

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 N° 08/11 de la Reunión de Ministros de Salud del MERCOSUR constituye un marco de referencia para la Farmacopea MERCOSUR.

**EL GRUPO MERCADO COMÚN
RESUELVE:**

Art. 1 - Aprobar, en el marco de lo establecido en la Resolución GMC N° 22/14, la monografía "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 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...

XLIII SGT N° 11 – Brasilia, 10/IV/15.

ANEXO

Método General para AFLATOXINAS

**Las aflatoxinas son muy tóxicas. Manejar con cuidado extremo.
Las aflatoxinas son fotosensibles, trabajar al abrigo de la luz.**

Método I

Proceder según lo descrito para *Cromatografía en capa fina* en los *Métodos Generales*.

Determinación de las aflatoxinas mediante cromatografía en capa fina (TLC). Este método puede ser utilizado para detectar la posible presencia de aflatoxinas en drogas vegetales y derivados en los que la monografía no recomienda otro método específico.

Fase estacionaria: sílica gel GF₂₅₄ con 0,25 mm de espesor

Fase Móvil: CHCl₃:Acetona 9:1 (v/v)

Revelador: UV 360-365 nm; solución de ácido sulfúrico 30% (v/v).

Solución Tampón de fosfato pH 7.4: Colocar 1,0 g de cloruro de potasio, 1,0 g de fosfato de potasio monobásico, 5,8 g de fosfato de sodio dibásico anhidro y 40,0 g de cloruro de sodio en un matraz **aforado** de 5 litros. Añadir aproximadamente 4,5 litros de agua y disolver. Ajustar a pH a 7,4 con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. Enrasar con agua y volver a calibrar el pH.

Solución madre de aflatoxinas: Disolver el contenido del estándar de aflatoxina en una mezcla de benceno y acetonitrilo 98:2 (v/v). Diluir cuantitativamente con el mismo disolvente para obtener soluciones con una concentración de 8 a 10 microgramos por ml de cada aflatoxina. Agite la solución durante 1 minuto. Determinar la absorbancia de cada solución a $\lambda=350\text{nm}$ en un espectrofotómetro adecuado, utilizando una mezcla de benceno y acetonitrilo 98:02 (v / v) como blanco. Calcular la concentración de aflatoxina de los mismos en mg / ml, usando la siguiente fórmula:

$$1.000 AP/\epsilon$$

dónde:

P = peso molecular de la aflatoxina

ϵ = absortividad molar de la aflatoxina en el disolvente correspondiente.

A= absorbancia de la solución

Estos valores se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1.

Aflatoxina	P (peso molecular)	ϵ (absortividad molar)
B1	312	19.800
B2	314	20.900
G1	328	17.100
G2	330	18.200

Solución patrón: Transferir alícuotas de 3 ml de cada una de las soluciones madre de aflatoxinas preparadas anteriormente a tubos con tapón. Agregar cantidades suficientes de benceno:acetonitrilo (98:2) para obtener soluciones de 1 µg / mL B1, 0,5 µg/mL B2, 1 µg/mL de G1 y 0,5 µg/mL G2.

Preparación de la solución muestra.

Columna:

Columna de inmunoafinidad (IaC) con anticuerpos monoclonales específicos para la aflatoxina.

Solvente de extracción: Disolver 5 g de cloruro de sodio en 200 ml de metanol / agua 70:30 (v / v).

Procedimiento:

Transferir 25 g de la muestra pesados exactamente, molida y tamizada por el tamiz N° 20, a un matraz de 500 mL. Agregar la cantidad suficiente de solvente de extracción para humedecer la muestra. Agitar con agitador mecánico durante 1 hora. Filtrar y recoger el filtrado en un Erlenmeyer de 250 mL. Transferir 80,0 ml del extracto, medidos exactamente, en un matraz de 250 mL, añadir 160 mL de solución tampón de fosfato pH 7,4. Agitar y filtrar por membrana de porosidad entre 0,8 a 1,6 micrones de diámetro de poro. Sembrar 120 mL del filtrado (equivalente a 5 g de la muestra) en la columna de afinidad, manteniendo una velocidad de flujo de 1-2 gotas por segundo, teniendo la precaución que la columna no se seque. Lavar la columna con 20 mL de solución tampón y secar haciendo pasar aire a través de la columna con una jeringa. Descartar el líquido de lavado. Eluir las aflatoxinas lentamente por gravedad de la columna con 2 mL de metanol. Recoger el eluido en un balón de 25 mL con un pequeño reservorio en la parte inferior, previamente pesado con exactitud. Secar usando evaporador rotatorio a 60 °C. Pesar para obtener el peso del residuo. Disolver el residuo en 100 µl de una mezcla de benceno:acetonitrilo (98:2) (v/v)

Solución fortificada con solución patrón: Mezclar 10 µl de la solución de la muestra con 4 µl de la solución patrón.

Análisis de aflatoxinas

Procedimiento: Aplicar por separado 10 microlitros de la solución de la muestra, 2, 4 y 6 microlitros de la solución estándar y 10 microlitros de la solución fortificada. Secar y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del disolvente se desplazarse unos 11 cm. Retirar la placa de la cámara para marcar el frente del solvente. Secar la placa al aire, protegido de la luz. Examinar la placa bajo luz UV a $\lambda=360$ nm: las aflatoxinas B1 y B2 aparecen como manchas azules y G1 y G2 como manchas verdes. Los valores de RF son aproximadamente: 0,4 a G2, G1 a 0,5, 0,6 a 0,7 para B2 y B1. Para confirmar, rociar la placa con revelador. Dejar secar en la oscuridad y ver la luz ultravioleta a $\lambda=360$ nm: las cuatro aflatoxinas se observan como manchas amarillas. Cálculo de la concentración de aflatoxinas de cada uno en mg / kg, parte de la muestra tomada por la fórmula

$$(PCV) / (Sm)$$

Donde P es el volumen en µL, solución estándar, C es la concentración de la solución patrón de aflatoxina (G1, B1 y 1 µg / ml G2, y B2 y 0,5 µg / ml), V es el

volumen en μL , la solución final del residuo, S es el volumen de solución de la muestra es el peso en g del residuo.

Criterios de Aceptación: Ausencia de manchas en la solución de la muestra en las áreas donde se observan las manchas de la solución patrón de aflatoxina. Si se observa alguna mancha en la solución de la muestra, comprobar la correspondencia con alguna mancha fluorescente de solución de aflatoxina para identificar esta aflatoxina. La intensidad de la mancha de la aflatoxina, si está presente en la solución de muestra, se compara con la intensidad de la mancha correspondiente de aflatoxina en la solución patrón, obteniéndose la concentración aproximada de las aflatoxinas en la de muestra. Máximos aceptados: son menor a $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ AFB1 y para la suma de menor a $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2, a menos que se recomiendan otros valores en la monografía específica.

Método II

Determinación de aflatoxinas por cromatografía líquida de alta eficiencia con detección por fluorescencia (HPLC-FLU), recomendado para esta droga y derivados del ginseng, jengibre, raíz de la uña y las vainas de sen, con la excepción de que para otras matrices el método sea evaluado finalmente adaptado y validado.

Solución madre primaria de aflatoxinas: Disolver AFB1 R en acetonitrilo / tolueno 02:98 para obtener una concentración de 10 µg/mL. Para determinar la concentración exacta de AFB1 en la solución madre, registrar la curva de absorción entre 330-370 nm en la celda de cuarzo. Calcular la concentración de AFB1 en microgramos por mililitro mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$C = (A.M.100)/\epsilon.l$$

Donde máximo A = absorbancia medida de la curva de absorción; M = masa molar de AFB1 (312 g / mol); ϵ = absorptividad molar de AFB1 en la mezcla acetonitrilo / tolueno (1.930 m² / mol); l = longitud del camino óptico de la cubeta (1 cm).

Solución secundaria ABF1: Preparar la solución secundaria que contenga 100 ng AFB1/ ml diluyendo de la solución madre primaria con acetonitrilo / tolueno 02:98. Envolver el matraz la solución con papel de aluminio y esperar que el contenido alcance la temperatura ambiente. Si la solución se almacenó durante un período largo (por ejemplo, 1 mes), pesar la botella y registra la masa antes de cada uso de la solución.

Soluciones estándar de aflatoxina: Transferir los volúmenes de solución secundaria de aflatoxinas que se indican en la Tabla 2 para matraces aforados separadas. Evaporar El solvente bajo corriente de nitrógeno. En cada matraz, añadir 75 ml de metanol, esperar disolución total y completar hasta 250 ml con agua.

Tabla 2 – Solución de aflatoxina B1 para preparación de la curva analítica.

Solución Patrón	Volumen de la solución secundaria (µl)	Concentración final de AFB1 en la solución patrón (µl/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 soluciones estándar AfB1 1 a 5, que cubre un rango de concentración de 8.1 µg / kg de aflatoxina B1 en droga vegetal. Comprobar si la curva tiene la linealidad adecuada. Si el contenido de AFB1 de la muestra bajo examen se encuentra fuera del rango de calibración, la solución de ensayo 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 pos-columna con reactor fotoquímico, bromuro de piridinio): acetonitrilo/metanol/agua (2:3:6 v/v/v);

B (para derivatización post-columna electroquímica con bromuro): 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 $\lambda=360$ nm y filtro de emisión a $\lambda=420$ nm). Si se emplea detector de longitud de onda variable, emplear $\lambda=365$ nm para excitación y $\lambda=435$ nm para emisión.

Derivatización post-columna con bromuro de perbromato de piridinio (PBPB):

- bomba peristáltica;
- T con volumen muerto=0;
- tubo de reacción de teflón (PTFE) (l = 0,45 m, di = 0,5 mm);
- fase móvil A;
- reactivo de post-derivatización: disolver 50 mg de PBPB en 1000 ml de agua (proteger de la luz y usar hasta en 4 días);
- Flujo del reactivo de derivatización: 0,4 ml/min.

Derivatización post-columna con reactor fotoquímico (PHRED):

- 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 do bulbo de UV, l = 25 cm e di = 0,25 mm, volumen muerto nominal de 1,25 ml;
- tempo de exposición = 2 min;
- fase móvil A.

Derivación post-columna con bromo generado electroquímicamente (KOBRA):

- KOBRA-cell: celda electroquímica que genera una forma reactiva de bromo para derivatización de la aflatoxina, resultando en la mejora de la fluorescencia;
- fuente de corriente continua en serie con la célula KOBRA que proporciona corriente constante de alrededor de 100 μ A;
- Tubo de reacción PTFE l = 0,12 cm y c = 0,25 mm;
- Fase móvil B;

Columna de inmunoafinidad (IAC).

Emplear una columna de inmunoafinidad conteniendo anticuerpos contra aflatoxina B con capacidad de no menos 100ng de afb1 y que debe tener una recuperación de por lo menos 80% cuando se aplica con una mezcla metanol/agua(12,5:87,5).

Acondicionar la IAC a temperatura ambiente

A 5 g de material vegetal en polvo seco añadir 100 ml de agua:metanol 30:70. Se extrae sonicando durante 30 minutos. Se filtra a través de papel de filtro plegado. Pipetear 10 ml del filtrado claro a un erlenmeyer de 150 ml. Añadir 70 ml de agua. Pasar a través de 40 ml columna de inmunoafinidad (IAC) a una velocidad de flujo de 3 ml / min (no más de 5 ml / min). Lavar la columna con 2 volúmenes de 10 ml de agua a una velocidad no superior a 5 ml / min. Secar el IAC usando vacío suave durante 5-10 segundos o pasar el aire con una jeringa, durante 10 segundos. Aplicar 0,5 ml de metanol en la parte superior de la columna y eluir por gravedad. Recoger el eluido en un matraz aforado de 5 ml. Después de 1 min, se aplicarán otros 0,5 ml de metanol y 1 min, después se aplica de un tercio metanol del volumen total de metanol a emplear. Recoger la mayor parte del disolvente aplicada con presión de aire comprimido en la parte superior de la columna o usando vacío suave. Diluir hasta 5 ml con agua y agitar bien. Si la solución es transparente, se puede utilizar

directamente. De lo contrario, pasar la solución filtrar antes del análisis. Utilizar una unidad de filtro desechable (por ejemplo, filtro de politetrafluoroetileno con un tamaño de poro de 0,45 micras) que no causa la pérdida de la retención por las aflatoxinas.

Volumen de inyección: 500 µl.

Orden de elución: AFG2, AFG1, AFB2 e 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 medida es igual a

$$(S-b)/a.$$

Calcule el tenor de AFB1 en la droga vegetal, en ng/g, usando a siguiente expresión:

$$(V_1 \cdot V_2 \cdot C)/(m \cdot V_i)$$

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

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