

# MICOTOX LTDA



**DETERMINACION DE AFLATOXINAS  
EN CEREALES Y ALIMENTO  
TERMINADO POR CROMATOGRAFIA  
EN CAPA FINA (TLC)**

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 2.0 mL de solución purificada al interior del cartucho (para mayor limpieza usar un cartucho M2006, dependiendo del sustrato).
6. Transferir exactamente 2.0 mL del extracto purificado a un tubo de ensayo limpio y

evaporar a sequedad bajo nitrógeno o bajo vacío en un baño termostático a 60°C.

## CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

7. Disolver el residuo seco con 100 µL de tolueno-acetonitrilo, 95+5 (agregar el solvente, tapar el tubo y agitar en vórtex durante 30 segundos).
8. Sembrar 20 µL de cada muestra junto con 5, 10 y 20 µL de estándar de trabajo en una cromato-placa de silicagel 60 de 10 x 10 cm (Merck 1.05553). La solución estándar de trabajo contiene 0.4 µg/mL de aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), 0.4 µg/mL de aflatoxina G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>), 0.12 µg/mL de aflatoxina B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>) y 0.12 µg/mL de aflatoxina G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) en tolueno-acetonitrilo 95+5 (disponible en Micotox Ltda.).
9. Desarrollar la placa con cloroformo-acetona, 90+10 hasta 1 cm del borde superior. Dejar secar al aire.
10. Observar la cromatoplaca bajo luz ultravioleta de onda larga (365 nm) y determinar el contenido de aflatoxinas de la muestra comparando la intensidad de las manchas de aflatoxinas de la muestra con las de los estándares. Las aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> fluorescen azul, las G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>, fluorescen verde.

## CONFIRMACION

Confirmar la presencia de las aflatoxinas asperjando la cromatoplaca con una solución de metanol-ácido acético-ácido sulfúrico, 80+10+10. Observar bajo luz ultravioleta de onda larga (365 nm). La fluorescencia de las aflatoxinas cambia a color amarillo.

## CALCULOS

Se toman 50 g de muestra en 100 mL de solvente; del extracto se toman 2 mL que se llevan a sequedad y se redisuelven en 100 µL, de los cuales se siembran 20 µL en placa.

Equivalente en peso de la muestra sembrada:

50 g x 2/100 ml x 0.02/0.1 ml = 0.2 g en placa.

$$\text{ng/g (ppb)} = \frac{\text{ng de toxina en la placa}}{0.2 \text{ g}}$$

### Cantidad de estándar de aflatoxinas sembrado en placa (ng):

Vol. µl	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>
5	2.0	0.6	2.0	0.6
10	4.0	1.2	4.0	1.2
20	8.0	2.4	8.0	2.4

### Equivalente en ppb del estándar de aflatoxinas sembrado en placa (ng/g):

Vol. µl	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>
5	10	3	10	3
10	20	6	20	6
20	40	12	40	12

Límite de detección: < 5 ppb de cada aflatoxina.

Límite de cuantificación: 10 ppb de AFB<sub>1</sub> y AFG<sub>1</sub>, 3 ppb de AFB<sub>2</sub> y AFG<sub>2</sub>.

AFLATOXINAS TLC