

MICOTOX LTDA



DETERMINACION DE OCRATOXINA A (OTA) EN CAFÉ VERDE POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

BASADO EN LOS MÉTODOS OFICIALES
AOAC 975.38 Y AOAC 991.44

EXTRACCION

1. Pesar 5 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 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 homogeneamente la muestra.
3. Adicionar 50 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 de filtro **cuantitativo** (por ej. S&S 589-3) y transferir exactamente 5.0 mL del 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 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 10 mL de CH_2Cl_2 , adicionados en dos 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 fondo cónico de ≥ 15 mL y eluir la ocratoxina A con 10 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 $60^\circ C$ 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, filtrar a través de membrana de $0.45 \mu m$ e inyectar 50 μL en el cromatógrafo de líquidos.

CONDICIONES CROMATOGRAFICAS

- Columna: RP-18 de 12.5 cm x 4 mm.
- Temperatura: $40^\circ C$.
- 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 20 μL de solución estándar de calibración en un vial de automuestreador y añadir 980 μL de fase móvil. La solución estándar contiene 1.0 $\mu g/mL$ de ocratoxina A en metanol (disponible en Micotox Ltda.). La solución final de calibración contiene 20 ng/mL de ocratoxina A. Inyectar 50 μL (1.0 ng) en el HPLC.
11. Calibrar el integrador del HPLC usando el método de calibración con estándar externo.

CALCULOS

Se toman 5 g de muestra en 50 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:

$$5 \text{ g} \times 5/50 \text{ mL} \times 0.05/1.0 \text{ mL} = 0.025 \text{ g}$$

$$\text{ng/g (ppb)} = \frac{\text{ng de toxina inyectados}}{0.025 \text{ g}}$$

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

Vol. μ l	OCRATOXINA A
50	1.0 ng

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

Vol. μ l	OCRATOXINA A
50	40 ppb

Límite de detección: <1.0 ppb

Límite de cuantificación: 1.0 ppb.

CONFIRMACION

Confirmar la identidad de la OTA convirtiéndola a OTA metil-éster. Realizar el proceso de extracción y purificación y al residuo seco añadir 100 μ L de trifluoruro de boro (BF_3) al 14% en metanol (Sigma B-1252). Calentar a 80°C por 10 min. Dejar enfriar, añadir 400 μ L de fase móvil, homogenizar e inyectar 50 μ L en iguales condiciones cromatográficas. El metil-éster de la ocratoxina A eluye a los 17.5 min. Derivatizar simultáneamente 100 ng de estándar.

OTA CAFÉ VERDE HPLC – COL M2200