

MICOTOX LTDA



DETERMINACION DE
DEOXINIVALENOL (DON) EN
CEREALES POR CROMATOGRAFIA
LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA
(HPLC)

MÉTODO AOAC PVM 2:1997

EXTRACCION

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) 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 muy lentamente el extremo con el tapón de caucho de un cartucho Micotox® M2005 en el tubo de ensayo y presionar hasta obtener solo un poco más de 2.0 mL de solución purificada al interior del cartucho (para mayor limpieza usar un cartucho M2007, dependiendo del sustrato). **NOTA: La obtención del**

extracto purificado debe tardar mínimo 30-40 segundos.

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.
7. Redisolver el residuo seco con 500 µL de fase móvil (agua-metanol-acetonitrilo, 90+5+5). Filtrar a través de membrana de filtración de 0.45 µm de diámetro de poro.
8. Inyectar 100 µL en el cromatógrafo de líquidos.

CONDICIONES CROMATOGRAFICAS

- Columna: RP-18 de 12.5 cm x 4 mm.
- Temperatura: 40°C.
- Fase móvil: Mezcla isocrática de agua-metanol-acetonitrilo (90+5+5).
- Flujo: 0.6 mL/min.
- Detector: Ultravioleta (220 nm).
- Tiempo de retención aproximado: 7.9 min.

CALIBRACION

9. Pipetear 20 µL de estándar de calibración (1.0 µg) en un vial de automuestreador y añadir 980 µL de agua. La solución estándar de calibración contiene 50 µg/mL de DON en metanol (disponible en Micotox Ltda.). La solución final de calibración contiene 1.0 µg/mL de DON. Inyectar 100 µL en el HPLC (0.1 µg).
10. Calibrar el integrador del HPLC usando el método de calibración con estándar externo.

CALCULOS

Se toman 25 g de muestra en 100 mL de solvente; del extracto se toman 2 mL que se llevan a sequedad y se redisuelven en 500 µL de fase móvil. Se inyectan 100 µL en el HPLC.

Equivalente en peso de la muestra inyectada:

$$25 \text{ g} \times 2/100 \text{ mL} \times 0.1/0.5 \text{ mL} = 0.1 \text{ g}$$

$$\mu\text{g/g (ppm)} = \frac{\text{ng de toxina inyectados}}{0.1 \text{ g}}$$

Cantidad de estándar de DON inyectado en el HPLC (µg):

Vol. µL	DON
100	0.1 µg

Equivalente en ppm del estándar de DON inyectado en el HPLC (µg/g):

Vol. µL	DON
100	1 ppm

Límite de detección: <0.1 ppm.

Límite de cuantificación: 0.1 ppm.

CONFIRMACION

La identidad del DON puede confirmarse realizando el análisis por cromatografía en capa fina utilizando el mismo extracto. Solicitar el método "**Análisis de aflatoxina B1, zearalenona y DON por cromatografía en capa fina**" al servicio técnico de Micotox Ltda.

DON HPLC