



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 detektor 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 ТЫСЯЧЕЛИСТНИКА ТАВОЛГОЛИСТНОГО

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,
контаминанты,
плесневые грибы,
афлатоксины,
безопасность,
высокоэффективная
жидкостная
хроматография, масс-
спектрометрическое
детектирование.

ABSTRACT

Проведена оценка безопасности цветков тысячелистника таволголистного - нового лекарственного средства противоязвенного, мочегонного и кровоостанавливающего средства по содержанию биологических контаминантов - афлатоксинов. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием из четырех известных афлатоксинов В₁, В₂, G₁ и G₂ обнаружен лишь один афлатоксин В₁. 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 микотоксинов [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 противоязвенного, мочегонного и кровоостанавливающего средства, определено содержание указанных выше опасных контаминантов. 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 организмов, 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.

Аналізу 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 C₁₈ с размером частиц не более 5,0 мкл;
- температура колонки -40°C;



- скорость потока подвижной фазы – 0,25 см³/мин;
- температура в отсеке устройства ввода проб – 10°C;
- 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 деионизированной 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 деионизированной 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 деионизированной воды и 10 см³ уксусной кислоты, перемешивают.

Приготовление градуировочных растворов

Для приготовления исходных растворов C_0 с массовой концентрацией 1000 мкг/см³ или C'_0 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 однократные 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 В ₁	0,1	0,2	1	2	10	20
Афлатоксин В 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 В₁, В₂, 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 C_0 и C'_0 в объемах, указанных в таблице 1, и доводят до метки ацетонитрилолом.

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 вialу или полипропиленовую пробу вместимостью 50 см³. Добавляют 25 см³ раствора для экстракции, помещают на 30 с в вибрационный шейкер, затем для перемешивания в течение 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 мембраной в вialу 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 В₁. 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 контаминантов – афлатоксинов. Из четырех известных афлатоксинов обнаружен лишь афлатоксин В₁. 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, – 301 с.
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). –С.57-67
8. Иммунохимические методы определения микотоксинов /Горячева И.Ю. и др. //Журнал аналитической химии. 2009. -№8. –С.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.