



DETERMINATION OF AFLATOXINS IN DOMESTIC ACHILLEA FILIPENDULINA MATERIALS

D. K. Pulatova

F. F. Urmanova

Tashkent Pharmaceutical Institute

e-mail: dildora.pulatova.74@bk.ru

<https://doi.org/10.5281/zenodo.15030244>

ARTICLE INFO

Received: 09th March 2025

Accepted: 14th March 2025

Online: 15th March 2025

KEYWORDS

Achillea filipendulina, flowers, mycotoxins, contaminants, mold fungi, aflatoxins, safety, high-performance liquid chromatography, massspectrometric detection.

ABSTRACT

The safety assessment achillea filipendulina flowers, a new anti - ulcer, diuretic and hemostatic medicinal product, was carried out based on the content of biological contaminants – aflatoxins. High-performance liquid chromatography with massspectrometric detection aflatoxins B1, B2, G1 and G2 revealed only one aflatoxins out of four known aflatoxins B1. It was found that its content in achillea filipendulina flowers is 0.00042 ± 0.00001 mcg/kg, which fully meets the requirements (no more than 0.005 mcg/kg) and indicates the safety of the studied raw materials.

MAHALLIY XOMASHYO TUBULG'IBARGLI BO'YMODARON GULLARI TARKIBIDA AFLATOKSINLARNI ANIQLASH

D.K. Pulatova

F.F. Urmanova

Toshkent Farmatsevtika Instituti

e-mail: dildora.pulatova.74@bk.ru

<https://doi.org/10.5281/zenodo.15030244>

ARTICLE INFO

Received: 09th March 2025

Accepted: 14th March 2025

Online: 15th March 2025

KEYWORDS

Tubulg'ibargli bo'ymodaron, gullar, mikotoksinlar, ifloslantiruvchi moddalar, mog'or zamburug'lari, aflatoksinlar, xavfsizlik, yuqori samarali suyuqlik xromatografiyasi, massa-spektrometrik detektor.

ABSTRACT

Me'da yarasiga qarshi, peshob xaydovchi va qon to'xtatuvchi xossaga ega bo'lgan yangi dorivor o'simlik vositasi - tubulg'ibargli bo'ymodaron gullarining xavfsizligini baholashda biologik kontaminantlar bo'lgan aflatoksinlar aniqlandi. Yuqori samarali suyuqlik xromatografiyasi usulida massa-spektrometrik detektori yordamida ma'lum bo'lgan to'rtta aflatoksinlar B₁, B₂, G₁ va G₂ dan faqat bitta aflatoksin B₁ aniqlandi. Tubulg'ibargli bo'ymodaron gullari tarkibida aflatoksinlar miqdori $0,00042 \pm 0,00001$ mkg/kg ekanligi aniqlandi, bu esa qo'yilgan talablarga to'liq javob beradi ($0,005$ mkg/kg dan ko'p emas) va o'rganilayotgan xomashyoning xavfsizligidan dalolat beradi.



ОПРЕДЕЛЕНИЕ АФЛАТОКСИНОВ В ОТЕЧЕСТВЕННОМ СЫРЬЕ ТЫСЯЧЕЛИСТИНКА ТАВОЛОЛИСТНОГО

Д.К. Пулатова

Ф.Ф.Урманова

Ташкентский фармацевтический институт

e-mail: dildora.pulatova.74@bk.ru

<https://doi.org/10.5281/zenodo.15030244>

ARTICLE INFO

Received: 09th March 2025

Accepted: 14th March 2025

Online: 15th March 2025

KEYWORDS

Тысячелистник таволголистный, цветки, микотоксины, контаминалты, плесневые грибы, афлатоксины, безопасность, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрическое детектирование.

ABSTRACT

Проведена оценка безопасности цветков тысячелистника таволголистного - нового лекарственного средства противоизвестного, мочегонного и кровоостанавливающего средства по содержанию биологических контаминалтов – афлатоксинов. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием из четырех известных афлатоксинов B_1 , B_2 , G_1 и G_2 обнаружен лишь один афлатоксин B_1 . Установлено, что содержание его в цветках тысячелистника таволголистного составляет $0,00042 \pm 0,00001$ мкг/кг, что в полной мере соответствует предъявляемым требованиям (не более 0,005 мкг/кг) и свидетельствует о безопасности исследованного сырья.

Введение. Лекарственные растения, произрастающее в неблагоприятных экологических условиях, могут накапливать несвойственные им чужеродные вещества – ксенобиотики, способные вызывать серьезные нарушения работы различных органов и систем организма.

В этой связи при оценке качества сырья лекарственных растений на современном уровне наряду с традиционными фармакопейными показателями необходимо учитывать требования безопасности [1,2].

К числу потенциальных факторов риска, которые необходимо учитывать при оценке безопасности растительного сырья, ВОЗ относит возможность загрязнения его радионуклидами, пестицидами, металлами – токсикантами и афлатоксинами из класса микотаксинов [3].

Принимая во внимание сближение требований к качеству лекарственного растительного сырья, заложенных в нормативных документах различных стран, в числе показателей, нормирующих безопасность отечественного сырья тысячелистника таволголистного, рекомендованного нами в качестве нового эффективного лекарственного средства противоизвестного, мочегонного и кровоостанавливающего средства, определено содержание указанных выше опасных контаминалтов. Ранее мы сообщали о результатах исследования цветков тысячелистника таволголистного на



содержание радионуклидов, пестицидов и токсичных тяжелых металлов [4,5]. Настоящая работа посвящена определению в них микотоксинов.

Как известно, микотоксины являются биологическими контаминантами – природными загрязнителями микроскопическими плесневыми грибами. Большинство изученных микотоксинов образуются в результате деятельности плесневых грибов трех родов: *Aspergillus*, *Penicillium* и *Fusarium*. Микотоксины вызывают иммунодепрессии организма, что приводит к различным инфекционным заболеваниям, поражению печени и других внутренних органов. Они обладают также выраженным канцерогенным действием [6]. В основе механизма их токсического действия лежит способность ингибировать синтез белка. Эти вещества достаточно устойчивы к воздействиям окружающей среды и не разрушаются даже при термической обработке [7].

В настоящее время известно около 300-400 микотоксинов [8]. К числу наиболее распространенных микотоксинов, представляющих опасность для здоровья человека и животных, относятся афлатоксины B₁, B₂, G₁ и G₂ [7].

Для определения содержания микотоксинов, в том числе афлатоксинов наиболее часто используются хроматографические методы: газожидкостная хроматография, совместно с масс-спектрометрией, высокоэффективная жидкостная хроматография с УФ-спектрометрической, флуоресцентной или масс-спектрометрической детекцией с различными вариантами пробоподготовки [7], а также более экономичные скрининговые методы.

Цель исследования. Оценка содержания афлатоксинов в лекарственном растительном сырье позволяет соблюдать установленные нормы по их содержанию, принимать необходимые решения по корректировке технологий производства, транспортировки, хранения и переработки, обеспечивающее безопасность лекарственной растительной продукции.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования служили цветки тысячелистника таволголистного, заготовленных с ботанически достоверных растений в пределах их естественного ареала.

Анализу подвергались средние пробы сырья, отобранные в соответствии с указаниями ГФ РУз [9].

Содержание афлатоксинов в сырье определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ, МС/МС), сущность которого заключается в экстракции микотоксинов из аналитической пробы, идентификации и количественном определении их по площадям пиков ион-продуктов с помощью градуировочной характеристики в режиме мониторинга выбранных реакций[10].

Определение проводили на хромато-масс-спектрометре, снабженном масс-спектрометрическим детектором с соблюдением следующих условий:

- колонка диаметром 2,1 мм, длиной 150 мм с обращенно - фазовым сорбентом С 18 с размером частиц не более 5,0 мкл;
- температура колонки -40⁰C;



- скорость потока подвижной фазы – 0,25 см³/мин;
- температура в отсеке устройства ввода проб – 10⁰С;
- объем вводимой пробы - 20 мм³.

Разделение проводили в режиме градиентного элюирования в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1.

Условия градиентного элюирования

Время, мин	Подвижная фаза А, %	Подвижная фаза Б, %
0,0	100	0
2,0	100	0
12,0	0	100
16,0	0	100
16,1	100	0
25,0	100	0

Приготовление растворов

Приготовление растворов подвижных фаз А и Б

Подвижная фаза А

Для приготовления подвижной фазы А в мерную колбу вместимостью 1000 см³ приливают 890 см³ дистиллированной воды, добавляют 100 см³ метанола, 10 см³ уксусной кислоты и 0,2 г ацетата аммония, перемешивают.

Подвижная фаза Б

Для приготовления подвижной фазы Б в мерную колбу вместимостью 1000 см³ приливают 970 см³ метанол, добавляют 20 см³ дистиллированной воды, 10 см³ уксусной кислоты и 0,2 г ацетата аммония, перемешивают.

Приготовление раствора для экстракции

В мерную колбу вместимостью 1000 см³ вносят 790 см³ ацетонитрила, 200 см³ дистиллированной воды и 10 см³ уксусной кислоты, перемешивают.

Приготовление градуировочных растворов

Для приготовления исходных растворов C_0 с массовой концентрацией 1000 мкг/см³ или C_i с массовой концентрацией 100 мкг/см³ для каждого микотоксина рассчитывают необходимую массу i-го вещества, мг, с точностью до первого десятичного знака, с учетом содержания основного вещества по формуле

$$m_i = \frac{C_0 \cdot V}{P_i} \cdot 100,$$

где C_0 – концентрация исходного раствора, мкг/см³;

V – объем мерной колбы, см³;

P_i – массовая доля основного вещества, %.

Построение градуировочной характеристики.



Построение и расчет градуировочной характеристики проводят в каждой серии измерений с помощью программного обеспечения хромато-масс-спектрометра. Проводят однократное измерения не менее трех градуировочных растворов в порядке возрастания концентрации микотоксинов в соответствии с таблицей 2.

Таблицей 2

Массовые концентрации микотоксинов в матричных градуировочных растворах

Микотоксин	Массовая концентрация микотоксина, нг/см ³					
	G ₁	G ₂	G ₃	G ₄	G ₅	G ₆
Афлатоксин B ₁	0,1	0,2	1	2	10	20
Афлатоксин B ₂	0,1	0,2	1	2	10	20
Афлатоксин G ₁	0,1	0,2	1	2	10	20
Афлатоксин G ₂	0,1	0,2	1	2	10	20

Приготовление исходных растворов афлатоксинов

Для приготовления исходных растворов афлатоксинов с массовой концентрацией 1000 мкг/см³ в мерные колбы вместимостью 10 см³ вносят по отдельности рассчитанные массы афлатоксинов B₁, B₂, G₁, G₂. Добавляют 8 см³ ацетонитрила, перемешивают, помещают в ультразвуковую баню на 15 мин и доводят объем до метки ацетонитролом.

Приготовление рабочего раствора афлатоксинов

Для приготовления рабочего раствора в мерную колбу вместимостью 100 см³ вносят исходные растворы C₀ и C₁ в объемах, указанных в таблице 1, и доводят до метки ацетонитрилом.

Подготовка проб

Из средней пробы сырья выделяют около 100 г, измельчают на лабораторной мельнице и просеивают через сито с отверстиями диаметром 0,5 мм, перемешивают. Взвешивают 5,00 г подготовленной пробы и помещают в виалу или полипропиленовую пробу вместимостью 50 см³. Добавляют 25 см³ раствора для экстракции, помещают на 30 с в вибрационный шейкер, затем для перемешивания в течении 60 мин на качающийся шейкер. Центрифугируют при 3500g в течение 20 мин.

В микроцентрифужную пробирку вносят 500 мм³ подвижной фазы А и 500 мм³ верхнего слоя экстракта.

Центрифугируют при 1500g при температуре 4⁰С в течение 20 мин. Пипеточным дозатором отбирают 700 мм³ верхнего слоя экстракта и фильтруют через микрофильтр с нейлоновой мембранией в виалу для ВЭЖХ- МС/МС анализа.

В инжектор хроматографа вводили 20 мм³ пробы, проводили измерения в условиях, используемых при установлении градуировочной зависимости.

Определяли и регистрировали на хроматограмме время удерживания пиков двух ионов – продуктов каждого микотоксина, соответствующее времени удерживания, найденному при измерении градуировочных растворов.



Результаты. В результате в цветках тысячелистника таволголистного из указанных выше афлатоксинов обнаружен лишь афлатоксин B₁. Содержание его в сырье (X) вычисляли по формуле:

$$X = 2 \frac{X_i \cdot V}{m},$$

где 2- фактор разведения экстрактов;

X_i – массовая концентрация микотоксинов в анализируемой пробе, определенная по градуировочному графику, нг/см³;

V - объем раствора для экстракции, см³;

M – масса навески, г.

Таким образом установлено, что фактическое значение его расширенной неопределенности составляет $0,00042 \pm 0,00001$ мкг/кг.

Заключение.

Проведена оценка безопасности цветков тысячелистника таволголистного, произрастающего в Узбекистане, по содержанию биологических контаминаントов – афлатоксинов. Из четырех известных афлатоксинов обнаружен лишь афлатоксин B₁. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией установлено, что содержание его в сырье составляет $0,00042 \pm 0,00001$ мкг/кг Установленный уровень не превышает предельно допустимую концентрацию (не более 0,005 мкг/кг), что подтверждает безопасность исследованного сырья.

References:

1. Алимкулова К.З., Урманова Ф.Ф. К вопросу экологической чистоты и безопасности нового растительного сбора «Флюкам» //Фармацевтический журнал. -Ташкент, 2020. - №1. -С. 16-18.
2. Экотоксиканты в лекарственном растительном сырье и фитопрепаратах /И.В.Гравель, Я.Н.Шойхет, Г.П.Яковлев, И.А.Самылина. -М.: ГЭОТАР - Медиа, 2012. -301с.
3. Кисилева Т.Л., Смирнова Ю.А. Лекарственные растения в мировой медицинской практике, государственное регулирование номенклатуры и качества. -М.: Издательство ассоциации натуротерапевтов, 2009. -295 с.
4. Пулатова Д.К., Мамасолиев А.И., Урманова Ф.Ф. Определение радиационной безопасности цветков тысячелистника таволголистного. // Материалы V Международной научно-практической конференции «Современное состояние фармацевтической отрасли: проблемы и перспективы». -Ташкент, 2024. – С.178-179.
5. Пулатова Д.К., Урманова Ф.Ф. Определение хлорорганических пестицидов в цветках тысячелистника таволголистного. //Казахстанский журнал медицины и фармации, Республика Казахстан, 2024. -С.62-67.
6. Микотоксины. URL: <https://www.syngenta.ru/>.



7. Буклагин Д.С. Методы определения микотоксонов в сельскохозяйственной продукции и кормах //Техника и технологии в животноводстве. 2020. -№4(40). -C.57-67
8. Иммунохимические методы определения микотоксинов /Горячева И.Ю. и др. //Журнал аналитической химии. 2009. -№8. -C.788-806.
9. ГФ Республики Узбекистан I том, 1часть. –Ташкент. -2021. 1214с.
10. ГОСТ 34140-2017. Метод определения микотоксонов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. – Москва: Стандартинформ, 2020.