

MICOTOX LTDA



DETERMINACION DE OCRATOXINA A EN CEREALES POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (TLC)

MÉTODO OFICIAL AOAC 973.37

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 12.5 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) 0.1M (3.42 mL de ácido fosfórico al 85% en 500 mL de agua) y humidificar homogéneamente la muestra.
3. Adicionar 125 mL de diclorometano (CH_2Cl_2) y homogenizar durante 2 minutos (licuadora) o durante una hora en agitador mecánico.
4. Filtrar a través de papel cualitativo rápido y transferir exactamente 5 mL del filtrado a un tubo de ensayo de 15 x 85 mm.

PURIFICACION

5. Atravesar un tapón de goma #5 con dos agujas calibre #18 de 2 pulgadas y colocarlo en un tubo de fondo cónico de 40 mL de capacidad. Insertar una columna Micotox® M2200 para purificación de ocratoxina A en una de las agujas y verter los 5 mL de filtrado al interior de la columna. Drenar por gravedad (<2.0 mL/min)* y descartar la solución.

*NOTA: La solución debe drenar a través de la columna a un flujo máximo de 2 mL/min. Antes de utilizar la columna Micotox M2200 presione fuertemente el material de empaque con un émbolo de jeringa plástica, esto compactará el material y evitará que el extracto de la muestra drene demasiado rápido.

6. Sin dejar secar el material de empaque, añadir 5 mL de hexano, seguidos por 15 mL de CH_2Cl_2 , adicionados en tres volúmenes sucesivos de 5 mL cada uno. Descartar la solución de lavado.
7. Cambiar el ensamble de tapón, agujas y columna a un tubo limpio de 40 mL y eluir la ocratoxina A con 20 mL de CH_2Cl_2 -HCOOH (ácido fórmico), 99+1, en dos volúmenes sucesivos de 10 mL cada uno.
8. Evaporar el eluato a sequedad usando un baño termostático a 60°C y una bomba de vacío (succionar por una de las agujas, dejando la otra libre para circulación del aire).

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

- ? Disolver el residuo seco con 100 μ L de tolueno-ácido acético, 99+1 (agregar el solvente, tapar el tubo y agitar en vortex durante 30 segundos).
- ? Sembrar 20 μ L de cada muestra junto con 5, 10 y 20 μ L de estándar de trabajo en una cromatoplaque de silicagel 60 de 10 x 10 cm (Merck 1.05553). La solución estándar contiene 1.0 μ g/mL de ocratoxina A en tolueno-ácido acético, 99+1 (disponible en Micotox Ltda.).

- ? Desarrollar la placa con tolueno-acetato de etilo-ácido fórmico (5+4+1) hasta 1 cm del borde superior. Dejar secar al aire.
- ? Observar la cromatoplaque bajo luz ultravioleta de onda larga (365 nm) y determinar el contenido de ocratoxina A comparando la intensidad de las manchas de las muestras con las de los estándares. La ocratoxina A tiene una fluorescencia azul-verdosa y un Rf aproximado de 0.6.

CALCULOS

Se toman 25 g de muestra en 125 mL de solvente orgánico; del extracto se toman 5 mL para purificación, los cuales se llevan a sequedad y se redisuelven con 100 μ L. Se siembran 20 μ L en placa.

Equivalente en peso de la muestra sembrada:

25 g x 5/125 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 ocratoxina A sembrado en placa (ng):

Vol. (μ L)	OCRATOXINA A
5	5 ng
10	10 ng
20	20 ng

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

Vol. (μ L)	OCRATOXINA A
5	25 ppb
10	50 ppb
20	100 ppb

Límite de detección: <10 ppb.
Límite de cuantificación: 25 ppb

CONFIRMACION

Asperjar la cromatoplaca con una solución alcohólica de bicarbonato (6.0 g de NaHCO_3 en 100 mL de H_2O + 20 mL de etanol) y dejar secar. Observar de nuevo bajo luz UV: la fluorescencia azul-verdosa cambia a azul y se hace más intensa.

OTA CEREALES TLC – COL M2200