

MICOTOX LTDA



DETERMINACION DE TRICOTICENOS TIPO A (T-2 toxina, DAS, HT-2 toxina y neosolaniol) EN CEREALES POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

EXTRACCION Y CLARIFICACION

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 10 mL del extracto filtrado a un tubo de ensayo de 15 x 85 mm.
5. Añadir 0.2 g de carbón activado, agitar en vórtex durante 1 minuto y dejar decantar durante 5-10 minutos.

PURIFICACION

6. Insertar el extremo con el tapón de caucho de un cartucho Micotox® M2005 en el tubo de ensayo y presionar hasta obtener 2.5 mL de solución purificada (para mayor limpieza usar un cartucho M2007, dependiendo del sustrato).

7. Transferir exactamente 2.5 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

8. 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).
9. Sembrar 20 µL de cada muestra junto con 5, 10, y 20 µL de estándar de trabajo en una cromatoplaque de silicagel 60 de 10 x 10 cm (Merck 1.05553). La solución estándar de trabajo contiene 5 µg/mL de T-2 y de HT-2 toxina y 10 µg/mL de DAS y de neosolaniol en tolueno-acetonitrilo, 95+5 (disponible en Micotox Ltda.).
10. Desarrollar la placa con cloroformo hasta 1 cm del borde superior. Dejar secar al aire. NOTA: En este paso no hay desplazamiento de los analitos pero se separan interferencias y se mejora la sensibilidad del método.
11. Desarrollar la placa con tolueno-acetato de etilo-ácido fórmico (5+4+1) hasta 1 cm del borde superior. Dejar secar al aire.
12. Sumergir (o aspejar) la cromatoplaque en una solución de ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 10% en metanol. Dejarla secar al aire y calentarla a 130°C en plato de calentamiento o estufa (mejor esta última), hasta que se observen a simple vista las manchas cromatográficas (5-10 minutos). Evitar sobrecalentar la placa.
13. Observar la cromatoplaque bajo luz UV de onda larga (365 nm):

Tricoticoeno	Rf	Color fluorescencia
T-2 toxina	0.45	Azul pálido
DAS	0.35	Anaranjado
HT-2 toxina	0.20	Azul pálido
Neosolaniol	0.15	Amarillo claro

CALCULOS

Se toman 50 g de muestra en 100 mL de solvente; del extracto se toman 2.5 mL que se llevan a sequedad y se redisuelven en 100 µL, de los cuales se siembran 20 µL. El equivalente en peso de la muestra sembrada es el siguiente:

$$50 \text{ g} \times 2.5/100 \text{ mL} \times 0.02/0.1 \text{ mL} = 0.25 \text{ g en placa}$$

$$\text{ng/g (ppb)} = \frac{\text{ng de toxina en la placa}}{0.25 \text{ g}}$$

Cantidad de estándar de tricoticenos sembrado en placa (ng):

Vol. µL	T-2	DAS	HT-2	NEO
5	25	50	25	50
10	50	100	50	100
20	100	200	100	200

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

Vol. µL	T-2	DAS	HT-2	NEO
5	100	200	100	200
10	200	400	200	400
20	400	800	400	800

Límites de detección: <100 ppb de T-2 y HT-2 toxinas, <200 ppb de DAS y neosolaniol.
Límites de cuantificación: 100 ppb de T-2 y HT-2 toxinas, 200 ppb de DAS y neosolaniol.

TRICOTICENOS TIPO A TLC – FASE NORMAL