



DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Apellidos, nombre	Fuentes López, Ana (anfuelo@upvnet.upv.es) Fernández Segovia, Isabel (isferse1@tal.upv.es) García Martínez, Eva (evgarmar@tal.upv.es)
Departamento	Tecnología de Alimentos
Centro	Universitat Politècnica de València

1 Resumen de las ideas clave

Las aminas biógenas son compuestos nitrogenados no proteicos presentes en numerosos alimentos (carne, pescado, queso, vino, vegetales,...). Las aminas biógenas más frecuentes en alimentos son histamina, tiramina, putrescina, cadaverina, triptamina, β -feniletilamina, espermina y espermidina. La técnica analítica más utilizada para la determinación de estos compuestos es la cromatografía de alta resolución (HPLC) por su precisión, exactitud y especificidad. A determinación y cuantificación de estos compuestos. En este artículo vamos a describir el procedimiento para la determinación de aminas biógenas por HPLC, mediante derivatización pre-columna con cloruro de benzoílo.

2 Introducción

Las aminas biógenas son compuestos orgánicos nitrogenados de carácter básico y de bajo peso molecular. Bajo la definición de aminas biógenas se agrupan diversos compuestos que tienen en común su origen biótico y la presencia de, al menos, un grupo amino. Atendiendo a su estructura química se pueden clasificar en alifáticas (putrescina, espermidina, espermita, cadaverina), aromáticas (tiramina, feniletilamina) o heterocíclicas (histamina, triptamina) y en función del número de grupo amino de la molécula, podemos hablar de monoaminas (histamina, feniletilamina, tiramina), diaminas (putrescina, cadaverina) o poliaminas (espermidina, espermina) [1].

Según su origen, las aminas biógenas se clasifican en dos grupos, aminas biógenas y aminas naturales. Las aminas biógenas se forman por la descarboxilación microbiana de los aminoácidos precursores. Dentro de este grupo se encuentran las aminas aromáticas tiramina, β -feniletilamina, histamina y triptamina. Las aminas naturales, de origen fisiológico, se forman como consecuencia de los procesos metabólicos celulares normales de los seres vivos. Por tanto, su presencia en los alimentos sería de origen endógeno. Dentro de este grupo se incluyen las diaminas putrescina y cadaverina y las poliaminas espermina, espermidina y agmatina (Figura 1).

Las tiramina, histamina, β -feniletilamina, serotonina y triptamina son aminas biógenas que presentan un importante papel en la actividad fisiológica humana como la regulación de la temperatura corporal, el pH estomacal,... Sin embargo, el interés de la determinación de las aminas biógenas en los alimentos radica en las posibles implicaciones toxicológicas de estos componentes para la salud humana, así como su significación desde un punto de vista higiénico-sanitario y tecnológico. En este sentido, la presencia de cantidades relativamente elevadas de aminas biógenas en un alimento puede indicar defectos higiénicos en algún momento de la cadena de producción o manipulación, y pueden suponer un riesgo toxicológico para determinados consumidores [2].

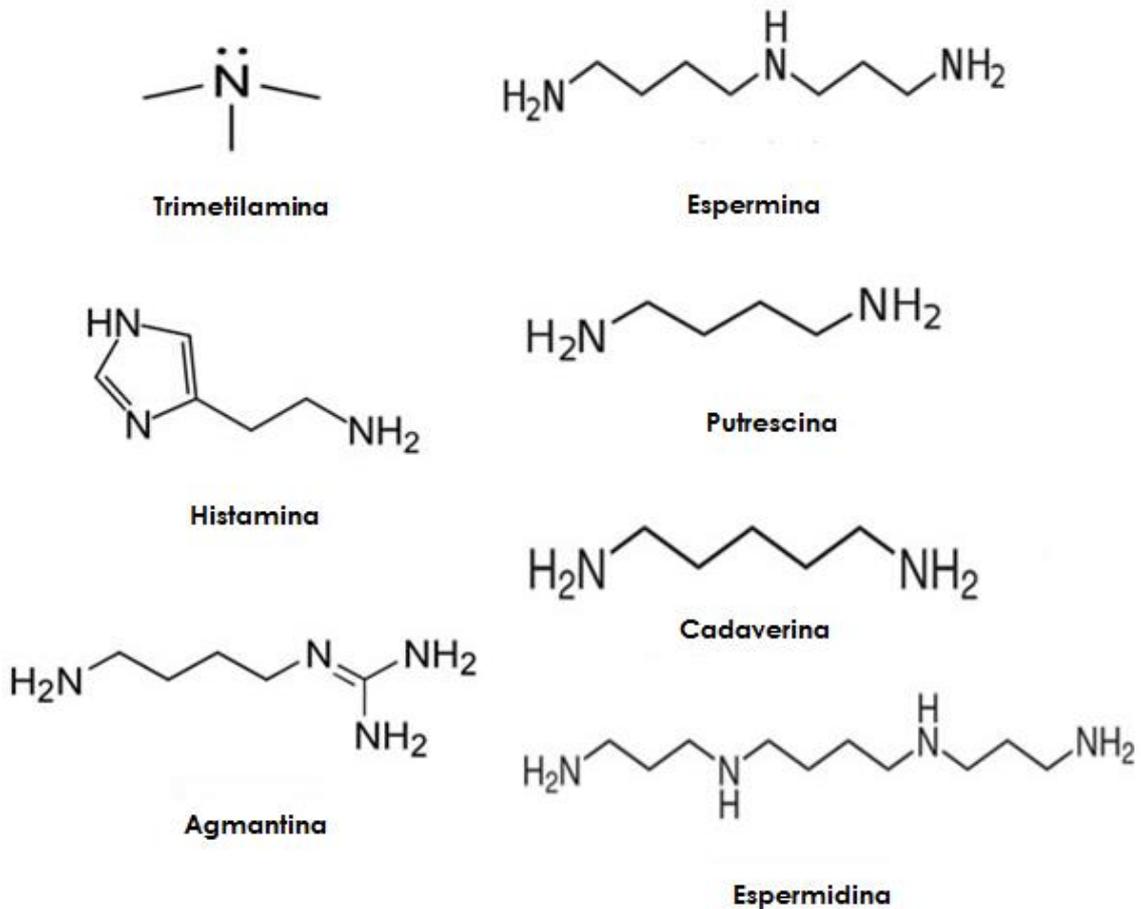


Figura 1. Estructura algunas de las aminas biógenas que pueden encontrarse en los alimentos.

Existen diferentes procedimientos analíticos para la determinación y cuantificación de aminas biógenas en alimentos. Estas técnicas pueden clasificarse en métodos biológicos, ópticos, enzimáticos y cromatográficos. Los métodos biológicos, ópticos y enzimáticos son bastante largos y laboriosos, ya que requieren eliminar las interferencias que podrían causar la presencia de otras sustancias, y sólo permiten el análisis de una sola amina biógena. Las técnicas cromatográficas, sin embargo, permiten el análisis simultáneo de varias aminas y presentan mayor precisión, exactitud y especificidad comparado con el resto de metodologías. Dentro de las técnicas cromatográficas, encontramos la cromatografía en capa fina, cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Entre estos métodos analíticos destaca el empleo de HPLC. La determinación de aminas biógenas por HPLC se basa en métodos de detección UV y/o de fluorescencia donde es necesario realizar una derivatización con cloruro de dansilo (DNS-Cl), ortoftaldehído (OPA), 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC), entre otros.

3 Objetivos

Con este artículo se pretende que el alumno sea capaz de:



- Llevar a cabo la determinación de aminas biógenas empleando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta (HPLC-UV) y derivatización pre-columna con cloruro de benzoílo.
- Calcular la concentración de una de las aminas biógenas identificadas, la histamina, en una conserva de pescado a partir de los resultados obtenidos en el análisis cromatográfico.

4 Desarrollo

En primer lugar vamos a describir el procedimiento para la determinación de aminas biógenas en una muestra de pescado. A continuación, veremos un ejemplo práctico del cálculo de la concentración de una de las principales aminas biógenas, la histamina, en una conserva de pescado.

4.1 Fundamento

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada con detección por UV es una de las técnicas analíticas que puede ser empleadas para la determinación de aminas biógenas en alimentos. Este análisis permite la determinación simultánea de las diferentes aminas biógenas que pueden estar presentes en el alimento. Para llevar a cabo esta determinación debe realizarse en primer lugar una extracción de las aminas de la muestra y la derivatización del extracto empleando una disolución de cloruro de benzoílo. Finalmente se llevará a cabo el análisis cromatográfico con el objetivo de identificar cada una de las aminas presentes en la muestra y cuantificarlas empleando disoluciones patrón.

4.2 Materiales y reactivos

Material e instrumentación:

- Balanza analítica
- Vaso de precipitado
- Embudos de cristal
- Papel de filtro
- Micropipetas de 10 y 1 mL
- Jeringa y filtros de jeringa de nylon de 0.45 μm .
- Matraces aforados de 10 mL
- Sistema de desgasificación de la fase móvil: baño ultrasonidos
- Viales de inyección
- Equipo cromatográfico: HPLC con detector UV-visible

Reactivos químicos:

- Disolución acuosa de ácido tricloroacético (TCA) al 6% (p/v).
- Disolución acuosa de hidróxido sódico 2 M.
- Disolución de cloruro de benzoílo al 2% (v/v) en acetonitrilo.
- Disolución acuosa saturada de cloruro sódico.
- Dietiléter.
- Agua calidad HPLC.
- Acetonitrilo calidad HPLC.



- Disoluciones acuosas de los patrones: histamina, putrescina, cadaverina, espermidina y espermina, a 10000 ppm cada una.
- Nitrógeno gas.

4.3 Procedimiento experimental

A continuación, vamos a ver con un ejemplo como determinar el contenido de histamina en una muestra de conserva de pescado empleando cromatografía líquida de alta resolución con derivatización precolumna [3].

1. Preparación de las disoluciones patrón

Las aminas biógenas (AB) analizadas son histamina, putrescina, cadaverina, espermidina y espermina. Para la determinación de estos compuestos en las muestras se emplean disoluciones patrón de cada uno de estos compuestos a diferentes concentraciones.

Para ello se preparan disoluciones patrón de cada amina biógena desde 0.5 hasta 25 mg AB/L disolución. Para la preparación de estas disoluciones se parte de una disolución madre de cada AB de concentración igual a 1000 mg AB/L disolución.

2. Preparación del extracto de la muestra

Se pesan en un vaso de precipitados, 5 g de la muestra, se añaden 20 mL de la disolución de TCA y se homogeneiza durante 3 min en ultraturrax.

A continuación el homogeneizado se centrifuga a 10000 rpm y 4 °C durante 10 min. El sobrenadante obtenido, se filtra a través de un filtro Whatman nº 1 y se afora con agua bidestilada hasta un volumen final de 50 mL.

3. Derivatización de las aminas biógenas

Para la llevar a cabo la derivatización de las aminas biógenas, se toma una alícuota de 2 mL de la disolución anterior procedente de la muestra (o 200 µL de las disoluciones de los patrones) y se llevan a un tubo de ensayo.

Se adiciona 1 mL de la disolución de NaOH 2 M y 1 mL de la disolución de cloruro de benzoílo. El tubo se agita en un vortex durante 1 min y se deja en reposo a temperatura ambiente durante 15 min.

A continuación este extracto se filtra a través de un filtro Whatman nº 1.

Se toma el extracto filtrado en un tubo de ensayo, se añaden 2 mL de disolución saturada de NaCl y se extraen las aminas biógenas con dietiléter. Para ello se adicionan 2 mL de dietiléter, se agita y cuando se separen las 2 fases se recoge la fase orgánica (superior), que es la fase donde se encuentran las aminas biógenas. Esta operación se lleva a cabo dos veces, para ello se vuelve a añadir 2 mL de dietiléter a la fase acuosa y la fase orgánica recogida en esta segunda extracción se pone junto con la fase orgánica recogida en la primera extracción.

Finalmente, se evapora el dietiléter de todo el extracto recogido hasta sequedad con una corriente de nitrógeno.

4. Inyección de las muestras y patrones

Los residuos de la muestra y patrones se redisuelven en 500 µL de acetonitrilo, agitando suavemente. Una vez disuelto el residuo, se filtra empleando un filtro de jeringa de nylon de 0.45 µm y se trasvasa a un vial de cromatografía que se introduce en el muestreador automático del equipo y se inyectan 20 µL en el equipo cromatográfico.



Condiciones cromatográficas

- Columna C18 (1540 x 4,6 mm y 5 μ m) con pre-columna
- Detector: UV-vis a $\lambda=254$ nm
- Fase móvil A: Acetonitrilo
- Fase móvil B: Agua
- Gradiente de elución:

Tiempo (min)	Flujo (mL·min ⁻¹)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0	1,2	80	20
2	1,5	70	30
4	1,8	60	40
6	1,8	50	50
15	1,5	20	80
20	1,2	80	20
22	1,2	80	20

5. Identificación y cuantificación de las aminas biógenas presentes en la muestra

Para la identificación de los analitos estudiados en la muestra, se inyectan en el equipo las disoluciones de los patrones derivatizados de cada una de las aminas biógenas estudiadas. La identificación de estos compuestos se lleva a cabo comparando los tiempos de retención (t_R) correspondientes a los picos de los patrones con los t_R de los picos obtenidos en el cromatograma de las muestras.

La cuantificación de las aminas biógenas se realiza mediante el método del estándar externo. Para ello, se inyectaron en el equipo cromatográfico las disoluciones de los patrones a diferentes concentraciones. A partir de los cromatogramas registrados, se calculan las áreas correspondientes a cada analito para cada concentración. Con estos datos, se construyen rectas de calibrado para cada uno de los compuestos, representando el área del pico frente a la concentración de patrón.

De los cromatogramas de las muestras, se obtienen también las áreas de cada compuesto y haciendo uso de las ecuaciones de las rectas de calibrado, se calculan las concentraciones de cada analito en el extracto de la muestra.

4.4 Caso práctico

Como ejemplo de este procediendo de análisis vamos a determinar el contenido en histamina en atún en conserva.

La histamina puede encontrarse a concentraciones elevadas en el pescado y sus derivados, principalmente en los productos fermentados o en conserva. Esta amina biógena se ha relacionado con la conocida como "intoxicación de los escómbridos" o "intoxicación histamínica" causada principalmente por el consumo de pescado con elevados niveles de histamina[4]. Normalmente, se trata de un trastorno leve y de corta duración en individuos sanos, pero las personas alérgicas o más sensibles pueden sufrir manifestaciones más severas. Debido a los efectos tóxicos de esta amina, la determinación de su presencia en alimentos es de gran interés.

Para la determinación de histamina se procederá según el protocolo de análisis descrito anteriormente y se inyectan en el sistema cromatográfico los extractos de la muestra y de las disoluciones patrón de histamina a diferentes concentraciones.

El análisis cromatográfico de las disoluciones patrón nos permite obtener los cromatogramas que nos van a servir para identificar la histamina en la muestra.

A partir de los cromatogramas de las disoluciones patrón (Figura 2) obtenemos que el tiempo de retención para la histamina es 5.96 min.

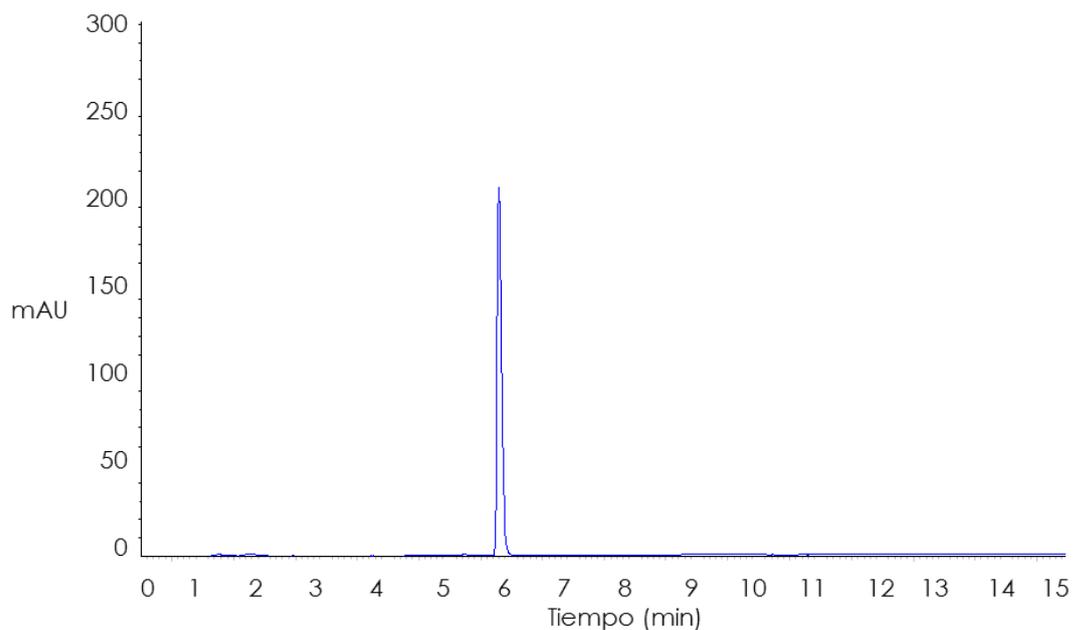


Figura 2. Cromatograma de la disolución patrón de histamina

Además al analizar disoluciones patrón de histamina a diferentes concentraciones podemos calcular las áreas correspondientes a los picos de la histamina (Tabla 1) en estas disoluciones.

Patrón (mg HIST/L)	t_R
0.5	23806
1.25	61546
2.5	129906
5	255872
12.5	637093
25	1133038

Tabla 1. Tiempo de retención y área de los picos de los cromatogramas de los patrones de histamina (HIST).

La representación de las áreas de los picos de estos compuestos frente a los valores de concentración nos permiten obtener la recta de calibrado para este compuesto (Figura 3).

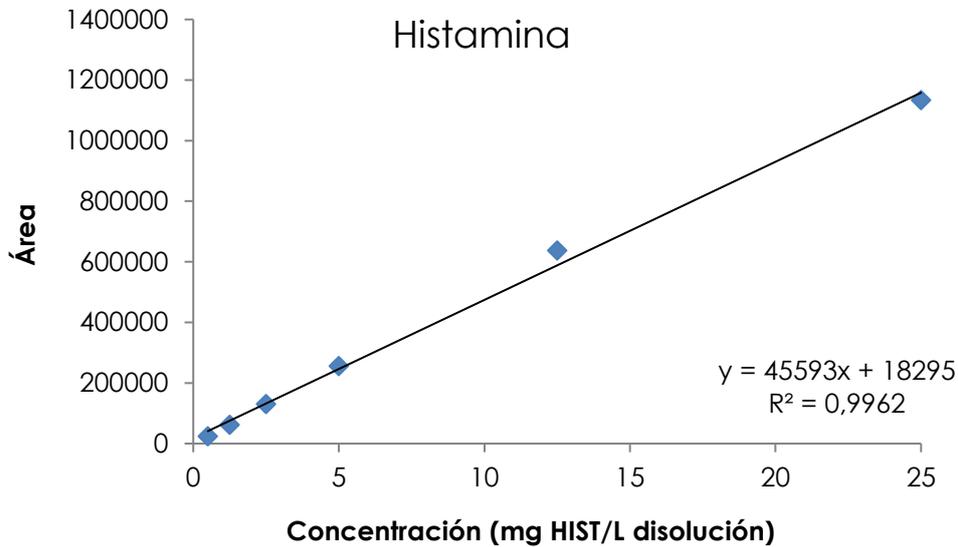


Figura 3. Recta de calibrado obtenida con los datos de la Tabla 1

Los extractos obtenidos a partir de las muestras se inyectan en el equipo HPLC empleando las mismas condiciones empleadas para los patrones. El cromatograma de este extracto se muestra en la figura 4, donde se puede identificar el pico correspondiente a la histamina ($t_R=5.9$).

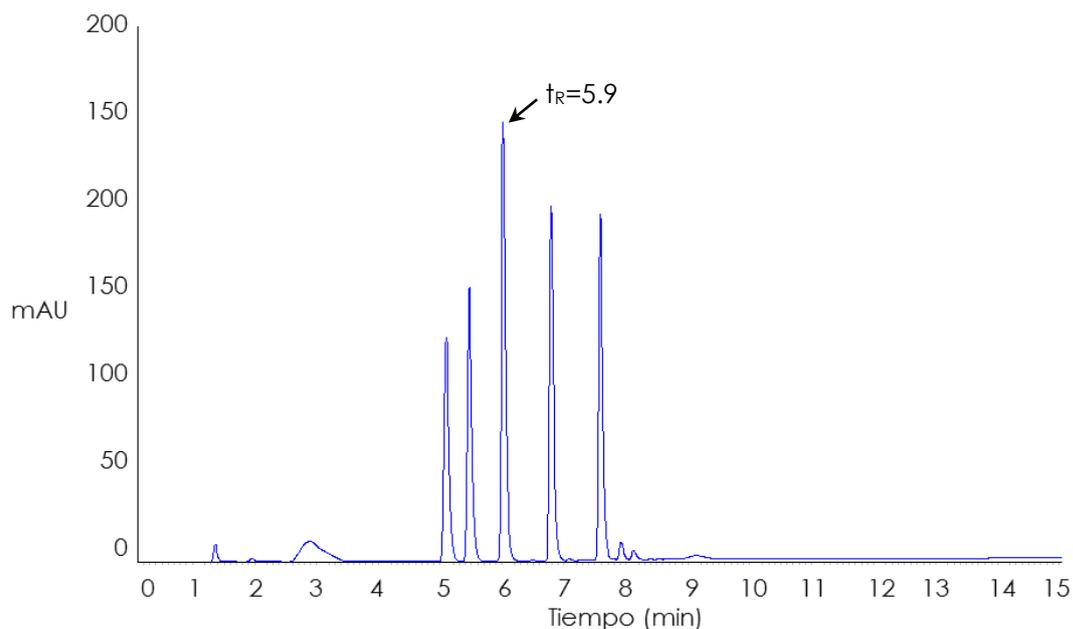


Figura 4. Cromatograma de la muestra de atún



La integración del pico correspondiente a la histamina nos permite obtener el valor del área para este analito. En este caso, el valor del área calculada para la histamina en la muestra es igual a 435351.

Sustituyendo el valor del área en la ecuación de calibrado podemos calcular la concentración esta amina biógena en el extracto inyectado en el cromatógrafo:

$$\text{Área (y)} = 435351 \rightarrow y = 45593x + 18295 \rightarrow \text{concentración (x)} = 9.147 \text{ mg/L}$$

Para determinar la concentración de histamina en la muestra analizada tenemos que considerar los diferentes pasos realizados en el protocolo analítico.

$$\text{HISTAMINA} = 9,147 \text{ mg/L} \times \left(\frac{0.05 \text{ L disolución}}{0.005 \text{ kg muestra}} \right) \times \left(\frac{0.5 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} \right) = 22.87 \text{ mg/kg}$$

Debido a la reconocida toxicidad de la histamina, el CODEX establece límites en el contenido de esta amina en 100 mg / kg en pescados de las familias *Scombridae*, *Scombrosocidae*, *Clupeidae*, *Coryphaenidae* y *Pomatimidae* [5]. Atendiendo a este criterio, podríamos decir que la muestra de atún (familia *Scombridae*) analizada es aceptable para el consumo.

5 Cierre

A lo largo de este objeto de aprendizaje hemos visto cómo llevar a cabo la determinación analítica de aminas biógenas en alimentos, mediante la técnica de HPLC. Con ayuda de un ejemplo, hemos visto cómo identificar y cuantificar la concentración de una de estas aminas, la histamina, en una conserva de pescado.

6 Bibliografía

[1]. Fernández, M.; Alvarez, M A. (2008). Las Aminas Biógenas en los alimentos. Agrosic, 2-8.

[2] Pons, S. (2005). "Estudio de alternativas para la evaluación de la frescura y la calidad del boquerón (*Engraulis encrasicolus*) y sus derivados". Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Ed. Universitat de Barcelona.

[3] Özogul, F.; Taylor, KDA; Quantick, P.; Özogul, Y. (2002). Biogenic amines formation in Atlantic herring (*Clupea harengus*) stored under modified atmosphere packaging using a rapid HPLC method". International Journal of Food Science and Technology, 37, 515-522.



[4] Ruiz-Capillas, C.; Jiménez-Colmenero, F. (2010). "Aminas biógenas: importancia toxicológica". Revista electrónica de biomedicina, 3, 58-60. Disponible en: <http://biomed.uninet.edu/2010/n3/ruiz-capillas.html>

[5] CODEX (1981). Norma para pescados en conserva. Codex Stan 119-1981. Disponible en: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/list-of-standards/en/>