

# MICOTOX LTDA



**DETERMINACION DE OCRATOXINA A  
EN CAFE VERDE, TOSTADO Y SOLUBLE  
POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE  
ALTA EFICIENCIA (HPLC)**

## EXTRACCION

1. Pesar 5 g de muestra molida en un vaso de licuadora de vidrio de 200 mL.
2. Añadir 100 mL de bicarbonato de sodio al 1% en agua.
3. Homogenizar durante 2 minutos a alta velocidad.
4. Filtrar a través de papel de filtro cuantitativo (Por ej. S&S 589-3) doblado en abanico y coleccionar al menos 20 mL del filtrado.
5. Pipetear 20 mL del filtrado y diluir con 20 mL de PBS (solución salina buferada).

## LIMPIEZA

6. Acondicionar una columna de inmunoafinidad para ocratoxina A (Micotox Ltda.) pasándole 10 mL de PBS. NOTA: Colocar la columna en un soporte convencional para columnas de fase sólida y empatar en la parte superior de la misma una jeringa plástica de 50 mL de capacidad.

7. Pasar los 40 mL del extracto diluido a través de la columna de inmunoafinidad cuidando de no pasar más de 2-3 mL por minuto.
8. Una vez hayan pasado los 40 mL del extracto diluido, lavar con 20 mL de agua a un flujo aproximado de 5 mL/min.
9. Secar la columna mediante vacío para retirar cualquier residuo de agua.
10. Eluir la ocratoxina A con 4 mL de metanol grado HPLC en un vial de fondo cónico de 5 mL. NOTA: Permitir que el metanol hidrate completamente el gel durante 2 a 3 minutos antes de eluir la ocratoxina.
11. Evaporar el eluato a sequedad bajo nitrógeno o usando un baño termostático a 60°C y una bomba de vacío.
12. Disolver el residuo seco con 1 mL de fase móvil, filtrar a través de membrana de 0.45 µm e inyectar 50 µL en el cromatógrafo de líquidos.

## CONDICIONES CROMATOGRAFICAS

- Columna: RP-18 de 12.5 cm x 4 mm.
- Temperatura: 40°C.
- Fase móvil: mezcla isocrática de acetonitrilo-agua-ácido acético (50+50+1).
- Flujo: 0.6 mL/min.
- Detector de fluorescencia de longitudes de onda variables. Excitación: 330 nm, emisión: 475 nm.
- Tiempo de retención aproximado: 7.7 min.

## CALIBRACION

13. Pipetear 20 µL de solución estándar de calibración en un vial de automuestreador y añadir 980 µL de fase móvil. La solución estándar contiene 1.0 µg/mL de ocratoxina A en metanol (solución concentrada 10X disponible en Micotox Ltda.). La solución final de calibración contiene 20 ng/mL de ocratoxina A. Inyectar 50 µL (1.0 ng) en el HPLC.
14. Calibrar el integrador del HPLC usando el método de calibración con estándar externo.

## CALCULOS

Se toman 5 g de muestra y se añaden 100 mL de solvente; del extracto se toman 20 mL para purificación. El eluato seco se redissuelve con 1.0 mL, del cual se inyectan 50 µL en el cromatógrafo.

Equivalente en peso de la muestra inyectada:

$$5 \text{ g} \times 20/100 \text{ mL} \times 0.05/1.0 \text{ mL} = 0.05 \text{ g}$$

$$\text{ng/g (ppb)} = \frac{\text{ng de toxina inyectados}}{0.05 \text{ g}}$$

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

Vol. (µL)	OCRATOXINA A
50	<b>1.0 ng</b>

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

Vol. (µL)	OCRATOXINA A
50	<b>20 ppb</b>

Límite de detección: <1 ppb

Límite de cuantificación: 1 ppb.

### **CONFIRMACION**

Confirmar la identidad de la ocratoxina A mediante conversión a Ocratoxina A metil-éster. Realizar el proceso de extracción y purificación y al residuo seco añadir 100 µL de trifluoruro de boro (BF<sub>3</sub>) al 14% en metanol (Sigma B-1252). Calentar a 80°C por 10 min. Dejar enfriar, añadir 400 µL de fase móvil, homogenizar e inyectar 50 µL en iguales condiciones cromatográficas. El metil-éster de la ocratoxina A eluye a los 17.5 min. Derivatizar simultáneamente 100 ng de estándar.

OTA CAFÉ VERDE Y SOLUBLE HPLC – IAC