

MICOTOX LTDA



**DETERMINACION DE AFLATOXINAS
EN CEREALES Y ALIMENTO
TERMINADO POR CROMATOGRAFIA
LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA
(HPLC)**

MÉTODO OFICIAL AOAC 994.08
NORMA ICONTEC NTC 1232

EXTRACCION

1. Pesar 50 g de muestra molida en un vaso de licuadora de vidrio de 250 mL o en un Erlenmeyer de 250 mL con tapa rosca.
2. Añadir 100 mL de acetonitrilo-agua, 84+16.
3. Homogenizar a alta velocidad durante 2 minutos (licuadora) o agitar vigorosamente durante una hora usando un agitador mecánico.
4. Filtrar a través de papel cualitativo rápido y transferir cerca de 5 mL del extracto a un tubo de ensayo de 15 x 85 mm.

PURIFICACION

5. Insertar el extremo con el tapón de caucho de un cartucho Micotox® M2004 en el tubo de ensayo y presionar hasta obtener aproximadamente 0.5 mL de solución purificada al interior del cartucho (para mayor limpieza usar un cartucho M2006, dependiendo del sustrato).

DERIVATIZACION

6. Transferir exactamente 200 µL del extracto purificado a un vial de 1.5 mL y adicionar 700 µL de reactivo de derivatización (ácido trifluoroacético-ácido acético-agua, 2+1+7). Tapar el vial y agitar en vórtex.
7. Calentar a $\geq 65^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos en baño termostático.
8. Dejar enfriar e inyectar 50 µL en el cromatógrafo de líquidos.

CONDICIONES CROMATOGRAFICAS

- Columna: RP-18 de 12.5 cm x 4 mm.
- Fase móvil: Mezcla isocrática de agua-metanol (60+40).
- Flujo: 0.8 mL/min.
- Detector de fluorescencia de longitudes de onda variables. Excitación: 365 nm, emisión: 450 nm.
- Orden de elución y tiempos de retención aproximados: aflatoxina G₁ (AFG₁, 4.1 min), aflatoxina B₁ (AFB₁, 6.4 min), aflatoxina G₂ (AFG₂, 8.6 min) y aflatoxina B₂ (AFB₂, 15.0 min).

CALIBRACION

9. Derivatizar 200 µL de solución estándar de calibración con 700 µL de reactivo de derivatización como se indica en el paso 6 e inyectar 50 µL en el cromatógrafo de líquidos. La solución estándar de calibración contiene 25 ng/mL de AFB₁, 25 ng/mL de AFG₁, 7.5 ng/mL de AFB₂ y 7.5 ng/mL de AFG₂, en acetonitrilo (solución concentrada 10X disponible en Micotox Ltda.).

10. Calibrar el integrador del HPLC usando el método de calibración con estándar externo.

CALCULOS

Se toman 50 g de muestra en 100 mL de solvente; del extracto se toman 200 µL a los cuales se añaden 700 µL de reactivo de derivatización. Se inyectan 50 µL de la mezcla en el HPLC.

Equivalente en peso de la muestra inyectada:

$$50 \text{ g} \times 0.2/100 \text{ mL} \times 0.05/0.9 \text{ mL} = 0.005555 \text{ g}$$

$$\text{ng/g (ppb)} = \frac{\text{ng de toxina inyectados}}{0.005555 \text{ g}}$$

**Cantidad de estándar de aflatoxinas
inyectado en el HPLC (ng):**

Vol. µL	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
50	0.2778	0.0833	0.2778	0.0833

**Equivalente en ppb del estándar de aflatoxinas
inyectado en el HPLC (ng/g):**

Vol. µL	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
50	50	15	50	15

Límite de detección: <1 ppb de cada aflatoxina.

Límite de cuantificación: 1 ppb de cada aflatoxina.

CONFIRMACION

La identidad de las aflatoxinas B₁ y G₁ puede confirmarse inyectando una alícuota de 200 µL del extracto purificado diluida con 700 µL de fase móvil. Si la muestra contiene AFB₁ y/o AFG₁, los picos correspondientes a las aflatoxinas B₁ y G₁ deben desaparecer.

AFLATOXINAS HPLC