



DEVELOPMENT OF THE EXTRACTION TECHNIQUE OF SAMPLE PREPARATION FOR LC-MS DETERMINATION OF AMANITIN AND PHALLOIDIN TOXINS IN FUNGI AND HUMAN URINE

Zayats M.F.¹, Leshchev S.M.¹, Pakhadnia Yu.G.², Ahabalaye A.A.³, Shahoika P.G.², Yurchenko R.A.¹

¹Belarusian State University, 4, Nezavisimosti Avenue, Minsk, 220030 Belarus, mikhail_zayats@tut.by, leshev.sergey54@gmail.com, yurchenko@aipsin.com

²National Anti-Doping Laboratory, 223040 Belarus, Minsk region, ag. Lesnoy, 31, director@antidoping.by, pavell1sg@gmail.com

³RUE «Center for Examinations and Tests in Health Service», Laboratory of Pharmacopoeial and Pharmaceutical Analysis, 83 block 15, 7th floor, Dzerzhinsky Avenue, Minsk, 220045 Belarus, alexandrmailbox@inbox.ru

At 20±1°C, the extraction of amanitin (α-amanitin, β-amanitin) and phalloidin (phalloidin and phalloidin) toxins with butanol from water and with butanol and isopropanol from aqueous solutions of ammonium sulfate and potassium hydrogen phosphate was studied. On the basis of the obtained experimental data, the distribution constants of toxins were calculated, which were used to develop a technique for extraction sample preparation in the process of determining toxins in fungal material and human urine. It has been shown that for the extraction of amanitin and phalloidin toxins from various objects with a high water content, it is advisable to use extraction with butanol using salting out with ammonium sulfate up to saturated solutions.

Extraction techniques have been developed for sample preparation of fungal material and human urine for the subsequent determination of toxins in them by liquid chromatography with mass spectrometric detectors such as "triple quadrupole" and "quadrupole – orbital trap". The technique for the determination of toxins in urine is characterized by a limit of quantification LOQ of about 1 ng/ml of urine. The technique for the determination of toxins in mushroom material – 600 ng / 1 g of dry mushrooms. The relative standard deviation RSD of the determination of toxins is about 10-15%.

Keywords: α-amanitine, β-amanitine, phalloidin, phalloidin, death cap, toxins, liquid chromatography, mass-spectrometry, extraction, distribution constants.

ПОИСК ПЕРСПЕКТИВНЫХ ИСТОЧНИКОВ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩЕГО СРЕДСТВА

Игнатовец О.С., Леонтьев В.Н., Феськова Е.В., Адамцевич Н.Ю., Страх Я.Л., Чернецкая Ю.Г.
Учреждение образования «Белорусский государственный технологический университет»,
220006, Минск, Свердлова, 13а, Ignatovets@belstu.by

Одним из наиболее многочисленных классов биологически активных веществ (БАВ) растительного происхождения являются фенольные соединения, которые обладают широким спектром биологической активности [1]. Принимая во внимание сведения о действии флавоноидов на многочисленные биохимические процессы, их низкой токсичности и учитывая заинтересованность отечественных фармацевтических предприятий в расширении ассортимента фитопрепаратов с различным биологическим действием с высокой конкурентоспособностью, есть основания рассматривать данный класс БАВ в качестве веществ, наиболее перспективных для создания высокоэффективных полифункциональных лекарственных препаратов. Для рынка лекарственных трав и сборов Республики Беларусь характерна стабильность, однако его объем и доля в общем объеме рынка фармпрепаратов на сегодняшний день скромна (около 2%). Ассортимент ранозаживляющих средств представлен в основном синтетическими препаратами. В связи с вышеизложенным, актуальным направлением исследований является поиск лекарственных растений с высоким содержанием



фенольных соединений и флавоноидов для разработки фитопрепаратов с ранозаживляющей активностью. Данную задачу можно решить за счет привлечения растительного сырья из Республики Узбекистан, обладающего высоким содержанием и широким спектром БАВ.

Объектами исследования являлись лекарственные растения, произрастающие в Республике Узбекистан (Ташкентская область, Паркентский район): душица обыкновенная (*Origanum vulgare* L.), шалфей мускатный (*Salvia sclarea* L.), зверобой продырявленный (*Hypericum perforatum* L.), бессмертник песчаный (*Helichrysum arenarium* L.), череда трехраздельная (*Bidens tripartita* L.), сенна александрийская (*Senna alexandrina* Mill.).

На первом этапе исследований проводили определение содержания фенольных соединений и флавоноидов в экстрактах лекарственных растений. Экстракцию исследуемых видов растительного сырья проводили следующим образом: 1 г навески измельченной массы растения смешивали с 30 мл 50% этилового спирта и экстрагировали при температуре 70°C в течение 30 мин, затем полученные вытяжки фильтровали и определяли содержание фенольных соединений методом Фолина и Чокальтеу в модификации Синглтона и Росси. Содержание флавоноидов в экстрактах оценивали спектрофотометрическим методом по реакции с хлоридом алюминия.

Наибольшее количество фенольных соединений наблюдалось в экстракте травы шалфея мускатного – $34,74 \pm 1,12$ мг-экв галловой к-ты / г а. с. с. и травы зверобоя продырявленного – $28,64 \pm 1,07$ мг-экв галловой к-ты / г а. с. с. Наибольшее содержание флавоноидов выявлено в цветках бессмертника песчаного – $83,75 \pm 1,65$ мг-экв рутина / г а. с. с. Для сравнения, в цветках бессмертника песчаного из коллекции ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», установлено содержание флавоноидов на уровне $61,60$ мг / г а. с. с. [2]. Полученные значения свидетельствуют о достаточно высоком содержании БАВ в образцах лекарственных растений Республики Узбекистан по сравнению с белорусскими представителями, что подтверждает перспективность данного типа сырья для разработки фитопрепаратов.

На дальнейшем этапе НИР проводили отбор растений по наличию в составе водно-спиртовых экстрактов кемпферол-3-β-D-глюкопиранозида и изокверцитрина (ключевых флавоноидов, способствующих регенерации кожных покровов) [3]. С целью первичного качественного обнаружения флавоноидов в растительном материале широко используется метод ТСХ. Это связано с таким неоспоримым его преимуществом, как простота и легкость проведения эксперимента, низкая стоимость оборудования.

Для определения качественного состава флавоноидов методом ТСХ экстракты упаривали на ротаторном испарителе. В качестве подвижной фазы использовали систему растворителей этилацетат : муравьиная кислота : вода (70 : 10 : 20). Растворы экстрактов с концентрацией 5 мг/мл наносили на пластинки в виде пятен диаметром 3–4 мм, которые проявляли в УФ-камере при длине волны 365 нм. Для качественного определения флавоноидов в экстрактах лекарственных растений применяли стандартные растворы кемпферол-3-β-D-глюкопиранозида (Sigma, Франция) и изокверцитрина (Sigma, Германия). Идентификацию веществ на хроматограммах осуществляли по характерному цвету зон и величинам R_f . При проявлении хроматограмм в УФ свете в образцах наблюдались зоны с желтой и желто-зеленой флуоресценцией, характерной для флаванолов; желто-коричневой – для флавонов, флаванол-3-гликозидов, флаванонов и халконов; голубой и фиолетовой – для фенольных кислот; ксантоны проявляются в виде оранжевых пятен; изофлавоны не проявляются. По совпадению окраски и величины $R_f = 0,59$ со стандартным образцом в экстракте цветков бессмертника песчаного идентифицирован кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид. По величине $R_f = 0,43$ и коричневой окраске в экстракте травы зверобоя продырявленного идентифицирован изокверцитрин – ключевой флавоноид, который способствует регенерации поврежденных кожных покровов. В экстрактах шалфея мускатного, душицы обыкновенной, сены александрийской и череды трехраздельная изокверцитрин и кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид не обнаружены. Таким образом, с помощью ТСХ в экстракте травы зверобоя продырявленного идентифицирован



изокверцитрин, а в экстракте цветков бессмертника песчаного – кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид.

Для подтверждения полученных результатов на следующем этапе НИР проводили анализ растительных экстрактов методом ВЭЖХ-МС. В качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил : 0,1%-ный водный раствор муравьиной кислоты в соотношении 25 : 75 в изократическом режиме при скорости элюирования 1 мл/мин. Регистрацию хроматографического разделения осуществляли с помощью диодно-матричного детектора в диапазоне длин волн 200–790 нм и масс-детектора с электроспрей-ионизацией. Регистрацию масс-спектров осуществляли в области отрицательных и положительных ионов. Параметры масс-спектрометрии в области отрицательных ионов: напряжение на капилляре – 3 кВ, напряжение на конусе – 30 В, напряжение на экстракторе – 4 В; в области положительных ионов – напряжение на капилляре – 3 кВ, напряжение на конусе – 40 В, напряжение на экстракторе – 3 В. Температура десольватации – 400°C, температура источника – 130°C, общий расход инертного газа (азота) – 480 л/час. Обработку результатов осуществляли при помощи программного обеспечения «Mass Lynx». Идентификацию и количественный анализ флавоноидов проводили с применением стандартных образцов. Результаты хроматографического анализа показали наличие в экстрактах зверобоя продырявленного изокверцитрина, гиперозида и хлорогеновой кислоты. В экстракте бессмертника песчаного идентифицирован кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид.

Таким образом, в ходе выполнения научно-исследовательской работы бессмертник песчаный и зверобой продырявленный отобраны для дальнейших исследований в качестве сырья для разработки ранозаживляющего фитопрепарата. Данная работа выполнена в рамках НИР «Разработка ранозаживляющего средства на основе комплекса флавоноидов растений, произрастающих в Республике Узбекистан» при поддержке БРФФИ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Флавоноиды как биологически активные соединения лекарственных растений / В.А. Куркин [и др.] // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – № 11. – С. 1897-1901.
2. Выделение флавоноидов из цветков бессмертника песчаного /Н.Ю. Адамцевич [и др.] // *Вестник ВДУ*. – 2021. – № 4. – С. 23-30.
3. Stimulation of neuroregeneration by flavonoid glycosides [Electronic resource]. – Mode of access: <https://patentimages.storage.googleapis.com/63/59/5e/174d4cea2e89ad/US20120087980A1.pdf>. – Date of access: 21.12.2021.

SEARCH FOR PROMISING SOURCES OF PLANT RAW MATERIALS FOR THE DEVELOPMENT OF A WOUND-HEALING AGENT

Ignatovets O.S., Leontiev V.N., Feskova A., Adamtsevich N.Yu., Strakh Ya.L., Charnetskaya Yu.
Belarusian State Technological University, Minsk, Republic of Belarus, Ignatovets@belstu.by

The content of biologically active substances (phenolic compounds, flavonoids) in medicinal plants growing in the Republic of Uzbekistan was studied. It has been established that the greatest amount of phenolic compounds is contained in the extracts of clary sage (*Salvia sclarea* L.) and Saint-John's wort (*Hypericum perforatum* L.), flavonoids – in the extract of sandy everlasting (*Helichrysum arenarium* L.).

Plant extracts were screened for the presence of kaempferol-3-β-D-glucopyranoside and isoquercitrin using thin layer chromatography and HPLC-MS. It has been established that these flavonoids are contained in sandy everlasting (*Helichrysum arenarium* L.) and Saint-John's wort (*Hypericum perforatum* L.), respectively.

Sandy everlasting (*Helichrysum arenarium* L.) and Saint-John's wort (*Hypericum perforatum* L.) were selected for further researches as a raw material for the development of a wound-healing phytopreparations.