

MICOTOX LTDA



DETERMINACION DE AFLATOXINA B₁, ZEARELENONA Y DEOXINIVALENOL (DON) EN CEREALES POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (TLC)

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) ó agitar vigorosamente durante una hora usando un agitador mecánico.
4. Filtrar a través de papel cualitativo rápido y transferir 8 mL del extracto a un tubo de ensayo de 15 x 85 mm. Adicionar 20 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® M2006 y presionar hasta obtener aproximadamente 2.5 mL de solución purificada en su interior.
6. Transferir exactamente 2 mL del extracto purificado a un tubo de ensayo limpio y evaporar a sequedad bajo vacío o bajo nitrógeno en un baño termostataado a 60°C.

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

7. Disolver el residuo seco con 100 µL de tolueno-acetonitrilo 95+5 (agregar el solvente, tapan el tubo y agitar en vortex 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 de estándar de trabajo contiene 0.4 µg/mL de aflatoxina B₁, 20 µg/mL de zearalenona y 20 µg/mL de DON en tolueno-acetonitrilo, 95+5 (disponible en Micotox Ltda.).
9. Desarrollar la placa con tolueno-acetona (50+50) hasta 1 cm del borde superior. Dejar secar al aire. Determinar las micotoxinas en la siguiente secuencia exacta:

Aflatoxina B₁: Observar la cromatoplaaca bajo luz ultravioleta de onda larga (365 nm) y determinar el contenido de aflatoxina B₁ (fluorescencia azul, Rf aproximado de 0.5).

Zearalenona: Sumerjir (o asperjar) la cromatoplaaca en una solución de cloruro de aluminio hexahidrato (AlCl₃·6H₂O) en metanol al 15%. Dejar secar al aire y observar bajo luz UV de onda corta (254 nm) (fluorescencia azul, Rf aproximado de 0.75).

DON: Calentar la cromatoplaaca en estufa o plato de calentamiento a 130-150°C durante uno o dos minutos o hasta que las manchas correspondientes al DON se hagan claramente visibles (fluorescencia azul, Rf aproximado de 0.3).

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.

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 sembrado en placa (ng):

Vol. µL	Aflatoxina B ₁	Zearalenona	DON
5	2	100	100
10	4	200	200
20	8	400	400

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

Vol. µL	Aflatoxina B ₁	Zearalenona	DON
5	10	500	500
10	20	1000	1000
20	40	2000	2000

Límites de detección: <5 ppb de aflatoxina B₁, <200 ppb de zearalenona, <200 ppb de DON.

Límites de cuantificación: 5 ppb de aflatoxina B₁, 250 ppb de zearalenona, 250 ppb de DON.

TRES TOXINAS TLC