

NORMA VENEZOLANA

COVENIN
3186:1995

PRODUCTOS DEL MAR. DETERMINACIÓN DE HISTAMINA.

PROLOGO

La Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN), creada en 1958, es el organismo encargado de programar y coordinar las actividades de Normalización y Calidad en el país. Para llevar a cabo el trabajo de elaboración de normas, la COVENIN constituye Comités y Comisiones Técnicas de Normalización, donde participan organizaciones gubernamentales, académicas, industriales y comerciales.

La presente norma fue elaborada bajo los auspicios del Comité Técnico de Normalización (CTN) PRODUCTOS ALIMENTICIOS por el Subcomité Técnico SCT PRODUCTOS DEL MAR y aprobada por la COVENIN en su reunión No. 12 de fecha 11-10-95.

En la elaboración de esta norma participaron las siguientes entidades: CA-MARA EMPALMADORES DE LA PESCA, INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE, INSTITUTO NACIONAL DE NUTRICIÓN, DIRECCIÓN DE HIGIENE DE LOS ALIMENTOS (M.S.A.S.), ALIMENTOS MARGARITA, AVEGAISA, LA GAVIOTA, EL FARO, CAR.



PROLOGO

La Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN), creada en 1958, es el organismo encargado de programar y coordinar las actividades de Normalización y Calidad en el país. Para llevar a cabo el trabajo de elaboración de normas, la COVENIN constituye Comités y Comisiones Técnicas de Normalización, donde participan organizaciones gubernamentales y no-gubernamentales relacionadas con un área específica.

La presente norma fue elaborada bajo los lineamientos del Comité Técnico de Normalización CT10 PRODUCTOS ALIMENTICIOS por el Subcomité Técnico SC7 PRODUCTOS DEL MAR y aprobada por la COVENIN en su reunión No136 de fecha 11-10-95.

En la elaboración de esta norma participaron las siguientes entidades: CAMARA ENLATADORES DE LA PESCA, INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE, INSTITUTO NACIONAL DE NUTRICIÓN, DIRECCIÓN DE HIGIENE DE LOS ALIMENTOS (M.S.A.S.), ALIMENTOS MARGARITA, AVECAISA, LA GAVIOTA, EL FARO, CAIP.



**NORMA VENEZOLANA
PRODUCTOS DEL MAR
DETERMINACIÓN DE HISTAMINA**

**COVENIN
3186:1995**

INTRODUCCIÓN

La histamina es uno de los principales compuestos implicados como causante de casos de envenenamiento y manifestaciones alérgicas originadas por el consumo de pescado tóxico del Sub-orden Scombroidei y orden Clupeiforme, entre las cuales se encuentran especies comerciales como: Atún, Cachorreta (Macarela) y Sardinas.

Este método es adecuado para la determinación de histamina en las especies antes mencionadas y en los productos elaborados con estas. El nivel de histamina puede ser usado al mismo tiempo como un indicador de la presencia de sustancias significativas para la salud pública.

1.- OBJETO

Esta Norma Venezolana establece el método de determinación de Histamina en productos marinos.

2.- PRINCIPIO DEL MÉTODO

La Histamina es extraída de la muestra con metanol, los compuestos interferentes son removidos por cromatografía de intercambio aniónico, y la histamina purificada es derivada con o-ftaldehído (OPT) para formar un fluoróforo. La intensidad de la fluorescencia es medida por fluorometría. El resultado es reportado como niveles equivalentes de histamina.

En el músculo del pescado están presentes gran cantidad de aminoácidos (incluyendo la histidina) y de otros compuestos que pueden interferir con la determinación de histamina; así como también en la formación del fluoróforo con OPT. Algunos otros homólogos de histidina y otras poliaminas pueden también reaccionar con el OPT; sin embargo ellos normalmente están en bajo nivel y no causan mayor problema. Todas estas interferencias pueden ser minimizadas con el proceso de intercambio aniónico.

3.- TOMA Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Tomar una muestra representativa del lote a analizar y almacenar de manera que se mantengan inalterables sus características originales, siendo el peso de la muestra extraída de aproximadamente 300 g.

3.1.- Recibida la muestra, la información sobre ella debe verificarse y registrarse en el libro del laboratorio. Las condiciones de éstas deberán verificarse para garantizar que las muestras frescas han sido debidamente refrigeradas y las congeladas continúan así. Es esencial que la muestra sea manejada y almacenada adecuadamente para garantizar que se mantendrán las condiciones originales de la misma.

3.2.- Las muestras frescas crudas deben prepararse inmediatamente al ser recibidas; de no ser esto posible deben ser congeladas de inmediato para su posterior análisis.

3.3.- Las muestras grandes o compuestas por trozos grandes, deben ser reducidas en una licuadora hasta lograr una mezcla homogénea y finamente molida.

3.3.1.- La muestra fresca obtenida en 3.3 debe analizarse inmediatamente después de la molienda, pero si esto no es posible debe congelarse rápidamente para detener el proceso de descomposición.

3.3.2.- Para los productos envasados: abra la lata y drene el contenido en un tamiz de 2,36 mm. por 1 1/2 minuto. Homogenice en un mortero la parte de la muestra retenida en el tamiz.

3.4.- Recolecte la muestra homogeneizada dentro de una cubeta plástica o una botella de vidrio completamente limpia. Congele la muestra hasta que sea requerida, asegúrese que la muestra sea homogénea antes de pesarla, si el líquido se ha separado, mezclar nuevamente antes del análisis.

4.- APARATOS

4.1.- Columna cromatográfica 150 x 9 mm ID ó 200 x 7 mm ID de vidrio, polipropileno o equivalente.

4.2.- Balones volumétricos de 100 ml

4.3.- Agitador magnético

4.4.- Fluorómetro con capacidad de excitación de 360 nm y emisión de 450 nm.

4.5.- Baño de agua (60°C)

5.- REACTIVOS

5.1.- Metanol (CH₃OH)

5.2.- Resina de intercambio aniónico BIO-RAD AG. 1 X8, 50-100 de malla.

5.3.- Ácido clorhídrico concentrado

5.3.1.- HCl 1N: Diluir 93 ml HCl concentrado a 1 L con agua destilada.

5.3.2.- HCl 0,1 N: Diluir 10 ml de HCl 1N a 100 ml con agua destilada.

5.4.- Hidróxido de sodio (NaOH)

5.4.1.- NaOH 1N: Disolver 41,2 g de NaOH en agua destilada, y diluir a un litro.

5.4.2.- NaOH 2N: Disolver 82,4 g de NaOH en agua destilada, y diluir a un litro.

5.5.- Ácido fosfórico (85% H₃PO₄)

5.5.1.- Ácido fosfórico al 10%: Diluir 10 ml de H₃PO₄ al 85% a 100 ml con agua destilada.

5.6.- O-ftalaldehído (OPT)

5.6.1.- Solución de OPT al 1% p/v en metanol, guarde en botella ámbar y refrigere.

5.7.- Dihidrocloreto de histamina (C₅H₉N₃ · 2 HCl)

5.7.1.- Patrón primario de histamina (1 mg/ml): Secar C₅H₉N₃ · 2 HCl sobre H₂SO₄ por 2 horas. Pesar 0,165 g disuelva y diluya hasta 100 ml con HCl 0,1 N. Refrigere.

5.7.2. Patrón de histamina (10 µg/ml): Diluya 1 ml de la solución patrón primario a 100 ml con HCl 0,1 N. Guarde refrigerado y prepare nuevamente cada 2 ó 3 meses.

5.7.3.- Patrones de trabajo (0,1; 0,2; 0,3 µg/ml): Diluya 1,0; 2,0; y 3,0 ml del patrón de 10 µg/ml a 100 ml con HCl 0,1 N. Prepare semanalmente.

6.- PROCEDIMIENTO

6.1.- Convierta la resina intercambiadora de iones a la forma OH, agitándola por 15 minutos, con NaOH 2 N en beaker (en una relación de 15 ml de NaOH por cada gramo de resina). Deje reposar por 20-30 minutos, decantando luego el líquido y repitiendo el tratamiento con NaOH. Lave completamente la resina con 2 ó 3 volúmenes similares de agua, decante después de cada lavado.

Posteriormente, filtre a través de un papel de filtro Whatman No. 2. Repita este lavado hasta que el agua de lavado esté neutra al papel de pH. Luego almacene la resina preparada bajo agua. Prepare semanalmente.

6.1.1.- Prepare la columna intercambiadora colocando un tapón de lanilla de vidrio en la base de la misma, luego añada suavemente resina para formar una capa de 8 cm. Se debe mantener la resina cubierta de agua todo el tiempo, y no se debe regenerar la resina dentro de la columna. Después que cada muestra haya sido extraída, lave la resina con 10 ml de agua destilada antes de aplicar la próxima muestra. Aproximadamente 50 muestras pueden ser corridas a través de cada lecho de resina. Sin embargo, periódicamente se debe verificar que las interferencias del compuesto no están siendo extraídas.

6.2.- Pesar exactamente 10 g de la muestra. En un homogeneizador de tejidos, añadir aproximadamente 50 ml de CH₃OH y agitar, por 2 minutos. Transfiera la mezcla a un Erlenmeyer volumétrico de 100 ml, enjuague el homogeneizador con CH₃OH y añada el enjuague al Erlenmeyer. Colóquelo en un baño de agua caliente a 60°C y deje reposar por 15 minutos, enfríe a 25°C y diluya a volumen con CH₃OH, luego filtre y guarde el filtrado en un refrigerador hasta que sea requerido para su análisis. El filtrado usualmente, no es necesario en los productos enlatados, ya que el sobrenadante puede ser decantado.

6.3.- Para remover las interferencias del extracto, pasar 4 ó 5 ml de agua a través de la columna intercambiadora de iones y descargar luego esta solución. Pipetear 1 ml del extracto sobre la columna y añadir de 4 a 5 ml de agua. Inmediatamente al empezar fluir por la columna, recoger en un Erlenmeyer de 50 ml, el cual debe contener 5 ml de HCl 0,1 N. La velocidad de flujo no es crítica, por lo tanto, puede utilizarse una velocidad mayor. Cuando el nivel del líquido está 2 mm. aproximadamente por encima de la superficie de la resina, añadir una segunda porción de 5 ml de agua, hasta que un total aproximadamente de 35 ml hayan sido extraídos. Detener el flujo y diluir a 50 ml con agua destilada, agitando suavemente. Almacene el eluato bajo refrigeración, hasta que sea requerido para su análisis. Los extractos son estables por algunas semanas.

6.4.- Pipetee 5 ml del eluato de la columna, colóquelo en un Erlenmeyer, añada 10 ml de HCl 0,1 N y 3 ml de NaOH 1N. Mezclar y esperar 4 minutos. Añadir 0,1 ml de la solución de OPT al 1% mezclar y esperar 4 minutos, añadir 3 ml de H₃PO₄ al 10% y mezclar. Lea la fluorescencia desarrollada en la muestra y compararla con el blanco.

6.5.- Prepare el blanco y la solución patrón, pipeteando dentro de un Erlenmeyer, de iguales medidas a los utilizados con la muestra, 5 ml de HCl 0,1 N, 5 ml de 0,1; 0,2; 0,3 µg/ml de las soluciones patrones de trabajo. Continúe

con el procedimiento desde 6.4, añadiendo a cada Erlenmeyer 10 ml de HCl 0,1 N. Leer la fluorescencia de cada solución usando el ajuste de sensibilidad del fluorómetro; el cual dará aproximadamente el 80% de la escala, al leer con el patrón de 0,3 µg/ml.

6.6.- El tiempo de la reacción es el único aspecto a controlar en los puntos anteriores, los tiempos dados con una variación de + 1/4 de minuto dan lectura de fluorescencia más alta y de mejor reproducibilidad.

6.7.- Se pueden usar dos métodos para verificar la dilución necesaria para las muestras con una lectura fuera de escala. Si el fluorómetro tiene varios rangos de sensibilidad la lectura puede ser realizada en un rango menor, en un segundo caso la muestra preparada puede ser diluida con una pequeña porción de la solución blanco. Lea la fluorescencia de la mezcla, de cualquier modo, para obtener un resultado adecuado, las muestras eluidas se podrán diluir con HCl 0,1 N y posteriormente se hará una corrida con estas diluciones.

7 CÁLCULOS

7.1.- Construya una curva de calibración con los valores obtenidos de fluorescencia Vs. concentración de histamina en los patrones de trabajo.

7.2.- Compare la fluorescencia de la muestra con la curva de calibración, y determine la concentración de histamina libre por 100 g de la muestra, de la siguiente manera: Si todas las diluciones están como se especificó en este procedimiento, los 0,2 µg/ml son iguales a 10 µg/ml en el extracto de metanol ó a 10 mg/100g de histamina en la muestra.

BIBLIOGRAFÍA

AOAC 1984. "Official methods of analysis. 14 th ed. Assoc. Official Analytical Chemist. Virginia USA.

Department of Fisheries and Oceans. 1986. Chemical methods manual: Chapter 3 Section 1: Histamina like substances. Toronto. Canadá.

Valls, J. 1990. Métodos fisico-químicos para evaluar la calidad en conservas de pescado. Taller sobre tecnología de productos marinos en conservas. Universidad de Oriente. Isla de Margarita.

Hilmer, F. 1985. Histamine- forming bacteria in tuna and other marine fish. Fisheries Technical paper No. 252. Roma Italia.

COVENIN
3186:1995

CATEGORIA
B

COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES
MINISTERIO DE FOMENTO

Av. Andrés Bello Edif. Torre Fondo Común Pisos 11 y 12

Telf. 575. 41. 11 Fax: 574. 13. 12

CARACAS

publicación de:



ICS: 71.040.40

RESERVADOS TODOS LOS DERECHOS

Prohibida la reproducción total o parcial, por cualquier medio.

ISBN: 980-06-1575-X

Descriptor: Determinación de histamina, análisis químico.