

MICOTOX LTDA



DETERMINACION DE OCRATOXINA A
EN CEREALES POR
CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA
EFICIENCIA (HPLC)

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 (H₃PO₄) 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 (CH₂Cl₂) 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. Montar 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 CH₂Cl₂, 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 CH₂Cl₂/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).
9. Disolver el residuo seco con 1 mL de fase móvil e inyectar 50 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 acetonitrilo-agua-ácido acético (50+50+1).
- Flujo: 0.6 mL/min.

- Detector de fluorescencia de longitudes de onda variables. Excitación: 330 nm, emisión: 460 nm.
- Tiempo de retención aproximado: 7.7 min.

CALIBRACION

10. Pipetear 10 µL de solución estándar de calibración y añadir 990 µL de fase móvil. La solución estándar contiene 10 µg/mL de ocratoxina A en metanol (disponible en Micotox Ltda.). La solución final de calibración contiene 100 ng/mL de ocratoxina A. Inyectar 50 µL (5 ng) en el HPLC.
11. Calibrar el integrador del HPLC usando el método de calibración con estándar externo.

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 1 mL de fase móvil. Se inyectan 50 µL en el HPLC.

Equivalente en peso de la muestra inyectada:

$$25 \text{ g} \times 5/125 \text{ mL} \times 0.05/1.0 \text{ mL} = 0.05 \text{ g}$$

$$\text{ng/g (ppb)} = \frac{\text{ng de toxina inyectados}}{0.05 \text{ g}}$$

Cantidad de estándar de ocratoxina A inyectado en el HPLC (ng):

Vol. (µL)	OCRATOXINA A
50	5 ng

Equivalente en ppb del estándar de ocratoxina A
inyectado en el HPLC (ng/g):

Vol. (µL)	OCRATOXINA A
50	100 ppb

Límite de detección: <5 ppb.

Límite de cuantificación: 5 ppb.

CONFIRMACION

Confirmar la identidad de la ocratoxina A mediante conversión a Ocratoxina A metil-éster. Realizar el proceso de extracción y purificación y al residuo seco añadir 100 µl de trifluoruro de boro (BF₃) al 14% en metanol (Sigma B-1252). Calentar a 80°C por 10 min. Dejar enfriar, añadir 400 µL de fase móvil, homogenizar e inyectar 50 µL en iguales condiciones cromatográficas. El metil-éster de la ocratoxina A eluye a los 17.5 min. Derivatizar simultáneamente 100 ng de estándar.

OTA CEREALES HPLC – COL M2200