

Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología

Titulo: Validación de un método de determinación de histamina por hplc en quesos y pescados

**Autores: Lic. Iván Hernández Garciarena
Dra. Ana M Jordán Quintans, Dra. Marta Cardona Gálvez, Lic. Yariela Sánchez Azaharez**



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 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*-oftaldehído, usando HPLC bajo gradiente isocrático y siguiendo la metodología propuesta por Gouygou y col. (1987).



Materiales y Métodos

Para la extracción de la histamina a partir de las muestras de queso y pescado, 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 tri cloro acético al 5%. De cada pescado se pesaron 50 g de muestra y se diluyeron en 100 mL de ácido tricloroacético al 10 %. Ambas muestras se homogenizaron con un equipo Ultraturrax y posteriormente se centrifugaron a 4° C 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



Vinhem
Instituto Tecnológico de
Quilicura, Chile

RESULTADOS CIENTÍFICOS

Por una Pedagogía de excelencia, con Rigor Académico y una Atención al estudiante



Materiales y Métodos

El líquido filtrado se colocó en viales para proceder a su derivatización con ortoftaldehído (OPA) ⁽³⁾; para luego colocarlos en el HPLC. La identificación se realizó con un estándar de histamina de 100 ppm en ácido tricloroacético al 10 %.

- Condiciones de la corrida cromatográfica:
- Volumen de inyección 20 μL ;
- Flujo de la fase móvil 0,8 ml/min;
- Tiempo de corrida 15 min;
- Temperatura del horno de columna 33°C
- Longitud de onda $\lambda_{\text{exc}} = 358 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisión}} = 447 \text{ nm}$,



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La linealidad del sistema fue evaluada con cinco niveles de concentración diferentes, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml, 4 µg/ml y 5 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.



Yimbem
Instituto Tecnológico Superior
Bogotá, Colombia

RESULTADOS CIENTÍFICOS

Por una Epistemología de excelencia, una Historia escrita y una Alimentación saludable.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

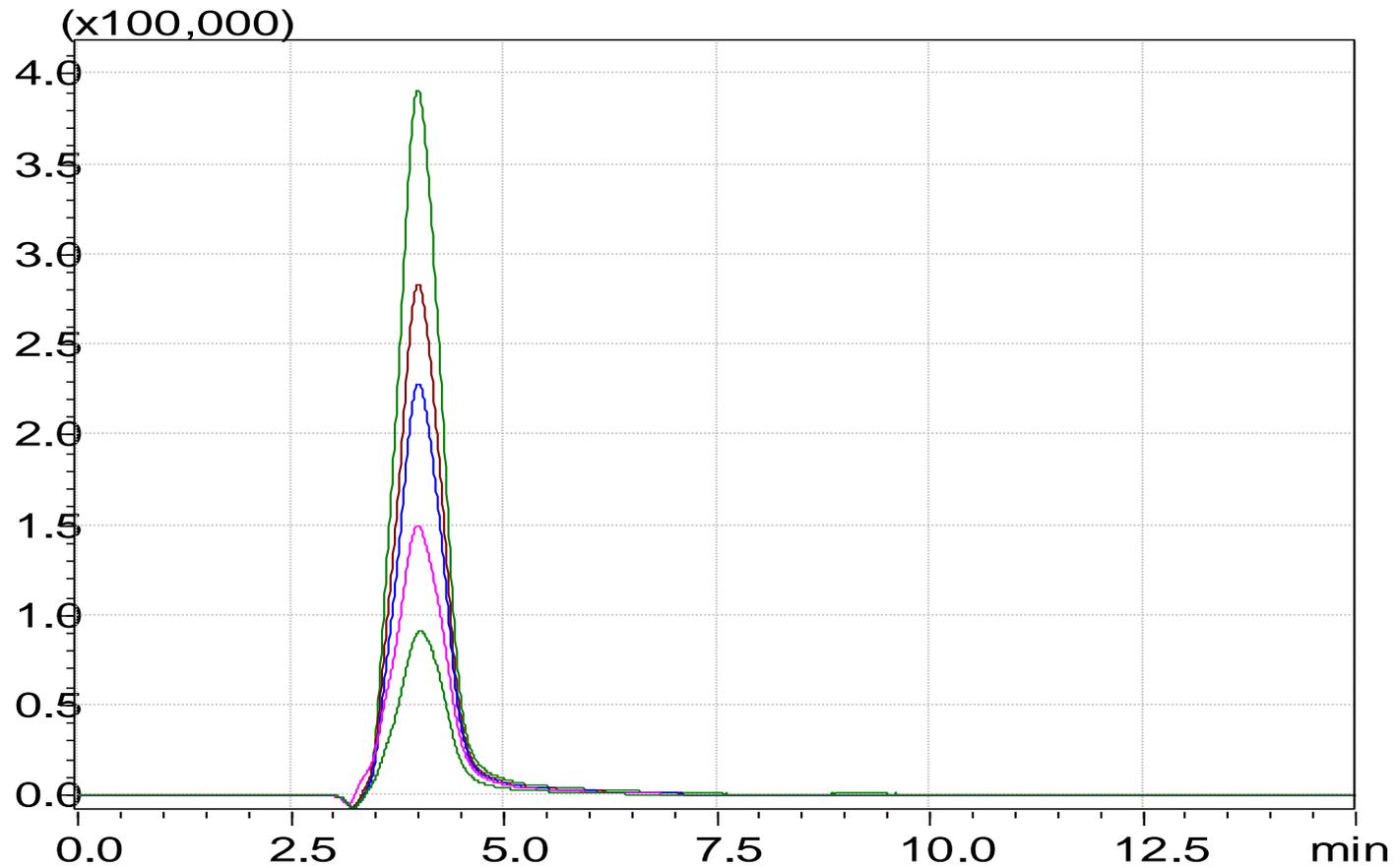
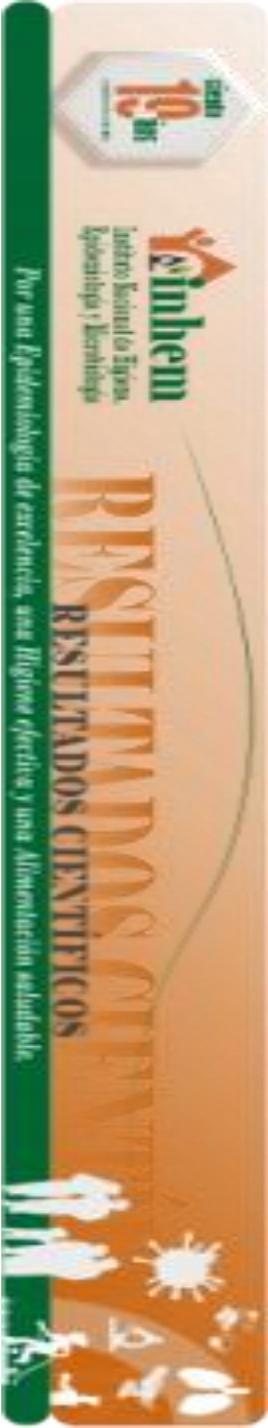


Figura 2: Cromatograma integrado de los puntos de la curva de calibración

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se puede evidenciar que todos los puntos coinciden con un mismo tiempo de retención que se encuentra entre 3.5 hasta 5 minutos, durante la experimentación se determino que no existen interferencias significativas dando lecturas correctas.

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



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 3: Valores en porcentos de recobrado según concentración de la curva de calibración

Recobrado (%)	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
96.1603767	1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$
97.7495953	3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$
99.3228126	5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$



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 I 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-368:2015. (2015) 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>
- 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-medicum.com/noticiasDelDia/verNoticia.php?noticia=29979>
- Gouygou J, Sinquin, C, Durand, P. High pressure liquid chromatography. Determination of histamine in fish. J. Food Sci. 1987; 52 (4): 925- 927

