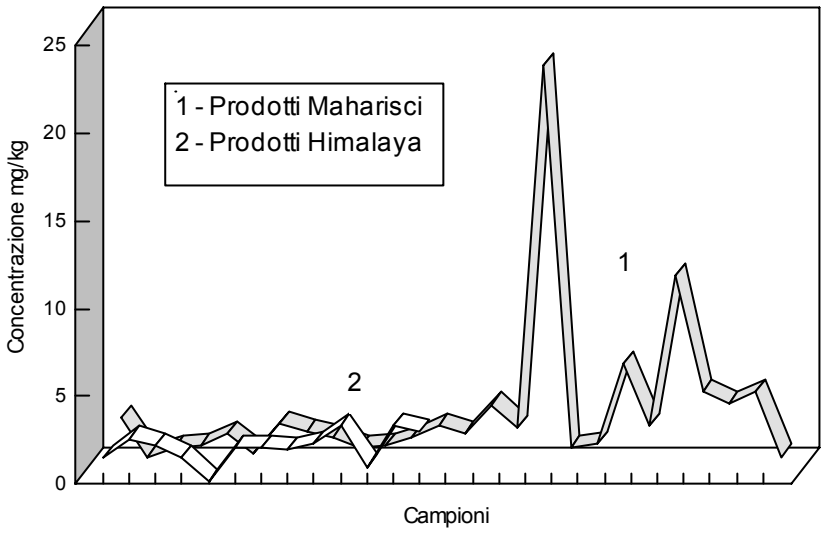


Figura A16. PIOMBO: confronto tra due serie di prodotti

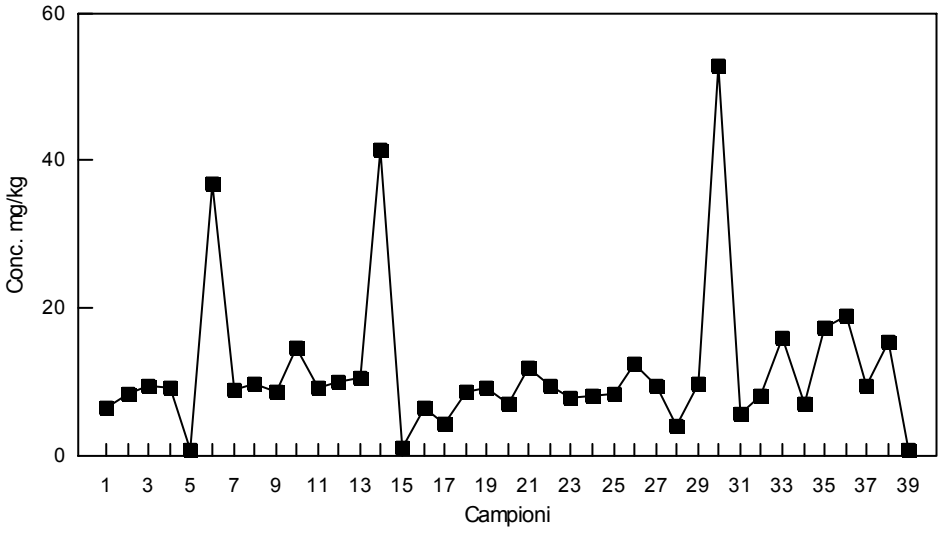


Figura A17. RAME: distribuzione nei campioni

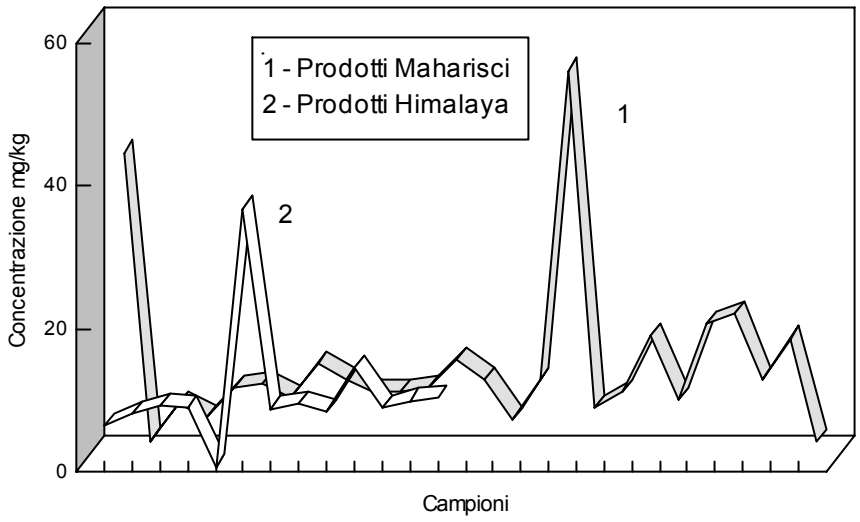


Figura A18. RAME: confronto tra due serie di prodotti

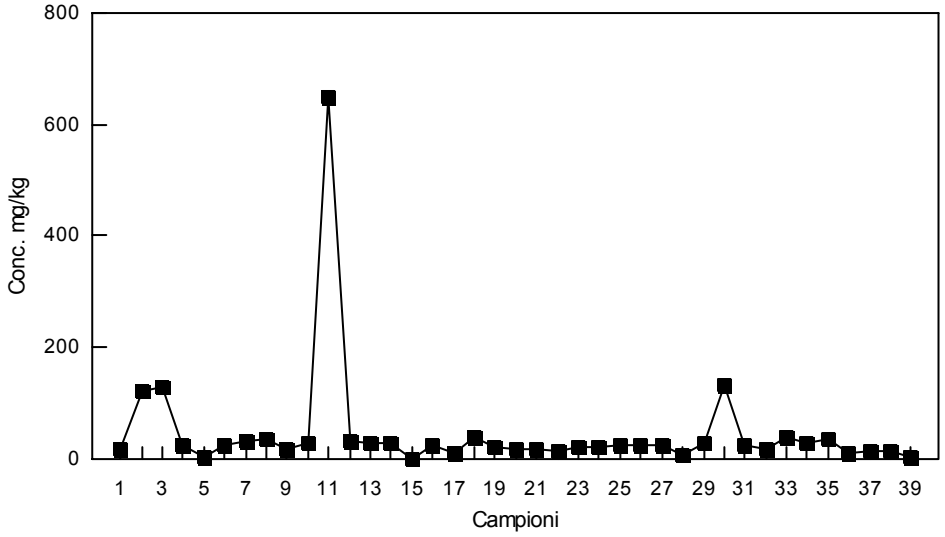


Figura A19. ZINCO: distribuzione nei campioni

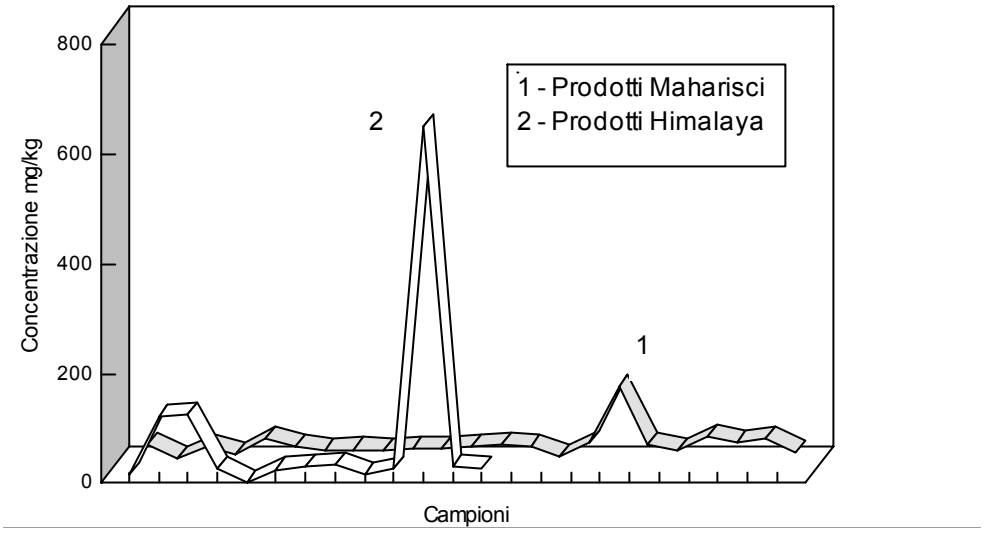


Figura A20. ZINCO: confronto tra due serie di prodotti

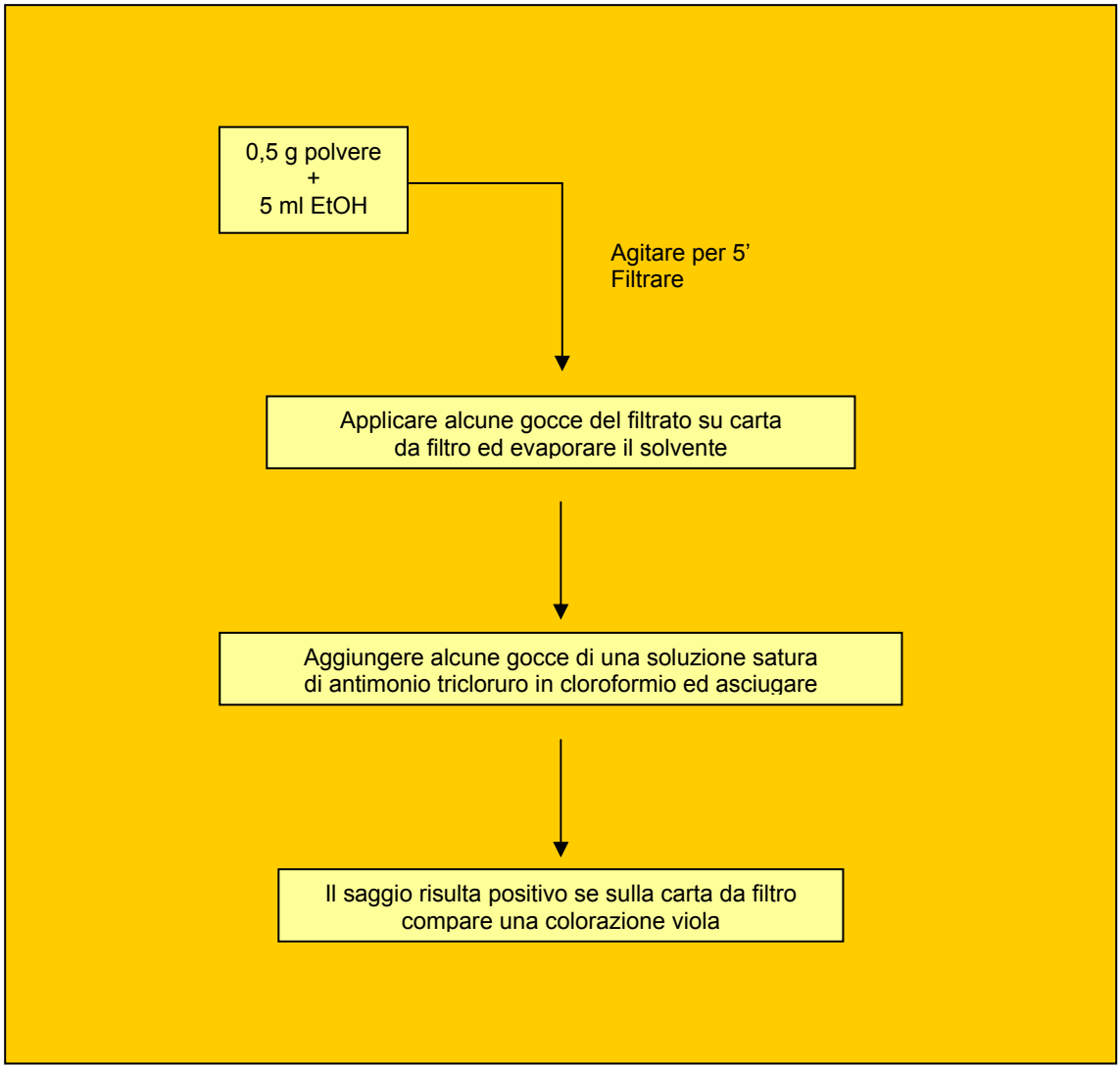
APPENDICE B

Riconoscimento chimico sui campioni di preparazioni erboristiche utilizzate nella medicina cinese

RADIX GINSENG

Nome botanico:	*Panax ginseng* L.
Famiglia:	*Araliaceae*
Componenti principali:	saponine steroidiche (ginsenosidi), sesquiterpeni, composti acetilenici, flavonoidi

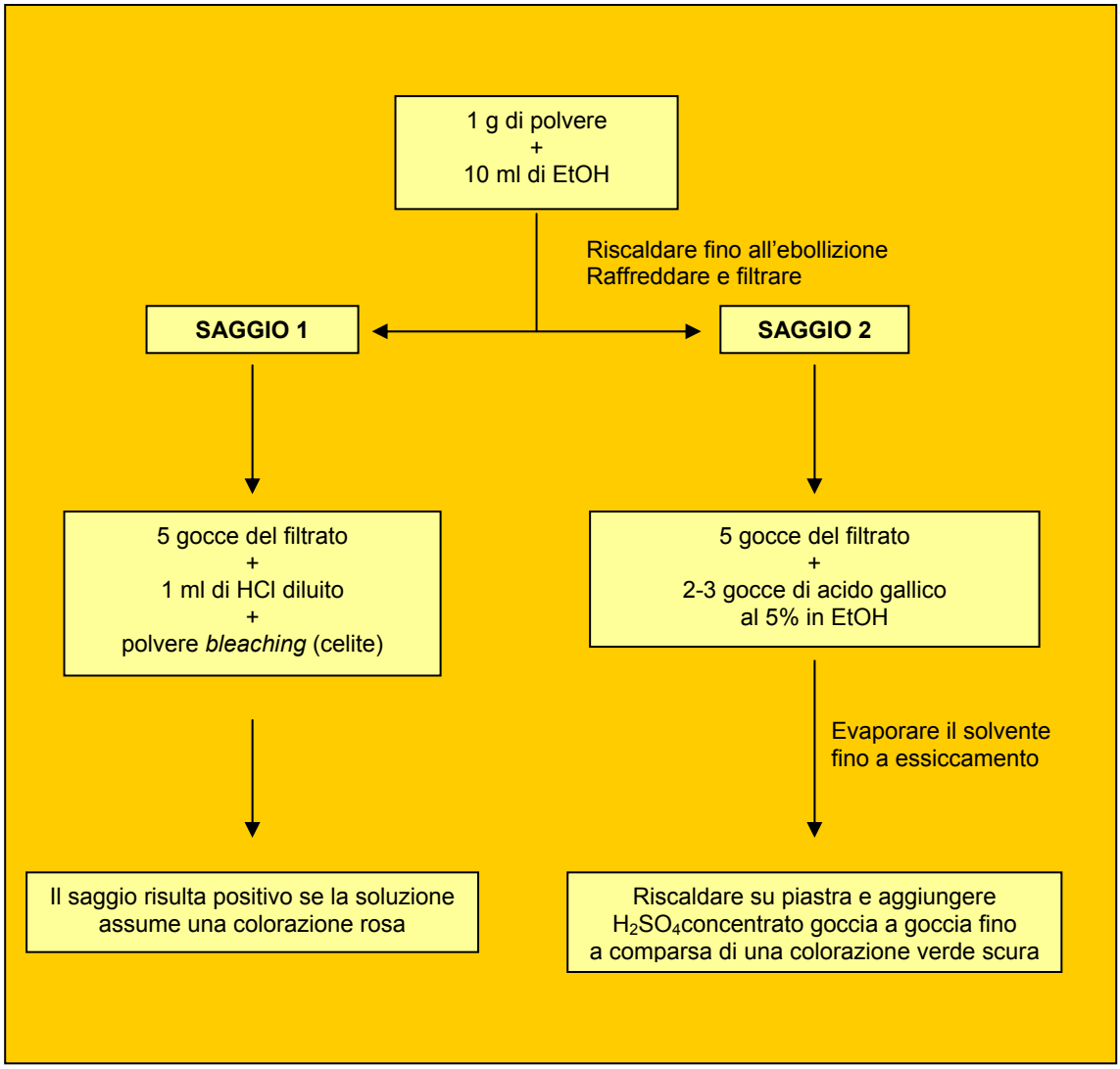
Saggio



RIZOMA COPTIDIS

Nome botanico:	*Coptis chinensis* Franch
Famiglia:	*Ranuncolaceae*
Componenti principali:	alcaloidi soprattutto quaternari come berberina e palmatina

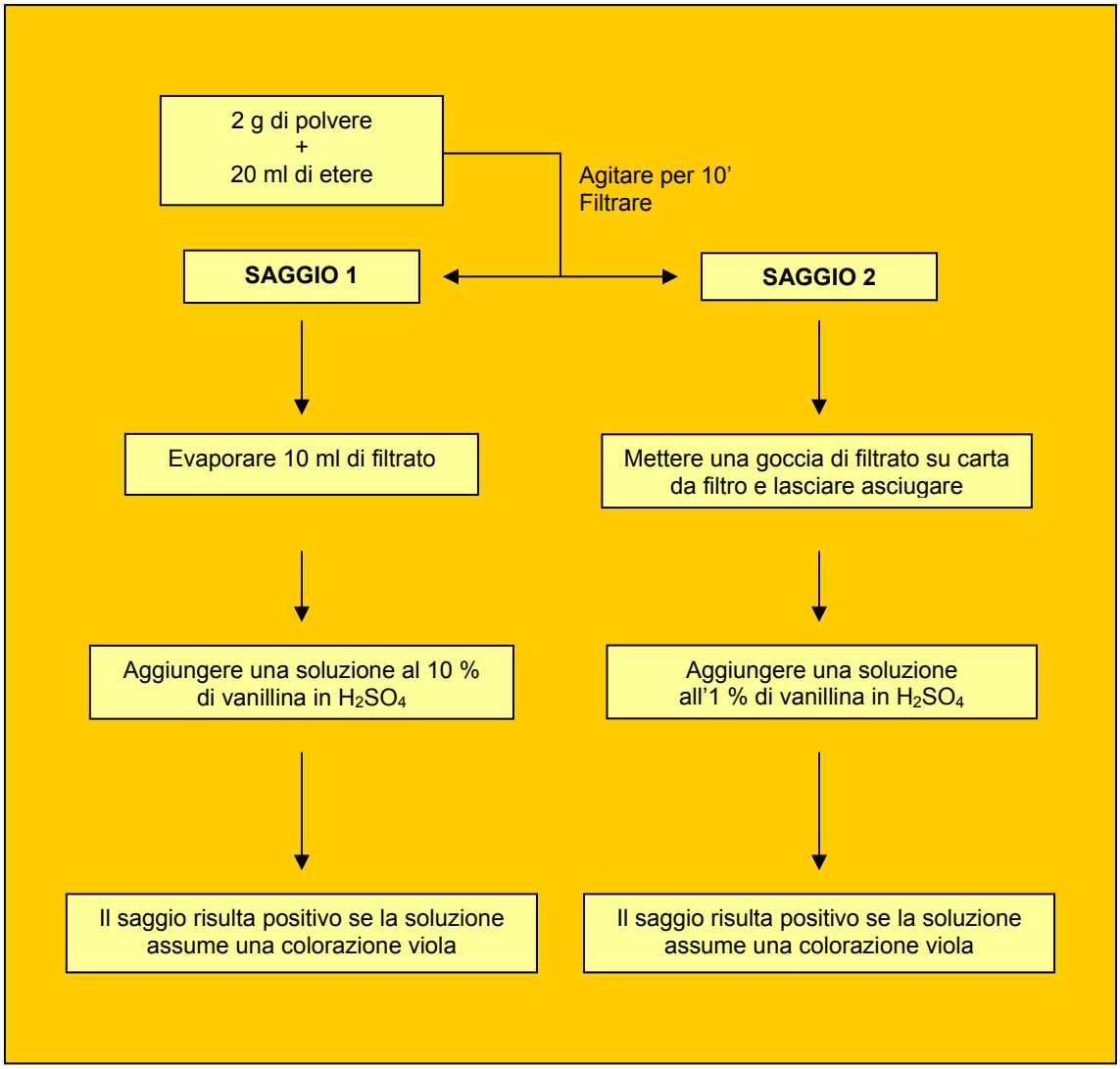
Saggi



RIZOMA ATRACTYLODIS MACROCEPHALAE

Nome botanico:	*Atractylodes macrocephala* Koidz
Famiglia:	*Compositae*
Componenti principali:	olio essenziale contenente atractilenolide II e III (lattoni) e atractilone

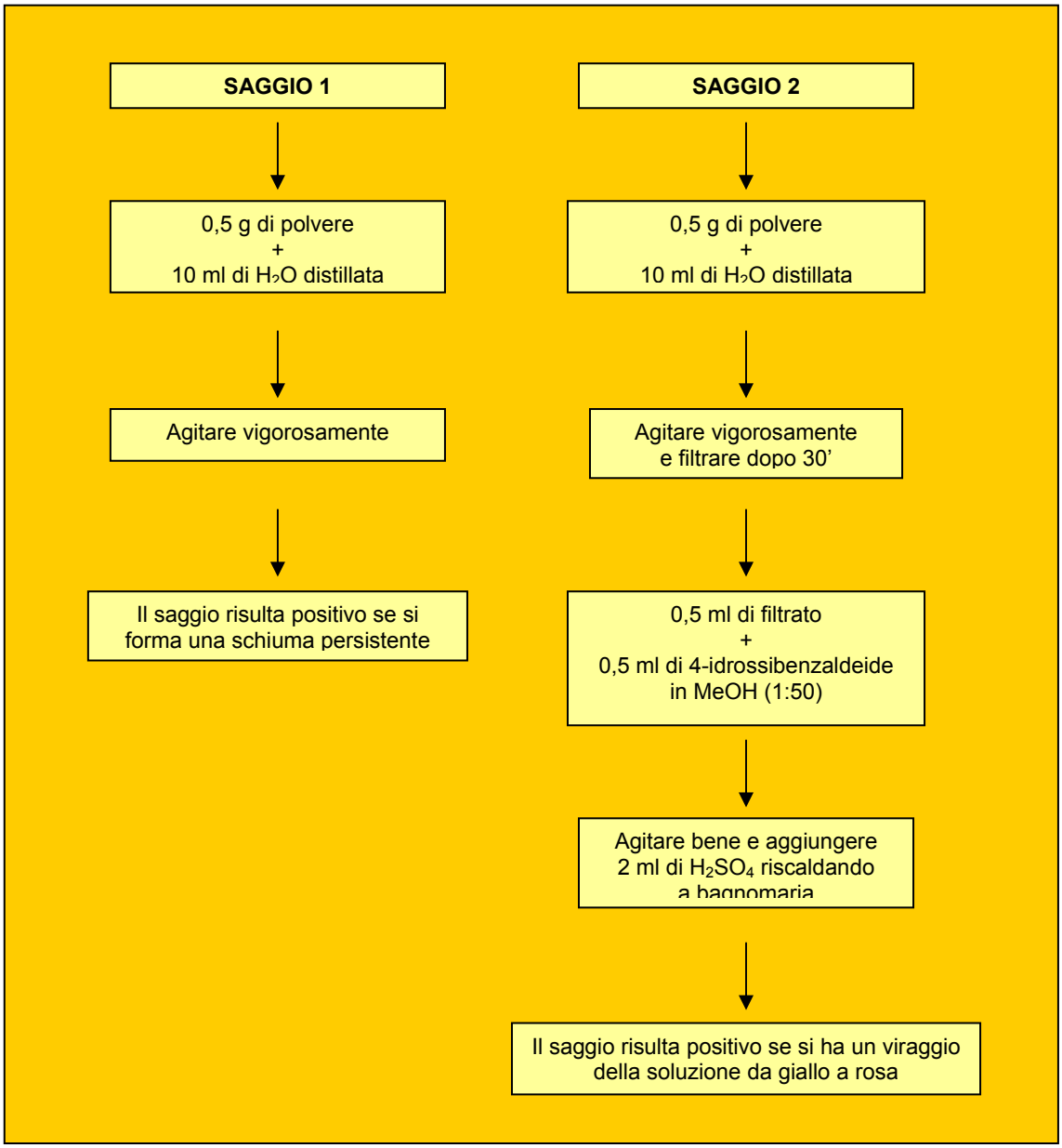
Saggi



RADIX BUPLEURI

Nome botanico:	*Bupleurum chinense* DC
Famiglia:	*Umbelliferae*
Componenti principali:	Saponine triterpeniche e sapogenine (saikogenina)

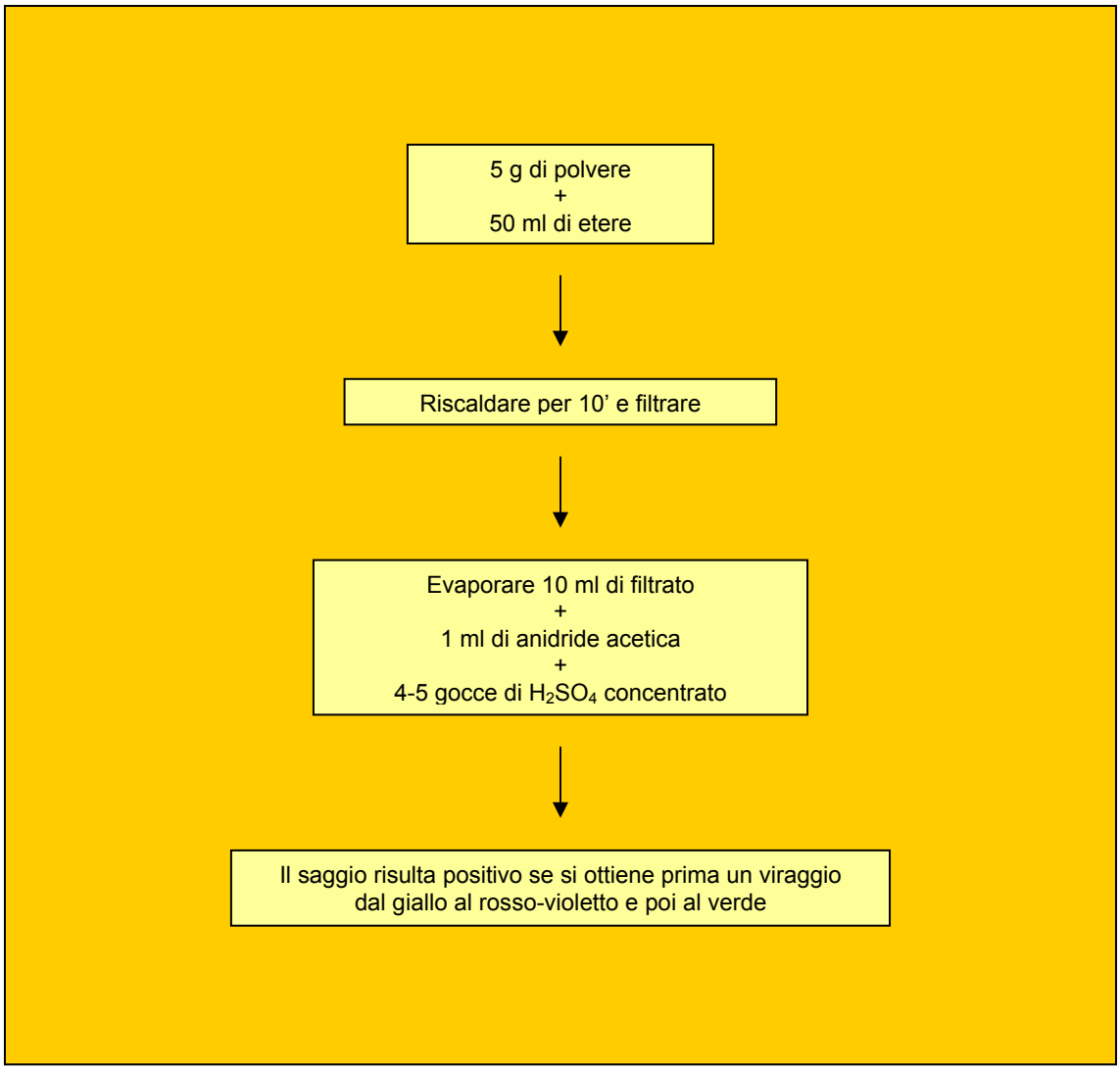
Saggi



RADIX PAEONIAE LACTIFLORAE

Nome botanico:	*Paeonia lactiflora* Pall
Famiglia:	*Ranuncolaceae*
Componenti principali:	Paeoniflorina (glucoside di un monoterpene della serie del pinano)

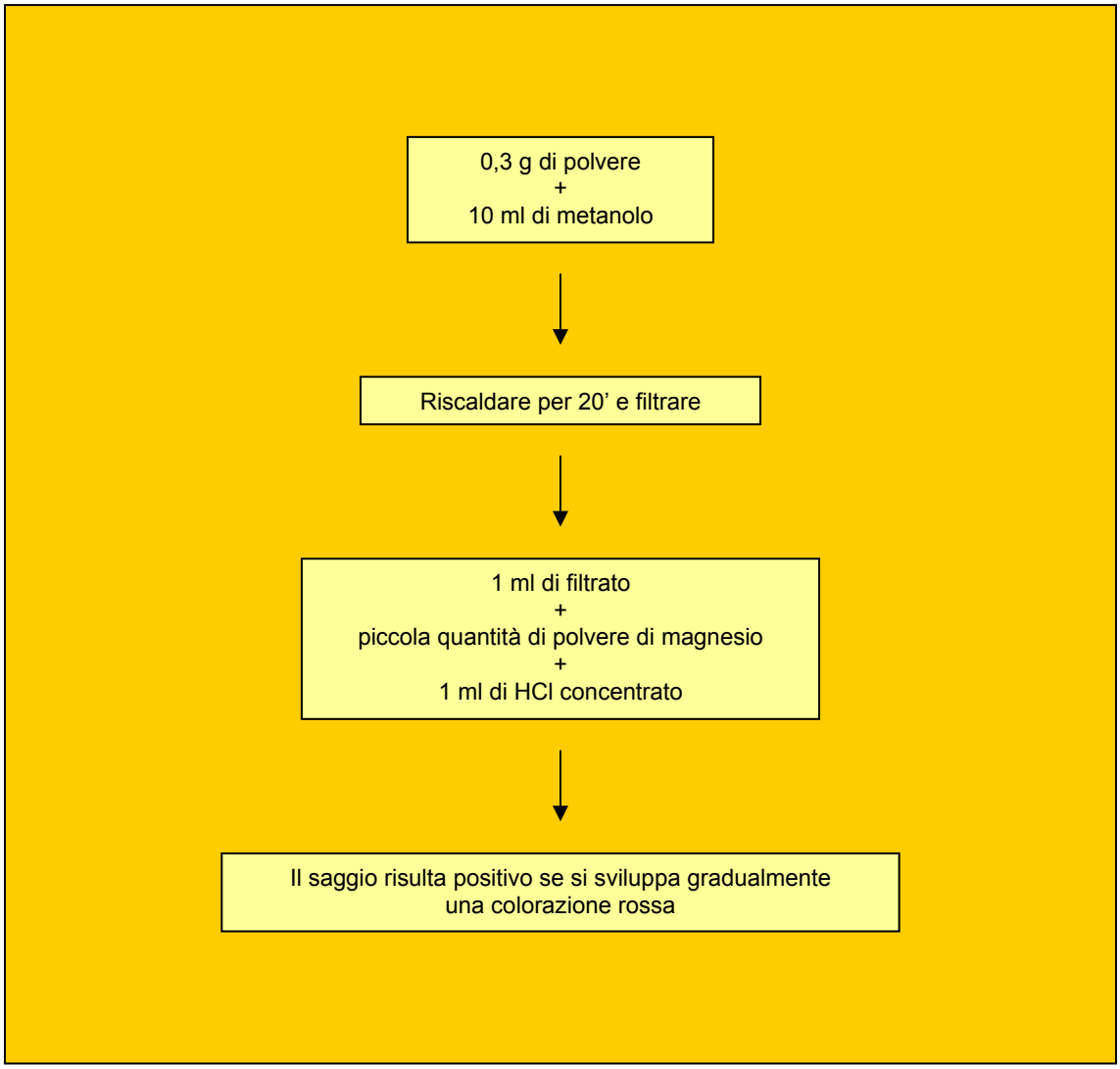
Saggio



PERICARPIUM CITRI RETICULATAE

Nome botanico:	*Citrus reticolata* Blanco
Famiglia:	*Rutaceae*
Componenti principali:	Flavonoidi (esperidina); olio essenziale (monoterpeni:limonene, α e β pinene, myrcene, α e β fellandrene, α- e β-terpinene, *p*-cimene; pigmenti carotenoidi

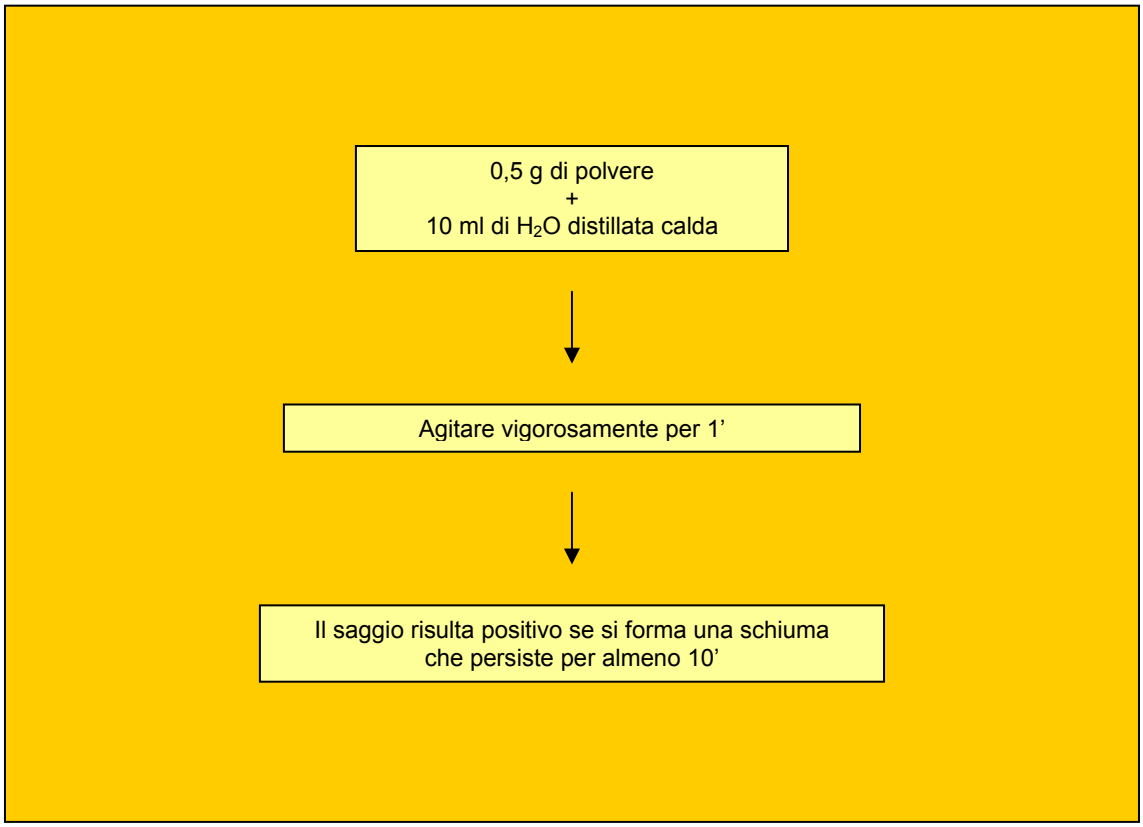
Saggio



RADIX POLYGALAE TENUIFOLIAE

Nome botanico:	*Poligala tenuifolia* Willd.
Famiglia:	*Polygonaceae*
Componenti principali:	saponine triterpeniche

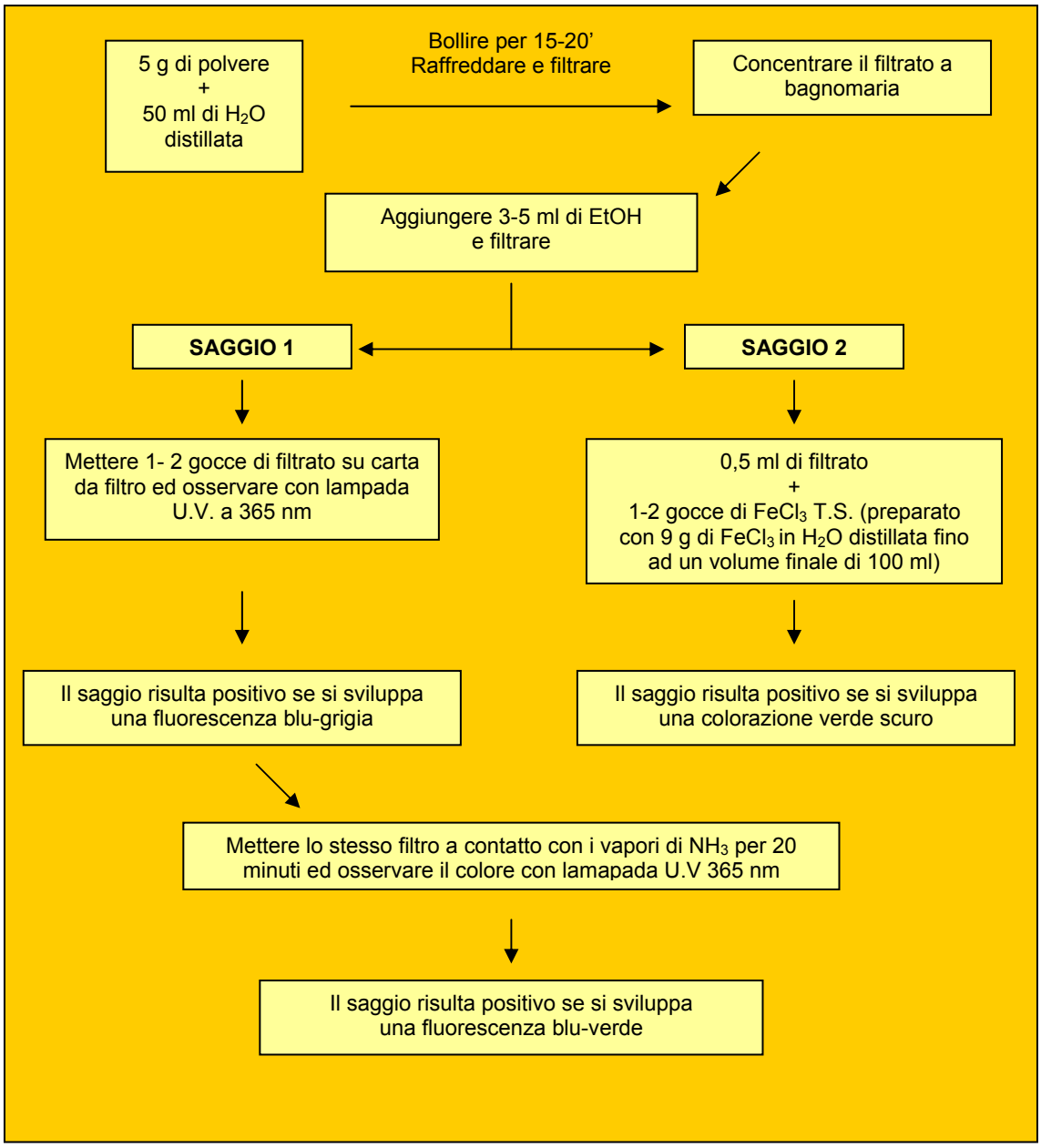
Saggio



RADIX SALVIAE MILTIORRIZHAE

Nome botanico:	*Salvia miltiorrhiza* Bge
Famiglia:	*Labiatae*
Componenti principali:	diterpeni a struttura fenantrenica (tanshinone), salviolo, miltidiolo, ferruginolo

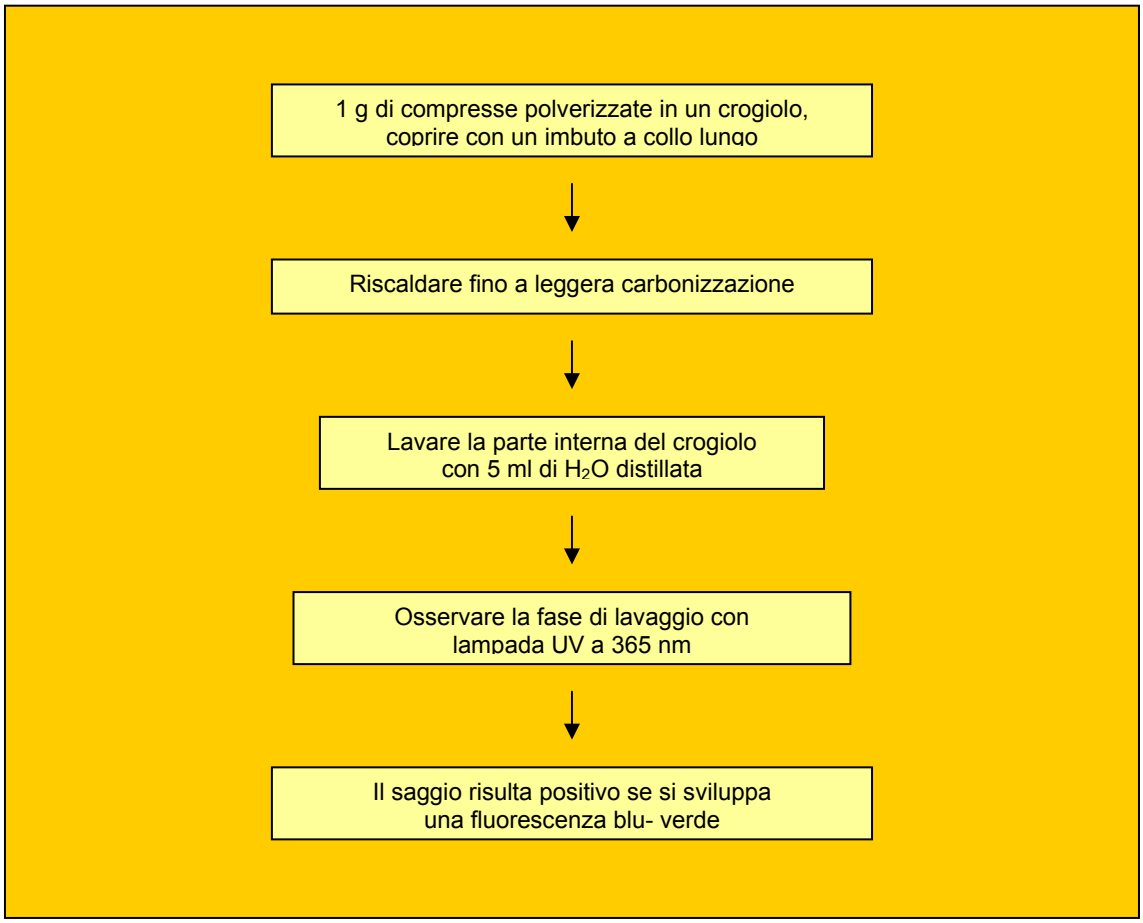
Saggi



TIAN WANG BI XIN DAN

Composizione: *Radix Salviae Miltiorrhizae; Radix Angelicae Sinensis; Rhizoma Acori Graminei; Radix Codonopsis Pilosulae; Poria; Fructus Schisandrae; Radix Ophiopogonis; Radix Asparagi; Radix Rehmanniae; Radix Scrophulariae; Radix Polygalae (trattata); Semen Ziziphi Spinosae; Semen Biotae; Radix Platycodi; Radix Glycyrrhizae; Cinnabaris*

Saggio



La riproduzione parziale o totale dei Rapporti *e* Congressi ISTISAN
a stampa o online deve essere preventivamente autorizzata.
Le richieste possono essere inviate a: pubblicazioni@iss.it.

Stampato da Ditta Grafiche Chicca & C. snc
Via di Villa Braschi 143, 00019 Tivoli (Roma)

Roma, dicembre 2004 (n. 4) 13° Suppl.