

TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN QUÍMICA



UNIVERSIDAD DE BURGOS

**OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE
DERIVATIZACIÓN EN LA DETERMINACIÓN DE
HISTAMINA MEDIANTE HPLC CON
DETECCIÓN FLUORIMÉTRICA**

Sonia Cuevas Mantecón

Tutoras: Ana Herrero Gutiérrez y Silvia Sanllorente Méndez

Julio de 2016

ÍNDICE

RESUMEN Y ABSTRACT	1
1. OBJETIVOS	3
2. INTRODUCCIÓN	3
3. FUNDAMENTO TEÓRICO	5
3.1 DISEÑO DE EXPERIMENTOS CENTRAL COMPUESTO	5
3.2 REGRESIÓN EN MÍNIMA MEDIANA DE CUADRADOS	7
4. EXPERIMENTAL	7
4.1 REACTIVOS Y DISOLUCIONES	7
4.2 INSTRUMENTACIÓN	8
4.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	8
4.4 SOFTWARE	9
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
5.1 ESTUDIOS INICIALES	9
5.2 OPTIMIZACIÓN DE LA DERIVATIZACIÓN	10
5.3 COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE ANÁLISIS	14
6. CONCLUSIONS	19
7. BIBLIOGRAFÍA	20

RESUMEN

En este trabajo se aborda la determinación de histamina mediante espectrofotometría de fluorescencia molecular. Dado que la histamina no presenta fluorescencia natural, se ha derivatizado con cloruro de dansilo y, debido a la interferencia de éste sobre la emisión fluorescente de la histamina, se ha recurrido a una técnica cromatográfica (HPLC) para separar las señales espectrales. En una primera parte del trabajo se han optimizado las variables experimentales más influyentes en la derivatización (pH, temperatura y tiempo) mediante el uso de un diseño central compuesto. Una vez optimizada esa etapa del análisis, se han comparado dos métodos de análisis que emplean longitudes de onda de excitación diferentes en la detección fluorimétrica. Dicha comparación se ha llevado a cabo a través de las distintas figuras de mérito que se han estimado. El procedimiento puesto a punto tiene una capacidad de detección ($CC\beta$) de 106 ppb, con probabilidades de falso positivo y falso negativo de 0.05.

ABSTRACT

The aim of this work was the determination of histamine through molecular fluorescence spectrophotometry. Since histamine does not exhibit native fluorescence, it was derivatized with dansyl chloride and, due to the interference of this on the fluorescent emission of histamine, a chromatographic technique (HPLC) was used to separate the spectral signals. Firstly, the experimental variables that most influence the derivatization (pH, temperature and time) were optimized by using a central composite design. Once this stage of the analysis was optimized, two methods of analysis which used different excitation wavelengths for the fluorimetric detection were compared. The comparison was performed through different figures of merit which were estimated. The developed procedure has a capability of detection ($CC\beta$) of 106 ppb, false negative and false probabilities being 0.05.

1. OBJETIVOS

Optimizar las condiciones de la reacción de derivatización para la determinación de histamina mediante espectrofotometría de fluorescencia molecular.

Estudiar la viabilidad de la determinación de histamina mediante espectrofotometría de fluorescencia molecular.

Encontrar las condiciones instrumentales más idóneas para llevar a cabo la determinación de histamina.

Validar el procedimiento de análisis.

2. INTRODUCCIÓN

Las aminas biógenas son bases de bajo peso molecular formadas por la descarboxilación de grupos amino libres durante la actividad metabólica celular de algunos microorganismos, plantas y animales [1]. Entre las principales aminas biógenas se encuentran la putrescina, cadaverina, espermidina, espermina, triptamina, 2-feniletilamina, tiramina o la histamina, siendo el estudio de esta última de especial importancia, ya que es la única regulada por la legislación vigente, siendo los límites máximos establecidos en la Unión Europea para la misma de 200 mg/kg en pescados frescos y de 400mg/kg en pescados sometidos a tratamientos de maduración enzimática como la salmuera [2]. La histamina se forma por la descarboxilación del aminoácido histidina catalizada por la histidina descarboxilasa y piridoxalfosfato como coenzima.

Estas aminas pueden encontrarse en una gran variedad de alimentos, bebidas y comestibles fermentados, especialmente aquellos que son ricos en proteínas. Dentro de la gran variedad de alimentos a los que afectan estas aminas se encuentran el pescado y sus derivados, productos cárnicos, huevos, quesos, vegetales fermentados, frutas, nueces, chocolate, productos de soja, cervezas y vinos. Las aminas biógenas son termoestables, no hay ningún tratamiento capaz de eliminarlas una vez que se han formado. [3]

Existen dos motivos para el estudio de las aminas en alimentos. El primero de ellos es su potencial toxicidad, y el segundo es utilizarlas como indicadores de la calidad de los alimentos.

Cuando los niveles de aminas biógenas son bajo, no constituyen un riesgo para la salud, ya que pueden ser metabolizadas a productos fisiológicamente menos activos gracias a la acción de enzimas como las oxidasas diamina. Sin embargo, cuando la concentración es elevada, el sistema es incapaz de degradarlas por completo, y los efectos sobre la salud se hacen notables, siendo las más tóxicas la histamina y la tiramina. La histamina tiene un corto periodo de incubación, que varía desde minutos hasta pocas horas tras la ingesta. Los principales síntomas de intoxicación en humanos por la incorporación de niveles elevados de histamina son dolor de cabeza, náuseas, vómitos, dificultad respiratoria, sofocos, sudoración, palpitaciones, diarrea y erupciones de color rojo brillante.

Son muchos los métodos empleados para la determinación de aminas biógenas [4]. Dentro de los más utilizados se encuentran la cromatografía en capa fina, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de líquidos de alta eficacia. También se obtienen buenos rendimientos empleando electroforesis capilar de zona. Entre las técnicas de

detección más usadas están la espectrofotometría de absorción molecular en el UV-visible y la espectrofotometría de fluorescencia molecular.

En ambos casos, para poder llevar a cabo la detección, se requiere un proceso de derivatización de las aminas, ya que ellas por si mismas no presentan grupos activos que originen absorción de radiación ni fluorescencia. Para ello se suele emplear cloruro de dansilo, que forma un derivado fluorescente con las aminas biógenas tanto primarias como secundarias. Otro compuesto que se puede emplear con el mismo fin es el OPA (orto-ftaldialdehído), aunque éste solo resulta de interés con aminas primarias y los derivados obtenidos en este caso son menos estables que los obtenidos con el cloruro de dansilo. Por el contrario, los derivados dansilados pueden conservarse a 4 °C protegidos de la luz, sin que se degraden, desde días hasta meses dependiendo de la amina de que se trate.

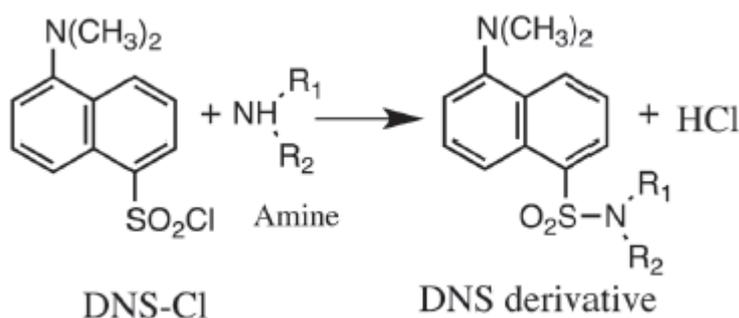


Figura 1. Reacción de derivatización del cloruro de dansilo con aminas.

Resulta de gran interés el análisis mediante espectrofotometría de fluorescencia molecular ya que es una técnica sencilla, económica y rápida, que permite alcanzar límites de detección muy bajos. Los derivados dansilados de las aminas biógenas son susceptibles de ser analizados mediante esta técnica. Sin embargo, en caso de que existieran interferencias en el análisis debido a la presencia de otros fluoróforos, sería necesario recurrir a una técnica de separación, como es la cromatografía.

La reacción de derivatización de la histamina con el cloruro de dansilo depende de varios factores experimentales, fundamentalmente del pH, de la temperatura y del tiempo de reacción. En base a algunos procedimientos encontrados en la bibliografía para llevar a cabo esta reacción, en este trabajo se ha optimizado un procedimiento para maximizar el rendimiento de dicha derivatización.

Una forma habitual de abordar este tipo de optimizaciones es recurrir a la metodología de diseño de experimentos, ya que con menor esfuerzo experimental es posible obtener resultados fiables.

Este trabajo se centra en el estudio de la histamina ya que, como se ha mencionado anteriormente, es la amina biógena de mayor interés por ser la única que cuenta con limitaciones legales en la actualidad.

3. FUNDAMENTO TEÓRICO

3.1 DISEÑO DE EXPERIMENTOS CENTRAL COMPUESTO

Esta metodología permite llevar a cabo la experimentación necesaria para optimizar un procedimiento de la forma más eficiente. A diferencia de otros diseños experimentales, los diseños de superficie de respuesta [5] tienen como objetivo encontrar los valores de los factores o variables experimentales que optimizan la variable respuesta.

Para llevar a cabo el diseño de experimentos, se hace necesario definir un dominio experimental, que dependerá de la amplitud en que varían los factores o variables experimentales. Una vez obtenido el dominio experimental, se propone un modelo matemático que relacione la respuesta experimental a optimizar con los factores experimentales. Los más utilizados son el modelo de primer orden o lineal y el modelo de segundo orden o cuadrático.

Si se emplea un modelo de primer orden, se está considerando que no existe interacción entre las variables estudiadas, es decir, que la modificación de una de ellas no afecta en la influencia de las demás. En estos casos, el modelo responde a la siguiente ecuación, expresada para dos factores experimentales:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \varepsilon \quad (1)$$

donde x_1 y x_2 son los factores codificados, y ε una variable aleatoria que sigue una distribución normal con media cero y distribución típica σ .

Cuando se prevé que puede existir interacción entre las variables y por tanto, curvatura, se emplea un modelo de orden dos, que para el caso de dos variables, responde a la siguiente ecuación:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_1 x_2 + \beta_4 x_1^2 + \beta_5 x_2^2 + \varepsilon \quad (2)$$

Los modelos de segundo orden son aquellos que permiten estudiar los efectos de interacción y efectos cuadráticos, aparte de los efectos lineales. Se utilizan ante la necesidad de explorar una superficie más compleja o bien cuando se tiene identificada la región de respuesta óptima y se quiere caracterizar esa superficie de respuesta. La superficie de respuesta permite inspeccionar, de manera visual, la respuesta en una cierta zona y encontrar unas condiciones óptimas de operación.

Estos modelos pueden expresarse en forma matricial como $\mathbf{y} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \boldsymbol{\varepsilon}$, donde \mathbf{y} es el vector respuesta, \mathbf{X} es el matriz del modelo y $\boldsymbol{\beta}$ es el vector de coeficientes. La estimación de $\boldsymbol{\beta}$ por mínimos cuadrados es $\mathbf{b} = (\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^T \mathbf{y}$, y la matriz de varianza-covarianza de las estimaciones de los coeficientes es $Cov(\mathbf{b}) = (\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} s^2 = (c_{ij}) s^2$, donde s^2 es la media de cuadrados residual, una estimación de σ^2 . La matriz $(\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1}$ se conoce como "matriz de dispersión". A partir de la diagonal de dicha matriz, puede extraerse información acerca de la calidad de los coeficientes estimados. Estos elementos, escalados, se denominan factores de inflación de varianza (VIF) y se consideran óptimos cuando su valor es uno, que garantiza la menor varianza posible para los coeficientes calculados, aunque se consideran diseños aceptables aquellos que

presenten unos valores de VIF comprendidos entre 1 y 4, siendo descartados aquellos cuyos VIF sean superiores a 7.

El último paso del proceso es la selección del diseño experimental, que representa el conjunto de condiciones experimentales que proporciona las estimaciones con menor varianza de los coeficientes del modelo y de la respuesta. Los más habituales para el tratamiento de problemas de optimización son el diseño Dohelert, el central compuesto y el Box Benken.

Entre los diseños de superficie de respuesta mencionados, el diseño central compuesto es uno de los más utilizados por su gran flexibilidad. Consta de un diseño factorial (diseño que consta de 2 o más factores, cada uno de los cuales con distintos niveles que permite. Este tipo de experimentos permiten el estudio del efecto de cada factor sobre la variable respuesta, así como el efecto de las interacciones entre factores sobre dicha variable) o factorial fraccionado a dos niveles. También incluye unos puntos centrales que permiten examinar la presencia de curvatura, obtener información sobre los efectos cuadráticos y estimar la magnitud del error experimental. Por último, consta de puntos axiales o estrella, a partir de los cuales se ajusta la curvatura con respecto a cada factor. La Figura 2 muestra un diseño central compuesto rotable, en la que puede apreciarse cómo los puntos (excepto los valores centrales) forman una circunferencia.

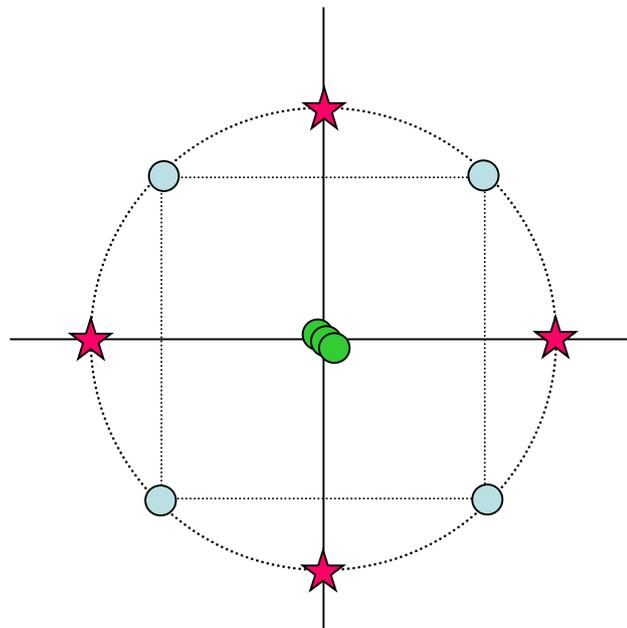


Figura 2. Diseño central compuesto: réplicas del punto central (zona central), puntos del diseño factorial (vértices del cuadrado), y puntos axiales (punto-estrella).

Una vez realizados los experimentos indicados por el diseño de experimentos, se hace necesaria la evaluación de la adecuación de los datos obtenidos al modelo programado. Éste será apropiado si: (1) el modelo explica significativamente la varianza de la respuesta (a través del test de significación y de porcentaje de varianza explicada, R^2); (2) no hay fallo de ajuste (el sesgo del modelo es cero), lo cual requiere disponer de réplicas en al menos uno de los puntos del diseño; y (3) los residuos siguen una distribución normal y son homocedásticos (tienen varianzas homogéneas), esto último únicamente si se tienen réplicas en varias condiciones experimentales.

3.2 REGRESIÓN EN MÍNIMA MEDIANA DE CUADRADOS

Como modelo para un calibrado univariante, se suele emplear la siguiente ecuación:

$$y = a + bx + \varepsilon \quad (3)$$

donde x es la variable independiente, y es la respuesta y ε es el error, que se supone aleatorio. Si el ajuste del modelo se lleva a cabo por mínimos cuadrados (LS), entonces se determinan los valores a y b que hacen mínima la suma de cuadrados de los residuos:

$$\min_{a,b} \left\{ \sum_{i=1}^n [y_i - (a + bx_i)]^2 \right\} \quad (4)$$

Bajo la hipótesis de que los residuos " ε " de la ecuación (3) siguen una distribución normal, el teorema de Gauss-Markoff indica que los estimadores LS son los de menor varianza entre los insesgados, es decir, que la estimación por mínimos cuadrados es la más precisa entre las exactas. Sin embargo, esto sólo puede garantizarse si la distribución de los residuos es normal, lo cual puede no verificarse si hay datos anómalos, ya que éstos pueden incrementar la probabilidad en las colas de la distribución o conducir a otro tipo de distribución. Por ello, la existencia de datos anómalos en el calibrado no garantiza la calidad de las estimaciones por mínimos cuadrados.

Para detectar la presencia de datos anómalos resultan de gran interés las regresiones robustas, que son más o menos insensibles a la presencia de datos anómalos y capaces de encontrar la verdadera relación lineal, permitiendo a su vez detectar los datos anómalos. Entre las regresiones robustas, destaca la regresión en mínima mediana de cuadrados (LMS). Esta técnica de regresión hace mínima la mediana de los cuadrados de los residuos, es decir,

$$\min_{a,b} \left\{ \text{mediana} \left\{ [y_i - (a + bx_i)]^2 \mid i = 1, 2, \dots, n \right\} \right\} \quad (5)$$

En este método de regresión se estiman dos índices para cada punto del calibrado, el residuo estandarizado y la resistencia al diagnóstico. El primero de ellos evalúa si un dato se aparta notablemente de los demás en su ordenada (dato outlier), y el segundo si lo hace en su abscisa ('punto leverage'). Si estos índices, en valor absoluto, superan un valor umbral, normalmente 2.5, se considera que el dato es anómalo. Entonces el dato es eliminado del conjunto y el modelo de regresión se ajusta entonces por mínimos cuadrados, ya que es la solución máximo-verosímil.

4. EXPERIMENTAL

4.1 REACTIVOS Y DISOLUCIONES

Disoluciones tampón de Na_2CO_3 0.1M y NaHCO_3 0.1M preparadas a partir de carbonato sódico p.a. (PANREAC) y bicarbonato sódico p.a. (PANREAC). Disolución de dansilo

(cloruro de dansilo, de pureza mínima del 99%, de Sigma) al 0.5% en acetona. Disolución de Histamina (diclorhidrato de histamina, de pureza mínima del 99%, de Sigma) de 10000ppm en HCl 0.1M.

4.2 INSTRUMENTACIÓN

Las medidas espectrofluorimétricas se han realizado a temperatura ambiente empleado un espectrofluorímetro PerkinElmer LS 50B (Waltham, MA, USA) equipado con una lámpara de descarga de xenón, una cubeta de cuarzo SUPRASIL® de 10 mm y volumen de 3.5 mL (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Las matrices de datos de excitación-emisión fueron registradas en los siguientes rangos de longitudes de onda: emisión entre 400–600 nm (cada 0.5 nm) y excitación entre 200-500 nm (cada 10 nm). La anchura de la rendija del monocromador fue en ambos casos de 10 nm y la velocidad de barrido 1500 nm min⁻¹. Para la adquisición de datos se empleó el software FL WinLab (PerkinElmer).

Los análisis cromatográficos se han llevado a cabo con un equipo para HPLC Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) consistente en una bomba cuaternaria VL (G1311C), un muestreador automático (G1329B), un compartimento de columna termostaticado (G1316A) y un detector de fluorescencia (G1321B). Una columna cromatográfica Kinetex® C18 100A, de 150 mm longitud, 4.6 mm diámetro interno y 5.0 µm tamaño de partícula (Phenomenex, Torrance, CA, USA) se utilizó para la separación de las aminos derivatizadas. Se empleó una fase móvil de Acetonitrilo:Agua (80:20) en condiciones de flujo isocrático, con un flujo de 1ml/min, y se programó un volumen de inyección de muestra de 10µL. La columna cromatográfica se mantuvo a 40°C durante todo el análisis. Se registró la emisión fluorescente en el rango espectral de emisión de 420-600nm con un intervalo de 10 nm, siendo las longitudes de onda empleadas para la excitación 350 nm en el estudio de la optimización de la reacción de derivatización, y 350 nm ó 255 nm en la última parte del trabajo.

Las derivatizaciones a temperatura controlada se desarrollaron en un baño de agua equipado con un termostato de inmersión Digiterm 200 (JP Selecta S.A., Barcelona, Spain).

4.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Las disoluciones para su derivatización se preparan de la manera que se indica a continuación. En matraces de 5 ml se introduce 1 ml de la disolución de histamina (la cual se prepara previamente en matraces de 10 ml añadiendo 2 ml de tampón obtenido por la mezcla, en la proporción adecuada, de los dos carbonatos para mantener el pH necesario, 9,6 en las condiciones óptimas, y se enrasa con acetona), se añaden 2 ml de cloruro de dansilo 0,5%, y se agita. El matraz se envuelve con papel de aluminio con el fin de aislar la disolución de la luz. Se introduce durante el tiempo de derivatización (45 min en las condiciones optimizadas) en un baño termostaticado a la temperatura de derivatización (40 °C en las condiciones optimizadas). Transcurrido este tiempo, se procede a detener la reacción añadiendo 100 µL de amoníaco. Se guarda en la oscuridad durante 30 min y finalmente se enrasa con acetonitrilo. Todas las disoluciones preparadas, tanto para el análisis espectrofluorimétrico como para el análisis cromatográfico, se filtran con un filtro de 0.22 µm antes de ser introducidas en los equipos de medida.

4.4 SOFTWARE

El diseño experimental se ha realizado y analizado con NEMRODW [6]. Los modelos de regresión por mínimos cuadrados se han ajustado con STATGRAPHICS Centurión XVI [7] y los modelos de regresión por mínima mediana de cuadrados (LMS) con PROGRESS [8]. El límite de decisión, $CC\alpha$, y la capacidad de detección, $CC\beta$, se han calculado utilizando el programa DETARCHI [9]. Las regiones de confianza conjuntas se han estimado con MATLAB [10].

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 ESTUDIOS INICIALES

En primer lugar, se ha abordado la determinación de histamina utilizando el espectrofluorímetro, dada la sencillez de la espectrofluorimetría como técnica de análisis. Para ello, se registran los espectros de fluorescencia de excitación y emisión de disoluciones de 0, 20, 40, 60, 80 y 100 ppm de histamina, que se han preparado siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 4.3. Para el barrido de excitación, se registró la emisión fluorescente entre 200 y 500 nm. Para la obtención de los espectros de emisión se realizó un barrido entre 400 y 650 nm.

Los espectros obtenidos mostraban la saturación del detector, por lo que se procedió a diluir los patrones 10000 veces, enrasando esta vez con acetona para evitar la aparición de precipitado que se dio en el primer estudio, probablemente debido a la alta concentración del tampón.

En la Figura 3 se puede observar cómo tanto la disolución que tiene histamina como la que únicamente tiene derivatizante presentan emisión fluorescente en la misma región espectral. Esto se debe a que, aunque el cloruro de dansilo no es activo en fluorescencia, éste se hidroliza parcialmente con rapidez, y su derivado hidrolizado sí que lo es. Por tanto, no es posible llevar a cabo la determinación de histamina con este procedimiento ya que el agente derivatizante ejerce una interferencia importante en la señal de la histamina. Esto hace necesario recurrir a una técnica de separación, como HPLC, para obviar dicha interferencia.

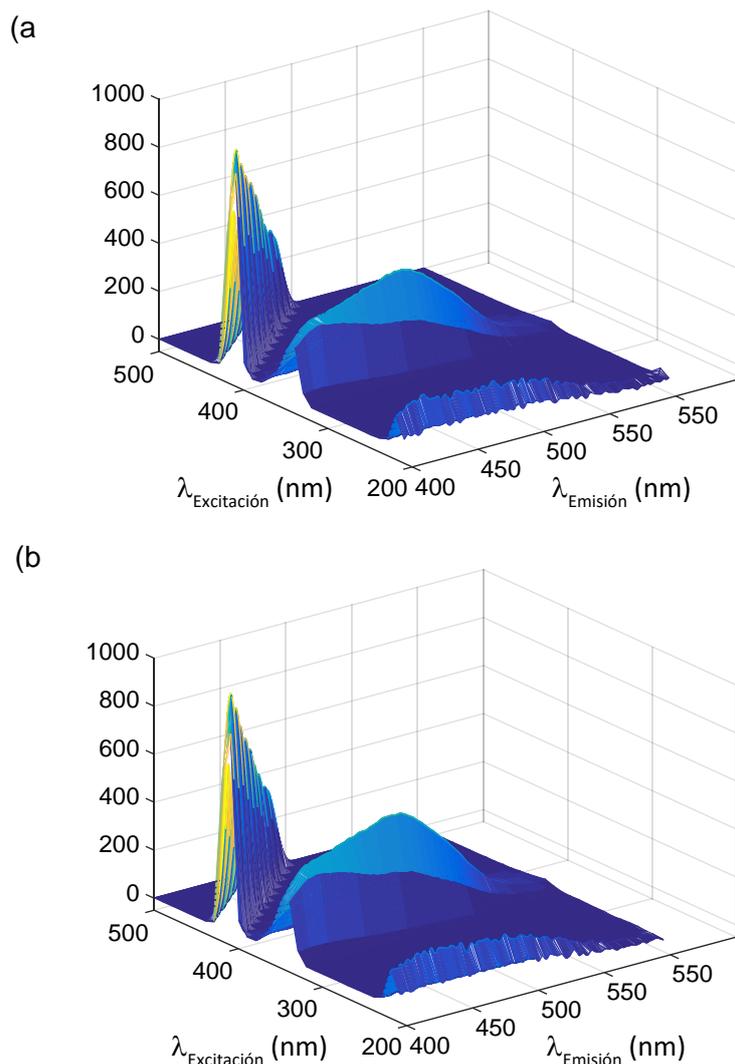


Figura 3 Señales espectrales de fluorescencia de excitación-emisión registradas a partir de disoluciones de (a) 0 y (b) 2 ppm de histamina.

5.2 OPTIMIZACIÓN DE LA DERIVATIZACIÓN

Una vez que se ha visto que es necesario recurrir a una técnica cromatográfica, se ha realizado una revisión bibliográfica para disponer de un punto de partida para desarrollar el método de análisis. A partir de las condiciones experimentales encontradas en la revisión de varios artículos [11,12,13], se plantea el desarrollo y optimización del procedimiento. En base a experiencias previas, se dispone del método cromatográfico que se detalla en la Sección 4.

Partiendo de unas condiciones de derivatización iniciales (pH = 9,9, tiempo = 45 min, y temperatura = 40 °C), se lleva a cabo la reacción de derivatización y el derivado obtenido se inyecta en el equipo cromatográfico. La Figura 4 muestra el cromatograma registrado para una muestra de histamina. Se puede comprobar cómo la técnica cromatográfica separa de forma eficaz la interferencia debida al dansilo y sus subproductos, que aparecen al comienzo del cromatograma, sin solaparse ya con la señal de la histamina, que eluye con un tiempo de retención de 2,17 min.

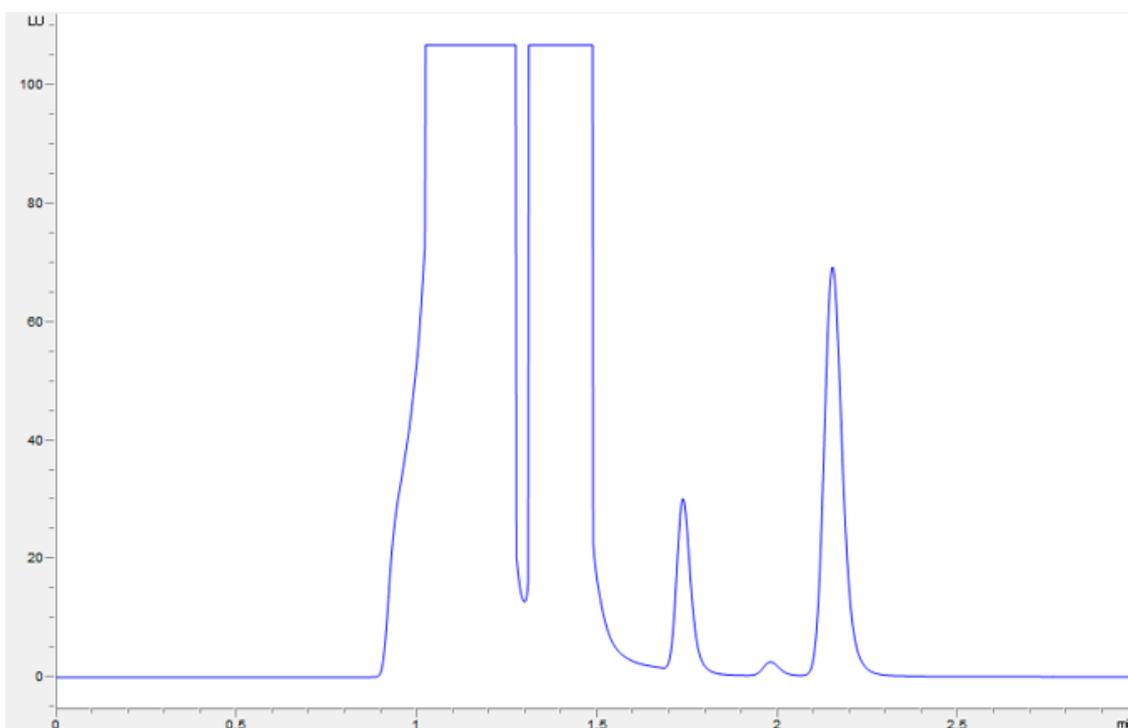


Figura 4 Cromatograma obtenido para una muestra de histamina de 40ppm

A continuación, se plantea optimizar los tres parámetros que más influyen en el rendimiento de la reacción de derivatización: el pH del medio, el tiempo y la temperatura de reacción. Para llevar a cabo la optimización se ajusta un modelo cuadrático, ecuación (6), que relacione la respuesta experimental (el área del pico cromatográfico de la histamina) con los tres factores experimentales en estudio.

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{11} X_1^2 + b_{22} X_2^2 + b_{33} X_3^2 + b_{12} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{23} X_2 X_3 \quad (6)$$

Para ajustar este modelo matemático, se ha diseñado la experimentación utilizando un diseño central compuesto para tres factores experimentales cuyo dominio experimental está definido por los parámetros que se especifican en la Tabla 1.

Tabla 1 Niveles de los factores del diseño central compuesto.

Factor	Valor central	Paso de variación
pH	9,9	0,5
Temperatura (°C)	40	12
Tiempo (min)	45	15

A continuación, se prepararon 18 disoluciones de 40 ppm de histamina que se sometieron a las distintas condiciones de derivatización marcadas por el plan experimental que se indica en la Tabla 2 y siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (se registraron los espectros de emisión fluorescente a una $\lambda_{excitación}$ de 350 nm). Los experimentos 12-15 se corresponden con cuatro réplicas del punto central del diseño, que permiten estimar la incertidumbre del procedimiento experimental y evaluar la posible existencia de fallo de ajuste.

Tabla 2 Matriz experimental, plan experimental y respuesta del diseño realizado. En negrilla se muestran los experimentos considerados anómalos.

Experimento	Matriz experimental			Plan experimental			Respuesta ($\lambda_{\text{emis. 520 nm}}$)
	x_1	x_2	x_3	pH	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	
1	0	-1,68	0	9,9	20	45	266,7
2	-1	-1	-1	9,4	28	30	249,8
3	1	-1	-1	10,4	28	30	245,1
4	-1	-1	1	9,4	28	60	257,2
5	1	-1	1	10,4	28	60	242,1
6	-1	1	-1	9,4	52	30	243,5
7	1	1	-1	10,4	52	30	243,1
8	-1	1	1	9,4	52	60	247,0
9	1	1	1	10,4	52	60	245,8
10	0	0	-1,68	9,9	40	20	251,6
11	-1,68	0	0	9,1	40	45	248,9
12	0	0	0	9,9	40	45	248,2
13	0	0	0	9,9	40	45	249,4
14	0	0	0	9,9	40	45	236,9
15	0	0	0	9,9	40	45	252,4
16	1,68	0	0	10,7	40	45	236,9
17	0	0	1,68	9,9	40	70	245,6
18	0	1,68	0	9,9	60	45	244,6

La Tabla 2 también muestra la respuesta obtenida para cada punto del diseño. Dichas respuestas se corresponden con la integración del área de pico correspondiente a los espectros obtenidos a una $\lambda_{\text{emisión}}$ de 520nm. Introduciendo esta respuesta en el programa Nemrod, se ajusta el modelo cuadrático. El modelo ajustado con todos los datos explicaría tan solo el 64% de la variabilidad de la respuesta y no es significativo, por lo que debe desecharse. Pero si se eliminan dos datos con un residuo estudentizado anormalmente grande respecto del resto (experimentos 2 y 14), se obtiene el modelo de regresión cuyos coeficientes se muestran en la Tabla 3. Se puede observar cómo los factores de inflación de varianza (VIFs) de los coeficientes, a pesar de haber modificado ligeramente el diseño central compuesto estándar, al eliminar dos datos, se encuentran muy próximos a la unidad, lo que asegura la buena calidad de la estimación de los coeficientes.

El modelo ajustado presenta un coeficiente de determinación, $R^2 = 0,933$, lo que supone que el modelo explica el 93.3 % de la variabilidad de la respuesta. Además, el modelo es significativo, como se puede deducir a partir de la tabla del ANOVA, que aparece en la Tabla 4; el test tiene una significación de 0,662%, que es menor del 5%, por lo que existen evidencias para rechazar la hipótesis nula a ese nivel de significación (H_0 : la regresión no explica una varianza superior a la residual) y aceptar, por tanto, la alternativa (H_a : la regresión es significativa).

Tabla 3 Coeficientes estimados y estadísticas del modelo cuadrático ajustado.

Nombre	Coeficiente	F. inflación	Desv. típica	t exp.	Signif. (%)
b ₀	250,01		1,61	155,28	< 0,01
b ₁	-4,31	1,13	0,84	-5,16	0,21
b ₂	-5,08	1,13	0,84	-6,07	0,09
b ₃	-1,23	1,13	0,84	-1,48	19,10
b ₁ ²	-2,54	1,18	0,84	-3,01	2,37
b ₂ ²	1,97	1,18	0,84	2,34	5,80
b ₃ ²	-0,52	1,18	0,84	-0,62	55,80
b ₁₂	4,44	1,20	1,16	3,83	0,86
b ₁₃	0,77	1,20	1,16	0,66	53,20
b ₂₃	2,39	1,20	1,16	2,06	8,50

Tabla 4 Tabla del ANOVA para el modelo ajustado.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Razón	Signif. %
Regresión	656,49	9	72,94	9,35	0,66
Residuos	46,82	6	7,80		
Fallo de ajuste	37,46	5	9,36	2,00	36,00
Error	9,36	2	4,68		
Total	703,31	15			

En cuanto al test de fallo de ajuste, se tiene un valor de probabilidad del 36%, que es mayor del 5%, por lo que no existen evidencias suficientes para rechazar la hipótesis nula (H₀: el sesgo es cero, el modelo es correcto), y por tanto se ha de concluir que el modelo no presenta fallo de ajuste. Además, se ha comprobado que los residuos siguen una distribución normal y se encuentran aleatoriamente distribuidos. Todo ello lleva a la conclusión de que el modelo ajustado es válido.

Para encontrar las condiciones de derivatización óptimas habría que representar la superficie de respuesta ajustada, pero no sería posible hacerlo gráficamente frente a los tres factores experimentales optimizados ya que se necesitaría un espacio de cuatro dimensiones, y si la representación se hiciera en tres dimensiones, se trataría de representaciones parciales con un factor fijo a un nivel determinado. Por ello, se ha recurrido al estudio del camino óptimo.

El estudio del camino óptimo consiste en construir superficies esféricas centradas en el punto central del diseño central compuesto de radio creciente y calcular en cada una de esas superficies esféricas el valor del máximo y del mínimo de la respuesta. Como en este caso se busca maximizar la respuesta, se debe considerar únicamente la parte derecha de la Figura 5a. En abscisas se representa la distancia al centro del diseño y en ordenadas la respuesta máxima. El camino óptimo de la respuesta muestra que la

respuesta máxima se alcanza en la frontera del dominio experimental, a una distancia aproximada de 1.7 desde el centro del diseño experimental.

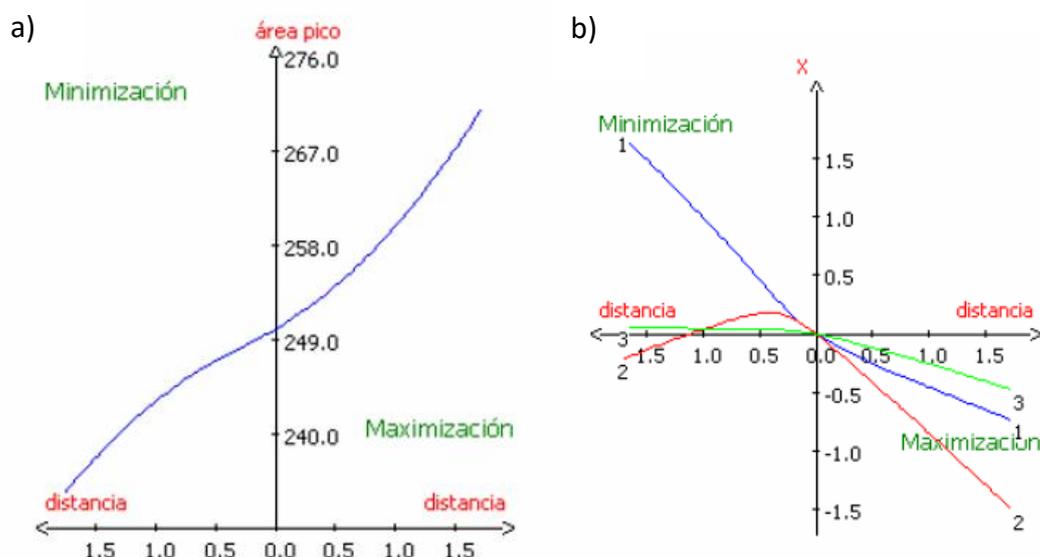


Figura 5 (a) Camino óptimo de la superficie de respuesta ajustada y (b) coordenadas (en variables codificadas) para cada factor experimental de los puntos del camino óptimo.

El eje de ordenadas de la Figura 5b representa los valores de los tres factores experimentales, en variables codificadas, que definen cada punto del dominio experimental donde se alcanza el máximo. Dicha figura muestra que la maximización de la respuesta depende fuertemente del segundo factor, la temperatura, en menor medida del primero, el pH, y muy poco del tercero, el tiempo de derivatización. Para alcanzar el máximo rendimiento en la derivatización la temperatura del baño tiene que tomar el nivel más bajo dentro del dominio experimental (20 °C), el pH ha de tomar valores un poco menos extremos (se ha seleccionado un pH = 9.6) y, por último, el tiempo de derivatización se puede fijar en 20 min, para reducir el tiempo de análisis, ya que apenas influye.

5.3 COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE ANÁLISIS

Tras la optimización de las condiciones de derivatización se plantea si, cara a mejorar la sensibilidad del procedimiento, sería posible realizar alguna modificación en cuanto a la determinación cromatográfica. En la mayor parte de la bibliografía consultada, la detección fluorimétrica se realiza con una $\lambda_{\text{excitación}} = 350 \text{ nm}$, que es la que se ha empleado en el apartado de optimización anterior. Sin embargo, en el estudio inicial de esta memoria, cuando se registraron las matrices de fluorescencia de excitación-emisión, se comprobó que se obtiene mayor emisión fluorescente para la histamina cuando la longitud de onda de excitación es 255 nm. Por ello, se procedió a llevar a cabo el procedimiento realizando la detección a las dos $\lambda_{\text{excitación}}$, 255 y 350 nm, para comparar los resultados obtenidos.

En primer lugar, se han realizado, siguiendo las condiciones obtenidas tras la optimización (pH=9,6, temperatura=20 °C y tiempo=20 min), sendos calibrados con

ambos métodos y se han obtenido las señales (áreas de pico) que se muestran en la Tabla 5. Cada muestra de calibrado se ha medido por triplicado. En la Figura 6 aparecen los cromatogramas registrados para la disolución más concentrada del calibrado a las dos longitudes de onda de excitación en estudio. Se puede observar cómo, para una misma concentración de histamina, el pico correspondiente, que aparece a 2,17 min, es mayor cuando la excitación se realiza a 255 nm.

Para detectar la posible presencia de datos anómalos se ha utilizado un método de regresión robusta, la regresión en mínima mediana de cuadrados (LMS). Dicha regresión se ha utilizado para detectar los datos anómalos, aquellos con residuo estandarizado (en valor absoluto) mayor de 2,5. Los datos anómalos, marcados en la tabla en negrita, se han eliminado y se ha hecho la regresión por mínimos cuadrados pertinente.

Tabla 5 Concentraciones de histamina (en ppm) y áreas de pico obtenidas cuando la detección fluorimétrica se lleva a cabo con $\lambda_{\text{excitación}} = 350 \text{ nm}$ (Método 1) o $\lambda_{\text{excitación}} = 255 \text{ nm}$ (Método 2).

Concentración	Método 1			Método 2		
	réplica 1	réplica 2	réplica 3	réplica 1	réplica 2	réplica 3
0	3,10	3,10	2,90	16,40	16,30	15,60
0,1	0,45	0,45	0,46	2,40	2,60	2,40
0,25	0,90	0,85	0,88	0,90	4,70	4,70
0,4	1,30	1,30	1,20	7,30	6,80	6,80
0,7	2,40	2,30	2,30	13,20	12,10	12,30
0,85	2,80	2,70	2,60	15,30	14,60	14,60
1	3,20	3,00	3,00	17,40	17,20	16,30
1,15	2,40	2,30	2,20	13,30	12,80	12,60
1,3	4,20	4,20	4,00	23,70	22,90	22,00
1,45	4,80	4,70	4,60	26,60	26,00	25,10
2,5	7,80	7,70	7,50	43,50	43,20	42,50
4	12,80	12,50	12,40	70,30	68,70	68,10
5,5	17,90	17,60	17,10	95,40	93,80	93,30
7	21,80	21,20	21,10	117,10	114,20	111,80
8,5	27,90	27,10	26,60	147,50	143,20	142,10
10	31,60	30,70	30,40	165,70	161,90	161,00

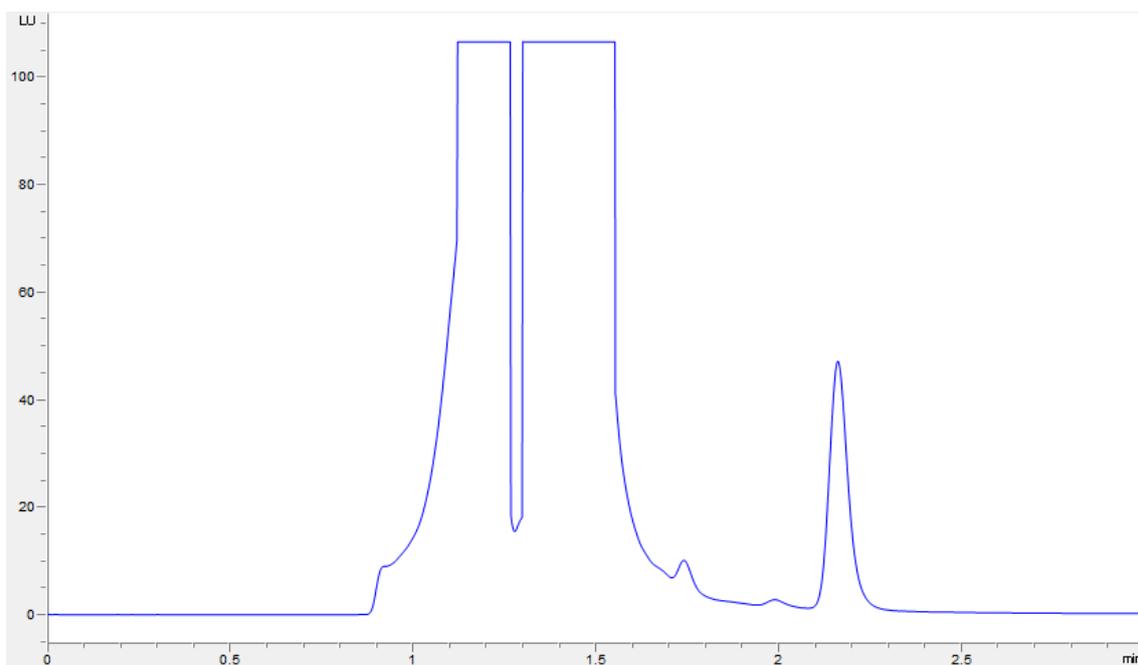
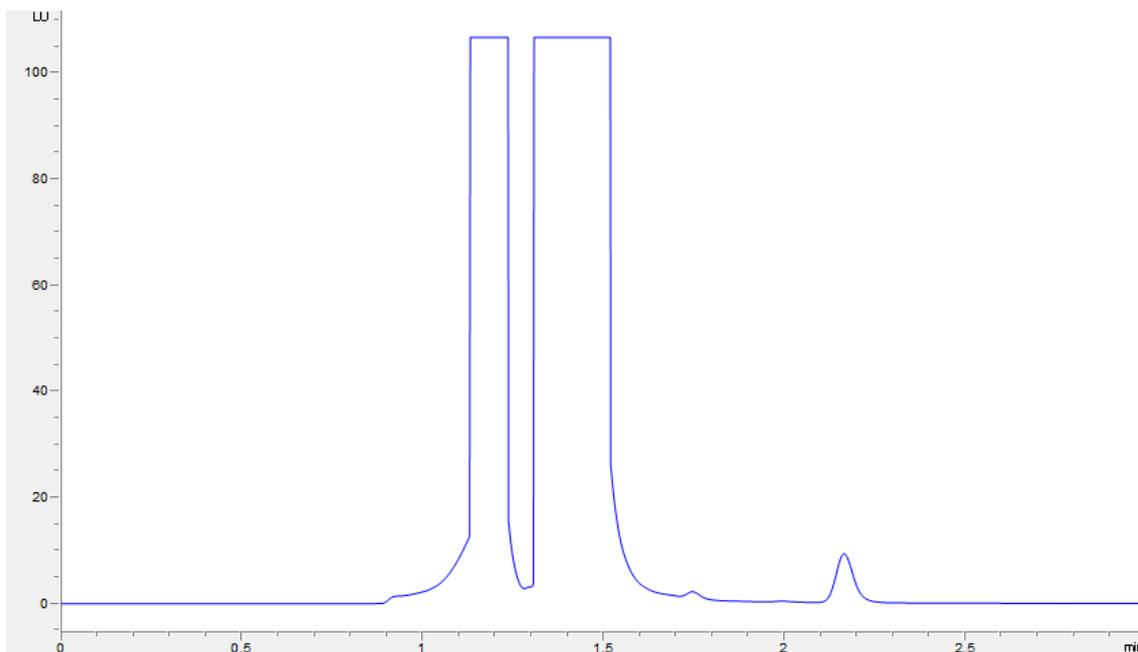


Figura 6 Cromatogramas obtenidos para una muestra de histamina de 10 ppm llevando a cabo la detección fluorimétrica con una $\lambda_{\text{emisión}} = 520 \text{ nm}$ y (a) $\lambda_{\text{excitación}} = 350 \text{ nm}$ o (b) $\lambda_{\text{excitación}} = 255 \text{ nm}$.

En la Tabla 6 aparecen reflejados los parámetros de los modelos ajustados en cada caso. Se puede ver que las regresiones tienen coeficientes de correlación muy altos y que el método 2 tiene una mayor sensibilidad ya que se tienen pendientes mucho mayores en todos los casos que con el método 1, pero esto no significa necesariamente que el método 2 sea mejor que el método 1 para llevar a cabo el análisis. De hecho, la comparación de ambos métodos de análisis se ha realizado a través de sus figuras de mérito. Así, a continuación, se han estimado diversas figuras de mérito para cada uno

de los métodos de análisis, y la valoración sobre qué procedimiento es más idóneo se ha realizado a partir de su estudio.

Tabla 6 Parámetros, coeficiente de correlación (ρ) y desviación típica de la regresión (s_{yx}) de los modelos de regresión ajustados con cada una de las réplicas de los calibrados de histamina con los dos métodos de análisis en estudio. $CC\alpha$ y $CC\beta$ son, respectivamente, el límite de decisión y la capacidad de detección calculadas en cada caso ($\alpha = \beta = 0.05$).

	Pendiente	Ordenada en el origen	ρ	s_{yx}	$CC\alpha$ (ppm)	$CC\beta$ (ppm)
Método 1	3,1493	0,1122	0,9990	0,0906	0,0564	0,1100
	3,1784	0,0012	0,9999	0,1411	0,0863	0,1687
	3,0343	0,0915	0,9999	0,1582	0,1000	0,1959
Método 2	17,2616	0,7836	0,9999	0,4804	0,0553	0,1079
	16,8474	0,7086	0,9999	0,5481	0,0632	0,1237
	16,9197	0,2454	0,9999	0,3797	0,0448	0,0873

Límite de decisión y capacidad de detección.

En la Tabla 6 se muestran los valores obtenidos del límite de decisión ($CC\alpha$) y la capacidad de detección ($CC\beta$) de ambos métodos. El primero de estos parámetros es el límite en el cual y a partir del cual se puede concluir con una probabilidad de error α que una muestra no es conforme. Por otro lado, la capacidad de detección ($CC\beta$): contenido mínimo de la sustancia que puede ser detectado, identificado o cuantificado en una muestra, con una probabilidad de error β . [14]

Los valores obtenidos tanto para el límite de decisión como para la capacidad de detección son, en general, significativamente menores para el método 2, con lo que la nueva longitud de onda de excitación utilizada en la detección fluorimétrica permite llegar a medir concentraciones más bajas de histamina. Utilizando el método 2 se tendría un límite de decisión de 54,4 ppb (frente a los 80,9 ppb del método 1), y una capacidad de detección de 106,3 ppb (frente a 158,2 ppb con el método 1), para $\alpha = \beta = 0.05$.

Exactitud: veracidad y precisión.

Para determinar estas dos figuras de mérito se han calculado las rectas de veracidad correspondientes a cada uno de los métodos estimando los modelos de regresión "concentración calculada" frente a "concentración real". La Figura 7 muestra los valores con los que se ha llevado a cabo el estudio.

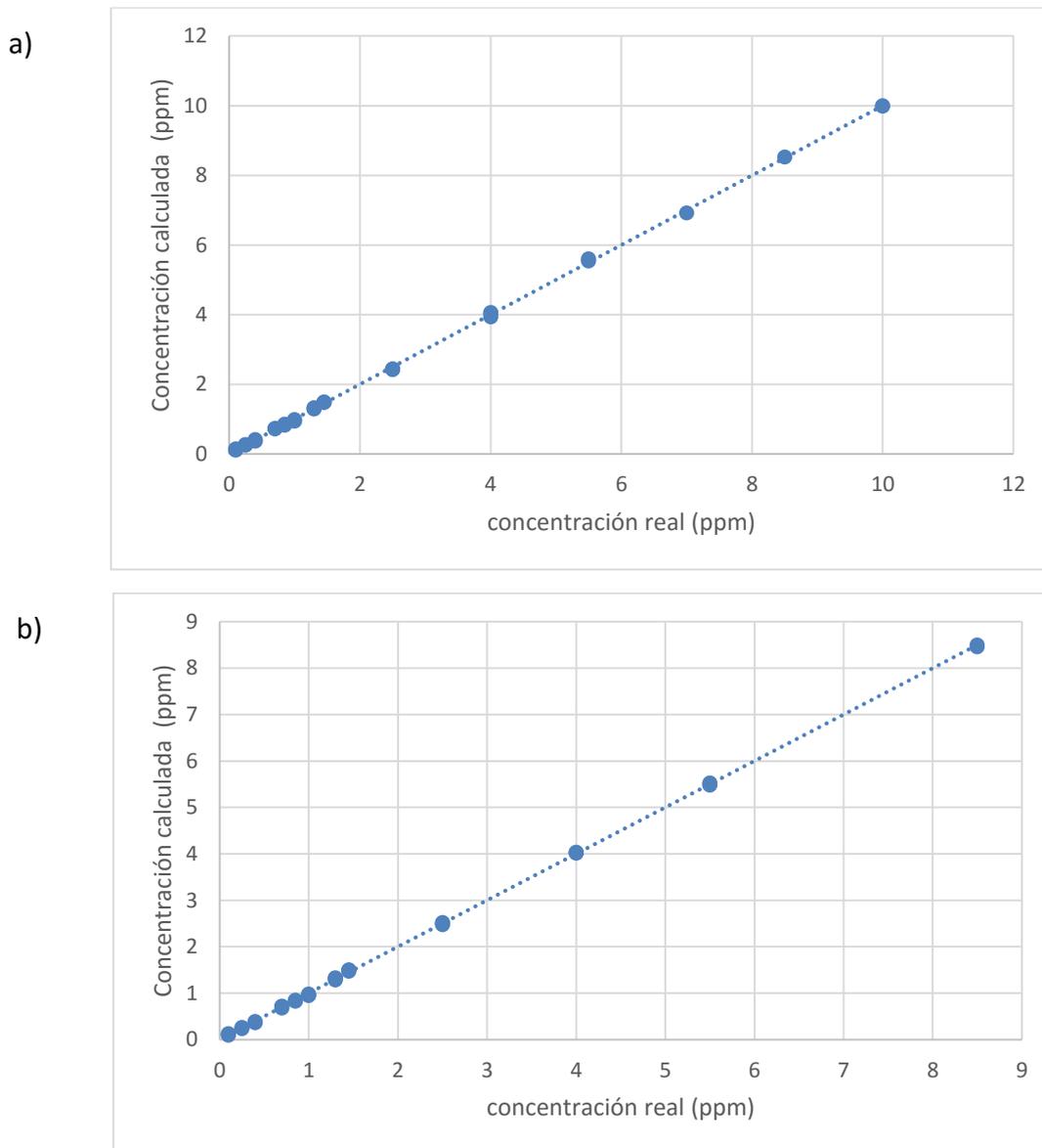


Figura 7 Recta de veracidad (a) del método 1 y (b) del método 2.

La Tabla 7 recoge los parámetros de los modelos de regresión ajustados para las rectas de veracidad en cada caso. La **precisión** de un procedimiento analítico puede estimarse, para el rango de concentración estudiado, a partir de la desviación típica residual de la recta de veracidad (s_{yx}); este valor puede asimilarse con una repetibilidad intermedia en el rango de concentración analizado.

Tabla 7 Parámetros, coeficiente de correlación (ρ) y desviación típica de la regresión (s_{yx}) de las rectas de veracidad de los dos métodos de análisis.

	Pendiente	Ordenada en el origen	ρ	s_{yx}
Método 1	1	$5 \cdot 10^{-8}$	0,9999	0,0410
Método 2	0,9999	$4 \cdot 10^{-5}$	0,9999	0,0263

Para ver si ambos métodos son veraces, es necesario comprobar si se verifica la hipótesis conjunta “la pendiente es 1 y el término independiente es 0” para cada uno de los métodos de análisis. En la Figura 8 se representan las regiones de confianza conjuntas para las pendientes y los términos independientes estimados en las rectas de veracidad. En ambos casos las regiones de confianza contienen el punto (1,0), por lo que se concluye que ambos métodos son veraces. Sin embargo, la región de confianza conjunta más pequeña es la del método 2, por lo que este método es más preciso.

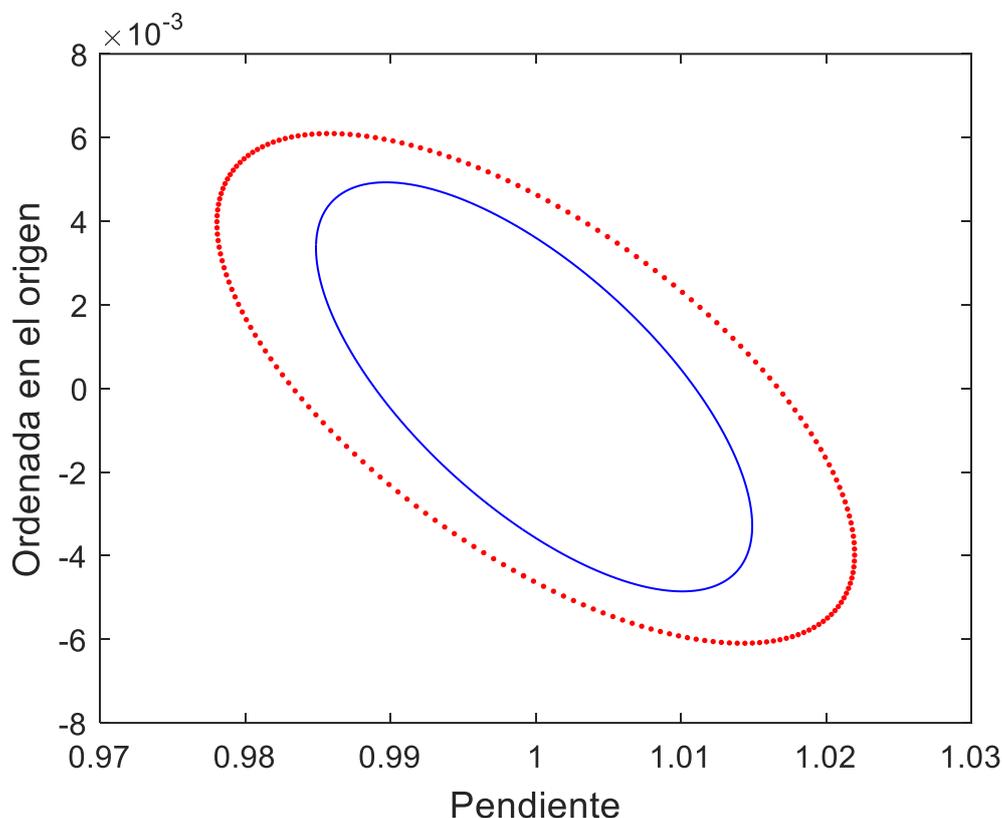


Figura 8 Regiones de confianza conjuntas para las rectas de veracidad de los dos métodos. La línea punteada corresponde a la región del método 1; y la línea continua la del método 2.

6. CONCLUSIONS

The direct determination of histamine through molecular fluorescence spectrophotometry is not possible since derivatization artifacts directly interferes the fluorescent signal of histamine.

The use of a separation technique, as HPLC, makes it possible the determination of histamine by means of molecular fluorescence spectrophotometry since it allows obviating the interference due to derivatization agent.

The experimental design methodology used makes it significantly easier to find the conditions to perform the derivatization of histamine, which has to be carried out at 20 °C, for 20 min and at pH 9.6.

To slightly modify the excitation wavelength used for the fluorimetric detection (set at 255 nm) with respect to that found in literature (350 nm) has led to better figures of merit for the analytical method.

Although the two methods studied are accurate, using 255 nm as excitation wavelength lower decision limits and capabilities of detection are reached, and a more precise method.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. L. Pinto, C. Horacio Díaz Nieto, M. A. Zón, H. Fernandez, M. C. Ugulino de Araujo, Handling time misalignment and Rank deficiency in liquid chromatography by multivariate curve resolution: Quantitation of five biogenic amines in fish, *Analytica Chimica Acta* (2016), 59-69.
2. Reglamento (UE) N o 1019/2013 de la Comisión, Off. J. Eur. Commun. L282 de 23 de octubre de 2013.
3. M. Saais, B. Saad, N. Hasani Hashim, A. Salhin Mohamed Ali, M. Idiris Saleh, Determination of biogenic amines in selected Malaysian food, *Food Chem.* 113 (2009), 1356-1362.
4. E. Dadáková, M. Krízek *, T. Pelikanova, Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC), *Food Chem.* 116, (2009), 365-370
5. L.A. Sarabia, M.C. Ortiz., Response surface methodology, En: Brown S.D., Tauler R., Walczak B. (Editores), *Comprehensive Chemometrics*, vol. 1. Amsterdam, 2009.
6. D. Mathieu, J. Nony, R. Phan-Thau-Lu, NemrodW (Version 2007 03), L.P.R.A.I., Marseille, France, 2007.
7. STATGRAPHICS Centurion XVI (versión 16.1.11), StatPoint Technologies, Inc. Herndon, VA, 2010.
8. P.J. Rousseeuw, A.M. Leroy, *Robust Regression and Outliers Detection*, John Wiley and Sons, New Jersey, 2001.
9. L.A. Sarabia, M.C. Ortiz, *TrAC: Trends Anal. Chem.* 13 (1994) 1-6.
10. MATLAB (versión 7.10), The MathWorks Inc., Natick, MA, 2010.
11. E. Dadáková, M. Křížek, T. Pelikánová, Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC), *Food Chem.* 116 (2009) 365–370.
12. J. Mah, H. Han, Y. Oh, M. Kim, Biogenic amines in Jeotkals , Korean salted and fermented fish products, *Food Chem.* 79 (2002) 239–243.
13. H. Zhai, X. Yang, L. Li, G. Xia, J. Cen, H. Huang, S. Hao, Biogenic amines in commercial fish and fish products sold in southern China, *Food Control.* 25 (2012) 303–308.

14. International Organization for Standardization, ISO 11843, Capability of detection. Part 1: Terms and definitions, 1997; and Part 2: Methodology in the linear calibration case, 2000. Geneva, Switzerland