

Validación de un método de determinación de histamina por HPLC en quesos y pescados

I. Hernández-Garciarena¹; R. García Baluja¹; A. M. Jordán Quintáns¹;
Y. Sánchez Azahares¹; M. Cardona Gálvez¹ y A. Vivar Perez²

¹Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM). La Habana, Cuba.

²Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria (IIIA). La Habana, Cuba.



RESUMEN

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución se emplea cada vez más en el análisis de muestras de alimentos, utilizándose para la determinación de histamina en quesos, pescados y otros alimentos que pudieran contenerla. Según la NC-TS 368:2010, la validación de un método analítico es el proceso de confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista por medio de estudios de laboratorio. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método sensible, simple, y selectivo para analizar la histamina después de la condensación con o-phthaldehído, usando HPLC bajo gradiente isocrático. Se presentan los resultados graficados y tabulados de la linealidad, precisión a través de la repetibilidad y la reproducibilidad, la incertidumbre y la exactitud determinadas para este método de análisis. El método es preciso, rápido, sensible para la determinación de histamina en quesos y pescados.

Palabras clave: Histamina, validación, HPLC

INTRODUCCIÓN

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se emplea cada vez más en el análisis de muestras de alimentos y es por ello que se utiliza para la determinación de histamina en quesos, pescados y otros alimentos que pudieran contenerla. El control analítico de un producto alimenticio o de sus ingredientes es necesario para asegurar su eficacia y seguri-

dad durante todas las etapas de su vida útil, incluyendo su almacenamiento, distribución y venta⁽¹⁾. Según la NC-TS 368: 2010, la validación de un método analítico es el proceso de confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista por medio de estudios de laboratorio, que las características de desempeño de la metodología cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas, asegurándose que es lineal, exacta y precisa bajo los rangos especificados, y que los resultados son altamente confiables.

Las características de desempeño habituales que deben considerarse en la validación de un método analítico son: exactitud, precisión, selectividad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad e intervalo. La determinación de estos parámetros, que se aplican de acuerdo con la categoría a la que pertenezcan, es lo que fundamenta la validación de un método analítico⁽²⁾.

La histamina es una sustancia que se deriva de la descarboxilación de aminoácidos o por la transaminación de aldehídos por acción de la enzima aminoacil-transaminasa, siendo constituyente normal de muchos alimentos y bebidas y ha sido encontrada en vinos, cervezas, quesos, pescados y productos cárnicos como resultado de los procesos de degradación y fermentación enzimática. Su presencia en altas cantidades en alimentos se encuentra asociada con el deterioro. Sin embargo, concentraciones bajas de aminos biógenas son esenciales para muchas funciones fisiológicas^(3,4).

El objetivo de este estudio fue desarrollar un método sensible, simple, y selectivo para analizar la histamina en muestras de pescados y quesos después de la condensación con o-ftalaldehído, usando HPLC bajo gradiente isocrático y siguiendo la metodología propuesta por Gouygou y col.(1987).

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se desarrolló en el Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología, con la participación del Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria. Se utilizaron muestras de queso y de pescados llegadas al Laboratorio de Micotoxinas provenientes de los departamentos de Registro Sanitario y el departamento de Higiene e

Ionización de alimentos

**“Nosotros también
ionizamos nuestros
productos
alimenticios”**

- *Porque aseguramos la inocuidad alimentaria*
- *Porque disminuimos el uso de conservantes artificiales*
- *Porque minimizamos los costos por rechazo*
- *Porque ganamos mercados en el exterior*

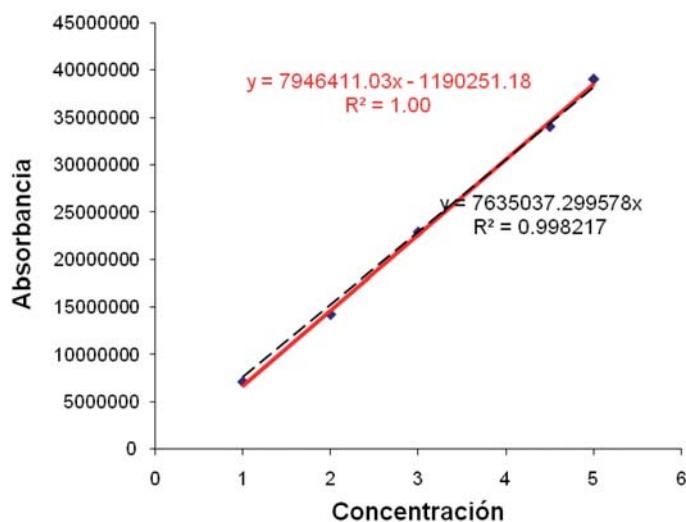
**ionics**
Ionización Gamma



www.ionics.com.ar

Solicite un asesor:
(011) 2150-6670 al 74
comercial@ionics.com.ar

Figura 1 - Curva de calibración y/o Linealidad de la intensidad de la fluorescencia para concentraciones crecientes de histamina.



Inocuidad de los Alimentos del INHEM. El método fluorimétrico para determinar la histamina se basa en la reacción del o-ftalaldehído, a un nivel de pH altamente alcalino, que forma un producto fluorescente después de convertirse en un producto más fluorescente y estable por acidificación⁽⁶⁾.

Distintos autores^(7,8,9) utilizaron la cromatografía de intercambio iónico para evitar interferencias con otras sustancias naturales, principalmente histidina y espermidina como técnicas de purificación específicas. La cuantificación de histamina se realizó con un equipo de HPLC Shimadzu con detector de fluorescencia, que posee un automuestreador modelo SIL-20A, una bomba LC-20AB, columna de fase reversa (25 cm de longitud, x 4.5 mm de diámetro interno y un diámetro de partícula 5 µm), un detector de fluorescencia (RF-10Axl). Para el análisis de los datos fue utilizado un software cromatográfico Class VP, marca Shimadzu.

Para la extracción de la histamina a partir de las muestras de queso, se utilizó la metodología descrita por Izquierdo y col.⁽¹⁰⁾ modificada de la que describió Zee y col.⁽¹¹⁾. De cada queso se pesaron 10 g de muestra; luego se diluyeron en 100 mL de ácido tricloro-acético al 5%. Para la extracción de la histamina de las muestras de pescado se utilizó la metodología descrita por Gouyguo y col.; de cada muestra

de cada pescado se pesaron 50 g y se diluyeron en 100 mL de ácido tricloro-acético al 10%. Ambas muestras se homogenizaron con un equipo Ultraturax y posteriormente se centrifugaron a 4°C de temperatura y 350 rpm durante 25 min. Una vez concluido este proceso, se filtró el sobrenadante con papel de filtro Whatman y luego se volvió a filtrar al vacío por membranas Millipore de 0,45 micras de poro. El líquido filtrado se colocó en viales para proceder a su derivatización con orto-ftaldehído (OPA)⁽⁵⁾, para luego colocarlos en el HPLC. La identificación se realizó con un estándar de histamina de 100 ppm en ácido tricloro-acético al 10%. Las condiciones de la corrida cromatográfica fueron:

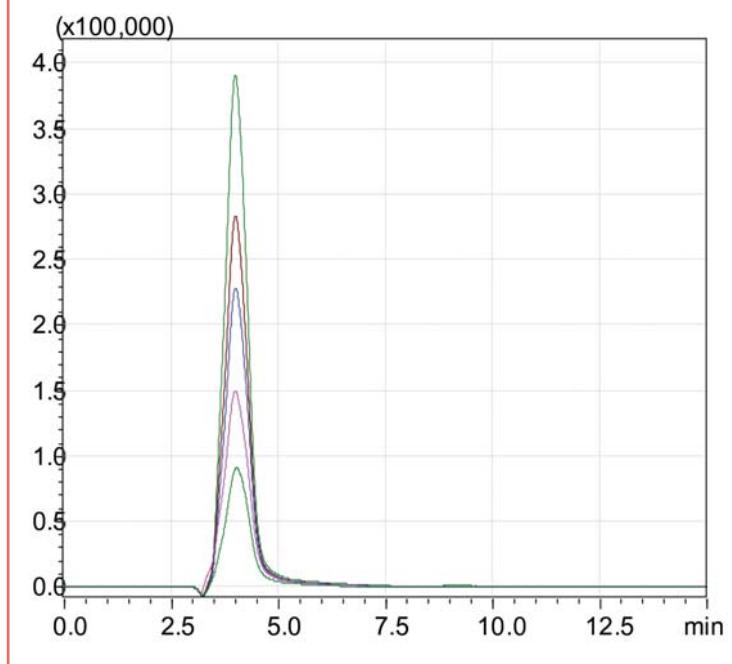
- Volumen de inyección 20µL.
 - Flujo de la fase móvil 0,8 ml/min.
 - Tiempo de corrida 15 min.
 - Temperatura del horno de columna 33°C.
 - Longitud de onda λ_{exc} = 358 nm; $\lambda_{emisión}$ = 447 nm.
- La fase móvil está compuesta por fosfato monosódico 50 mmol/L + acetonitrilo en una relación 75:25.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La linealidad del sistema fue evaluada con cinco niveles de concentración diferentes: 1.0 µg/ml; 2.0 µg/ml; 3.0 µg/ml; 4.0 µg/ml y 5.0 µg/ml, utilizando solución estándar de histamina. La preparación de las soluciones de prueba fue realizada por duplicado, considerando la concentración de 5 µg equivale a 100 ppm. Los resultados del procesamiento estadístico obtenidos en el estudio de la linealidad se muestran en la Figura 1 donde se obtuvo la ecuación de la recta, representada por la ecuación $y = 2357984x - 496276,6$ con un coeficiente de correlación de $R^2=0,998$ -muy próximo a 1- demostrando que la correlación entre la respuesta del cromatógrafo y la concentración de histamina es correcta, lo que indica que existe linealidad en el método empleado.

Mariño y col. en su estudio de desarrollo y validación de métodos analíticos para la cuantificación de antirretrovirales por HPLC en el 2006 obtuvo

Figura 2 - Cromatograma integrado de los puntos de la curva de calibración



valores de r^2 de 0,99, demostrando al igual que en nuestro estudio que la correlación entre el área y la concentración es buena.

La figura 2 muestra el cromatograma integrado de los cinco puntos de la curva de calibración correspondientes a las concentraciones de 1.0 $\mu\text{g/ml}$, 2.0 $\mu\text{g/ml}$, 3.0 $\mu\text{g/ml}$, 4.0 $\mu\text{g/ml}$ y 5.0 $\mu\text{g/ml}$. La curva reporta en el eje de las Y las áreas comprendidas para cada punto y en el eje de las X el tiempo de retención correspondiente.

Se puede ver que todos los puntos coinciden con un mismo tiempo de retención, que se encuentra entre 3.5 hasta 5 minutos; durante la experimentación se determinó que no existen interferencias significativas dando lecturas correctas. La evaluación del blanco se realizó con agua desmineralizada, siendo la señal del cromatograma cercana a la línea base, al ser el blanco no se mostró un pico definido, comprobando la no detección del analito.

El estudio realizado en Guatemala en el 2010 por Flores H. y Pinagel D. reveló límites de detección y cuantificación de 2.50 y 8.35 mg/kg , respectivamente, trabajando con lomos de atún, Medina Blanco en el 2017 al determinar histamina en quesos obtuvo límites de detección de 1.48 $\mu\text{g/g}$ y un límite de cuantificación de 4.95 $\mu\text{g/g}$; estos límites son los que definen la concentración más baja detectable y cuantificable por el método. Estos lími-

tes no tienen estipulado un valor aceptable o rechazable, pero les confieren información sobre el método al determinar el alcance que éste puede tener al analizar las concentraciones más bajas requeridas.

Se aprecia que todos los puntos coinciden con un mismo tiempo de retención, que se encuentra entre 3.5 hasta 5 minutos; durante la experimentación se determinó que no existen interferencias significativas dando lecturas correctas. La evaluación del blanco se realizó con agua desmineralizada, siendo la señal del cromatograma cercana a la línea base, al ser el blanco no se mostró un pico definido, comprobando la no detección del analito. En el estudio realizado por Flores, H. y Pinagel, D. en el año 2010 en lomos de atún en Guatemala, obtuvieron un coeficiente de determinación de 0,999; y además para comprobar esta linealidad aplicaron un análisis de varianza entre el área y la concentración de histamina obtenida, donde quedó demostrada la linealidad significativa para $p < 0,00001$.

Cuantificación. El límite de cuantificación (Tabla 1), se determinó por medio de las desviaciones típicas de las soluciones patrones con su concentración más baja, caracterizada por el primer punto de la curva de calibración.

Tabla 1 - Límite de Cuantificación	
LMC	
Pescados	0.023

Este límite define la concentración más baja detectable y cuantificable por el método. Además no tiene estipulado un valor aceptable o rechazable, pero confiere información sobre el método al determinar el alcance que éste puede tener al analizar las concentraciones más bajas requeridas.

Precisión. Según la NC-TS: 368 del 2015, precisión es el grado de concordancia entre los resultados de análisis independientes obtenidos bajo condiciones específicas. Estos resultados están en función de los parámetros repetibilidad y reproducibilidad que se muestran en las Tablas 2 y 3, respectivamente.

Tabla 2 - Repetibilidad del método

Precisión	X	SD	CV%
Repetibilidad	23.98	1.29	5.41

Tabla 3 - Reproducibilidad

Precisión	SD	$\sum SD^2 \times 2$	Reproducibilidad
Reproducibilidad	137.63	37887.10	6.6741

Ballesteros (2014) obtuvo una precisión con un coeficiente de variación menor del 2%, siendo este valor inferior al coeficiente de variación obtenido en este trabajo.

Para el parámetro de reproducibilidad se tuvo en cuenta la desviación estándar ponderada, ya que se determinó con las muestras que se recibían en el laboratorio durante seis meses. Los datos se muestran en la Tabla 3. Hernández Ballesteros también utilizó en su estudio desviaciones estándar ponderadas.

Exactitud. A partir de los resultados de la tabla 4 se puede ver que hubo un aumento del porcentaje de recobrado en la medida que aumentó la concentración de la curva patrón, aún así siempre se mantuvieron por encima del 96%.

Mariño y col realizó un estudio en el 2006 y obtuvieron valores de recuperación mayores al 96% con respecto a la concentración inicial en todos los anti-retrovirales ensayados, en el presente estudio los valores de recuperación obtenidos también se encuentran por encima de 96 %.

Baraggio, al trabajar con quesos y determinar histamina, reportó en el 2010 concentraciones de alrededor de 700 ppm de histamina, sus resultados están muy por encima de lo reportado en este trabajo (Tabla 5), donde las concentraciones son menores, incluso menor que los límites establecidos por la FDA. Teniendo en cuenta las concentraciones de histamina determinadas en las muestras analizadas, se puede concluir que son consideradas no tóxicas, ya que la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos ha establecido una concentración tolerable de histamina en pescado de 50

Tabla 4 - Valores en porcentos de recobrado según concentración de la curva de calibración

Recobrado (%)	Concentración (µg/mL)
96.1603767	1.0ug/ml
97.7495953	3.0ug/ml
99.3228126	5.0ug/ml

ppm y una concentración entre 50-200 ppm consideradas como riesgo. Los valores obtenidos por nuestro estudio se encuentran por debajo de los límites máximos de residuos establecidos por la FDA tanto para el pescado como para el queso (100 mg/kg y 200mg/kg respectivamente)⁽¹⁴⁾.

CONCLUSIONES

El método analítico para la determinación de histamina en pescados y quesos por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa es adecuado bajo todos los parámetros de desempeño evaluados, para un rango de análisis de 1.0 µg/ml a 5.0 µg/mL, siendo lineal con un alto coeficiente de determinación y un alto nivel de recobrado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hernández Ballesteros, B.A. (2014). Validación del método analítico por HPLC para disolución de levonorgestrel 1.5 mg grageas. (Tesis de Licenciatura). Universidad Veracruzana. México.
- NC-368:2010. (2010) Guía para la validación de métodos de ensayos químicos para alimentos. ICS 67.020.
- Fernández Jeri, Armstrong, Control de la producción de histamina durante el deterioro del pescado. Disponible en URL: <http://tarwi.lamolina.edu.pe/~leojeri/hidrobiologico.htm>

Tabla 5 - Algunos resultados de la cuantificación de histamina en muestras de pescado y quesos

Producto	Concentración (mg/kg)
Pescado	
MahiMahi	10.38
Atún en aceite	4.24
Sardina picante	1.21
Sardina en aceite	2.17
Atún claro	0.49
Queso	
Queso azul	52.38
Queso Granada claro	84.52
Queso blanco semiduro	24.94
Queso duro	15.20
Queso blanco	59.20

4. Siegel Jerome. La histamina juega un papel decisivo en el mantenimiento de la conciencia [Sitio de Internet] 2004. Consultado 19 de mayo del 2004. Disponible en <http://www.e-medikum.com/noticiasDelDia/verNoticia.php?noticia=29979>

5. Gouygou J, Sinquin, C, Durand, P. High pressure liquid chromatography. Determination of histamine in fish. J. Food Sci. 1987; 52 (4): 925- 927

6. Shore, P.A., Burkhalter, A. and Cohn, V.H., 1959. A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. J. Pharmacol. Exp. Ther. 127: 182.

7. Green, H. and Erickson, R.W. 1964. Effect of some drugs upon rat brain histamine content. Int. J. Neuropharmacol. 3: 315.

8. Kremsner, L.T. and Pfeiffer, C.C. 1966. Identification of substan-

ces interfering with the fluorometric determination of brain histamine. BiochemPharmacol. 15: 197.

9. Michaelson, I.A. 1967. Spermidine: A contaminant in the n-butanol extraction of brain in the fluorometric assay of histamine. Eur. J. Pharmacol. 1: 378.

10. Izquierdo P, Allara M, Torres G, García A, Barboza y Piñero M. I. Histamina en quesos madurados: Manchego, Parmesano y de año. Revista Científica, FCV-LUZ / Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela. 2003; 6: 431-435

11. Zee, J.; Simard, R.; Heureux, L.; Lebens, W. Technol.Food Sci. Technol. 18: 245 - 248. 1985.

12. Mariño, E.L.V., Albert, M.S., Ferrer, M., Modamio, P., Lastra, C.F. (2006). Desarrollo y validación de métodos analíticos para la cuantificación de antirretrovirales por HPLC. (Tesis de Maestría). Universidad de Barcelona. España.

13. Flores, H Pinagel, D 2010. Determinación de los niveles de histamina presentes en muestras de lomo de atún, de peces (familia escombridae), provenientes de la industria atunera guatemalteca. Instituto de Investigaciones químicas y biológicas. Facultad de Ciencias químicas y farmacia Universidad de San Carlos de Guatemala. Vol. I8 No. I Revista Científica año 2010

14. Medina BlancoDayana, 2017. Validación del método analítico para determinar la concentración de histamina en quesos mediante HPLC. Tesis en

opción al Título en Licenciatura en Ciencias Alimentarias Universidad de La Habana. Instituto de Farmacia y Alimentos

15. Hernández Ballesteros, B.A. (2014). Validación del método analítico por HPLC para disolución de levonorgestrel 1.5 mg grasas. (Tesis de Licenciatura). Universidad Veracruzana. México.

16. Baraggio, N.G., Velázquez, N.S., Simonetta, A.C. (2010). Aminas biógenas generadas por cepas bacterianas provenientes de alimentos lácteos y cárnicos. Revista científica y Tecnología 13, 1 - 8.

17. Sumner, S.; Roche, F.; Taylor, S. Factors Controlling Histamine Production in Swiss cheese Inoculated with Lactobacillus buchneri. J. Dairy Sci. 73 (11): 30503058.1990.





INDESUR

BOMBA DE PISTON SANITARIA INDESUR PS

ACCIONAMIENTO NEUMATICO TOTALMENTE DESARMABLE

APLICACIONES

- Jugos, concentrados y pulpas
- Cremas
- Lacteos
- Colorantes y aditivos
- Salsas y condimentos
- Jarabes y aceites

ventas@indesur.com.ar - 011 4206-1867 / 3908

