

# MICOTOX LTDA



## DETERMINACION DE OCRATOXINA A (OTA) EN CAFÉ VERDE POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (TLC)

METODO OFICIAL AOAC 975.38

### EXTRACCION

1. Pesar 25 g de café verde molido 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 agua, homogenizar y adicionar 125 mL de diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). Homogenizar durante 2 minutos (licuadora) o durante una hora en agitador mecánico.
3. Filtrar a través de papel de fibra de vidrio de 18.5 cm en embudo corriente o con papel de fibra de vidrio de 9 cm usando un embudo Buchner.
4. Transferir exactamente 10 mL del extracto filtrado a un tubo de ensayo limpio.

### 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 10 mL de filtrado al interior de la columna.

Drenar por gravedad ( $<2.0 \text{ mL/min}$ )\* y descartar la solución.

\*NOTA: La solución debe drenar 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 15 mL de hexano, seguidos por 15 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (adicionados en dos volúmenes sucesivos de 7.5 mL cada uno). Descartar la solución de lavado.
7. Cambiar el ensamble de tapón, agujas y columna a un tubo limpio de fondo cónico de  $\geq 25 \text{ mL}$  y eluir la ocratoxina A con 20 mL de tolueno-ácido acético 98+2, en dos volúmenes sucesivos de 10 mL cada uno.
8. Evaporar el eluato a sequedad usando un baño termostático a  $60^\circ\text{C}$  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  $\mu\text{L}$  de tolueno-ácido acético, 99+1 (agregar el solvente, tapar el tubo y agitar en vortex durante 30 segundos).
- Sembrar 20  $\mu\text{L}$  de cada muestra junto con 5, 10 y 20  $\mu\text{L}$  de estándar de trabajo en una cromatoplaque de silicagel 60 de 10 x 10 cm (Merck 1.05553). La solución estándar contiene 1.0  $\mu\text{g/mL}$  de ocratoxina A en tolueno-ácido acético, 99+1 (disponible en Micotox Ltda.).

- Desarrollar la placa con tolueno-ácido fórmico (5+4+1) hasta 1 cm del borde superior. Dejar secar al aire.
- NOTA: Puede usarse como solvente alternativo tolueno-metanol-ácido acético (18+1+1). Pueden requerirse dos desarrollos consecutivos para obtener una adecuada separación del ruido de fondo. En algunas muestras de café verde, especialmente aquellas con residuos de pergamino, es necesario desarrollar primero la placa con éter etílico con el fin de retirar interferencias.
- 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  $R_f$  aproximado de 0.6.

### CALCULOS

Se toman 25 g de muestra en 125 mL de solvente orgánico; del extracto se toman 10 mL para purificación, los cuales se llevan a sequedad y se redisuelven con 100  $\mu\text{L}$ . Se siembran 20  $\mu\text{L}$  en placa.

Equivalente en peso de la muestra sembrada:

$$25 \text{ g} \times 10/125 \text{ mL} \times 0.02/0.1 \text{ mL} = 0.4 \text{ g en placa}$$

$$\text{ng/g (ppb)} = \frac{\text{ng de toxina en la placa}}{0.4 \text{ g}}$$

**Cantidad de estándar de ocratoxina A  
sembrado en placa (ng):**

Vol. $\mu$ 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. $\mu$ l	OCRATOXINA A
5	12.5 ppb
10	25 ppb
20	50 ppb

Límite de detección: <5 ppb.

Límite de cuantificación: 5 ppb

**CONFIRMACION**

Asperjar la cromatoplaca con una solución alcohólica de bicarbonato (6.0 g de  $\text{NaHCO}_3$  en 100 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  + 20 mL de etanol) y dejar secar al aire. Observar de nuevo bajo luz UV: la fluorescencia azul-verdosa cambia a azul y se hace más intensa.

OTA CAFE VERDE TLC – COL M2200