

2.1.8.XX. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АФЛАТОКСИНА В₁

Афлатоксины относятся к высокотоксичным и канцерогенным 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, оснащенный перчатками-манипуляторами. Процедуры деконтаминации лабораторных отходов, содержащих афлатоксины, предложены Международным агентством по изучению рака (International Agency for Research on Cancer, IARC).

Афлатоксины являются микотоксинами природного происхождения, продуцируемыми в основном *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus*. Эти грибы широко распространены в природе и наиболее часто встречаются в случае произрастания некоторых видов злаков в стрессовых условиях, например, засухи. Плесневый грибок встречается в почве, гниющей растительности, сене и зернах, склонных к загрязнению микроорганизмами, и поражает все типы органических субстратов при любых условиях, благоприятствующих ее росту. Благоприятные условия включают высокую влажность и высокую температуру. Известно как минимум 13 различных природных типов афлатоксинов, большинство из которых является высокотоксичными и канцерогенными. Наиболее токсичным считается афлатоксин В₁. Лекарственное растительное сырье, склонное к контаминации афлатоксинами, испытывают по валидированной методике.

Представленная в данной общей фармакопейной статье методика подходит для определения содержания афлатоксина В₁ в имбиря корневищах, сенны плодах и гарпагофитума корнях.

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

Содержание афлатоксина В₁ должно составлять не более чем 2 ppb при отсутствии других указаний в частной фармакопейной статье.

Также уполномоченным органом может быть установлено предельное содержание суммы афлатоксинов В₁, В₂, G₁ и G₂ не более 4 ppb.

МЕТОДИКА

Жидкостная хроматография (2.1.2.28).

Афлатоксины подвержены деструкции при воздействии света. Растворы, содержащие афлатоксины необходимо защищать от воздействия дневного света.

Определение проводят с защитой от дневного света, закрывая окна пленкой, поглощающей ультрафиолетовое излучение, и используя приглушенное освещение. Допускается проводить испытание при закрытых жалюзи или шторах при искусственном освещении (допустимо использование флуоресцентных ламп).

Всю посуду перед использованием ополаскивают 10 % (об/об) раствором серной кислоты Р и затем тщательно промывают водой дистиллированной Р до отсутствия следов кислоты (проверяют с помощью индикаторных полосок для определения pH).

Испытуемый раствор. Используют иммуноаффинную колонку, содержащую антитела к афлатоксину В₁ с емкостью не менее 100 нг афлатоксина В₁ и обеспечивающую открываемость не менее 80 % при прохождении через нее раствора 5 нг афлатоксина В₁ в смеси из 12,5 мл метанола Р и 87,5 мл воды Р. К 5,00 г измельченного испытуемого образца (500) (2.1.9.30) прибавляют 100,0 мл (V₁) смеси 30 объемов воды Р и 70 объемов метанола Р и экстрагируют при воздействии ультразвука в течение 30 мин. Фильтруют через

складчатый бумажный фильтр. 10,0 мл (V_i) прозрачного фильтрата переносят в коническую колбу вместимостью 150 мл и прибавляют 70 мл *воды Р*. 40,0 мл полученного раствора 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 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 пропуская через колонку воздух 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 мерную колбу вместимостью 5 мл (V_2). Через 1 мин вносят вторую порцию *метанола Р* объемом 0,5 мл, а еще через 1 мин вносят третью порцию *метанола Р* объемом 0,5 мл. Собирают элюат при помощи пропускания через колонку воздуха или при помощи вакуума. Объединенные элюаты доводят *водой Р* до объема 5,0 мл и тщательно перемешивают. 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 афлатоксины.

Первичный основной раствор афлатоксина В₁. Афлатоксин В₁ *Р* растворяют в смеси из 2 объемов *ацетонитрила Р* и 98 объемов *толуола Р* для получения раствора с концентрацией 10 мкг/мл. Для определения точной концентрации афлатоксина В₁ в основном растворе снимают спектр поглощения (2.1.2.24) в диапазоне длин волн от 330 нм до 370 нм с использованием кварцевых кювет. Концентрацию афлатоксина В₁ в микрограммах на миллилитр рассчитывают по формуле:

$$\frac{A \times M \times 100}{\varepsilon \times l}$$

где: A — оптическая плотность в максимуме полученного спектра;
 M — молярная масса афлатоксина В₁ (312 г/моль);
 ε — молярный коэффициент поглощения афлатоксина В₁ в смеси *толуол – ацетонитрил* (1930 м²/моль);
 l — длина оптического пути (1 см).

Вторичный основной раствор афлатоксина В₁. Вторичный основной раствор, содержащий 100 нг/мл афлатоксина В₁, готовят разведением первичного основного раствора афлатоксина В₁ смесью *ацетонитрил Р – толуол Р* (2:98 об/об). Колбу с содержимым тщательно обертывают алюминиевой фольгой и хранят при температуре ниже 4 °С. Перед использованием содержимого колбы алюминиевую фольгу не удаляют, пока содержимое не достигнет температуры от 15 °С до 25 °С. Если раствор хранится в течение длительного периода времени (например, 1 мес.), взвешивают колбу с содержимым и записывают массу перед и после каждого использования раствора.

Стандартные растворы афлатоксина В₁. В мерные колбы вместимостью 250 мл помещают объемы вторичного основного раствора афлатоксина В₁, указанные в таблице 2.1.8.XX.-1. Пропускают поток азота при температуре от 15 °С до 25 °С до практически полного испарения растворителя. В каждую колбу прибавляют 75 мл *метанола Р*, дают афлатоксину В₁ раствориться и доводят *водой Р* до объема 250,0 мл.

Таблица 2.1.8.XX.-1. – *Стандартные растворы афлатоксина В₁*

Стандартный раствор	Объем вторичного основного раствора, мкл	Конечная концентрация стандартного раствора, нг/мл
1	125	0,05
2	250	0,1
3	500	0,2
4	750	0,3

5	1000	0,4
---	------	-----

Калибровочный график. Строят калибровочный график зависимости сигнала от концентрации афлатоксина В₁ (в нанограммах на миллилитр) в стандартных растворах 1 – 5 (охватывает диапазон, эквивалентный содержанию афлатоксина В₁ в испытуемом образце 1–8 ppb) и проверяют его линейность. Если содержание афлатоксина В₁ в испытуемом образце выходит за пределы калибровочного диапазона, испытуемый раствор должен быть разведен до достижения подходящей концентрации.

Условия хроматографирования:

– колонка: длиной 0,25 м и внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная *силикагелем октадецилсилильным* для хроматографии Р с размером частиц 5 мкм;

– подвижные фазы:

– подвижная фаза А (для постколоночной дериватизации с фотохимическим реактором или пиридиния бромидом): *ацетонитрил Р – метанол Р – вода Р (2:3:6 об/об/об)*;

– подвижная фаза Б (для постколоночной дериватизации с бромом, получаемым электрохимически): 0,12 г *калия бромида Р* и 350 мкл *азотной кислоты разбавленной Р1* прибавляют к 1 л подвижной фазы А;

– скорость подвижной фазы: 1 мл/мин;

– детектор: флуоресцентный; рекомендуемые настройки – 365 нм (длина волны возбуждения) и 435 нм (длина волны эмиссии);

– объем вводимой пробы: 500 мкл.

Условия постколоночной дериватизации с пиридиния гидробромидом пербромидом:

– безимпульсный насос;

– тройник с нулевым мертвым объемом;

– политетрафторэтиленовая реакционная трубка длиной 0,45 м и внутренним диаметром 0,5 мм;

– подвижная фаза А;

– постколоночный дериватизирующий реактив: 50 мг *пиридиния гидробромида пербромида Р* растворяют в 1000 мл *воды Р* (хранят с защитой от света и используют в течение 4 сут);

– скорость потока дериватизирующего реактива: 0,4 мл/мин.

Условия постколоночной дериватизации с использованием фотохимического реактора:

– реактор с одной ртутной ультрафиолетовой лампой низкого давления с максимальной интенсивностью при длине волны 254 нм (мощностью не менее 8 Вт);

– полированная пластина-держатель;

– витой реактор: политетрафторэтиленовая трубка, плотно намотанная вокруг ультрафиолетовой лампы, длиной 25 м, внутренним диаметром 0,25 мм и номинальным свободным объемом 1,25 мл;

– время экспозиции: 2 мин;

– подвижная фаза А.

Условия постколоночной дериватизации с бромом, получаемым электрохимически:

– электрохимическая ячейка, генерирующая реактивную форму брома для дериватизации афлатоксинов, выражающуюся в усилении флуоресценции; доступна из разных коммерческих источников;

– источник постоянного тока, соединенный с электрохимической ячейкой, дающий постоянный ток в 100 мкА;

– политетрафторэтиленовая реакторная трубка длиной 0,12 м, внутренним диаметром 0,25 мм;

– подвижная фаза Б.

Порядок элюирования веществ: афлатоксин G₂, афлатоксин G₁, афлатоксин В₂,

афлатоксин В₁.

Расчеты. Рассчитывают уравнение линейной зависимости вида $y=ax+b$. Концентрация афлатоксина В₁ в испытуемом растворе равна $\frac{S-b}{a}$, где S – измеренный сигнал для испытуемого раствора.

Содержание афлатоксина В₁ в испытуемом образце (в ррб) 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 растворителя, использованный для экстракции, в миллилитрах;
 V_i – объем раствора, взятый для иммуноаффинной очистки, в миллилитрах;
 V_2 – объем раствора после элюирования с иммуноаффинной колонки и разведения в миллилитрах;
 C – найденная концентрация афлатоксина В₁ в испытуемом растворе в нанogramмах на миллилитр.

Присутствие афлатоксина В₁ в испытуемом образце может быть подтверждено с помощью хроматограмм без постколоночной дериватизации, но следует учесть, что это приводит к значительному снижению сигнала афлатоксина В₁ (более чем в 10 раз).