

# MICOTOX LTDA



## DETERMINACION DE ZEARALENONA EN CEREALES POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

NORMA ICONTEC NTC 4881

### 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 5 mL del extracto a un tubo de ensayo de 15 x 85 mm. Adicionar 50 µL de ácido acético glacial y homogenizar con la ayuda de un vórtex (el ácido acético aumenta la recuperación de la zearalenona).

### PURIFICACION

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

solución purificada con la ayuda de una pipeta.

6. Transferir 500 µL de la solución purificada a un vial de automuestreador de 1.5 mL de capacidad.
7. Adicionar 500 µL de agua grado HPLC y homogenizar.
8. Inyectar 50 µL en el cromatógrafo de líquidos.

### CONDICIONES CROMATOGRAFICAS

- Columna: RP-18 de 150 x 4.6 mm (D.I.).
- Temperatura: ambiente.
- Fase móvil: Mezcla isocrática de metanol:agua:ácido acético (65+35+1).
- Flujo: 0.6 mL/min.
- Detector de fluorescencia de longitudes de onda variables. Excitación: 270 nm, emisión: 465 nm.
- Tiempo de retención aproximado: 11 min.

### CALIBRACION

9. Tomar 10 µL de solución estándar de calibración y añadir 990 µL de fase móvil. La solución estándar contiene 10 µg/mL de zearalenona en metanol (disponible en Micotox Ltda.). La solución final de calibración contiene 100 ng/mL de zearalenona.
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 500 µL a los cuales se añaden 500 µL de agua HPLC. Se inyectan 50 µL de la mezcla en el HPLC.

Equivalente en peso de la muestra inyectada:

$$50 \text{ g} \times 0.5/100 \text{ mL} \times 0.05/1.0 \text{ mL} = 0.0125 \text{ g}$$

$$\text{ng/g (ppb)} = \frac{\text{ng de toxina inyectados}}{0.0125 \text{ g}}$$

Cantidad de estándar de zearalenona inyectado en el HPLC (ng):

Vol. µL	ZEARALENONA
50	5 ng

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

Vol. µL	ZEARALENONA
50	400 ppb

Límite de detección: >50 ppb.

Límite de cuantificación: 100 ppb.

### CONFIRMACION

La identidad de la zearalenona puede confirmarse realizando el análisis por cromatografía en capa fina utilizando el mismo extracto y cartucho de limpieza usados en el presente método. Solicitar el método "Análisis de zearalenona por cromatografía en capa fina" al servicio técnico de Micotox Ltda.

ZEARALENONA HPLC V01-07