

### 2.1.8.37. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОХРАТОКСИНА А

*Охратоксин А относится к нефротоксичным и нефроканцерогенным веществам. По возможности все манипуляции проводят в вытяжном шкафу. Вследствие электростатических свойств токсинов в сухом виде и их склонности к распространению по всей рабочей поверхности, при работе с ними принимают особые меры предосторожности, например, используют закрытый бокс, оборудованный перчатками-манипуляторами. Посуда, контактировавшая с охратоксином А, должна быть обеззаражена (например, посуду ополаскивают метанолом и обеззараживают, выдерживая не менее 2 ч в растворе натрия гипохлорита концентрированном Р, после чего тщательно промывают водой).*

Представленная в данной общей фармакопейной статье методика подходит для определения содержания охратоксина А в солодки корнях и в солодки корней экстракте сухом.

Для определения охратоксина А в лекарственном растительном сырье или растительной фармацевтической субстанции можно использовать данную методику, если доказана ее пригодность, или используют другую валидированную методику.

#### МЕТОДИКА

Жидкостная хроматография (2.1.2.28).

*Используют посуду из темного стекла, не содержащую остатков детергентов. При необходимости посуду перед использованием ополаскивают 10 % (об/об) раствором серной кислоты Р и тщательно промывают водой дистиллированной Р до отсутствия следов кислоты (проверяют с помощью индикаторных полосок для определения pH).*

*Раствор А. Смешивают 80 объемов воды Р, предварительно доведенной муравьиной кислотой безводной Р до значения pH 2,3, и 20 объемов ацетонитрила Р.*

*Испытуемый раствор. Используют иммуноаффинную колонку, содержащую антитела к охратоксину А, с емкостью не менее 100 нг охратоксина А и обеспечивающую открываемость не менее 70 %. К 2,00 г измельченного испытуемого образца (250) (2.1.9.30) прибавляют 80 мл раствора 30 г/л натрия гидрокарбоната Р и экстрагируют при воздействии ультразвука в течение 30 мин (через 15 мин сменяют воду в ультразвуковой бане). Охлаждают до температуры от 15 °С до 25 °С, доводят до объема 100,0 мл ( $V_1$ ) раствором 30 г/л натрия гидрокарбоната Р и центрифугируют. 5,0 мл ( $V_i$ ) прозрачной надосадочной жидкости тщательно перемешивают с 30 мл буферного раствора с pH 7,4 Р и весь полученный объем пропускают через иммуноаффинную колонку, имеющую температуру от 15 °С до 25 °С, со скоростью 3 мл/мин (скорость не должна превышать 5 мл/мин). Колонку промывают 10 мл буферного раствора с pH 7,4 Р, затем дважды промывают водой Р порциями по 10 мл со скоростью, не превышающей 5 мл/мин, и высушивают с использованием слабого вакуума в течение 5–10 с или пропусканием через колонку воздуха с использованием шприца в течение 10 с. В колонку вносят 0,5 мл метанола Р и дают растворителю пройти через колонку под действием силы тяжести. Элюат собирают в стеклянный флакон вместимостью 4 мл. Через 30 с в колонку вносят вторую порцию 0,5 мл метанола Р, дают растворителю пройти через колонку под действием силы тяжести и собирают в тот же стеклянный флакон. Через последующие 30 с вносят третью порцию 0,5 мл метанола Р. Собирают весь удерживаемый в колонке объем, пропуская через нее воздух или при помощи вакуума. Объединенные элюаты выпаривают досуха в среде азота с использованием нагревательного блока (при температуре 40 °С). Сухой остаток растворяют в 0,5 мл ( $V_2$ ) раствора А. Если полученный раствор прозрачный, он может быть использован для дальнейшего испытания. В случае получения*

непрозрачного раствора, его пропускают через мембранный фильтр (например, политетрафторэтиленовый фильтр с номинальным размером пор 0,45 мкм), который не удерживает охратоксин А.

*Первичный основной раствор охратоксина А.* 1,0 мл раствора охратоксина А *Р* доводят метанолом *Р* до объема 100,0 мл и тщательно перемешивают.

*Вторичный основной раствор охратоксина А.* 10,0 мл первичного основного раствора охратоксина А доводят метанолом *Р* до объема 100,0 мл и тщательно перемешивают.

*Стандартные растворы охратоксина А.* Объемы первичного основного раствора охратоксина А или вторичного основного раствора охратоксина А, указанные в таблице 2.1.8.37.-1, помещают в отдельные колбы и доводят раствором А до объема 50,0 мл.

Таблица 2.1.8.37.-1. – Стандартные растворы охратоксина А

Стандартный раствор	Объем первичного основного раствора охратоксина А, мкл	Конечная концентрация охратоксина А в стандартном растворе, нг/мл
1	5000	50
2	2500	25
3	1000	10
4	500	5
5	250	2,5
Стандартный раствор	Объем вторичного основного раствора охратоксина А, мкл	Конечная концентрация охратоксина А в стандартном растворе, нг/мл
6	500	0,5
7	100	0,1

*Калибровочный график.* Строят калибровочный график зависимости сигнала от концентрации охратоксина А (в нанограммах на миллилитр) в стандартных растворах 1 – 7 (охватывает диапазон, эквивалентный содержанию охратоксина А в испытуемом образце 0,5–250 ррб) и проверяют его линейность. Если содержание охратоксина А в испытуемом образце выходит за пределы калибровочного диапазона, испытуемый раствор должен быть разведен до достижения подходящей концентрации.

*Условия хроматографирования:*

– колонка: длиной 0,15 м и внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная *силикагелем октадецилсилильным для хроматографии Р* с размером частиц 5 мкм;

– температура колонки: 45 °С;

– подвижные фазы:

– подвижная фаза А: вода *Р*, доведенная кислотой фосфорной *Р* до рН 2,3;

– подвижная фаза Б: ацетонитрил *Р*;

– режим градиентного элюирования:

Время (мин)	Подвижная фаза А (% об/об)	Подвижная фаза Б (% об/об)
0–30	80→40	20→60
30–35	40→20	60→80
35–37	20	80
37–40	20→80	80→20

– скорость подвижной фазы: 0,8 мл/мин;

– детектор: флуоресцентный; рекомендуемые настройки – 330 нм (длина волны возбуждения) и 460 нм (длина волны эмиссии);

– объем вводимой пробы: 20 мкл.

*Расчеты.* Рассчитывают уравнение линейной зависимости вида  $y=ax+b$ . Концентрация охратоксина А в испытуемом растворе равна  $\frac{S-b}{a}$ , где  $S$  – измеренный сигнал для испытуемого раствора.

Содержание охратоксина А в испытуемом образце (в ppb) рассчитывают по формуле:

$$\frac{V_1 \times V_2 \times C}{m \times V_i}$$

- где:  $m$  – навеска испытуемого образца, взятая для анализа, в граммах;  
 $V_1$  – объем полученного экстракта в миллилитрах;  
 $V_i$  – объем раствора, взятый для иммуноаффинной очистки, в миллилитрах;  
 $V_2$  – объем раствора, в котором растворен сухой остаток, в миллилитрах;  
 $C$  – найденная концентрация охратоксина А в испытуемом растворе в нанограммах на миллилитр.