

MICOTOX LTDA



DETERMINACION DE TRICOTICENOS TIPO A (T-2 toxina, HT-2 toxina, DAS y neosolaniol) EN CEREALES POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (TLC) DE FASE REVERSA (RP-18)

EXTRACCION Y CLARIFICACION

1. Pesar 25 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) ó 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 40 µL de cada muestra junto con 10, 20 y 40 µL de estándar de trabajo en una cromatoplaque de fase reversa RP-18 (C18) de 10 x 10 cm. La solución estándar de trabajo contiene 5 µg/mL de T-2 toxina, 5 µg/mL de HT-2 toxina, 10 µg/mL de DAS y 10 µg/mL de neosolaniol en tolueno-acetonitrilo, 95+5 (disponible en Micotox Ltda.).
10. Desarrollar la placa con metanol-agua - ácido acético (25+15+1) hasta 1 cm del borde superior. Dejar secar al aire.
11. Sumergir (o asperjar) 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.
12. Observar la cromatoplaque bajo luz UV de onda larga (365 nm):

Tricoticoeno	Rf	Color fluorescencia
Neosolaniol	0.7	Amarillo claro
DAS	0.5	Anaranjado
HT-2 toxina	0.4	Azul pálido
T-2 toxina	0.3	Azul pálido

CALCULOS

Se toman 25 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 40 µL. El equivalente en peso de la muestra sembrada es, entonces:

25 g x 2.5/100 mL x 0.04/0.1 mL = 0.25 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	NEO	DAS	HT-2	T-2
10	100	100	50	50
20	200	200	100	100
40	400	400	200	200

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

Vol. µL	NEO	DAS	HT-2	T-2
10	400	400	200	200
20	800	800	400	400
40	1600	1600	800	800

Límites de detección: <200 ppb de T-2 y HT-2 toxinas, <400 ppb de DAS y neosolaniol.
Límites de cuantificación: 200 ppb de T-2 y HT-2 toxinas, 400 ppb de DAS y neosolaniol.

TCT-A TLC FASE REVERSA