MERCOSUR/GMC/P.RES. Nº 19/23 REV. 01

FARMACOPEA MERCOSUR: DETERMINACIÓN DE AFLATOXINAS

VISTO: El Tratado de Asunción, el Protocolo de Ouro Preto y las Resoluciones N° 31/11 y 22/14 del Grupo Mercado Común.

CONSIDERANDO:

Que la Farmacopea MERCOSUR tiene como objetivo establecer los requisitos mínimos de calidad y seguridad de los insumos para la salud, especialmente de los medicamentos, apoyando las acciones de reglamentación sanitaria y promoviendo el desarrollo técnico, científico y tecnológico regional.

Que las especificaciones farmacopeicas establecen, por medio de monografías, requisitos mínimos para el control de seguridad y calidad de los insumos, especialidades farmacéuticas, plantas medicinales y derivados producidos o utilizados en los Estados Partes.

Que las especificaciones farmacopeicas son utilizadas como parámetro para las acciones de vigilancia sanitaria, incluyendo el registro de medicamentos, inspecciones y análisis de laboratorio.

Que la Farmacopea MERCOSUR y la producción de patrones propios de calidad favorecen al desarrollo científico y tecnológico de los Estados Partes, contribuyendo a la disminución de la dependencia de proveedores extranjeros y promoviendo a la industria regional.

Que la Farmacopea MERCOSUR debe ser primordialmente sanitaria, con énfasis en la salud pública, y presentar una metodología analítica accesible a los Estados Partes, buscando su reconocimiento y respetabilidad internacional.

Que el diálogo regulatorio y la integración entre los Estados Partes promueven el acceso de la población a medicamentos con mayor calidad y seguridad.

Que el Acuerdo Nº 08/11 de la Reunión de Ministros de Salud del MERCOSUR constituye un marco de referencia para la Farmacopea MERCOSUR.

EL GRUPO MERCADO COMUM
RESUELVE:

Art. 1 - Aprobar, en el marco de lo establecido en la Resolución GMC N° 22/14, el método general “Farmacopea MERCOSUR: Determinación de aflatoxinas”, que consta como Anexo y forma parte de la presente Resolución.

Art. 2 - Los Estados Partes indicarán, en el ámbito del Subgrupo de Trabajo Nº 11 “Salud” (SGT N° 11), los organismos nacionales competentes para la implementación de la presente Resolución.

Art. 3 - Esta Resolución deberá ser incorporada al ordenamiento jurídico de los Estados Partes antes de 29/XII/2023.

LX GMC EXT.- Puerto Iguazú, 02/VII/23.

ANEXO

DETERMINACIÓN DE AFLATOXINAS

Las aflatoxinas son muy tóxicas. Manejar con cuidado extremo.
Las aflatoxinas son fotosensibles. Proteger de la luz las soluciones patrón y muestras.

Método: Determinación por cromatografía líquida de alta eficiencia.

Proceder según lo descripto en la Resolución GMC Nº 34/22 “Farmacopea MERCOSUR: Cromatografía”.

Sistema cromatográfico: Utilizar un equipo para cromatografía líquida de alta eficiencia con detección por fluorescencia (HPLC-FLU), recomendado para las siguientes drogas vegetales, sus preparados y derivados: ginseng, jengibre, uña de gato y las vainas de sen, con la excepción de que para otras matrices el método sea evaluado, adaptado y validado.

Solución primaria de aflatoxina B1*:* Disolver Aflatoxina B1 R (AFB1) en acetonitrilo:tolueno (2:98) para obtener una solución de 10 µg/mL. Para determinar la concentración exacta de AFB1 en la solución madre, registrar la curva de absorción entre 330 y 370 nm en celda de cuarzo. Calcular la concentración de AFB1 en µg/mL, usando de la siguiente fórmula:

$$C = \frac{A \times P \times 100}{\varepsilon \times l}$$

Donde
A = absorbancia medida en lo máximo de la curva de absorción
P = peso molecular de AFB1 (312 g/mol)
ε = absortividad molar de AFB1 en la mezcla acetonitrilo/tolueno (1930 m^2 / mol)
l = longitud del camino óptico de la cubeta (1 cm)

Solución secundaria de AFB1: Preparar la solución secundaria que contenga 100 ng/mL de AFB1 diluyendo de la solución madre primaria con acetonitrilo:tolueno (2:98). Proteger el frasco de la solución con papel de aluminio y esperar a que el contenido alcance la temperatura ambiente. Si la solución fuera almacenada por un período largo (por ejemplo, un mes), pesar la botella y registrar la masa antes de cada uso de la solución.

Soluciones estándar de AFB1: Transferir los volúmenes de *Solución secundaria de AFB1* indicados en la Tabla 2 a matraces aforados de 250 mL. Evaporar el solvente bajo corriente de nitrógeno a temperatura ambiente. En cada matraz, añadir 75 mL de metanol, homogeneizar y completar a volumen con agua.

Tabla 2 - Soluciones de aflatoxina B1 para preparación de la curva analítica

Solución estándar de AFB1	Volumen de la solución secundaria (µL)	Concentración final de AFB1 en la solución estándar (ng/mL)
1	125	0,05
2	250	0,1
3	500	0,2
4	750	0,3
5	1000	0,4

Curva analítica: Preparar la curva de calibración utilizando las soluciones estándar AFB1 1 a 5, que cubre un rango de concentración de 1 a 8 µg/kg de AFB1 en la droga vegetal. Verificar si la curva tiene la linealidad adecuada. Si el contenido de AFB1 de la muestra a ser examinada se encuentra fuera del rango de la curva de calibración, la solución muestra debe ser diluida hasta que el contenido de aflatoxinas sea adecuado para la curva de calibración establecida**.**

Columna: C18, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm.

Fases Móviles

A (para la derivatización post-columna con reactor fotoquímico o bromuro de piridinio):acetonitrilo:metanol:agua (2:3:6 v/v/v);

B (para derivatización post-columna bromuro generado electroquímicamente): agregar 0,12 g de bromuro de potasio y 350 mL de ácido nítrico diluido R1 por litro de fase móvil A.
Flujo: 1,0 mL/min.

Detección: Detector de fluorescencia (filtro de excitación a 360 nm y filtro de emisión a 420 nm). Si se emplea detector de longitud de onda variable, emplear 365 nm para excitación y 435 nm para emisión.

Derivatización post-columna con bromuro de perbromato de piridinio (PBPB por su sigla en inglés**):**
- bomba peristáltica;
- T con volumen muerto igual a cero (0);
- tubo de reacción de teflón (PTFE) (longitud = 0,45 m, diámetro = 0,5 mm);
- fase móvil A;
- reactivo de post-derivatización: disolver 50 mg de PBPB en 1.000 mL de agua (proteger de la luz y usar hasta en cuatro (4) días);
- flujo del reactivo de derivatización: 0,4 mL/min.

Derivatización post-columna con reactor fotoquímico (PHRED por su sigla en inglés**):**
- reactor con lámpara de bulbo de mercurio de baja presión (mínimo de 8 W) a 254 nm;
- placa de soporte pulida;
- bobina de reacción: tubo de PTFE firmemente enrollado en torno al bulbo de UV, longitud = 25 cm y diámetro = 0,25 mm, volumen muerto nominal de 1,25 mL;

- tiempo de exposición = 2 min;
- fase móvil A.

Derivatización post-columna con bromo generado electroquímicamente):

- Celda electroquímica que genera una forma reactiva de bromo para derivatización de la aflatoxina, resultando en la intensificación de la fluorescencia;
- fuente de corriente continua en serie con la celda electroquímica que genera una forma reactiva de bromo para derivatización de la aflatoxina que proporciona corriente constante de aproximadamente 100 µA;
- tubo de reacción PTFE, longitud = 0,12 cm y diámetro = 0,25 mm;
- fase móvil B.

Columna de inmunoafinidad (IAC por su sigla en inglés**):** Emplear una columna de inmunoafinidad conteniendo anticuerpos contra aflatoxina B1, con capacidad de no menos 100 ng de AFB1 y que debe tener una recuperación de por lo menos 80% cuando se aplica una solución de 5 ng de AFB1 con una mezcla metanol:agua (12,5:87,5). Acondicionar la IAC a temperatura ambiente.

Procedimiento: A 5 g de material vegetal seco y pulverizado añadir 100 mL de agua:metanol (30:70) y extraer por sonicación durante 30 minutos. Filtrar a través de papel de filtro plegado. Transferir 10 mL del filtrado claro a un erlenmeyer de 150 mL. Añadir 70 mL de agua. Pasar 40 mL a través de una IAC a un flujo aproximado de 3 mL/min (no exceder de 5 mL/min). Lavar la columna con 2 volúmenes de 10 mL de agua a un flujo que no exceda de 5 mL/min. Secar la IAC usando vacío suave durante 5 a 10 segundos o pasar aire con una jeringa, durante 10 segundos. Aplicar 0,5 mL de metanol en la parte superior de la columna y eluir por gravedad. Recolectar el eluido en un matraz aforado de 5 mL. Después de 1 minuto aplicar otros 0,5 mL de metanol. Después de 1 minuto, aplicar una tercera porción de 0,5 mL de metanol en la parte superior de la columna. Recolectar la mayor parte del disolvente aplicando presión con aire comprimido en la parte superior de la columna o usando vacío suave. Completar a volumen con agua y agitar bien. Si la solución es transparente, se puede utilizar directamente; de lo contrario, pasar la solución a través de un filtro antes del análisis. Utilizar un filtro desechable (por ejemplo, filtro de politetrafluoroetileno con un tamaño de poro de 0,45 µm) que no causa la pérdida de las aflatoxinas por la retención. Proceder a la derivatización de la muestra a analizar por HPLC-FLU para mejorar la fluorescencia de las aflatoxinas.

Volumen de inyección: 500 µL.

Orden de elución: AFG2, AFG1, AFB2 y AFB1.

Cálculo: Determinar la ecuación de la curva analítica (y = ax + b) con la concentración de AFB1 (ng/mL) en el eje x y la señal (S) en el eje y. La concentración de AFB1 en la solución muestra es igual a:

$$C = \frac{S - b}{a}$$

Calcular el contenido de AFB1 en la droga vegetal, en ng/g, usando la siguiente expresión:

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

Donde
m = masa de droga vegetal, en g
V1 = volumen del solvente usado en la extracción, en mL
Vi = alícuota utilizada en la IAC, en mL
V2 = volumen final de la solución después de la elución de la IAC y la dilución, en mL
C = concentración de AFB1 en la solución muestra en ng/mL

La presencia de AFB1 puede ser confirmada mediante el registro de un cromatograma sin derivatización post-columna que resulta en una reducción significativa (mayor a 10 veces) en la respuesta de AFB1.

Criterios de aceptación: Los límites máximos aceptados son, para drogas vegetales, no contener más de 2 µg/kg de aflatoxina B1 y un límite de 4 µg/kg para la suma de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2, excepto cuando se especifican otros valores en una monografía individual.