



**FACULTAD DE OCEANOGRAFÍA, PESQUERÍA, CIENCIAS ALIMENTARIAS Y
ACUICULTURA**

**APLICACIÓN DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)
PARA DETERMINAR HISTAMINA EN HARINA DE PESCADO**

Línea de investigación:
**Harina y aceite de pescado, conservas, congelados y recursos
hidrobiológicos**

Trabajo de Suficiencia Profesional para optar el Título Profesional de
Ingeniero Pesquero

Autora

Naventa Mauricio, Mercedes Natalia

Asesor

Guzmán Loyola, Edmundo Eugenio

ORCID: 0000-0003-2689-2783

Jurado

Marín Machuca, Olegario

Aldave Palacios, Gladis Josefina

Blas Ramos, Walter Eduardo

Lima – Perú

2025

APLICACIÓN DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) PARA DETERMINAR HISTAMINA EN HARINA DE PESCADO

INFORME DE ORIGINALIDAD

23%

INDICE DE SIMILITUD

22%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

9%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

webcache.googleusercontent.com

Fuente de Internet

3%

2

hdl.handle.net

Fuente de Internet

2%

3

repositorio.una.ac.cr

Fuente de Internet

1%

4

dspace.unitru.edu.pe

Fuente de Internet

1%

5

aulavirtual2.unfv.edu.pe

Fuente de Internet

1%

6

Submitted to Universidad de San Martín de Porres

Trabajo del estudiante

1%

7

cdn.www.gob.pe

Fuente de Internet

1%

8

www.coursehero.com

Fuente de Internet

1%



Universidad Nacional
Federico Villarreal

VRIN | VICERRECTORADO
DE INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE OCEANOGRAFÍA, PESQUERÍA, CIENCIAS ALIMENTARIAS Y
ACUICULTURA

APLICACIÓN DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) PARA
DETERMINAR HISTAMINA EN HARINA DE PESCADO

Línea de investigación:

Harina y aceite de pescado, conservas, congelados y recursos hidrobiológicos

Trabajo de Suficiencia Profesional para optar el Título Profesional de Ingeniero Pesquero

Autora

Naventa Mauricio, Mercedes Natalia

Asesor

Guzmán Loyola, Edmundo Eugenio

ORCID: 0000-0003-2689-2783

Jurado

Marín Machuca, Olegario

Aldave Palacios, Gladis Josefina

Blas Ramos, Walter Eduardo

Lima – Perú

2025

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado en primer lugar a San Judas Tadeo por todas las bendiciones que me brinda día a día; por escucharme y guiarme siempre. A mi mamita Digna, por su gran amor incondicional. A mi madre por demostrarme la lucha que es sacar adelante a sus hijas, y dejarnos ese legado que tomo como un gran ejemplo. A mi hijo Tadeo; que, siendo tan pequeñito, es la personita que me motiva a salir adelante y mostrar una mejor versión de mí.

AGRADECIMIENTOS

A SGS del Perú S.A.C., a mis compañeros del laboratorio de Instrumental Orgánica, al supervisor Carlos Balbín por sus enseñanzas, y por confiar en mi criterio para la toma de decisiones. A mi asesor Ing. Edmundo Guzmán Loyola por su guía para elaborar el presente trabajo. A mi alma mater Universidad Nacional Federico Villareal y sus docentes por brindarme cada enseñanza y así formarme profesionalmente.

ÍNDICE

RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
I. INTRODUCCIÓN	11
1.1 Trayectoria del autor	12
1.2 Descripción de la empresa	15
1.3 Organigrama de la empresa	16
1.4 Áreas y funciones desempeñadas	17
II. DESCRIPCIÓN DE UNA ACTIVIDAD ESPECÍFICA	21
2.1 Marco teórico de la cromatografía.....	21
2.2 Marco teórico de la histamina	28
2.3 Marco conceptual.....	31
2.4 Nuevos aprendizajes logrados.....	32
2.5 Actividades realizadas en laboratorio	62
III. APORTES MÁS DESTACABLES A LA EMPRESA.....	70
IV. CONCLUSIONES	74
V. RECOMENDACIONES	75
VI. REFERENCIAS.....	76
VII. ANEXOS.....	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Preparación del stock y curva de calibración.....	53
Tabla 2. Criterios de aseguramiento de calidad en determinación de histamina por HPLC.....	56
Tabla 3. Registros necesarios en la determinación de histamina por HPLC.....	58
Tabla 4. Significado de cada columna del Registro de Control de procesos de la figura 20	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Organigrama del Departamento de Orgánica de SGS del Perú SAC	16
Figura 2. Cromatografía, tipos y clasificación.....	22
Figura 3. Detector para Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	25
Figura 4. Disposición de módulos para el sistema UltiMate 3000	26
Figura 5. Conexiones del panel posterior en el sistema UltiMate 3000	27
Figura 6. Formación de histamina a partir de la descarboxilación microbiana de la histidina	29
Figura 7. Icono de acceso e inicio de sesión para software Chromeleon 7.2	33
Figura 8. Interfaz general del Chromeleon Console	33
Figura 9. Interfaz del Chromeleon Console para Data INO-327-T	34
Figura 10. Conexión de módulos en Instruments-Home para uso de panel Set	34
Figura 11. Procedimiento para crear una carpeta en el software Chromeleon 7.2	35
Figura 12. Creación de secuencia de estándares y muestras en el software Chromeleon 7.2	37
Figura 13. Continuación de la creación de secuencia de estándares y muestras	38
Figura 14. Proceso de purga del equipo.....	41
Figura 15. Proceso de limpieza de jeringa, loop y aguja desde panel en pestaña del Sampler	44
Figura 16. Procedimiento para tomar control del equipo	46
Figura 17. Inicio del análisis, adición de lecturas y muestras en secuencia	48
Figura 18. Procedimiento de lavado apagado	50
Figura 19. Flujograma para determinar histamina en harina de pescado por HPLC	57
Figura 20. Registro de Control de Procesos.....	59
Figura 21. Registro de Preparación de Estándares para la Curva de Histamina	61
Figura 22. Registro de Preparación del Estándar Control de la Curva de Histamina	62

Figura 23. Curva de calibración y valores de áreas para estándares de histamina por HPLC	63
Figura 24. Curva de lectura y áreas de muestras en análisis de histamina por HPLC	64
Figura 25. Registro de cálculos para la determinación de histamina por HPLC	65
Figura 26. Informe de ensayo a muestra de harina de pescado	67

RESUMEN

El trabajo aborda la aplicación de la Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) para determinar histamina en harina de pescado, que consiste en extraer histamina con ácido tricloroacético y derivatizada con cloruro de dancilo a 55 °C, la separación cromatográfica es modo isocrático fase reversa Metanol: Agua: Acetonitrilo, usando una columna C18; se desarrolla en etapas, siendo una el enfoque la importancia de la histamina en productos alimenticios y la determinación por el método HPLC. Se describe actividades haciendo uso del HPLC en la determinación de histamina en harina de pescado en el Laboratorio de Orgánica de la empresa SGS del Perú SAC. La histamina es un indicador muy importante en los productos pesqueros como la harina de pescado, debido a su toxicidad que puede provocar la muerte, es por ello que lo análisis de histamina requieren técnicas analíticas confiables, considerando el contenido de histamina como indicador de calidad en materia prima y de productos procesados, por ello se clasifican los productos y establecen los precios a nivel mundial en productos pesqueros especialmente de la harina de pescado. Como experiencia, las instrucciones operativas para el manejo del sistema de análisis por HPLC, explica el método de ensayo para la determinación de histamina por HPLC en harina de pescado, describe los registros y cálculos para cuantificar la histamina en una muestra de harina de pescado, así como un informe de ensayo. Luego se describe la validación de métodos y auditorias para la acreditación como aportes realizados a la empresa.

Palabras clave: histamina, harina de pescado, HPLC

ABSTRACT

This work addresses the application of High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) to determine histamine in fishmeal. The process involves extracting histamine with trichloroacetic acid and derivatizing it with dansyl chloride at 55 °C. The chromatographic separation is performed in reversed-phase isocratic mode using a C18 column (Methanol: Water: Acetonitrile). The study is developed in stages, one of which focuses on the importance of histamine in food products and its determination by the HPLC method. Activities using HPLC for the determination of histamine in fishmeal at the Organic Laboratory of SGS del Perú SAC are described. Histamine is a crucial indicator in fishery products such as fishmeal due to its toxicity, which can be fatal. Therefore, histamine analysis requires reliable analytical techniques, considering histamine content as a quality indicator in raw materials and processed products. This is why products are classified and prices are established globally, especially for fishmeal. This document presents the operational instructions for using the HPLC analysis system, explaining the test method for determining histamine in fishmeal by HPLC. It describes the records and calculations for quantifying histamine in a fishmeal sample, as well as a test report. The validation of methods and audits for accreditation are then described as contributions made to the company.

Keywords: histamine, fishmeal, HPLC

I. INTRODUCCIÓN

El presente informe describe en forma detallada las diversas actividades pre profesionales desarrolladas en la empresa SGS del Perú SAC para la obtención al título profesional por la modalidad de Suficiencia Profesional, el cual trata sobre la aplicación de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para la determinación de histamina en harina de pescado.

El informe tiene como objetivo describir la importancia de la histamina como indicador de calidad en los productos pesqueros y su efecto tóxico en los seres humanos, y su alcance está limitado específicamente al procedimiento de manejo del sistema HPLC, el método de análisis, y los cálculos para su cuantificación de histamina en matrices de harina de pescado.

La empresa SGS del Perú SAC realiza diversos servicios de análisis químicos, y en el caso específico para la determinación de histamina en harina de pescado utiliza la HPLC cuyo método esta validado por el Instituto Nacional de la Calidad (INACAL).

El trabajo inicialmente contiene la trayectoria del autor, seguido de la descripción de la empresa donde se desarrolló las actividades pre profesionales, el organigrama de la empresa dentro del cual se encuentra el área de trabajo y las áreas y funciones desempeñadas.

En la continuación se describe una actividad específica, la cual explica las características de la histamina en los alimentos y su efecto toxico, luego los principios de la HPLC, los equipos que posee la empresa donde se realizó el trabajo, las instrucciones operativas para el manejo del sistema el cual está configurado con el software Chromeleon, el método de ensayo para la determinación de histamina por HPLC en harina de pescado, los registros, los cálculos para determinar la concentración de histamina en harina de pescado y el informe de ensayo de histamina en harina de pescado y el marco conceptual.

En la parte final del trabajo se presenta los aportes más destacados a la empresa, las

conclusiones, recomendaciones, referencias y anexos.

1.1 Trayectoria del autor

Egresada de la carrera profesional de Ingeniería Pesquera de la Universidad Nacional Federico Villarreal con el grado de Bachiller, con estudios de Maestría en Administración con mención en Gestión Empresarial en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, y Bombero Profesional de la Compañía de Bomberos Internacional N° 14.

Dentro de mis capacidades y competencias organizativas soy organizada y disciplinada con capacidad de análisis, trabajo en equipo, y obtención de resultados según metas en base a mi experiencia laboral, valores, ética profesional y compromiso. Manejo y organización de personal.

Respecto a mis capacidades y competencias técnicas logradas en base a mi experiencia laboral y continuas capacitaciones puedo citar las siguientes:

- Manejo del UHPLC (Sistema para Cromatografía Líquida de Alta Performance),
- Titulador Potenciométrico,
- Uso de normas según ISO/NTP 17025:2017,
- Verificación de material de vidrio-volumétrico,
- Revisión de certificados de calibración,
- Monitoreo de frecuencia de calibración,
- Repetibilidad, Reproducibilidad,
- Homogeneidad, Precisión,
- Informe de muestra control en cada análisis de ensayo,
- Resultados enviados a software interno CClass
- Monitoreo ambiental

Para fortalecer mis estudios de pregrado, realice las siguientes capacitaciones:

- Curso de SAP (Sistema de Gestión Empresarial)
Universidad La Salle. Febrero 2018
- Capacitación de Brigadista de Primeros Auxilios, RCP, Curso de Desfibrilador Externo Automático (DEA)
South American Rescue Association SAC (Sara Perú SAC). Diciembre 2017
- Sistema HACCP y sus programas prerrequisitos BPM, POE y POES
Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM). 2015
- Curso de Especialista en Monitoreo Ambiental
Centro de Especialización Ambiental (CENESAM). 2015
- Especialización de Indicadores de Calidad Ambiental y Salud del Borde Marino Costero del Perú.
Colegio de Ingenieros del Perú (CIP). 2014
- Sistemas Integrados de Gestión de la Calidad, Seguridad y Medio Ambiente (Normas ISO 9001, ISO 14001 y OHSAS 18001)
Universidad Nacional Federico Villarreal. 2014
- Diseño y Construcción de Infraestructura Acuícola
Colegio de Ingenieros del Perú (CIP). 2014.
- Excel Avanzado, Tablas Dinámicas y Power Pivot
Instituto CIMAS. 2014
- Calderos en la Industria Pesquera
Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV). 2014
- Administración y Marketing
Universidad Privada del Norte (UPN). 2014

- Nudos Marinos, Artes y Aparejos de Pesca, Terminología Náutica y Legislación Pesquera.

Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV). 2013

- Idioma Ingles

Asociación Cultural Peruano Británica. 2012-2013

- Idioma Portugués

Centro de Idiomas de la Universidad de San Martin de Porres. 2013

- Libreta de Embarco y Carnet de Pesca

Capitanía de Puerto – Callao. 2013

En el ámbito laboral, mi experiencia es la siguiente:

- Empresa: SGS del Perú SAC

Cargo: Coordinadora SSMA de Laboratorio

Funciones: Dar soporte y mantener los requerimientos del Sistema de gestión de Seguridad, Salud Ocupacional y Medio Ambiente de los laboratorios EHS. Participar en la elaboración y ejecución del Plan de Emergencias de los laboratorios, así mismo de la revisión de la Identificación de Peligros y Evaluación de Riesgos y Controles (IPERC) y mapa de riesgos. Participar en la elaboración y ejecución de los simulacros de los laboratorios a cargo contemplando los productos químicos críticos usados en el mismo.

Periodo: agosto 2018 – mayo 2019

- Empresa: SGS del Perú SAC

Cargo: Analista del Laboratorio de Instrumental Orgánico

Funciones: Análisis de histamina, etoxiquina, lisina disponible, antioxidantes fenólicos, aminas biogénicas y determinación de cloruro por medio de Cromatografía Líquida por HPLC y método potenciométrico de harina y aceite de pescado.

Periodo: abril 2015 – julio 2018

- Empresa: Corporación Acuarios del Golfo Camaronera Menier S.A. de Taura Guayas

Cargo: Asistente de Producción

Funciones: Planificar las tareas y distribución de fracción de alimento por día en langostino, determinar parámetros del agua como pH, temperatura, y oxígeno disuelto en las diferentes piscinas de crianza. Monitoreo constante del tamaño de langostino para su cosecha. Trato comercial con el posible cliente para formalizar una compra de lotes de langostino. Manejo de personal cargo.

Periodo: diciembre 2014 – marzo 2015

- Empresa: Langostinera Criador El Guamito S.A.C. de Puerto Pizarro, Tumbes, Perú.

Cargo: Asistente de Producción

Funciones: Preparación de alimento para el langostino en cultivo. Toma de parámetros del agua tales como pH, temperatura y oxígeno disuelto en las diferentes piscinas de crianza. Monitoreo constante del tamaño del langostino para su cosecha.

Periodo: abril 2013 – julio 2014

1.2 Descripción de la empresa

SGS fue establecida en 1878, transformó el comercio del grano en Europa ofreciendo unos servicios de inspección agrícola innovadores. La empresa se registró en Ginebra como *Société Générale de Surveillance* en 1919 (SGS del Perú, 2022a).

El año 1986 empezó a operar en Lima con un equipo de 40 empleados. Hoy, la sede peruana es una de las más importantes, de la región sudamericana (SGS del Perú, 2022b).

En la actualidad, SGS del Perú está presente en 28 ciudades del Perú, con cerca de 2,000 empleados, ofreciendo un rango amplio de soluciones a prácticamente todo sector e industria

existente, incluyendo medioambiente, agricultura, minería, industrial, pesca, certificación de sistemas de gestión, productos de consumo, automotriz y, petróleo, gas y productos químicos.

Según Datosperu.org (2022) el RUC de SGS del Perú S.A.C. es 20100114349 y tiene como actividad principal los ensayos y análisis técnicos.

1.3 Organigrama de la empresa

La empresa está liderada por el Gerente General responsable del logro de los objetivos trazados, dentro de ello en un segundo nivel se encuentra la Gerencia de Laboratorio que es la encargada de velar por la gestión de cada laboratorio de la empresa, y dentro de la Gerencia de Laboratorios se encuentran los Departamentos que son áreas encargadas de realizar los diferentes ensayos, como, por ejemplo: el Departamento de Orgánica comprenden los laboratorios de Microbiología, Productos Orgánicos e Instrumental Orgánica.

A nivel de Departamento trabajan todos los analistas, los cuales de acuerdo con su antigüedad y experiencia están categorizados, iniciándose en Auxiliares, para luego llegar a Junior, después a Analista y finalmente al máximo nivel de Senior.

En la figura 1 se presenta el organigrama del Departamento de Orgánica.

Figura 1

Organigrama del Departamento de Orgánica de SGS del Perú SAC



Nota. SGS del Perú (2021)

1.4 Áreas y funciones desempeñadas

Como Analista de Laboratorio inicié mis actividades en el Departamento de Productos Orgánicos - Laboratorio de Instrumental Orgánica, permaneciendo en dicho un periodo de tres años y tres meses, reportando todo lo actuado a la coordinadora de Producción y Supervisor del laboratorio.

La descripción del cargo como Analista de Laboratorio, se describe a continuación, el cual se presenta en el Anexo A (SGS del Perú, 2017).

Principales responsabilidades:

Realizar análisis de acuerdo con los procedimientos establecidos.

Responsabilidades específicas:

- Verificar el estado de calibración y operatividad de los equipos.
- Mantener orden y limpieza en el Laboratorio y cumplir con las normas de seguridad del Laboratorio.
- Programar el trabajo a realizar de acuerdo a las prioridades de análisis de acuerdo a lo indicado por el encargado del Laboratorio.
- Realizar análisis de acuerdo a los procedimientos establecidos.
- Preparar reactivos y estándares para los análisis.
- Efectuar los controles necesarios en la ejecución de los ensayos.
- Reportar los datos e información necesaria para la evaluación de resultados y/o validar los resultados.
- Cumplir con el programa de Aseguramiento de Calidad y/o los controles establecidos para el método de ensayo.
- Participar en el desarrollo de técnicas o métodos de análisis a emplear en el caso de nuevas

determinaciones.

- Identificar no conformidades y proponer acciones correctivas / preventivas en la ejecución específica de sus actividades.
- Aplicar, mantener y promover la mejora continua del Sistema de Gestión de la Calidad.

Los métodos que desarrollé durante mi etapa de analista fueron los siguientes:

- Aflatoxina en nueces y paprika
- Ocratoxina en paprika
- Determinación de cloruro de sodio en harina de pescado y foliares
- Determinación de histamina en matices de harina y aceite de pescado
- Determinación de Etoxiquina en matrices de harina y aceite de pescado

De los cuales el presente trabajo trata de la determinación de histamina en harina de pescado mediante el uso de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Posteriormente postulé al puesto de Coordinadora de Seguridad, Salud Ocupacional y Medio Ambiente (SSMA) para los laboratorios de Environmental, Health and Safety, de las sedes Arequipa, Cajamarca y Callao. Reportando a la supervisión y gerencia de OI (Operational Integrity), desempeñando las siguientes actividades:

Principales responsabilidades:

Dar soporte y mantener los requerimientos del Sistema de Gestión de Seguridad, Salud Ocupacional y Medio Ambiente de los Laboratorios.

Responsabilidades específicas:

- Coordinar continuamente sus actividades con el supervisor OI para laboratorios.
- Dar soporte en el cumplimiento y actualización del Sistema de Gestión de Seguridad, Salud Ocupacional y Medio Ambiente de los laboratorios a su cargo.

- Trabajar en conjunto con los supervisores de los laboratorios a su cargo y mantener actualizado el sistema de documentación SSMA de los laboratorios asignados.
- Recibir en forma diaria retroalimentación del prevencionista de campo sobre situaciones particulares que ameriten seguimiento en el turno correspondiente.
- Verificación diaria de la ejecución de las charlas de 5 minutos de los laboratorios a su cargo y el correcto llenado de los registros.
- Verificación en todos los laboratorios a su cargo respecto al correcto llenado de APR, uso correcto de EPPs, orden y limpieza, ausencia de equipos de música, no uso de aparatos electrónicos, celulares, ipods, audífonos, no uso de alhajas ni relojes, no ingesta de alimentos. Ante un hallazgo de los antes nombrados reportar en forma inmediata al Supervisor de Laboratorio y al Supervisor OI.
- Inspección periódica, de la zona de residuos peligrosos, pozas de sedimentación de metalurgia cuando corresponda, zona de almacenamiento de gases comprimidos, zona de tanques de neutralización, zona de almacenamiento intermedio de residuos peligrosos de los laboratorios, zona de almacenes internos de los laboratorios.
- Verificación del cumplimiento de la compatibilidad de los insumos químicos de los almacenes internos de los laboratorios.

Funciones ejecutadas y su relación con el perfil profesional del Ingeniero Pesquero de la Universidad Nacional Federico Villarreal

- La ejecución de análisis en el Laboratorio de Instrumental Orgánica de acuerdo con los procedimientos establecidos está relacionada con la competencia específica que gestiona procesos de evaluación y administración de recursos pesqueros de importancia comercial cumpliendo las normas nacionales e internacionales con un enfoque sistémico.

- La participación en el desarrollo de técnicas o métodos de análisis a emplear en el caso de nuevas determinaciones está relacionada con la competencia específica que diseña, selecciona, implementa y gestiona procesos de transformación y mejora continua de productos derivados de la pesca y acuicultura con eficiencia y eficacia, cumpliendo con las normas de calidad, sanidad e inocuidad.
- Dar soporte y mantener los requerimientos del Sistema de Gestión de Seguridad, Salud Ocupacional y Medio Ambiente de los laboratorios está relacionada con la competencia específica que planea, organiza, dirige y controla organizaciones con y sin fines de lucro, con ética y liderazgo, cumpliendo con la normativa vigente.
- Aplicar, mantener y promover la mejora continua en la gestión de los laboratorios a cargo está relacionada con la competencia genérica de generar ideas y trabajar en la creación de productos y servicios que la sociedad necesite, poniendo al alcance de la sociedad: servicios profesionales con una mejor apertura de centros laborales, ofreciendo de esta forma mejores puestos de trabajo.

II. DESCRIPCIÓN DE UNA ACTIVIDAD ESPECÍFICA

2.1 Marco teórico de la cromatografía

La cromatografía comprende diversas técnicas analíticas que se sustentan en la separación de los componentes de un producto y su posterior análisis cualitativo y cuantitativo. Dentro de las diferentes técnicas cromatográficas existe un aspecto en común donde todas ellas tienen una fase móvil es decir existe un fluido que puede ser líquido, gas o fluido supercrítico que arrastra a la muestra a través de una fase estacionaria que puede ser un sólido o un líquido. Para Lancelotti (2007) los elementos que componen la muestra interaccionan de distinta manera con la fase estacionaria y la fase móvil, interactuando químicamente y separándose, para luego pasar por un detector que produce una señal que puede estar en función a la concentración y el tipo de compuesto.

La cromatografía es una de las muchas técnicas de separación y tiene como objetivos la separación luego la identificación y finalmente la cuantificación. Con la separación se tiene la posibilidad de purificar y determinar los elementos o compuestos en estudio.

Según Crouch et al. (2008) la separación en cromatografía es el resultado de las diferencias en la interacción entre los diferentes compuestos con la fase estacionaria, por lo que los componentes más afines por la fase estacionaria serán más retenidos y consecuentemente migrarán menos; así mismo los menos afines por la fase estacionaria migrarán en mayor cantidad. Además, el mismo transporte genera que los analitos se dispersen, para obtener una buena separación se deben controlar varios factores sino puede ocurrir que la dispersión opaque la separación lograda.

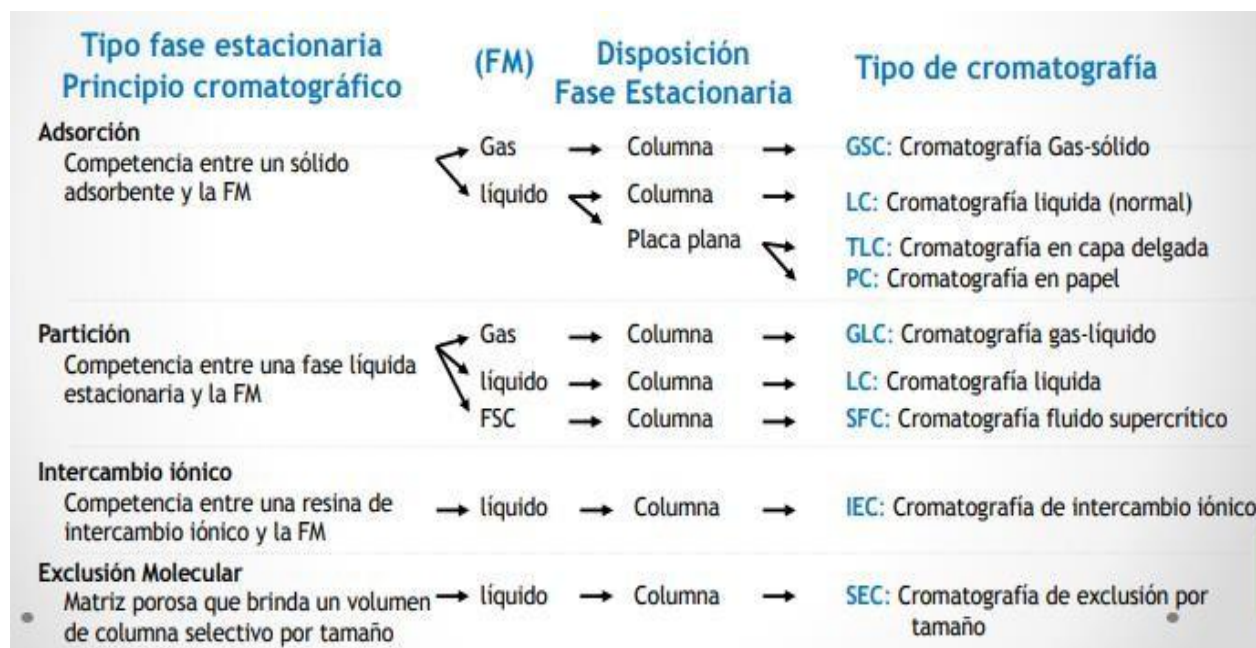
La cromatografía puede desarrollarse en diferentes tipos de fase estacionaria el cual corresponde al principio cromatográfico, utilizando diferentes medios de flujo utilizando para ello diferentes disposiciones de fase estacionaria (columna o placa plana) lo que conduce a los

diferentes tipos de cromatografía.

En la figura 2 se presenta los tipos y clasificación de la cromatografía.

Figura 2

Cromatografía, tipos y clasificación



Nota. Stanley et al (2008)

Dentro de los conceptos teóricos y aplicaciones de la cromatografía:

La cromatografía es un método muy utilizado en todas las ramas de la ciencia que permite la separación, identificación y determinación de los componentes químicos en mezclas complejas. Ningún otro método de separación es tan potente y de aplicación tan general. Las cromatografías son procesos que abarcan varias técnicas separativas, basadas en propiedades físicas de ciertos materiales, que, en interacción con sustancias o mezclas de sustancias, la/s cual/es guarda/n relación con las propiedades químicas de éstas, permite descomponer una mezcla y analizar sus constituyentes. Con el desarrollo de la tecnología, las técnicas cromatográficas se diversificaron y mejoraron sensiblemente su capacidad para resolver mezclas de distinta naturaleza. (Sgariglia et al, 2010, p. 1)

2.1.1 Aplicaciones

La cromatografía se utiliza para hacer análisis de tipo cualitativo y cuantitativo mediante las diferentes técnicas existentes, teniendo aplicación en muestras que contengan compuestos orgánicos, Sgariglia et al (2010) señala:

Algunos ejemplos de aplicación son:

- Determinación del porcentaje de formación de una molécula de síntesis, en una planta de síntesis orgánica.
- Determinación de porcentaje de solvente en un producto agroquímico terminado.
- Determinación de concentración de producto activo en un producto agroquímico terminado.
- Control de calidad de pureza de solventes, como alcohol etílico anhidro, tolueno, xileno, benceno, que entran como materias primas a una planta.
- Determinación del contenido de principio activo de un medicamento.
- Control de calidad de la pureza de materias primas entrantes a bodega de una fábrica de productos medicinales, tales como: alcohol etílico al 95%, propilenglicol, glicerina, alcohol isopropílico, o-toluidina, paracetamol, butanol, octanol, benzaldehído, acetato de etilo, éter di etílico, alcanfor, y muchos otros.
- En fábricas de adhesivos, pegamentos, pinturas, para controlar que el producto terminado lleve las cantidades indicadas de solventes, humectantes, colorantes, gomas, resinas, poliuretanos, secantes, rellenos, esponjantes, suspensores, emulsificantes.
- En investigaciones policiales o forenses resulta una herramienta muy útil para el análisis de muestras.
- En fábricas de alimentos, para control de calidad de producto terminado y materias primas,

tales como proteínas, aromatizantes, determinación de colorantes.

- En la industria petrolera, es un método indispensable, para analizar las composiciones de casi todos los productos que van saliendo, del cracking, los tipos de gasolinas, los compuestos orgánicos destinados a síntesis.
- En el control de la producción vinícola, tiene infinidad de usos, desde usarse como una “nariz electrónica”, para caracterización de vinos, de acuerdo a parámetros previamente establecidos por expertos, concentración de componentes, análisis de aminos, como etanolamina, metilamina, agmatina, triptamina. Determinación de ocratoxina A.
- Su utilización es indispensable en análisis industriales, forenses bromatológicos, toxicológicos, clínicos y de contaminación ambiental. (p. 5)

2.1.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

La cromatografía de líquida de alta resolución (HPLC) requiere de sistemas de bombeo de escaso caudal aproximadamente de 1 ml/minuto a presiones por lo general de 145 atmósferas, con una precisión en el flujo de $\pm 0,01$ ml/minuto, lo cual es necesario, debido a que una de las características cromatográficas básicas de una sustancia en estudio denominada analito que se encuentra en una muestra a analizar es el tiempo de retención, o en otros términos, el tiempo que demora luego de ser ingresada en el sistema en salir o eluir de la columna y ser captada por el detector (Skoog y Leary, 1994; Meyer, 2004).

La HPLC es una de las técnicas cromatográficas más utilizadas por su característica de poder separar analitos de diferentes características a lo que se llama también análisis de los componentes químicos de una mezcla. Tiene diversos usos tales como la industria farmacéutica, alimentaria, química, médica, bioquímica, entre otros (Suarez y Morales, 2018; Bliesner, 2006),

Las ventajas del HPLC frente a otras técnicas cromatográficas, según Dong (2013), son:

- Alta reproducibilidad en los análisis cuantitativos
- Alto poder de separación con detección sensible
- La operación es flexible, personalizable, automatizada y de alta precisión
- Tiempo de separación menor a 30 min por muestra analizada.

Equipo para Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

La empresa SGS del Perú SAC para realizar cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utiliza equipos de la marca Thermo Fisher Scientific Inc. de procedencia norteamericana.

En la figura 3 se muestra la imagen del Detector con su marca respectiva

Figura 3

Detector para Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)



Nota. Thermo Fisher Scientific Inc. (2013)

El detector es parte del sistema UltiMate 3000, y su ubicación para aplicaciones analíticas por HPLC, y la organización de los módulos se muestra en la figura 4, sin embargo, la disposición de los módulos depende de la aplicación.

Figura 4

Disposición de módulos para el sistema UltiMate 3000



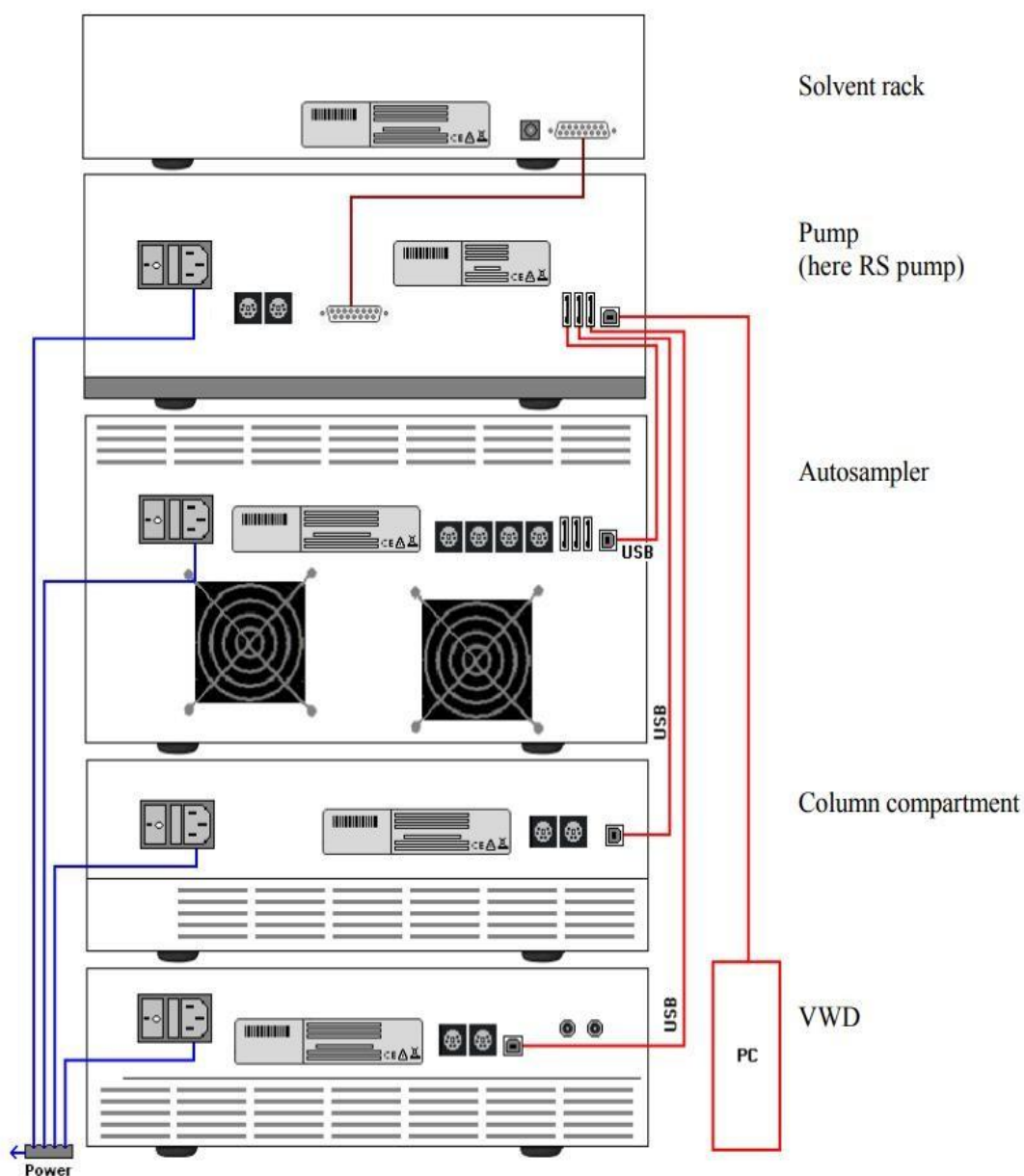
Nota. Thermo Fisher Scientific Inc. (2013)

Aparte del rack de solvent, todos los módulos del sistema UltiMate 3000 se pueden conectar por separado a la computadora Chromeleon usando el puerto USB en el panel posterior del instrumento.

En la figura 5 se presenta las conexiones del panel posterior del sistema UltiMate 3000

Figura 5

Conexiones del panel posterior en el sistema UltiMate 3000



Nota. Thermo Fisher Scientific Inc. (2013)

Especificaciones técnicas del sistema

- Condiciones ambientales:
 Humedad relativa de 20 – 80%,
 Temperatura de 15 – 35 °C
- Bomba:
 Sistema de solventes: Binario Flujo máximo: 10 ml/minuto
 Presión operativa máxima: 15000 psi
- Detector:
 Modelo fluorescencia Modelo UV-visible
- Autosampler:
 Capacidad de jeringa: 450 uL
 Volumen de inyección de muestra: 500 UI
- Manejo de datos:
 Software: Chromeleon 7.2.

2.2 Marco teórico de la histamina

Sobre su estructura y origen del compuesto.

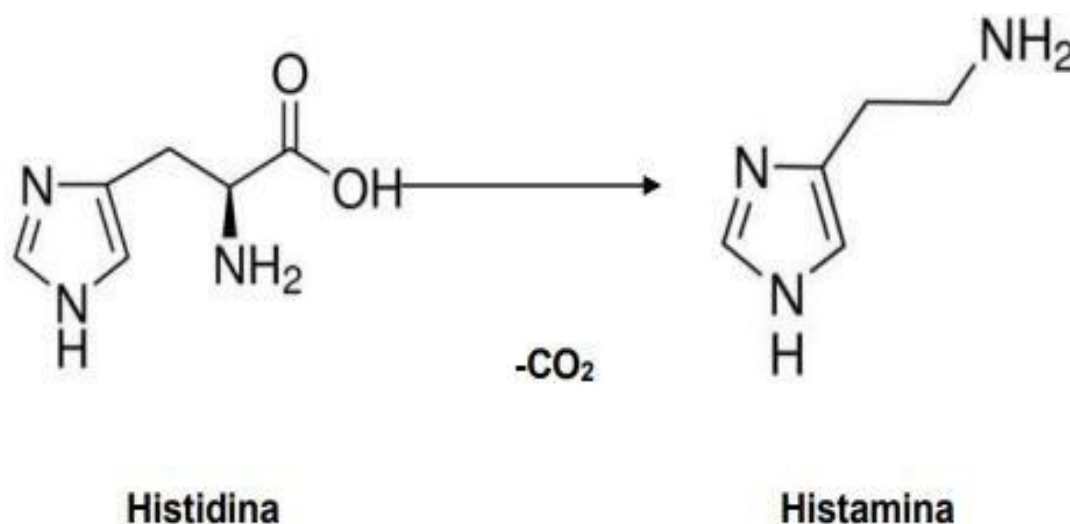
La histamina [1-metil-4-(β -amino-etil)-imidazol] es una amina biogénica, una base orgánica producida por las células vivas del cerebro, del hígado, de los pulmones, de los intestinos, inclusive de las células de la piel. En la naturaleza está en forma inactiva, pero es liberada en su configuración activa como consecuencia de una lesión o por reacciones antígeno/anticuerpo. (Villalobos, 2022, p. 1)

La histamina en la mayoría de los peces se encuentra en su tejido muscular en forma libre, pero en otros alimentos proviene de la acción enzimática de la enzima histidina descarboxilasa.

En la figura 6 se presenta la formación de la histamina

Figura 6

Formación de histamina a partir de la descarboxilación microbiana de la histidina



Nota. La histidina descarboxilasa se encuentra en ciertas bacterias que se encuentran en los órganos de la mayoría de los peces sin alterar el metabolismo.

La harina de pescado obtenida por secado directo e indirecto contiene histamina, la cual puede variar según la calidad del producto donde las de mejor calidad pueden tener una concentración inferior a 500 ppm mientras que otras alcanzan hasta las 1000 ppm. (La Organización Internacional de la Harina y el Aceite de Pescado [IFFO], 2008; Zaldivar, 1996)

La histamina es una amina biogénica que se origina a partir del deterioro de la histidina libre que se encuentra en el pescado, por lo tanto, se convierte en un indicador del grado de calidad de frescura de la materia prima para la fabricación de harina de pescado generando una correlación entre la materia prima y el producto final entonces a menor cantidad de histamina en la materia prima menor cantidad de histamina en la harina. (Gómez, 2016; Rivera, 2020).

La determinación de la histamina en la harina de pescado se justifica por sus efectos

negativos que puede producir en los seres vivos que la consumen dentro de su alimentación. Según Alberecht y Salas (2001) la toxicidad de la histamina produce reacciones alérgicas y el grado de afección está relacionado con la cantidad de histamina consumida, así mismo cuando se producen estas intoxicaciones, interviene el grado de sensibilidad del consumidor, donde algunos tienen mayor o menor grado de tolerancia.

La ingesta de alimentos con alto nivel de histamina puede derivar en un envenenamiento por intoxicación, cuya incubación es inmediata de 6 a 8 horas luego de comer. (Feng et al., 2015)

Para las intoxicaciones en humanos no existe una dosis mínima de intoxicación, sin embargo, según los antecedentes se encontrado que pescados con concentraciones a 200 ppm de histamina han producido afección, pero con mayor frecuencia aquellos pescados que se encuentran con concentraciones mayores a 500 ppm. (Yeannes y Casales, 1995)

La harina de pescado se utiliza en la fabricación de alimento balanceado participando generalmente en un 10% de producto final, por lo tanto, si la harina contiene 250 ppm de histamina, el alimento preparado solo contendrá 25 ppm de histamina, razón por la cual, cuanto más baja es la concentración de histamina la calidad de la harina es mejor. (Au, 1996)

La producción de histamina luego de la muerte de un pez se debe a la actividad enzimática de la histidina-carboxilasa que actúa sobre la L-histidina, ya que el pez queda sin capacidad de inhibir el incremento de bacterias. (Food and Drug Administration [FDA], 2011).

Desde el año de 1995 las entidades internacionales que velan por la salud y alimentación humana como son la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), así como la Comisión del Codex Alimentarius, establecieron que un kilogramo de producto a lo más puede tener 100 mg de histamina. (FDA, 2011)

2.3 Marco conceptual

Cromatografía

Es un proceso de separación cuya técnica contiene dos fases una estacionaria y otra móvil y atraviesa un medio cromatográfico, donde la fase estacionaria generalmente es un material sólido con una superficie activa. La fase móvil es líquida o gaseosa. Por lo tanto, cuando la fase móvil atraviesa la fase estacionaria, los compuestos de la muestra se separan que luego son identificados y cuantificados a medida que eluyen de la columna. (Fried y Sherma, 1999).

HPLC

Son las iniciales de “*high performance liquid Chromatography*” método analítico cualitativo y cuantitativo utilizado para separar mezclas complejas en tiempos rápidos. El método puede identificar trazas de elementos orgánicos e inorgánicos. (Deinstrop, 2007)

Histamina

Se encuentra en alimentos como el pescado y resiste el calor de la esterilización y es un indicador de inadecuadas condiciones higiénicas en su elaboración o uso de materias primas en malas condiciones. (Cervantes, 2009)

Harina de pescado

Es el producto obtenido por secado con extracción de la materia grasa si es necesario y molienda de pescado, y puede provenir de diferentes especies. (INACAL, 2010)

Muestra

Una o más unidades seleccionadas entre una población de unidades, o una porción de material seleccionada entre una cantidad mayor de material; la intención de una muestra obtenida es ser representativa de la población, las muestras se seleccionan en función a las características de la población y las variables que se quieren evaluar o medir, donde puede ser el contenido de

contaminantes o residuos, entre otros. (Rivera, 2020)

2.4 Nuevos aprendizajes logrados

2.4.1 Instrucción operativa para manejo del sistema UltiMate 3000

La actividad específica que se describe a continuación es un nuevo aprendizaje que logré dominar en mi condición de analista en el Laboratorio de Instrumental Orgánica de la empresa SGS del Perú SAC, determinando histamina en matrices de harina de pescado, utilizando HPLC, lo cual comparto para su difusión y conocimiento de los profesionales del sector pesquero.

La empresa SGS del Perú SAC en su Laboratorio de Instrumental Orgánica, cuenta con el sistema UltiMate 3000 para realizar cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para lo cual ha desarrollado las instrucciones operativas con la finalidad de garantizar el manejo adecuado del sistema, dentro del contexto de las buenas prácticas de laboratorio; donde el Supervisor del laboratorio es el responsable de implementar, mantener y hacer cumplir las instrucciones establecidas, y el analista es el responsable de conocer y aplicar todos los procedimientos validados por la empresa. (SGS del Perú, 2021)

Los procedimientos para el manejo del sistema UltiMate 3000 son los siguientes:

a) Procedimiento para encendido del equipo

Las condiciones ambientales del laboratorio deben estar con una humedad relativa de 20 a 80% y una temperatura de 15 a 35 ° C.

Los componentes del sistema tales como la bomba, el detector, el autosampler y el software Chromeleon 7.2 deben estar correctamente calibrados y en perfecta operación.

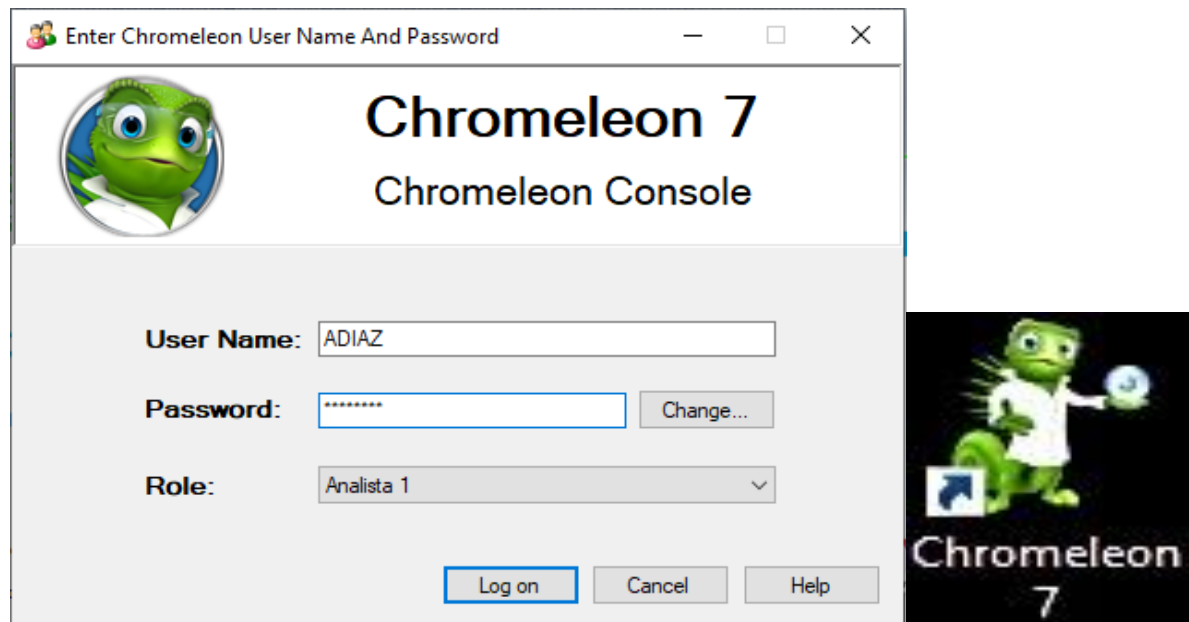
El encendido del sistema consiste en encender cada uno de los módulos con el switch que está detrás de cada módulo, luego se coloca la columna según el método a trabajar.

En la figura 7 se observa el icono para acceder al software Chromeleon 7.2 luego del cual aparece el inicio de sesión para que el analista ingrese su nombre del usuario y password luego

del cual hace clic en Log on para entrar al aplicativo.

Figura 7

Icono de acceso e inicio de sesión para software Chromeleon 7.2

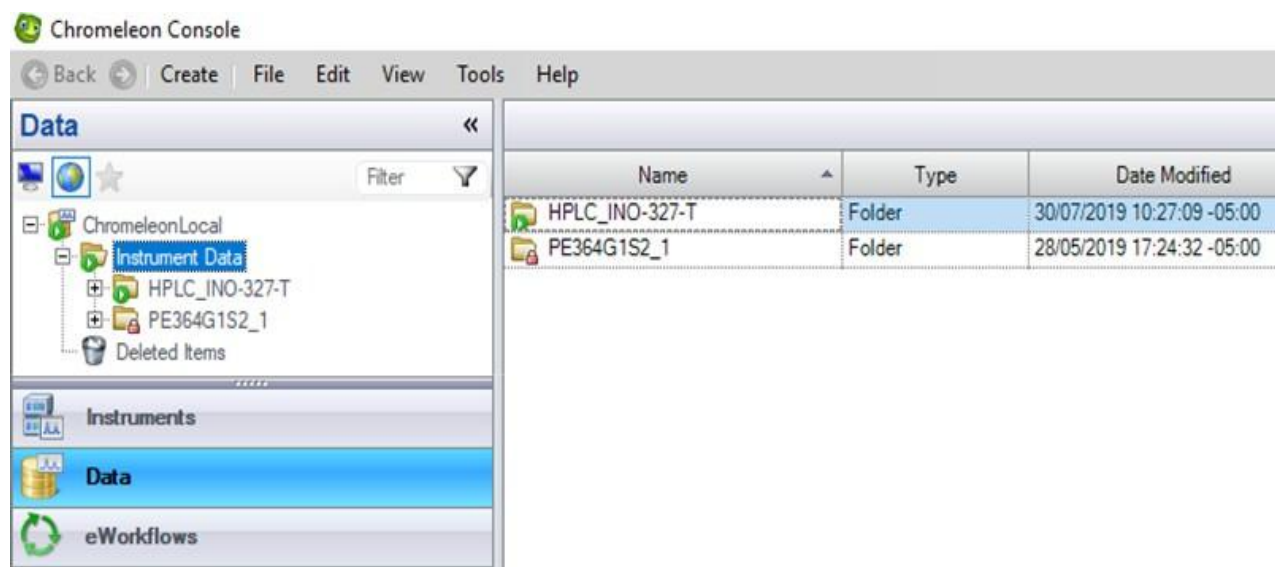


Nota. SGS del Perú SAC (2021)

En la figura 8 se muestra la interfaz del Chromeleon Console

Figura 8

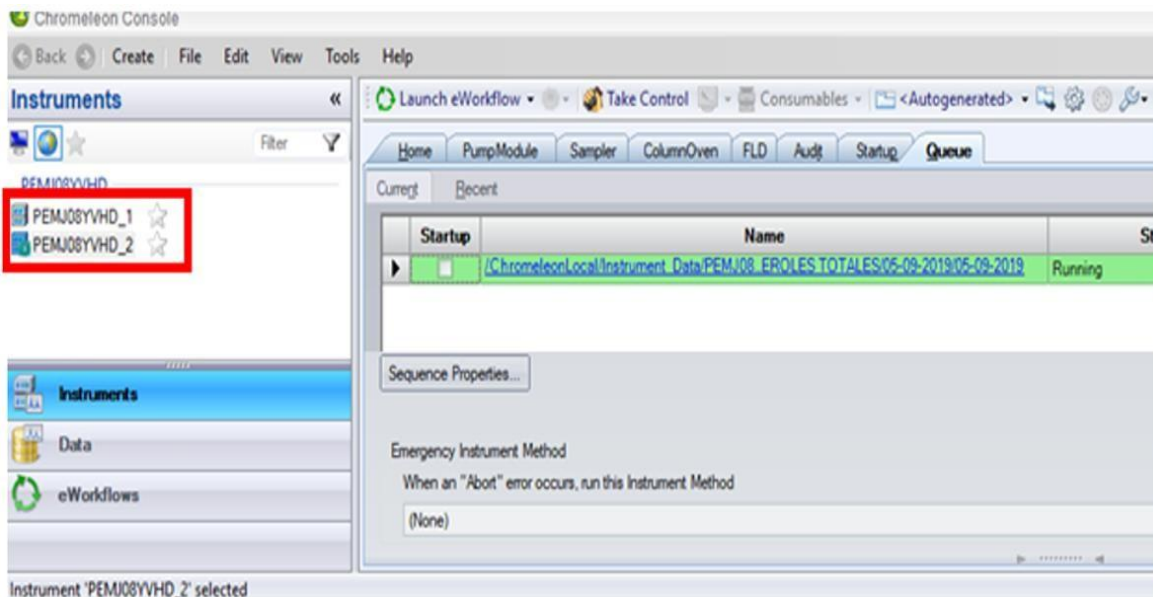
Interfaz general del Chromeleon Console



En la figura 9 se presenta la interfaz del Chromeleon Console-Data INO-327-7

Figura 9

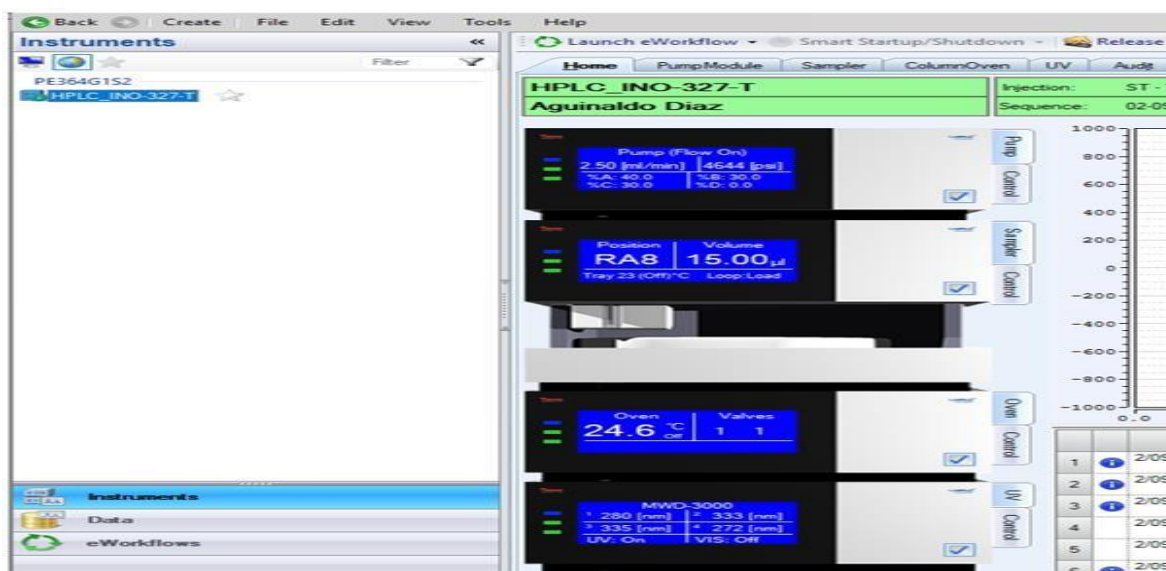
Interfaz del Chromeleon Console para Data INO-327-T



Cuando los equipos tienen dos bombas aparecerá como la imagen de la figura 10, y para hacer uso del Panel Set, se debe conectar los módulos ubicados en Instruments-Home.

Figura 10

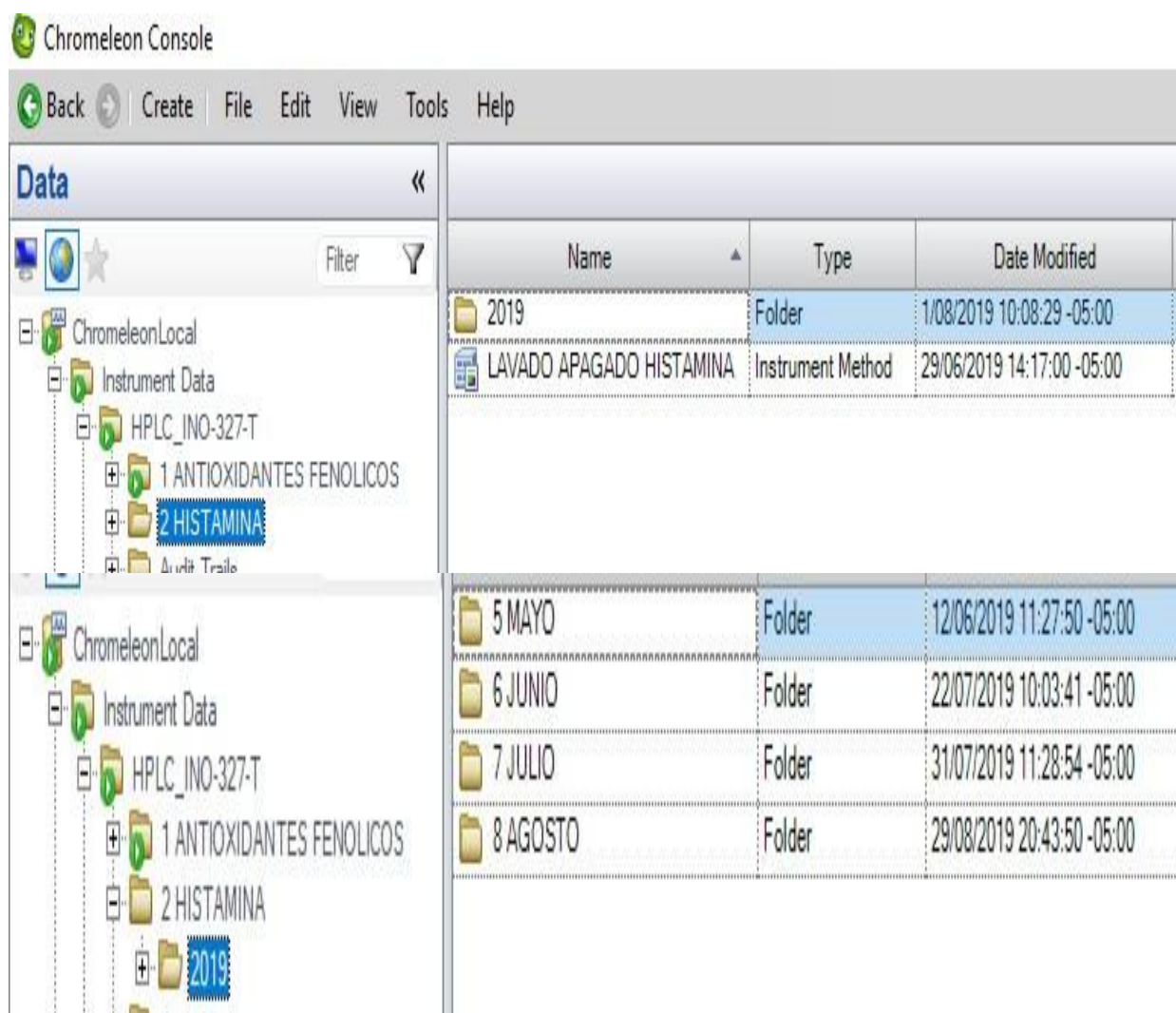
Conexión de módulos en Instruments-Home para uso de panel Set

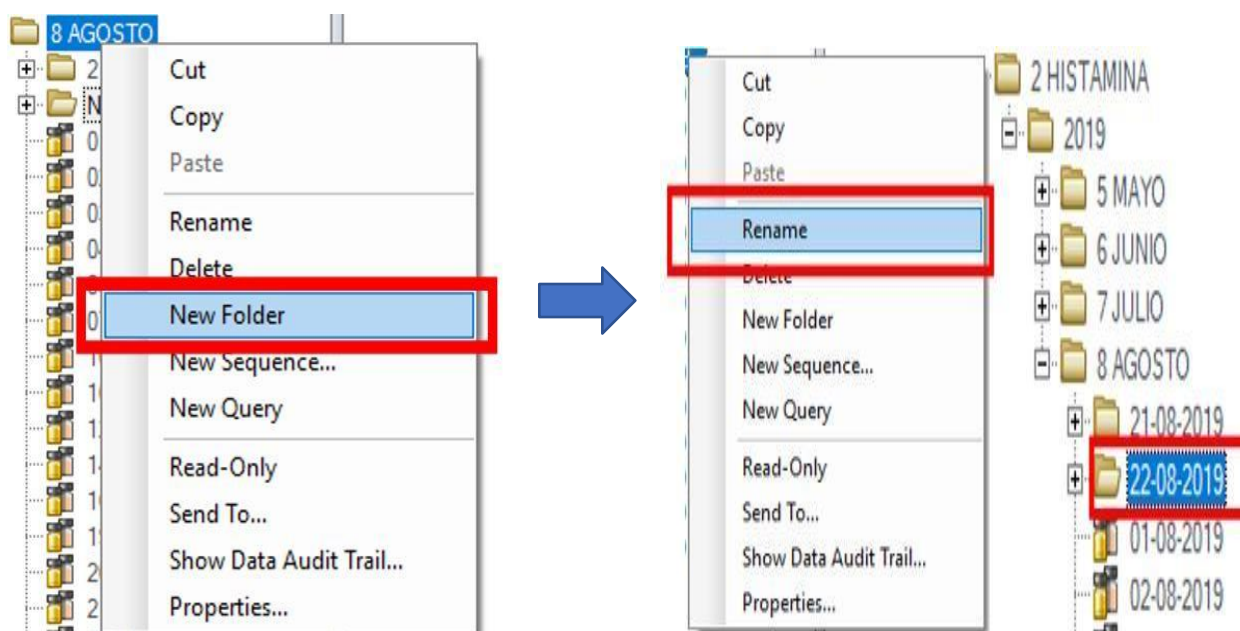
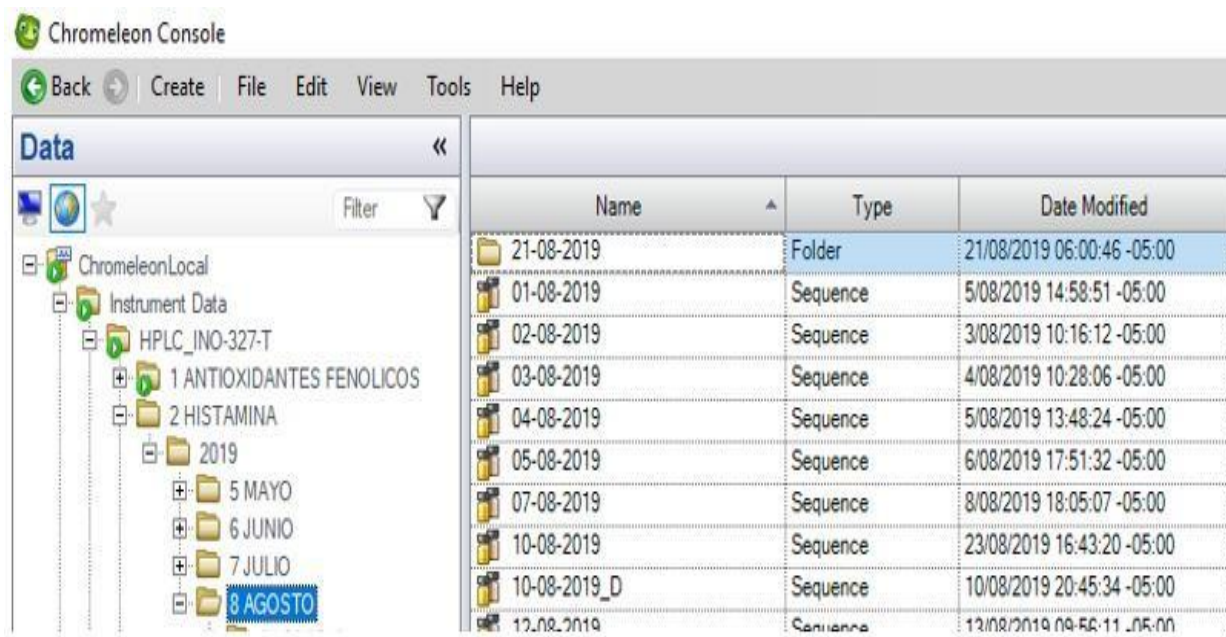


En la figura 11 (páginas 22 y 23), continua el procedimiento para crear una carpeta ingresando a **Instrument Data** y luego ingresando a HPLC_INO-327-T (cuando el sistema tiene una sola bomba), luego hacer clic en el método que desea trabajar, clic en el año en el que se está trabajando donde se desplegarán los meses, clic derecho en el mes actual y seleccionar **New Folder**. Luego parece una nueva carpeta al cual se hará clic derecho en RENAME y se indica la fecha actual de trabajo.

Figura 11

Procedimiento para crear una carpeta en el software Chromeleon 7.2





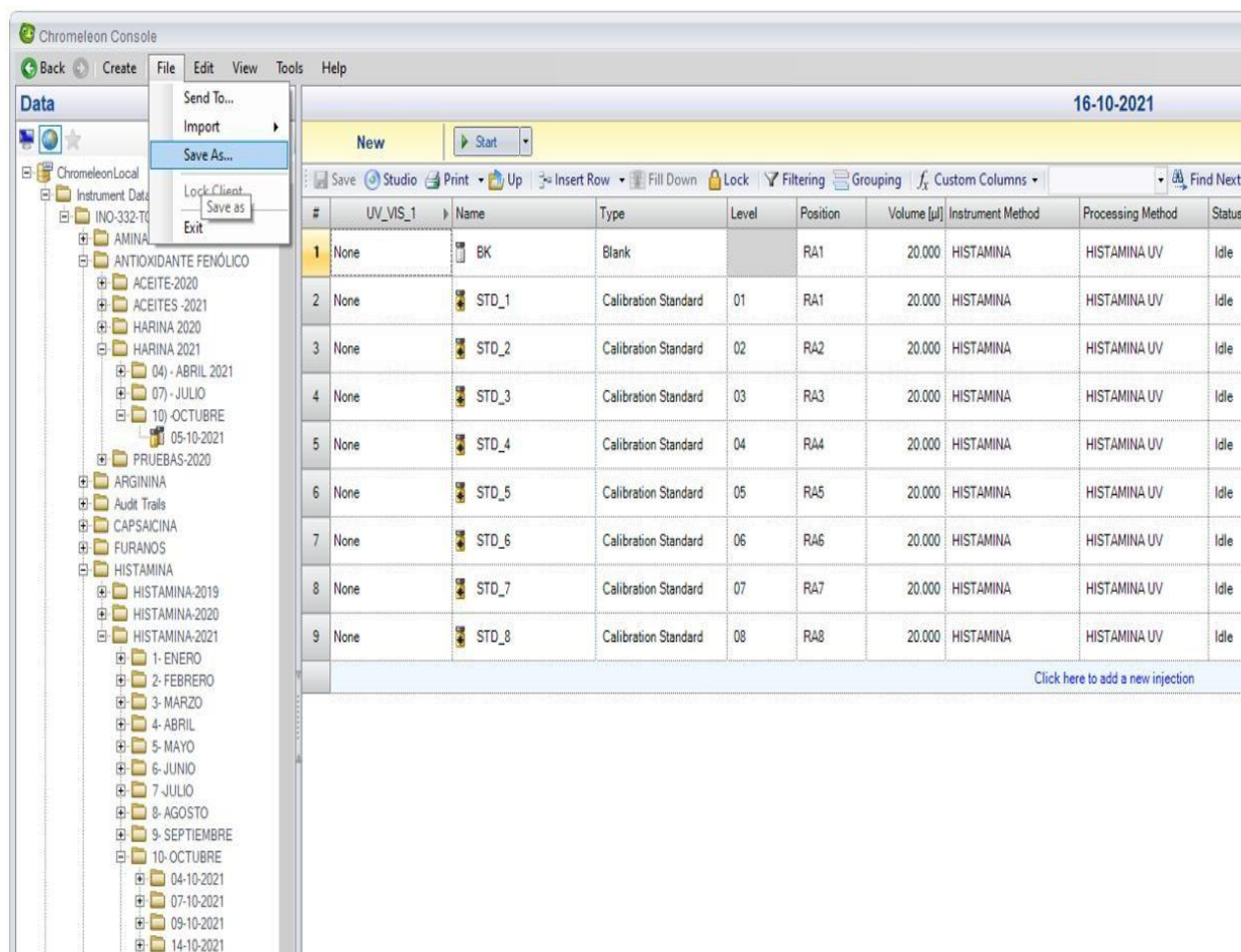
Nota. SGS del Perú SAC (2021)

b) Procedimiento para crear una nueva secuencia usando el detector de UV-visible y FLD (fluorescencia)

En la figura 12 se presenta el procedimiento para crear secuencia de estándares y muestras, ingresando a **FILE-SAVE as**,

Figura 12

Creación de secuencia de estándares y muestras en el software Chromeleon 7.2



En la ventana que sale se hace clic en **siguiente**, y se escoge el mes y se digita la fecha, luego en la siguiente pantalla, antes del inicio de análisis se inserta un blanco fase móvil para el lavado del sistema, luego clic derecho y se elige **Insert Sample**, luego se coloca los estándares: estándar 1, 2, hasta el 8, lo cual se presenta en la figura 13 que comprende las páginas 25, 26, 27, 28, 29 y 30.

Figura 13

Continuación de la creación de secuencia de estándares y muestras

The figure consists of two screenshots of the Chromeleon Console software interface, showing the 'Save Sequence As' dialog box. The top screenshot shows the dialog with 'Look in' set to '16-10-2021' and 'Object name' set to '16-10-2021'. The bottom screenshot shows the dialog with 'Look in' set to 'HISTAMINA-2021' and 'Object name' set to '16-10-2021'. Both screenshots show a table of sequences with columns: #, UV_VIS_1, Name, Type, Level, Position, Volume [µl], Instrument Method, Processing Method, Status, Inject Time, and Lock Status.

Top Screenshot: Save Sequence As Dialog

Look in: 16-10-2021

Name	Type	Date Modified	Comment
16-10-2021	Sequence	16/10/2021 16:03:15 -05:00	

Object name: 16-10-2021
Channel:
Object type: Sequence
☐ Save Raw Data

Bottom Screenshot: Save Sequence As Dialog

Look in: HISTAMINA-2021

Name	Type	Date Modified	Comment
1-ENERO	Folder	24/01/2021 07:41:42 -05:00	
2-FEBRERO	Folder	19/02/2021 12:17:15 -05:00	
3-MARZO	Folder	31/03/2021 08:25:37 -05:00	
4-ABRIL	Folder	30/04/2021 12:48:47 -05:00	
5-MAYO	Folder	31/05/2021 08:09:49 -05:00	
6-JUNIO	Folder	30/06/2021 09:31:18 -05:00	
7-JULIO	Folder	31/07/2021 07:11:57 -05:00	
8-AGOSTO	Folder	14/10/2021 11:54:25 -05:00	
9-SEPTIEMBRE	Folder	14/10/2021 11:54:06 -05:00	
10-OCTUBRE	Folder	16/10/2021 10:16:49 -05:00	
DIARIO	Folder	26/06/2021 09:08:37 -05:00	

Object name: 16-10-2021
Channel:
Object type: Sequence
☐ Save Raw Data

Table of Sequences (Visible in Both Screenshots)

#	UV_VIS_1	Name	Type	Level	Position	Volume [µl]	Instrument Method	Processing Method	Status	Inject Time	Lock Status
1	None	BK	Blank		RA1	20.000	HISTAMINA	HISTAMINA UV	Idle		
2	None	STD_1	Calibration Standard	01	RA1	20.000	HISTAMINA	HISTAMINA UV	Idle		
3	None	STD_2	Calibration Standard	02	RA2	20.000	HISTAMINA	HISTAMINA UV	Idle		
4	None	STD_3	Calibration								
5	None	STD_4	Calibration								
6	None	STD_5	Calibration								
7	None	STD_6	Calibration								
8	None	STD_7	Calibration								
9	None	STD_8	Calibration								

Table of Associated Items (Visible in Bottom Screenshot)

Name	Comment	Type	Date Modified
Default		View Settings	16/02/2021 17:15:25 -05:00
HISTAMINA	Histamina	Instrument Method	12/09/2020 17:47:59 -05:00
HISTAMINA UV		Processing Method	31/07/2021 10:25:37 -05:00
LAVADO APAGADO UV01		Instrument Method	30/03/2020 13:44:51 -05:00
platos teoricos		Report Template	9/02/2021 10:47:15 -05:00

Chromeleon Console

Back Create File Edit View Tools Help

Data 16-10-2021

ChromeleonLocal

Instrument Data

INO-332-TC

AMINAS BIOGENICAS

ANTIOXIDANTE FENOLICO

ACEITE-2020

ACEITES -2021

HARINA 2020

HARINA 2021

(04) - ABRIL 2021

(07) - JULIO

(10) - OCTUBRE

05-10-2021

PRUEBAS-2020

ARGININA

Audit Trails

CAPSAICINA

FURANOS

HISTAMINA

HISTAMINA-2019

HISTAMINA-2020

HISTAMINA-2021

1- ENERO

2- FEBRERO

3- MARZO

4- ABRIL

5- MAYO

6- JUNIO

7- JULIO

8- AGOSTO

9- SEPTIEMBRE

10- OCTUBRE

04-10-2021

07-10-2021

09-10-2021

14-10-2021

15-10-2021

16-10-2021

New Start

Save Studio Print Up Insert Row Fill Down Lock Filtering Grouping Custom Columns Find Next

#	UV_VIS_1	Name	Type	Level	Position	Volume [µl]	Instrument Method	Processing Method	Status
1	None	BK	Blank		RA1	20.000	HISTAMINA	HISTAMINA UV	Idle
2	None	STD_1	Calibration Standard	01	RA1	20.000	HISTAMINA	HISTAMINA UV	Idle
3	None	STD_2	Calibration Standard	02	RA2	20.000	HISTAMINA	HISTAMINA UV	Idle
4	None	STD_3	Calibration Standard						
5	None	STD_4	Calibration Standard						
6	None	STD_5	Calibration Standard						
7	None	STD_6	Calibration Standard						
8	None	STD_7	Calibration Standard						
9	None	STD_8	Calibration Standard						

Save Sequence As

Look in: 10- OCTUBRE

Name	Type	Date Modified	Comment
04-10-2021	Folder	4/10/2021 10:54:54 -05:00	
07-10-2021	Folder	7/10/2021 12:41:52 -05:00	
09-10-2021	Folder	9/10/2021 09:23:52 -05:00	
14-10-2021	Folder	14/10/2021 09:28:43 -05:00	
15-10-2021	Folder	15/10/2021 08:51:53 -05:00	
16-10-2021	Folder	16/10/2021 10:17:12 -05:00	

Object name: 16-10-2021

Channel:

Object type: Sequence

☐ Save Raw Data

Save Cancel

Chromeleon Console

Back Create File Edit View Tools Help

Data 16-10-2021

ChromeleonLocal

Instrument Data

INO-332-TC

AMINAS BIOGENICAS

ANTIOXIDANTE FENOLICO

ARGININA

Audit Trails

CAPSAICINA

FURANOS

HISTAMINA

HISTAMINA-2019

HISTAMINA-2020

HISTAMINA-2021

1- ENERO

2- FEBRERO

3- MARZO

4- ABRIL

5- MAYO

6- JUNIO

7- JULIO

8- AGOSTO

9- SEPTIEMBRE

10- OCTUBRE

04-10-2021

07-10-2021

09-10-2021

14-10-2021

15-10-2021

16-10-2021

DIARIO

LISINA

Qualification

ROTONONA

TOCOFEROL PUREZA

VITAMINA (A)

VITAMINA (A-PRUEBA)

VITAMINA C

Manual

Deleted Items

New Start

Save Studio Print Up Insert Row Fill Down Lock Filtering Grouping Custom Columns Find Next

#	UV_VIS_1	Name	Type	Level	Position	Volume [µl]	Instrument Method	Processing Method	Status
1	None	BK	Blank		RA1	20.000	HISTAMINA	HISTAMINA UV	Idle
2	None	STD_1	Calibration Standard			20.000	HISTAMINA	HISTAMINA UV	Idle
3	None	STD_2	Calibration Standard	02	RA2	20.000	HISTAMINA	HISTAMINA UV	Idle
4	None	STD_3	Calibration Standard	03	RA3	20.000	HISTAMINA	HISTAMINA UV	Idle
5	None	STD_4	Calibration Standard	04	RA4	20.000	HISTAMINA	HISTAMINA UV	Idle
6	None	STD_5	Calibration Standard	05	RA5	20.000	HISTAMINA	HISTAMINA UV	Idle
7	None	STD_6	Calibration Standard	06	RA6	20.000	HISTAMINA	HISTAMINA UV	Idle
8	None	STD_7	Calibration Standard	07	RA7	20.000	HISTAMINA	HISTAMINA UV	Idle
9	None	STD_8	Calibration Standard	08	RA8	20.000	HISTAMINA	HISTAMINA UV	Idle

Indicates the type of injection Unknown...Unspiked

Click here to add a new injection

No	Name	Type	Po	Inj. Vol.	Program	Method	Status	Inj. Date/Time
1	St - 1	Standard	RA	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single	
	How to...		RA	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single	
	What's this?		RA	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single	
	Open		RA	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single	
	Query		RA	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single	
	Sync		RA	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single	
	Copy		RB	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single	
	Paste		RB	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single	
	Clear		RB	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single	
	Insert Sample		RB	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single	
	Delete Samples		RB	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single	
	Append Sample		RB	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single	
	Edit Field...		RC	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single	
	Fill Column		RC	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single	
	Display Columns...							
	Report Columns							
	Batch Report...							
	Report Signed Results...							
	Print Sequence							
	Show History...							
	Properties...							

Seleccionamos la opción **Blank** donde corresponda.

No	Name	Type	Po	Inj. Vol.	Program	Method	Status
1	BK	Blank	RA	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single
2	St - 1	Unknown	RA	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single
3	St - 2	Blank	RA	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single
4	St - 3	Validate	RA	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single
5	St - 4	Standard	RA	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single
6	St - 5	Matrix	RA	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single
7	St - 6	Spiked	RA	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single
8	St - 7	Unspiked	RA	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single
9	St - 8	Standard	RA	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single

La secuencia debe quedar ordenada en esta posición :

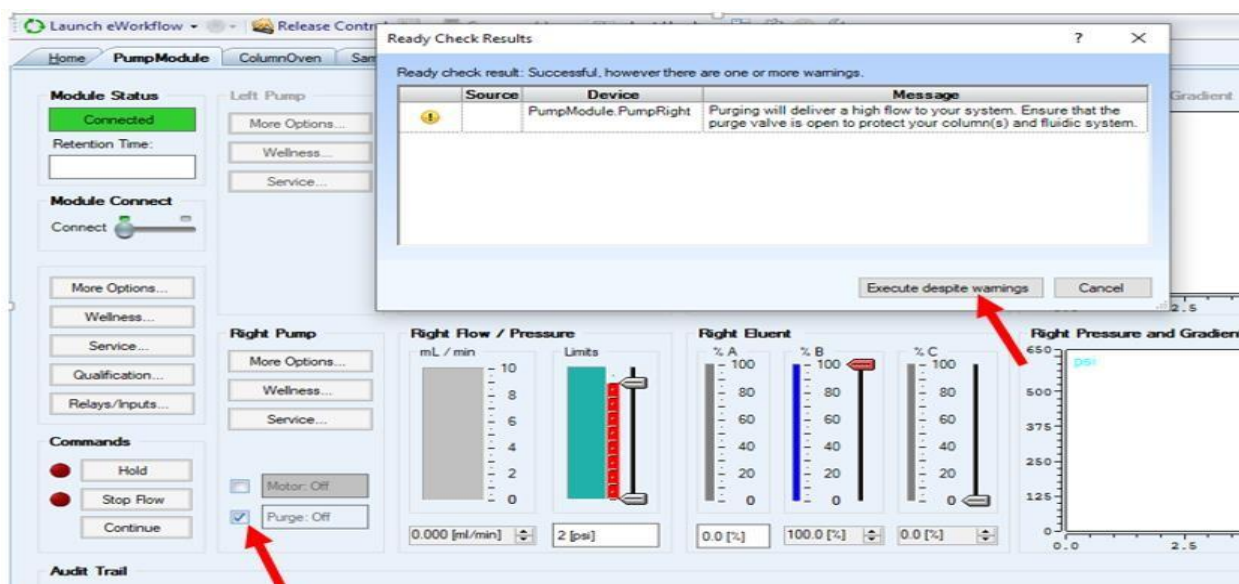
No	Name	Type	Pos.	Inj. Vol.	Program	Method	Status
1	BK	Blank	RA1	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single
2	St - 1	Standard	RA1	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single
3	St - 2	Standard	RA2	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single
4	St - 3	Standard	RA3	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single
5	St - 4	Standard	RA4	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single
6	St - 5	Standard	RA5	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single
7	St - 6	Standard	RA6	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single
8	St - 7	Standard	RA7	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single
9	St - 8	Standard	RA8	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single
10	BK	Blank	RB1	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single
11	LBXXXXXXXX_1	Unknown	RB1	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single
12	LBXXXXXXXX_2	Unknown	RB2	15.000	HISTAMINA	HISTAMINA	Single

c) Acondicionamiento del equipo

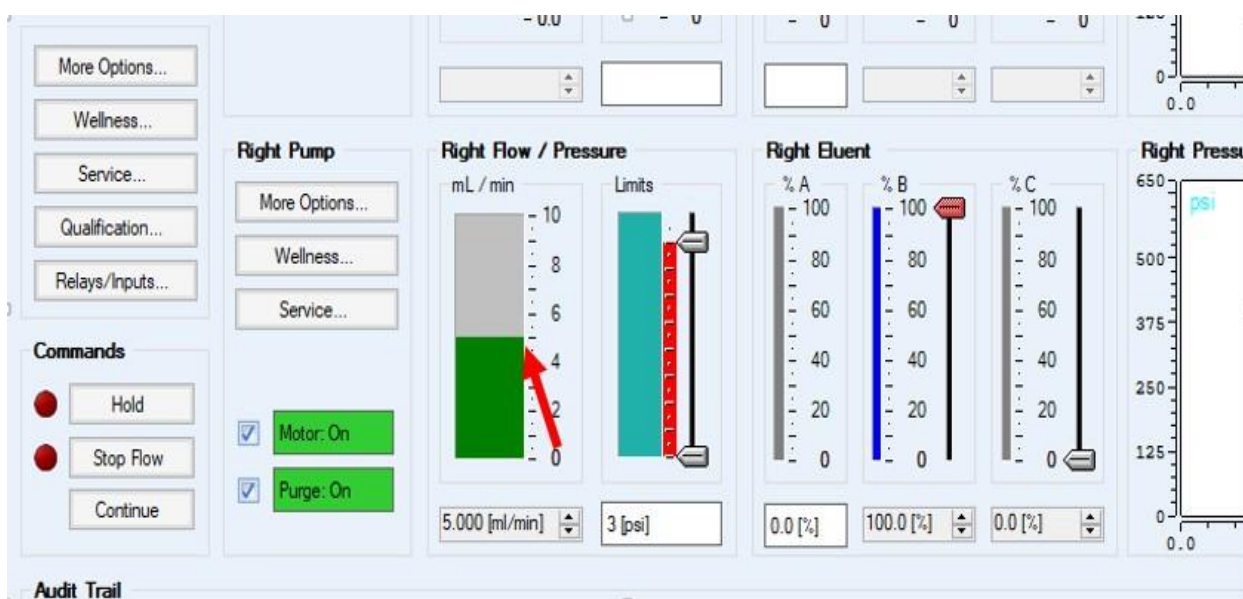
Para purgar ingresar a Panel Set, aplicar **Purge:Off**, luego **Ready Check Results**, dar clic en **Executive despite warnings**, lo cual se presenta en la figura 14 que comprende las páginas 31, 32, 33, 34 y 35.

Figura 14

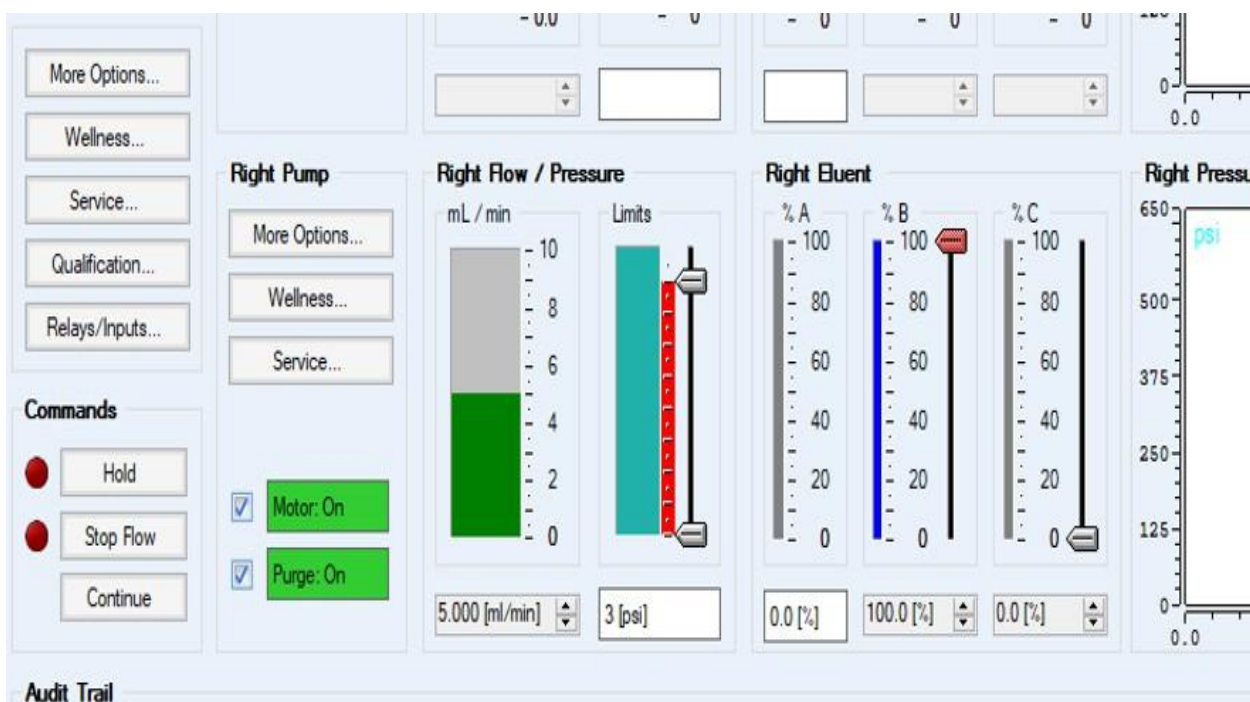
Proceso de purga del equipo



La presión del equipo ya está programada hasta que capacidad puede soportar.

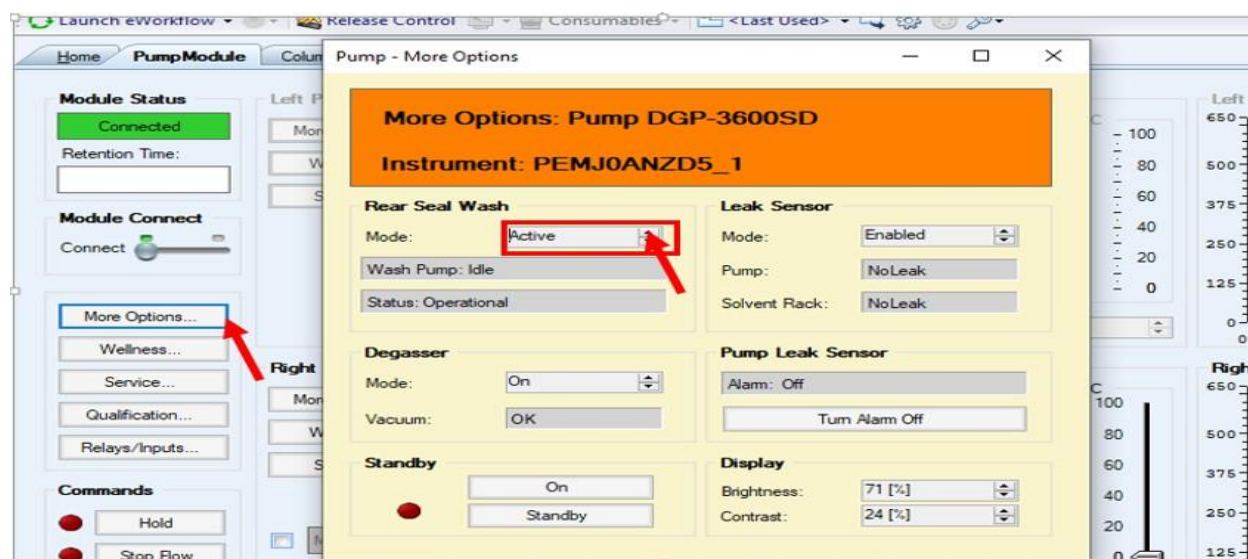


Se realizan tres purgas 100% de cada canal, se recomienda no purgar los 3 canales juntos, provocaría desgaste en la válvula

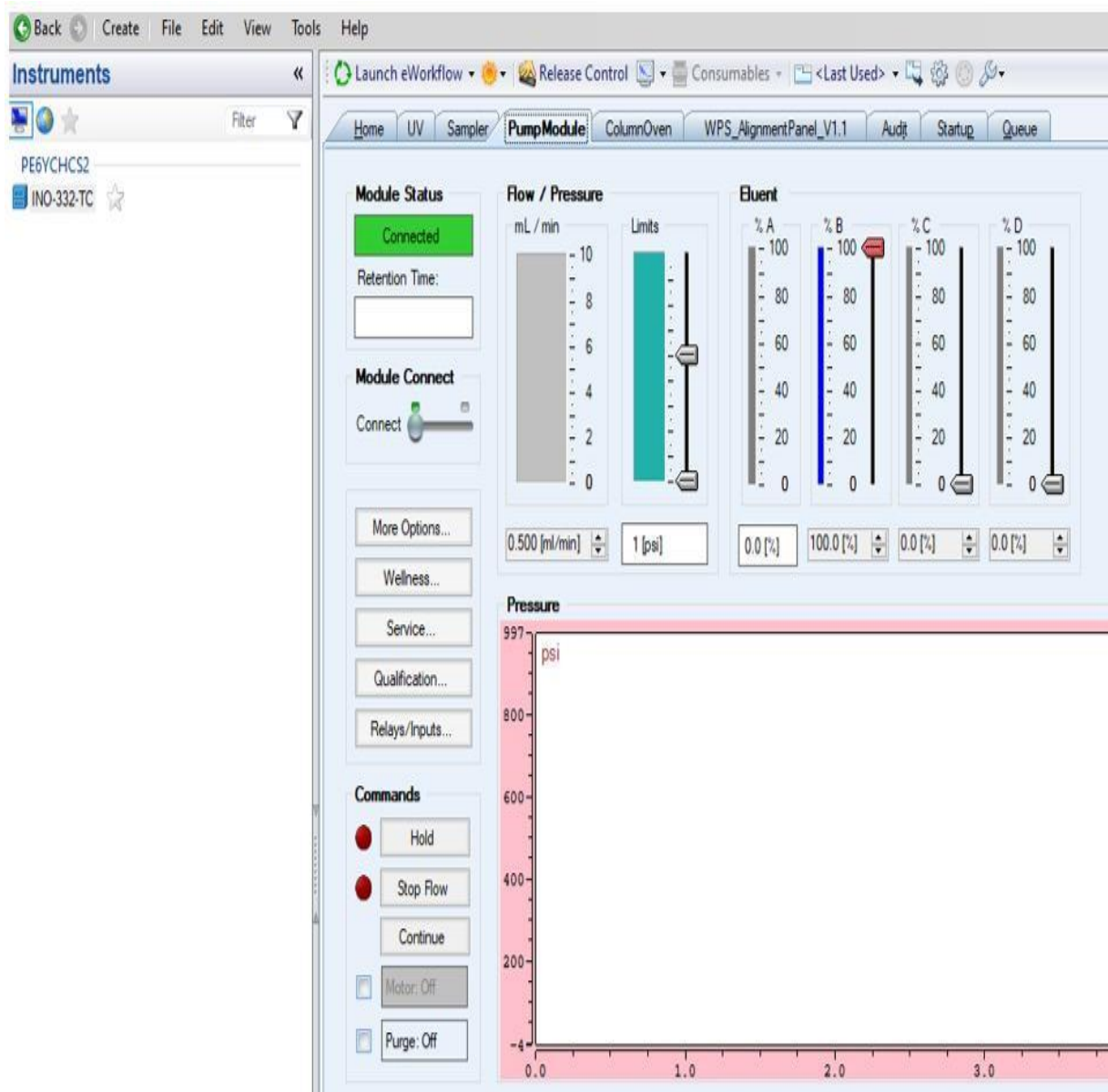


Para el lavado de sellos se ingresa a **More Options** y se despliega una ventana **Pump- More Options**, donde dice **mode**: se coloca a **Active** y para que se ejecute la acción se da **Enter**.

Se tiene que realizar hasta que el sistema quede libre de burbujas



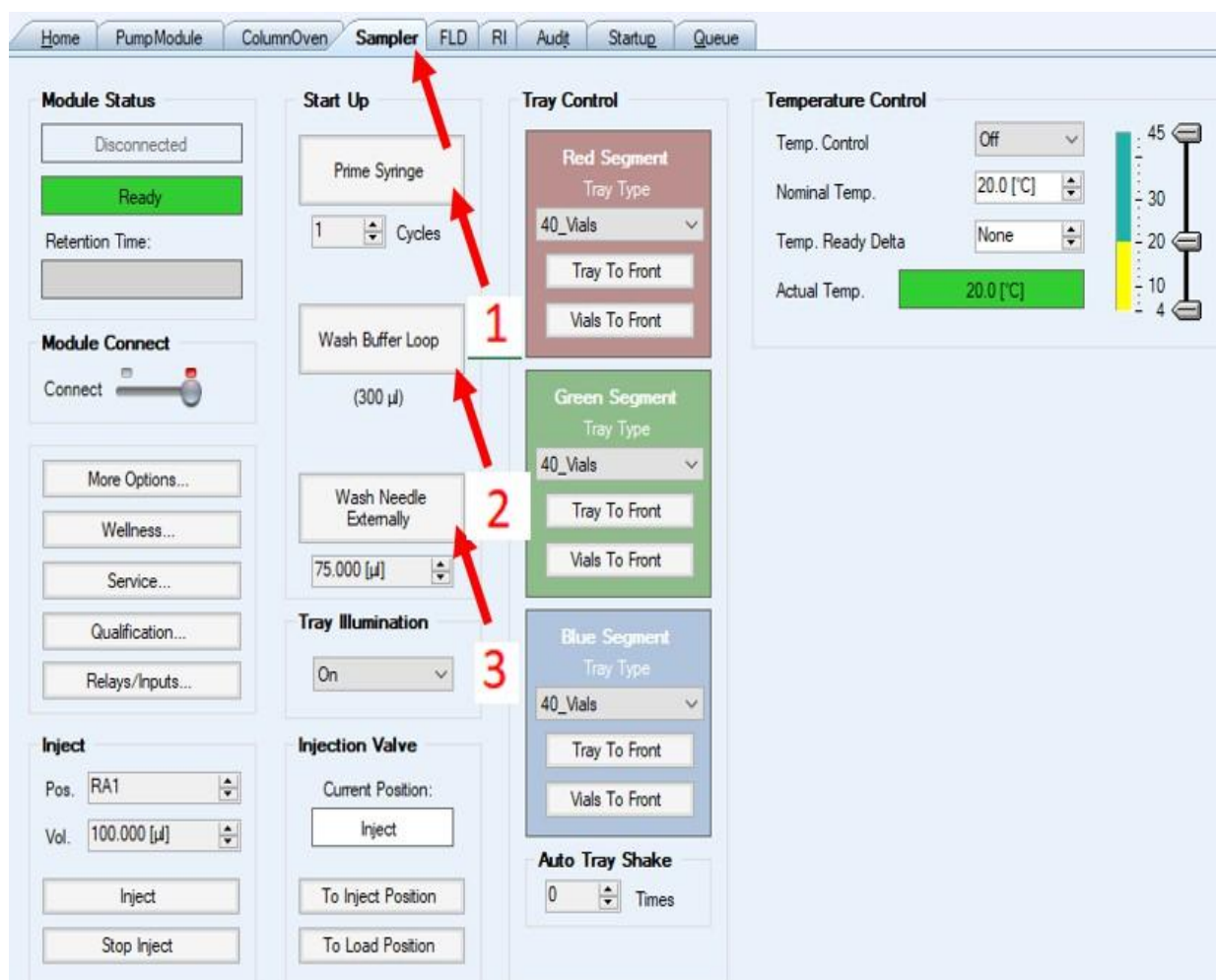
Hay equipos que tienen 4 canales de purga y se realiza el mismo procedimiento, pero cuando toque purgar el canal A se edita 100%, en el canal B se coloca 0% y solo sale el valor.



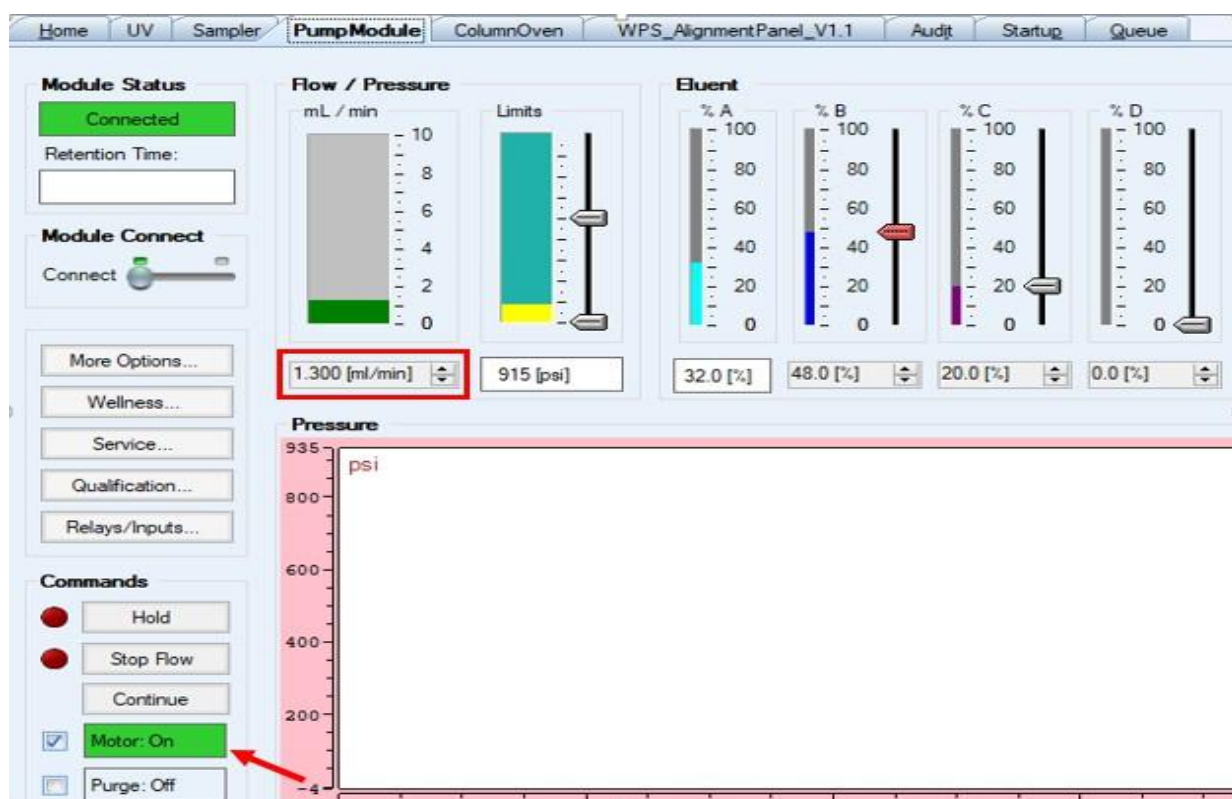
La figura 15 (páginas 36, 37, 38 y 39) muestra la limpieza de jeringa, loop y aguja desde el panel de control en la pestaña del Sampler, Para limpiar jeringa clic en Start Up de Prime Syringel, luego clic en Wash Bujer Loop y clic en Wash Needle Externally.

Figura 15

Proceso de limpieza de jeringa, loop y aguja desde panel en pestaña del Sampler

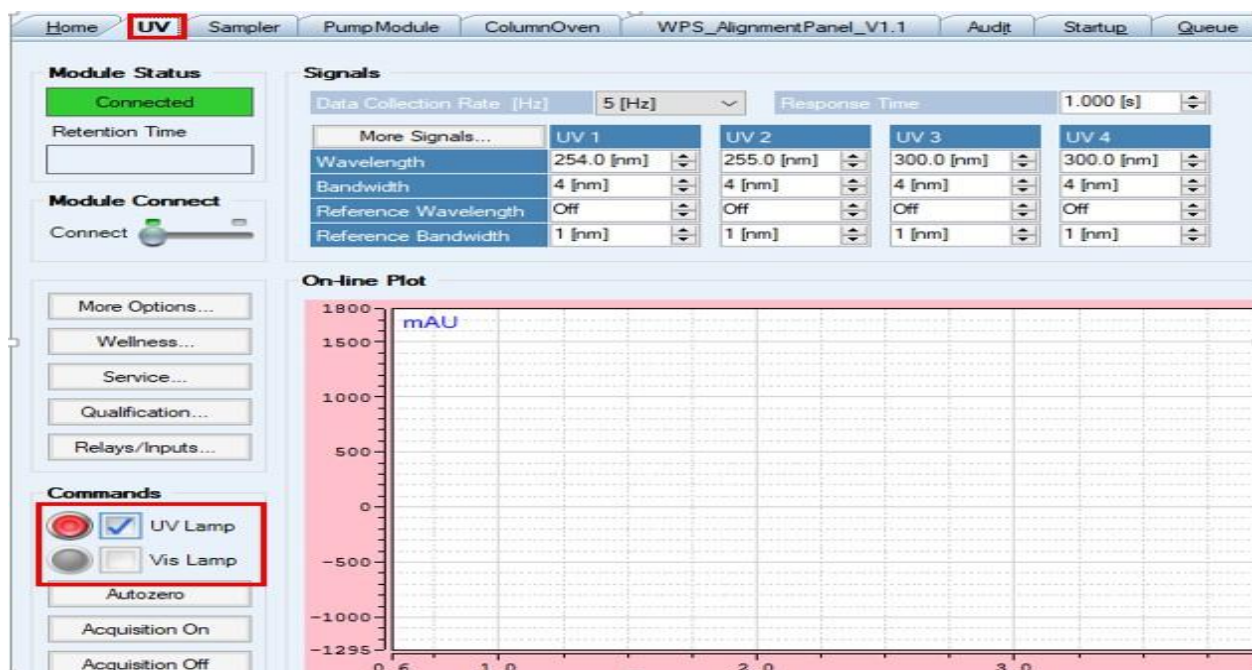


Nota. Cuando se está realizando la limpieza el not **Ready** es color amarillo, una vez concluido el **Ready** des e color verde. Para encender la bomba se ingresa al flujo, por ejemplo, en el caso de la histamina es 1.3 mL/min en **Pump Module**, según el método a usar y se hace clic en **Motor: off** y pasa a **Motor: On**.

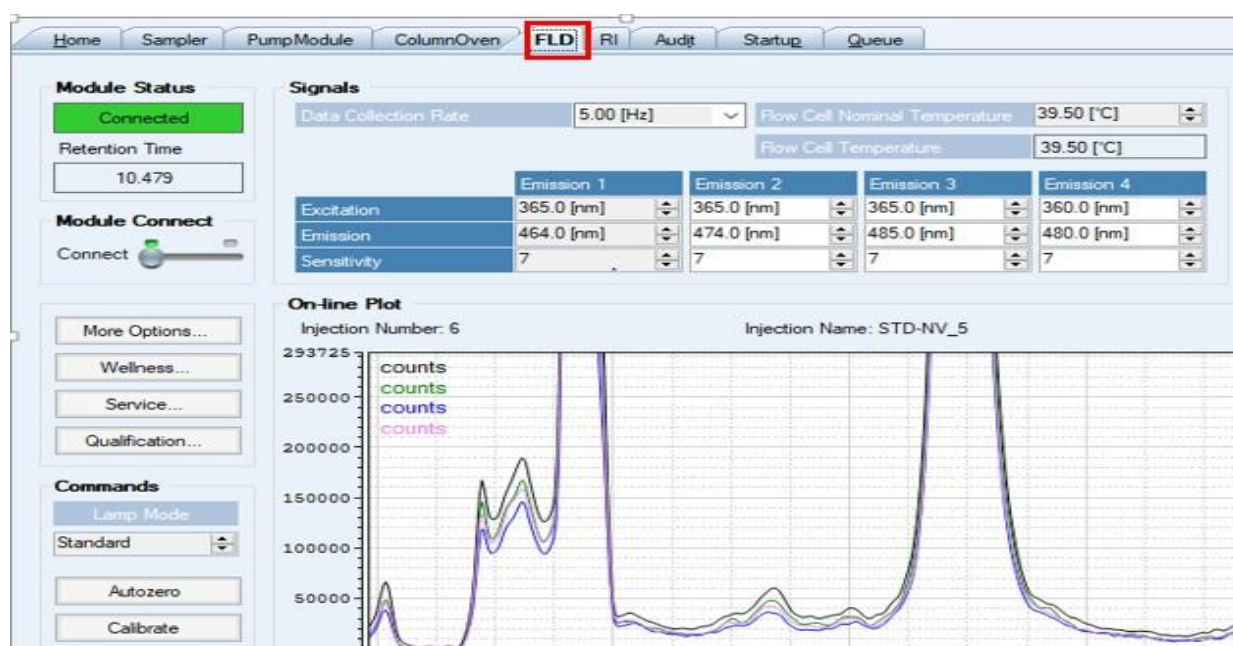


Para encender la lámpara se hace clic en:

- **UV Lamp o Vis Lamp** ingresando a la pestaña **UV**, dependiendo del análisis se enciende las lámparas y se espera que la lámpara se encienda (el botón se pone de color rojo claro).



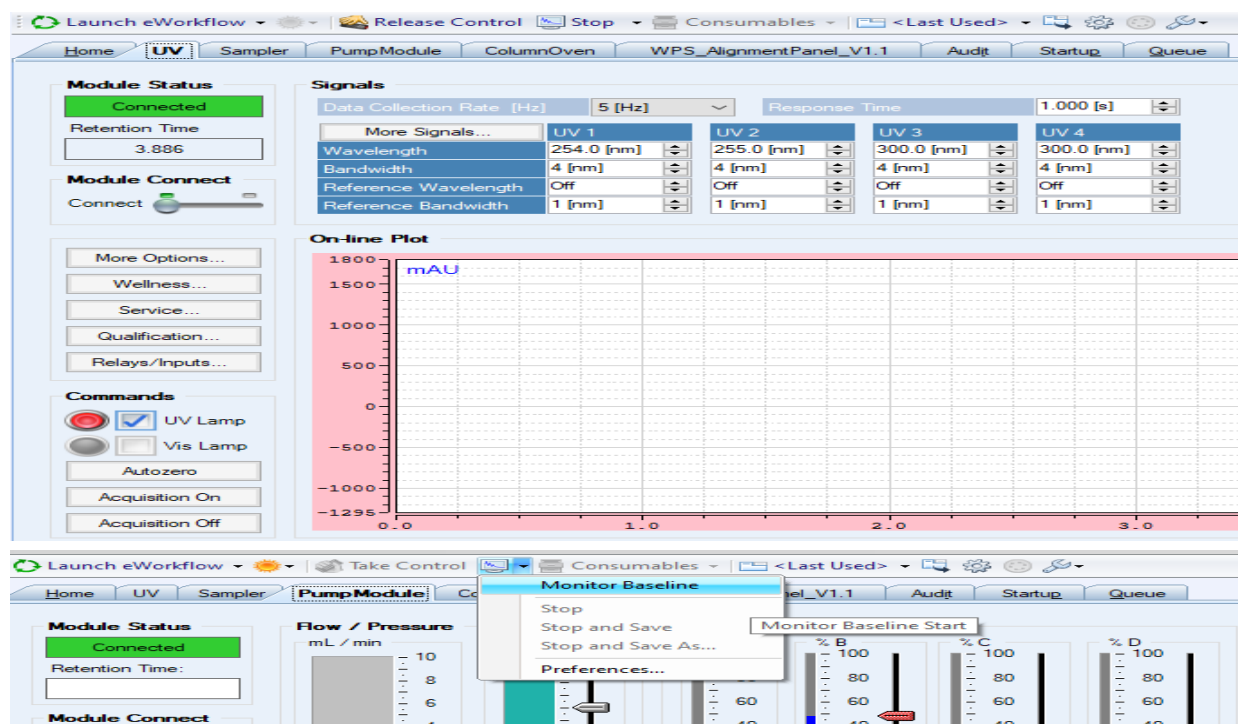
- En el detector de Fluorescencia ingresando a la pestaña **FLD**

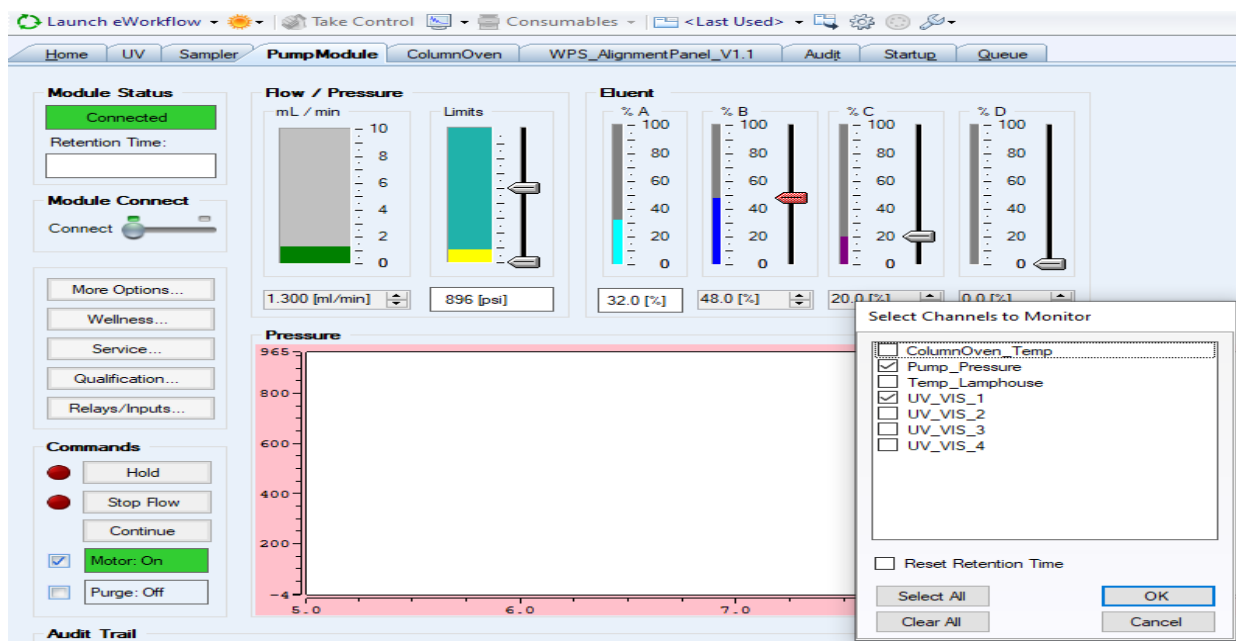


La figura 16 (páginas 40, 41 y 42) muestra la toma de control del equipo ingresando a Release Control y sale **Take Control**, luego en otro icono se despliega y aparece **Monitor Baseline** y se despliega una ventana **Select Channels to Monitor** y se da OK.

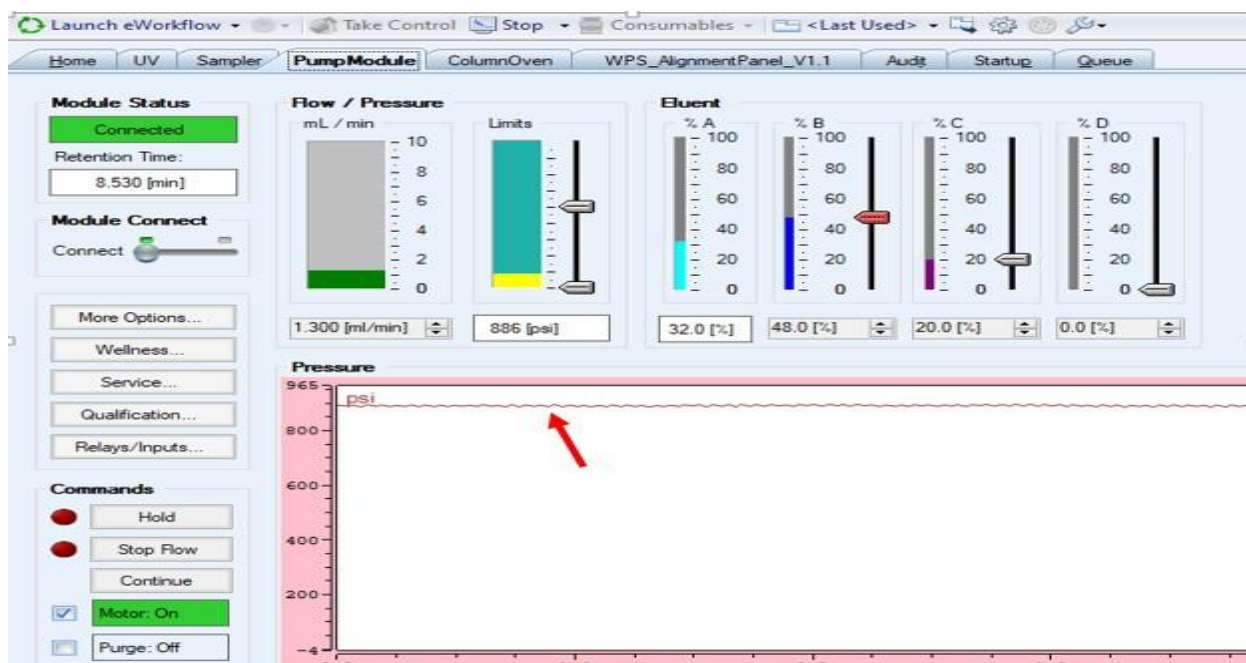
Figura 16

Procedimiento para tomar control del equipo

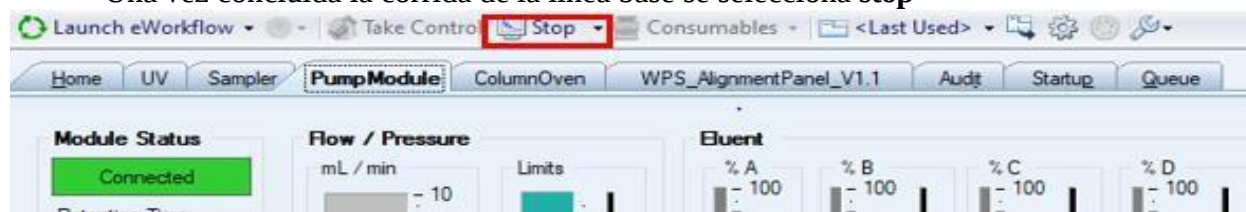




La línea base se corre aproximadamente 15 minutos y aparecerá como el siguiente cromatograma.



Una vez concluida la corrida de la línea base se selecciona **stop**

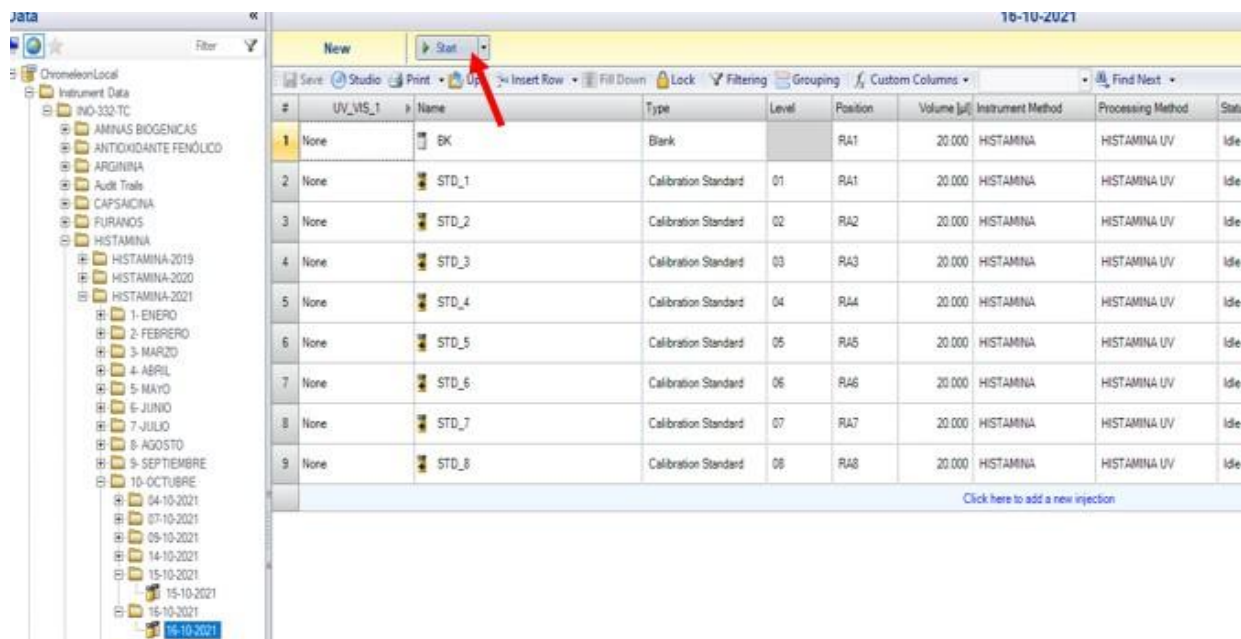


La figura 17 (paginas 43, 44 y 45) muestra el inicio del análisis, la adición de más lecturas y la muestra en secuencia

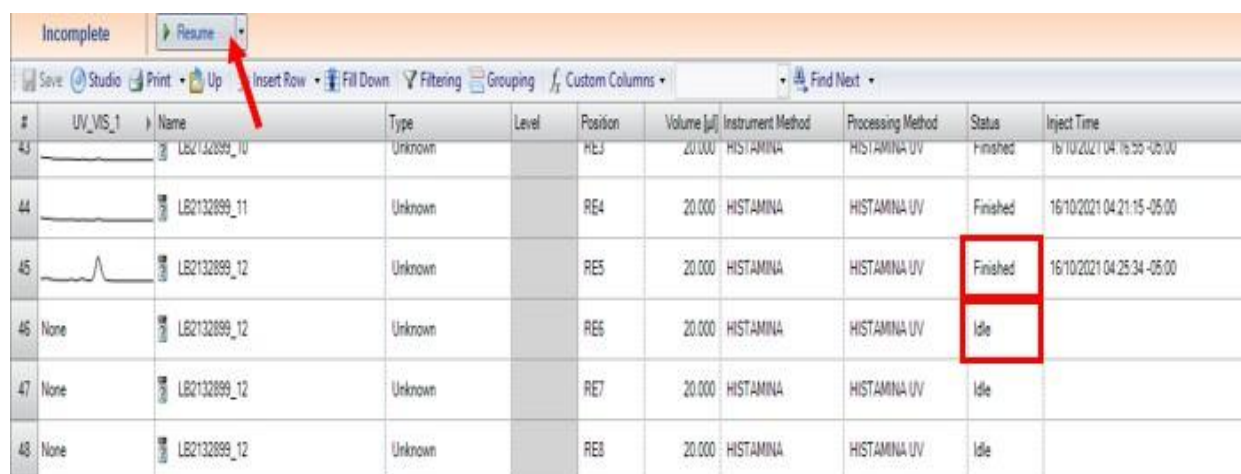
Figura 17

Inicio del análisis, adición de lecturas y muestras en secuencia

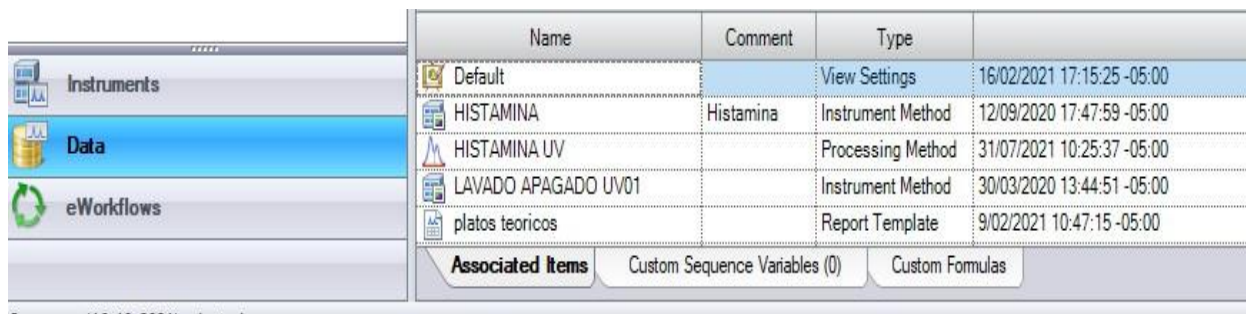
Para el inicio del análisis se hace clic en **Start /Stop Batch**



En el caso de tener corridas finalizadas y se quiere seguir adicionando más lecturas ya no sale Start sino Resume.



Cuando se va al icono **Data** se despliega una ventana con la secuencia cargada y se hace clic en **Start**



The screenshot shows the 'Instruments' tab on the left sidebar. The main window displays a table of associated items with the following data:

Name	Comment	Type	
Default		View Settings	16/02/2021 17:15:25 -05:00
HISTAMINA	Histamina	Instrument Method	12/09/2020 17:47:59 -05:00
HISTAMINA UV		Processing Method	31/07/2021 10:25:37 -05:00
LAVADO APAGADO UV01		Instrument Method	30/03/2020 13:44:51 -05:00
platos teoricos		Report Template	9/02/2021 10:47:15 -05:00

Below the table, there are tabs for 'Associated Items', 'Custom Sequence Variables (0)', and 'Custom Formulas'.

Below this, another screenshot shows a 'New' sequence setup. The 'Start' button is highlighted with a red box. The table below shows the sequence items:

#	UV_VIS_1	Name	Type	Level
1	None	BK	Blank	
2	None	STD_1	Calibration Standard	01
3	None	STD_2	Calibration Standard	02
4	None	STD_3	Calibration Standard	03
5	None	STD_4	Calibration Standard	04
6	None	STD_5	Calibration Standard	05
7	None	STD_6	Calibration Standard	06
8	None	STD_7	Calibration Standard	07
9	None	STD_8	Calibration Standard	08

Cuando la corrida de la secuencia comienza, el color verde nos indicara en que muestra está la secuencia

Running Stop									
Save Studio Print Up Insert Row Fill Down Lock Filtering Grouping Custom Columns Find Next									
#	UV_VIS_1	Name	Type	Level	Position	Volume [µl]	Instrument Method	Processing Method	Status
1	No Signal	BK	Blank		RA1	20.000	HISTAMINA	HISTAMINA UV	Running
2	None	STD_1	Calibration Standard	01	RA1	20.000	HISTAMINA	HISTAMINA UV	Idle
3	None	STD_2	Calibration Standard	02	RA2	20.000	HISTAMINA	HISTAMINA UV	Idle
4	None	STD_3	Calibration Standard	03	RA3	20.000	HISTAMINA	HISTAMINA UV	Idle
5	None	STD_4	Calibration Standard	04	RA4	20.000	HISTAMINA	HISTAMINA UV	Idle

d) Programa de lavado apagado

Para dejar la secuencia con lavado/apagado se va a la columna **Instrument Method** y en la corrida final se despliega las opciones y se selecciona el de **LAVADO/APAGADO** y se digita **LAVADO/APAGADO** en la última columna de **NAME** y se coloca un vial vacío con tapa en la ruleta correspondiente. Ejemplo en este caso el vial vacío iría en la posición **RB1**.

En la figura 18 que comprende las páginas 46 y 47, se muestra el procedimiento de lavado/apagado.

Figura 18.

Procedimiento de lavado apagado

#	UV_VIS_1	Name	Type	Level	Position	Volume [μl]	Instrument Method
1	None	BK	Blank		RA1	20.000	HISTAMINA
2	None	STD_1	Calibration Standard	01	RA1	20.000	HISTAMINA
3	None	STD_2	Calibration Standard	02	RA2	20.000	HISTAMINA
4	None	STD_3	Calibration Standard	03	RA3	20.000	HISTAMINA
5	None	STD_4	Calibration Standard	04	RA4	20.000	HISTAMINA
6	None	STD_5	Calibration Standard	05	RA5	20.000	HISTAMINA
7	None	STD_6	Calibration Standard	06	RA6	20.000	HISTAMINA
8	None	STD_7	Calibration Standard	07	RA7	20.000	HISTAMINA
9	None	STD_8	Calibration Standard	08	RA8	20.000	HISTAMINA
10	None	LAVADO/APAGADO	Calibration Standard	08	RB1	20.000	HISTAMINA

Create instrument method...
HISTAMINA
LAVADO APAGADO UV01

UV_VIS_1	Name	Type	Level	Position	Volume [μl]	Instrument Method	Processing Method	Status	Inject Ti
None	BK	Blank		RA1	20.000	HISTAMINA	HISTAMINA UV	Finished	16/10/2
No Signal	STD_1	Calibration Standard	01	RA1	20.000	HISTAMINA	HISTAMINA UV	Running	
None	STD_2	Calibration Standard	02	RA2	20.000	HISTAMINA	HISTAMINA UV	Idle	
None	STD_3	Calibration Standard	03	RA3	20.000	HISTAMINA	HISTAMINA UV	Idle	
None	STD_4	Calibration Standard	04	RA4	20.000	HISTAMINA	HISTAMINA UV	Idle	
None	STD_5	Calibration Standard	05	RA5	20.000	HISTAMINA	HISTAMINA UV	Idle	
None	STD_6	Calibration Standard	06	RA6	20.000	HISTAMINA	HISTAMINA UV	Idle	
None	STD_7	Calibration Standard	07	RA7	20.000	HISTAMINA	HISTAMINA UV	Idle	
None	STD_8	Calibration Standard	08	RA8	20.000	HISTAMINA	HISTAMINA UV	Idle	
None	LAVADO/APAGADO	Calibration Standard	08	RB1	20.000	LAVADO APAGADO UV01	HISTAMINA UV	Idle	

Después que termine de lavar la columna y el uso de equipo UHPLC, se deberá registrar en ANA-R el uso del equipo.

2.4.2 Método de ensayo para determinar histamina por HPLC en harina de pescado

El método tiene como objetivo establecer un documento que defina la metodología de ensayo de histamina en harina de pescado, el cual también tiene alcance a productos hidrobiológicos. (SGS del Perú SAC, 2016a)

Principio del método

La histamina es extraída con ácido tricloroacético y derivatizada con cloruro de dancilo a 55 °C. La separación cromatográfica se realiza en modo isocrático fase reversa Metanol: Agua: Acetonitrilo usando una columna C18.

Equipos utilizados

- Cromatógrafo Líquido de Alta Performance con detector UV/Visible
- Columna cromatográfica
- Guarda columna
- Balanza analítica con 1 mg de resolución
- Agitador de vaivén
- Centrifuga
- Estufa con termorregulador
- Sistema de filtración con bomba de vacío
- Baño ultrasonido

Reactivos y soluciones

- Histamina diclorhidrato con una pureza mínima de 98%
- Acetonitrilo grado HPLC
- Metanol grado HPLC
- Agua

- Acetona, grado reactivo
- Solución acuosa de ácido tricloroacético al 5% (TCA)
- Solución saturada de bicarbonato de sodio (10,3 g / 100 g). Preparación en Anexo A.
- Solución de cloruro de dancilo en acetona (0,4%). Preparación en Anexo B
- Solución metanol: agua, 60:40 (para lavado de sellos)

Procedimiento

a) Preparación de la muestra

La muestra de harina de pescado es preparada por el área de preparación de muestras orgánicas

b) Preparación del estándar

Solución stock de 1000 mg/l, pesamos 166 mg +/- 10 mg de histamina diclorhidrato con una precisión de 0,1 mg en matraz volumétrico de 100 ml, ver pureza del estándar en certificado, disolver con agua Tipo I y completar a volumen. Conservan a menos de 15 °C por un mes. El flujograma de la preparación se presenta en el Anexo C.

Soluciones de curva de calibración, a partir de la solución de 1000 mg/l tomamos alícuotas de 1, 2, 3, 5, 10 ml y aforamos a 100 ml con TCA al 5%, se obtiene concentraciones aproximadas de 10, 20, 30, 50 y 100 mg/ml; a partir del estándar de 100mg/ml tomar 1, 2 y 4 ml y aforamos a 100 ml con TCA al 5%, y se obtienen concentraciones aproximadas de 1, 2, 4 mg/l. que se muestra en la tabla 1. Conservar a menos de 15 °C por un mes. El flujograma de la preparación se presenta en el Anexo D.

Tabla 1*Preparación del stock y curva de calibración*

	Peso Estándar (mg)	Alícuota Stock (ml)	Alícuota ST-8 (ml)	Volumen (ml)	Concentración (ppm / mg/l)
STOCK	166			100	1002,385
ST-1			1	100	1,002
ST-2			2	100	2,005
ST-3			4	100	4,01
ST-4		1		100	10,024
ST-5		2		100	20,048
ST-6		3		100	30,072
ST-7		5		100	50,119
ST-8		10		100	100,238

Nota. SGS del Perú SAC (2016a)

Curva baja: 1 ppm a 10 ppm equivale en muestra de 50 a 500 ppm

Curva alta: 10 ppm a 100 ppm equivale en muestra de 500 a 5000 ppm

c) Procedimiento para harina de pescado

- Pesar alrededor de 0,2 g de harina de pescado con una precisión de 0,1 mg en un vial.
- Adicionar 10 ml de Ácido Tricloroacético (TCA) al 5 %
- Colocar los viales en el agitador a 400 rpm +/- 20 rpm por 24 minutos aproximadamente

(las muestras se pueden almacenar en refrigeración por 24 horas antes de la dancilación).

- Realizar la dancilación:
 - . Colocar 0,25 ml de solución bicarbonato de sodio saturado en tubos de vidrio.
 - . Agregar 0,5 ml de cada solución de la curva de calibración. En el caso de las muestras agregar 0,5 ml del sobrenadante, homogenizar manualmente.
 - . Por último, agregar 0,5 ml de solución cloruro de dancilo y homogenizar.
- Colocar la mezcla de reacción a 55 °C $\pm$ 5 °C por 1 hora aproximadamente en la estufa
- Enfriar los tubos a temperatura ambiente o en la refrigeradora
- Centrifugar por 6 minutos a 3000 rpm
- Filtrar el sobrenadante de las muestras y de la curva de calibración por el filtro de membrana 0,45 μ m a viales y recibir el filtrado en viales para autosampler
- Acondicionar el equipo HPLC y programar la secuencia según la instrucción operativa
- Colocar los viales al equipo HPLC e iniciar la programación
- Terminada la secuencia determinar la histamina mediante la curva de calibración.

d) Procedimiento para harinas de pescado mayores a 5000 ppm

Cuando las muestras son mayores a 5000 ppm se recomienda pesar 0,2 g de la muestra con una precisión de 0,1 mg, llevar a fiola de 50 ml, agregar 30 ml aproximadamente de TCA al 5% agitar en el shaker a 400 rpm por 24 minutos aproximadamente, enraizar con el mismo reactivo, homogenizar y esperar que sedimente la muestra. Realizar la dancilación y continuar con todo el procedimiento descrito en el ítem c)

e) Condiciones cromatográficas

- Detector UV/Visible: Longitud de onda 254 nm

- Columna cromatográfica: LiChroCART 30-4mm-Purospher STAR RP-18e (3um) o equivalente.
- Guarda columna: LiChroCART 4-4mm-Purospher STAR RP-18e (5um) o equivalente.
- Fase móvil: Acetonitrilo/Metanol/Agua (48:20:32). Filtrar antes de su uso.
- Volumen de inyección: 15 µl.
- Flujo: 1,0 a 1,5 ml/ min.

NOTA: Filtrar la fase móvil antes de su uso.

Cálculo de la concentración de histamina

El cálculo de la concentración de histamina en ppm (ug/g) en la muestra se obtiene despejando la lectura del área de la curva de calibración, usando regresión lineal como:

$$y = (Ax + B)$$

$$x = (y - B) / A$$

$$\text{Histamina (ppm)} = (x \cdot Fd)$$

Dónde:

x: Concentración de histamina en la muestra (ppm)

y: Área de la muestra.

A: Pendiente de la curva de calibración.

B: Intercepto de la curva de calibración.

Fd: Factor de dilución (volumen de dilución de la muestra/peso de muestra)

Aseguramiento de calidad en determinación de histamina

En la tabla 2 se presenta los criterios para verificar la calidad de los análisis

Tabla 2*Criterios de aseguramiento de calidad en determinación de histamina por HPLC*

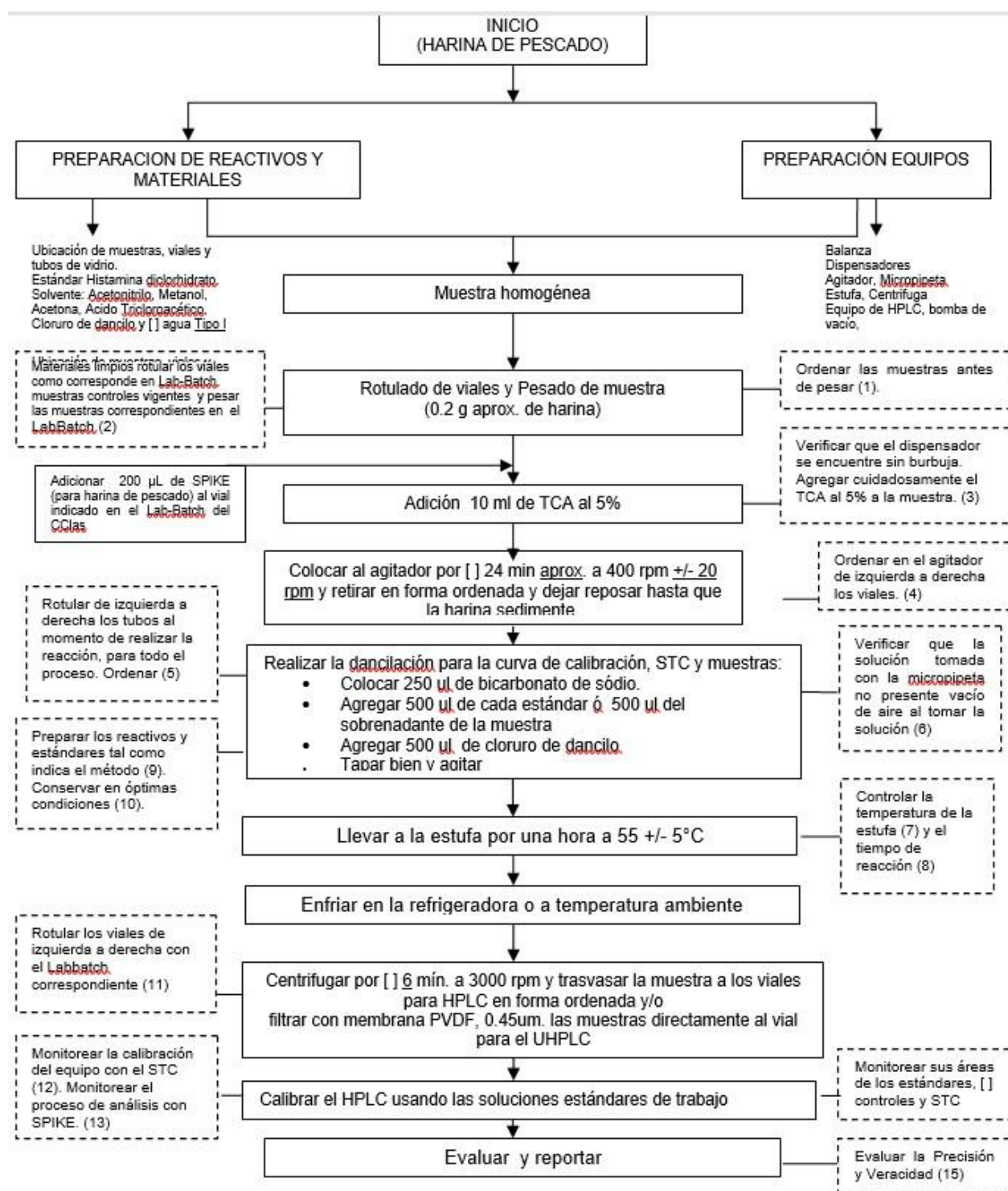
Producto	Nombre	Frecuencia	Monitoreo	Criterio de Aceptación
Harina de Pescado	Precisión: Repetibilidad	10% de las determinaciones en cada ensayo	DATA ENTRY/Status QC	< LRSDr
	Veracidad: Blancos de Proceso	1 Blanco cada batch de 40 determinaciones	Gráfica de Blancos	< LD
	Veracidad: Muestra Control (Histamina)	1 muestra control cada batch de 40 determinaciones (3 muestras control)	Gráfica de Muestra Control	< LRSDR
	Veracidad: Muestra fortificada (STD de Histamina)	1 muestra fortificada cada batch de 40 determinaciones o por mes	Gráfica de % de Recuperación	80% a 120%
	Veracidad: STC (Estándar control para la curva)	En cada batch de 40 determinaciones	Gráfica control STC	En el CCLAS

Nota. Los criterios para el aseguramiento de la calidad corresponden a la PRECISION y la VERACIDAD, la primera mediante el indicador de la REPETIBILIDAD, y la segunda con cuatro indicadores de VERACIDAD (Blancos de proceso, Muestra control de histamina, Muestra fortificada de histamina y Estándar control para la curva), tomado de SGS del Perú (2016a).

En la figura 19 se presenta el flujograma del método para la determinación de histamina mediante la HPLC.

Figura 19

Flujograma para determinar histamina en harina de pescado por HPLC



Nota. SGS del Perú SAC (2016a)

2.4.3 Registros en la determinación de histamina por HPLC en harina de pescado

En la tabla 3 se presenta el listado de registros necesarios en la determinación de histamina en harina de pescado.

Tabla 3

Registros necesarios en la determinación de histamina por HPLC

Nombre/Título	Que se registra	Frecuencia
Registro de verificación de flujo de bomba Perkin Elmer.	Tiempo que demora en enrasar la fiola, código del cronómetro y la fiola de 25 ml (INO-107-T).	Semanal
Verificación de flujo.	Tiempo que demora enrasar fiola, código cronómetro y fiola de 25 ml	Semanal
Registro de ingreso de columnas para HPLC.	Ingreso de columna nueva, activación, reactivación y observación	Cada vez que ingrese una columna nueva o sea necesario
Registro de uso de la columna para el HPLC.	Se registra el número de platos teóricos y resolución de las columnas	Para columna nueva, cada mil inyecciones o si es necesario
Verificación de la centrífuga.	Los rpm que marca tacómetro	Mensual
Verificación del agitador con plataforma digital.	Los rpm que marca tacómetro	Mensual
Estándares de histamina.	Peso del estándar del clorhidrato de histamina, con las concentraciones de los estándares de la curva de calibración, fecha de preparación y de vencimiento.	Mensual o cuando sea necesario
Estándar de histamina para adición estándar.	Peso del estándar del clorhidrato de histamina, con la concentración del Spike, fecha de preparación y de vencimiento.	Mensual o cuando sea necesario
Estándar de histamina STC.	Peso del estándar del clorhidrato de histamina, con la concentración del STC, fecha de preparación y de vencimiento	Mensual o cuando sea necesario
Control de proceso de histamina.	Se registra: Fecha del análisis, código equipo, código columna, tiempo de retención del analito, flujo de la fase móvil, presión de la bomba, proporción de la fase móvil, áreas de los estándares, curva de calibración (alta y baja), factor de correlación, número de inyecciones e iniciales del analista responsable	Diario

Nota. SGS del Perú, (2016b)

En la figura 20 (páginas 55 y 56) se muestra el Registro del Control de Procesos

Figura 20

Registro de Control de Procesos

Editar trabajo - VE1600527							
Navegar Cerrar Guardar Comando Instrumento Recoger Estatus							
E1							
	Type	Ident	E CONTROL_PROCESO_HIS EQUIPO NOUNIT dl (0)	F CONTROL_PROCESO_HIS FECHA NOUNIT dl (0)	G CONTROL_PROCESO_HIS NOMBRE COLUMNA NOUNIT dl (0)	H CONTROL_PROCESO_HIS RT MIN dl (0)	I CONTROL_PROCESO_HIS FLUJO ML/MIN dl (0)
1	UNK	VE1600527.001					
2	UNK	VE1600527.002	INO-277-T	02-05-2016	PUROSPHER STAR 42	1.84	1.3
3	UNK	VE1600527.003	INO-277-T	03-05-2016	PUROSPHER STAR 42	1.87	1.3
4	UNK	VE1600527.004	INO-277-T	04-05-2016	PUROSPHER STAR 42	1.84	1.3
5	UNK	VE1600527.005	INO-277-T	05-05-2016	PUROSPHER STAR 42	2.41	1.3
6	UNK	VE1600527.006	INO-277-T	06-05-2016	PUROSPHER STAR 42	1.8	1.3
7	UNK	VE1600527.007					
8	UNK	VE1600527.008					
9	UNK	VE1600527.009					
10	UNK	VE1600527.010					

Editar trabajo - VE1600527							
Navegar Cerrar Guardar Comando Instrumento Recoger Estatus							
E1							
	Type	Ident	J CONTROL_PROCESO_HIS PRESION PSI dl (0)	K CONTROL_PROCESO_HIS FM(ACN-MEDH-H2O) NOUNIT dl (0)	L CONTROL_PROCESO_HIS AREA_ST1 NOUNIT dl (0)	M CONTROL_PROCESO_HIS AREA_ST2 NOUNIT dl (0)	N CONTROL_PROCESO_HIS AREA_ST3 NOUNIT dl (0)
1	UNK	VE1600527.001					
2	UNK	VE1600527.002	945	48-20-32	755.8342	1791.4858	3362.7826
3	UNK	VE1600527.003					
4	UNK	VE1600527.004	975	48-20-32	855.69	1742.23	3475.78
5	UNK	VE1600527.005				1697	
6	UNK	VE1600527.006	985	48-20-32	857.09	1726.85	3459.02
7	UNK	VE1600527.007				1853.9	
8	UNK	VE1600527.008	870	48-20-32	37599	75073	145771
9	UNK	VE1600527.009			34684		
10	UNK	VE1600527.010		48-20-32	826.3375	1763.9271	3561.3039
11	UNK	VE1600527.011			939.5877	1682.2201	

Editar trabajo - VE1600527							
Navegar Cerrar Guardar Comando Instrumento Recoger Estatus							
E1							
	Type	Ident	O CONTROL_PROCESO_HIS AREA_ST4 NOUNIT dl (0)	P CONTROL_PROCESO_HIS AREA_ST5 NOUNIT dl (0)	Q CONTROL_PROCESO_HIS AREA_ST6 NOUNIT dl (0)	R CONTROL_PROCESO_HIS AREA_ST7 NOUNIT dl (0)	S CONTROL_PROCESO_HIS AREA_ST8 NOUNIT dl (0)
1	UNK	VE1600527.001					
2	UNK	VE1600527.002	8360.0223	18758.1456	29282.4018	46589.7609	93641.0905
3	UNK	VE1600527.003					
4	UNK	VE1600527.004	8970.92	17745.44	27359.65	45590.89	92787.93
5	UNK	VE1600527.005					
6	UNK	VE1600527.006	8685.63	16875.38	26603.27	45559.79	90969.7
7	UNK	VE1600527.007					
8	UNK	VE1600527.008	426924	884638	1386600	2381774	5009091
9	UNK	VE1600527.009					
10	UNK	VE1600527.010	8829.8107	18434.9136	29207.3604	51487.2934	103640.652

Editar trabajo - VE1600527							
Navegar Cerrar Guardar Comando Instrumento Recoger Estatus							
E1							
	Type	Ident	T CONTROL_PROCESO_HIS CV NOUNIT dl (0)	U CONTROL_PROCESO_HIS ANALISTA NOUNIT dl (0)	V CONTROL_PROCESO_HIS CONFORMIDAD NOUNIT dl (0)	W CONTROL_PROCESO_HIS NUMERO_INYECCIONES NOUNIT dl (0)	X CONTROL_PROCESO_HIS OBSERVACION NOUNIT dl (0)
1	UNK	VE1600527.001					
2	UNK	VE1600527.002	CB y = 835.47 x + 4.76	MN	C	43	CB: R2 = 0.9995
3	UNK	VE1600527.003	CA: y = 937.82 x - 83.927				CA: R2 = 0.9996
4	UNK	VE1600527.004	CB y = 908.1 x - 58.817	MN	C	72	CB: R2 = 0.9998
5	UNK	VE1600527.005	CA: y = 938.1 x - 454.56				CA: R2 = 0.9999
6	UNK	VE1600527.006	CB y = 874.92 x + 18.773	MN	C	10	CB: R2 = 0.9997
7	UNK	VE1600527.007	CA: y = 923.51 x - 575.45				CA: R2 = 0.9998
8	UNK	VE1600527.008	CB y = 43262 x - 8577.8	YB	C	89	CB: R2 = 0.9966

En la tabla 4 se describe el significado de cada columna del Registro de Control de Procesos presentado en la figura 20

Tabla 4

Significado de cada columna del Registro de Control de procesos de la figura 20

Columna	Nombre	Dato a ingresar
E	Equipo	Se ingresa el equipo utilizado
F	Fecha	Fecha
G	Nombre de la columna	El código de la columna utilizada
H	RT	El tiempo de retención del pico de histamina
I	Flujo ml/Min	El flujo utilizado
J	Presión PSI	La presión de la bomba del equipo utilizado
K	FM(ACN-MEOH-H ₂ O)	La proporción de la fase móvil utilizada
L	AREA_ST1	El área del estándar 1 de la curva de calibración
M	AREA_ST2	El área del estándar 2 de la curva de calibración
N	AREA_ST3	El área del estándar 3 de la curva de calibración
O	AREA_ST4	El área del estándar 4 de la curva de calibración
P	AREA_ST5	El área del estándar 5 de la curva de calibración
Q	AREA_ST6	El área del estándar 6 de la curva de calibración
R	AREA_ST7	El área del estándar 7 de la curva de calibración
S	AREA_ST8	El área del estándar 8 de la curva de calibración
T	CV	La ecuación de la curva de calibración baja y alta
U	Analista	El analista encargado de calibrar el equipo
V	Conformidad	Se escribe una C si es conforme o NC si no es conforme
W	Numero de inyecciones	El número de inyecciones del equipo durante todo el día.
X	Observación	Se coloca el R ² de las curvas de calibración tanto de la curva baja como de la curva alta; como también el cambio de la guarda columna o cualquier observación

Nota. SGS del Perú SAC, (2016b)

En la figura 21 se presenta el registro de preparación de estándares para la curva de histamina.

Figura 21

Registro de Preparación de Estándares para la Curva de Histamina

	A	B	C	D	E	F	G
1	ESTÁNDARES DE HISTAMINA						
2							
3	Datos del Estandar						
4	Código :	P-PRI-MR-2-10					
5	Marca :	FLUKA					
6	Lote :	BCBD3526Y					
7	Pureza :	100.2	%				
8	Fecha Venc.:	03/08/2017					
9							
10							
11	Preparacion del Stock y Standares de trabajo						
12							
13		Peso Estándar	Alic. Stock	Alic. ST-8	Vol.	CONCENTRACION	
14		(mg)	(mL)	(mL)	(mL)	ppm (mg/L)	
15	STOCK	166.4			100	1006.810	
16	ST-1			1	100	1.007	
17	ST-2			2	100	2.014	
18	ST-3			4	100	4.027	
19	ST-4		1		100	10.068	
20	ST-5		2		100	20.136	
21	ST-6		3		100	30.204	
22	ST-7		5		100	50.340	
23	ST-8		10		100	100.681	
24	SPIKE		10		100	100.681	
25							
26	Observación						
27	Los estándares preparados se guardan en la refrigeradora y protegidos de la luz.						
28							
29	Fecha de preparación:	01/10/2013					
30	Fecha de vencimiento:	01/11/2013					
31	Analista:	JR					
32	Como calcular la concentracion del volumen de spike adicionado a la muestra:						
33		CANTIDAD UL	VOLUMAN FINAL	10 M	FD	COM .FINAL	
34	ST ADICION	100.681	200	10	50	100.681	
35							
36							
37	D-INO-DR-37-01						

Nota. SGS del Perú SAC, (2016b)

En la figura 22 se presenta el registro de preparación de estándares para la curva de histamina.

Figura 22

Registro de Preparación del Estándar Control de la Curva de Histamina

	A	B	C	D	E	F	G
1	ESTÁNDARES DE HISTAMINA						
2	STC						
3	Datos del Estandar						
4	Código	: P-PRI-MR-2-STC-10					
5	Marca	: SIGMA					
6	Lote	: BCBG8381V					
7	Pureza	: 100		%			
8	Fecha Venc.	26/08/2014					
9							
10							
11	Preparacion del Stock y Standares de trabajo						
12							
13		Peso Estándar	Alic. Stock	Alic. ST-7	Vol.	CONCENTRACION	
14		(mg)	(mL)	(mL)	(mL)	ppm (mg/L)	
15	STOCK	167.7			100	1012.650	en Agua
16	ST-1	Pesar para obtener 1000 ppm		1	100	1.519	227.846 en TCA
17	ST-2			2	100	3.038	
18	ST-3			3	100	4.557	
19	ST-4		1		100	10.127	
20	ST-5		3		100	30.380	
21	ST-6		5		100	50.633	
22	ST-7		15		100	151.898	
23							
24	Observación						
25	Los estándares preparados se guardan en la refrigeradora y protegidos de la luz.						
26							
27	Fecha de preparación:	01/10/2013					
28	Fecha de vencimiento:	01/11/2013					
29	Analista:	JR					
30							

Nota. SGS del Perú SAC, (2016b)

2.5 Actividades realizadas en laboratorio

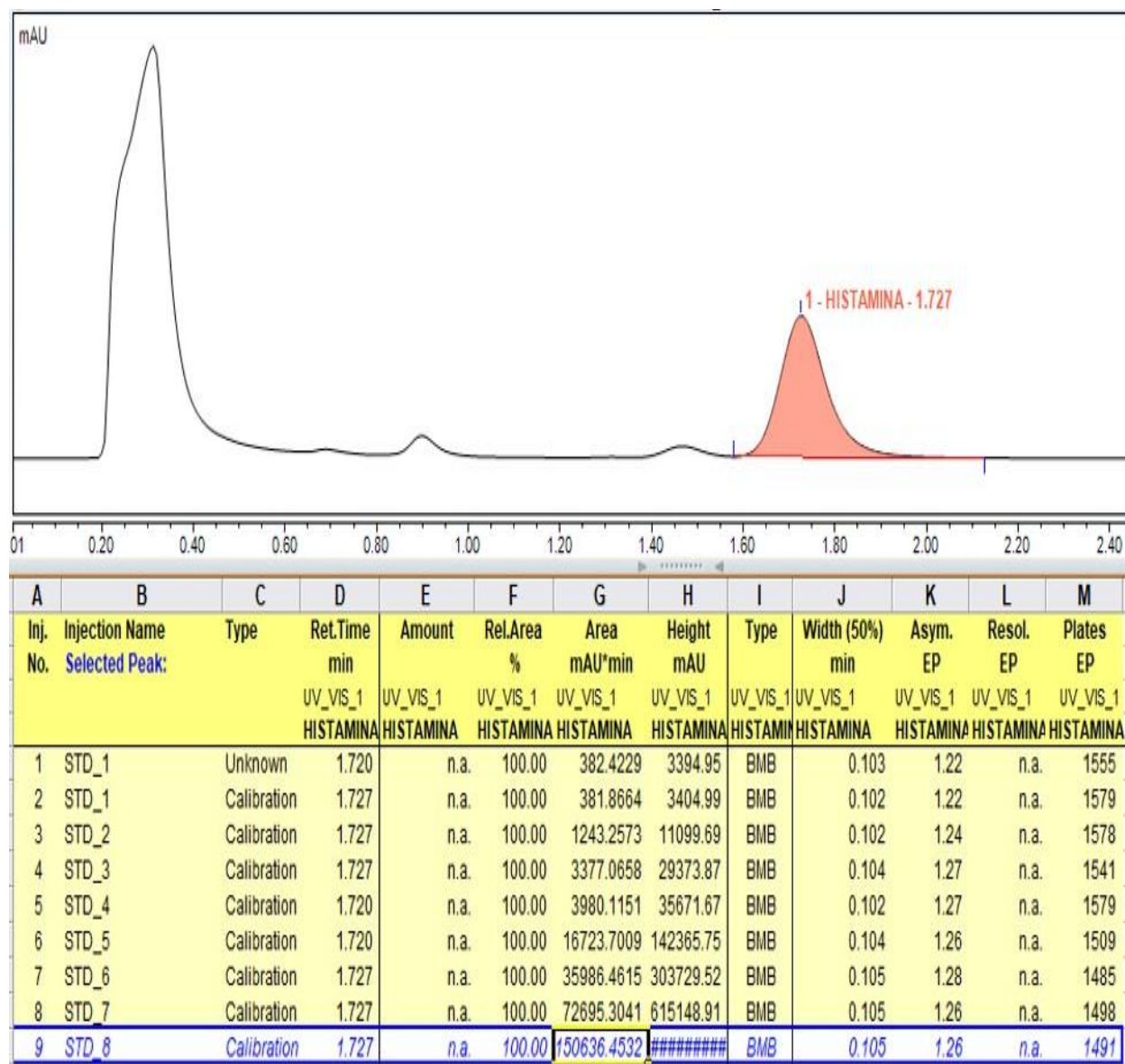
2.5.1 Cálculos para determinar histamina por HPLC en harina de pescado

La primera etapa de análisis corresponde al desarrollo de la curva de calibración, en la cual se determina gráficamente el Tiempo de Retención en minutos, cuyo valor se lee en el eje X.

En la figura 23 se presenta la curva de calibración de histamina por HPLC en la cual las unidades del eje X están en minutos y las unidades del eje Y están en (mAU); así mismo se presentan los valores de las áreas para los diferentes estándares de trabajo.

Figura 23.

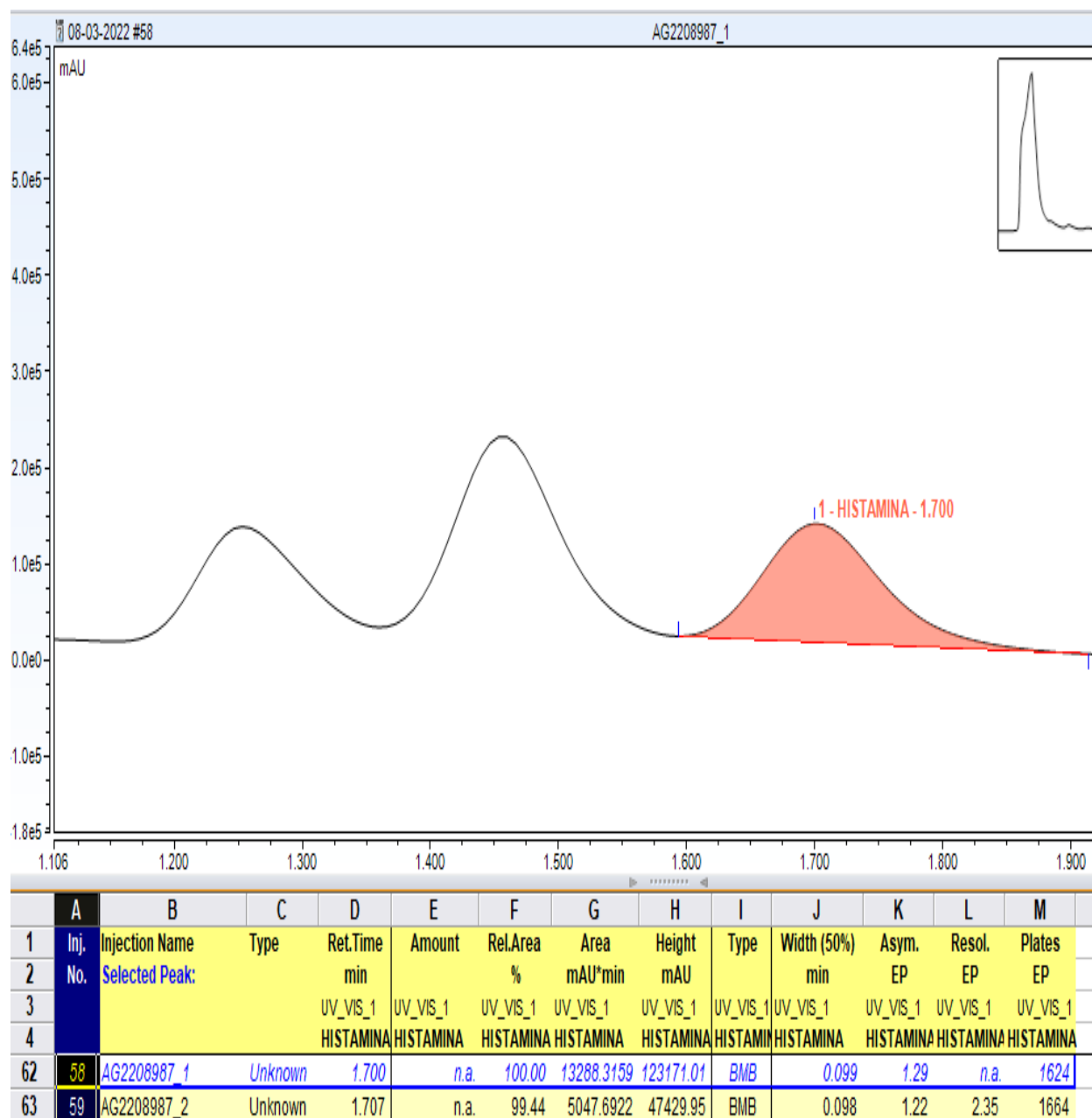
Curva de calibración y valores de áreas para estándares de histamina por HPLC



En la figura 24 se presenta la lectura de la curva de histamina por HPLC, así como las áreas de las muestras en análisis.

Figura 24

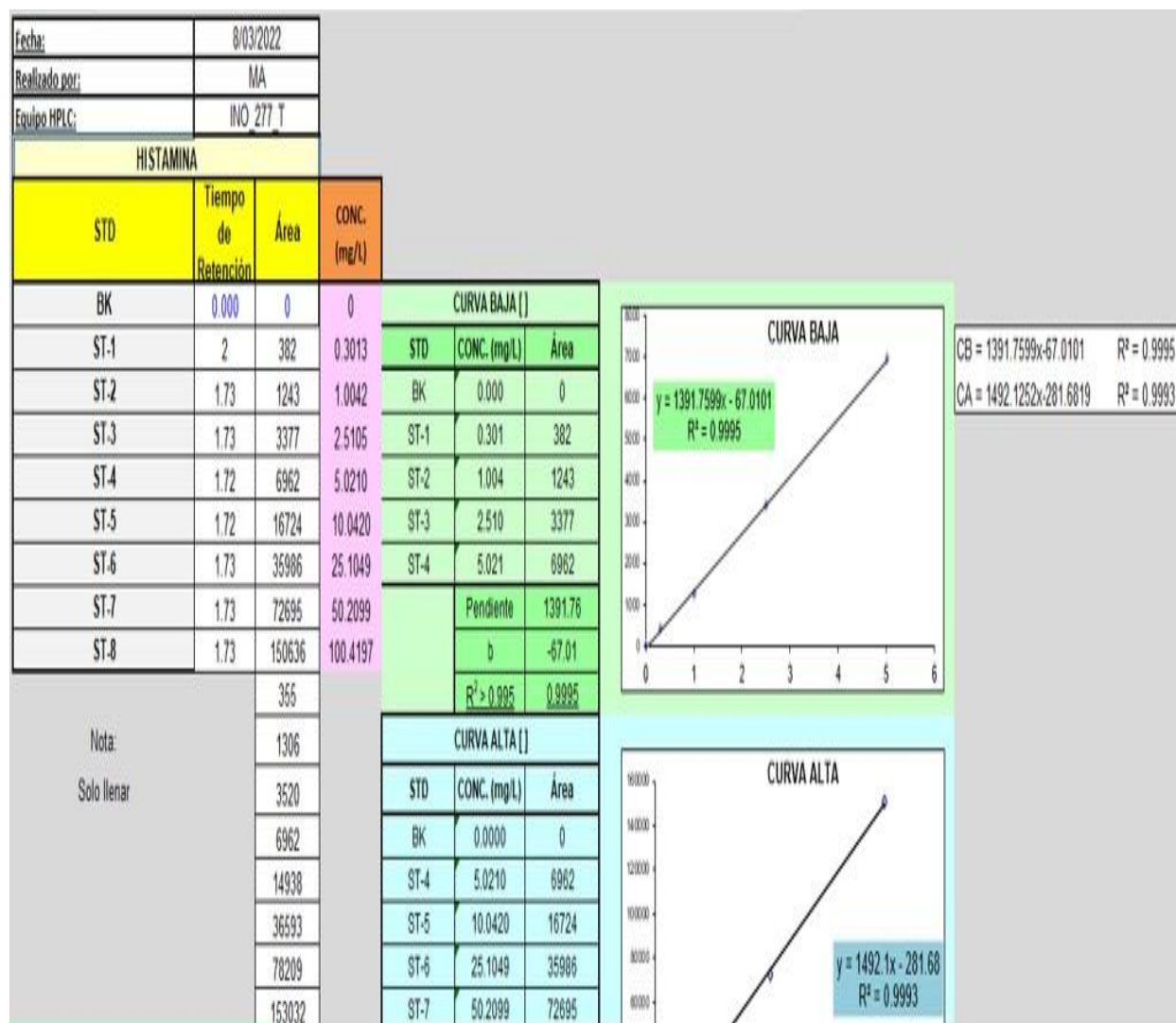
Curva de lectura y áreas de muestras en análisis de histamina por HPLC



En la figura 25 se presentan los registros de cálculo para la determinación de histamina, en base a los datos obtenidos en la curva de calibración, realizando análisis de regresión simple para la curva baja y alta, cuyos coeficientes se requieren para los cálculos.

Figura 25.

Registro de cálculos para la determinación de histamina por HPLC



Con la información obtenida de las curvas de lectura por HPLC y de la regresión simple desarrollada para la curva alta y baja se tienen los siguientes datos para los cálculos correspondientes a la muestra con código AG2208987:

a) RT: 1.70 min

b) Área: 13288

c) Cálculo de la concentración de histamina en la curva: $X = (Y - B) / A$

Donde:

$Y = \text{Área} = 13288$

$B = \text{Menor intercepto} = 281.68$

$A = \text{Pendiente} = 1492.13$

$X = (13288 - 281.68) / 1492.13$

$X = 9.09 \text{ mg/L}$

Cálculo de la histamina en PPM: $\text{Histamina (PPM)} = X * Fd$

$Fd = \text{Factor de dilución}$

Peso: 0.2034 g

Volumen: 10

$\text{Histamina (PPM)}: (9.09 * 10) / 0.2034$

$\text{Histamina (PPM)}: 447 \text{ mg/Kg}$

2.5.2 Informe de ensayo de histamina en harina de pescado

Los laboratorios de ensayo la empresa SGS del Perú SAC están acreditados por el Instituto Nacional de Calidad (INACAL) organismo de acreditación nacional.

Las solicitudes de ensayo lo realizan tanto personas jurídicas como naturales y los análisis se realizan con métodos validados que se indican en los respectivos informes emitidos por la empresa para ser entregado a los solicitantes.

En la figura 26 (páginas 64 y 65) se presenta el informe de un ensayo correspondiente a una empresa quien solicitó la determinación de histamina utilizando la HPLC.

Figura 26.

Informe de ensayo a muestra de harina de pescado

	LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL ORGANISMO DE ACREDITACIÓN INACAL – DA CON REGISTRO N° LE – 002																									
Registro N° LE - 002																										
Interno : AG2208987 Rev. 0																										
Página 1 de 3																										
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 20%;">Análisis solicitado por:</td> <td colspan="2">TECNOLOGICA DE ALIMENTOS S.A. JR. VITTORE SCARPAZZA CARPACCIO NRO. 250 URB. SAN BORJA NORTE (PISO 11- INTERIOR 1,2,3,4). SAN BORJA</td> </tr> <tr> <td>Solicitud de Ensayo:</td> <td>414222</td> <td>Cantidad Muestras: 2</td> </tr> <tr> <td>Producto descrito como:</td> <td>HARINA DE PESCADO</td> <td>Fecha de Recepción: 07/03/2022</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>Fecha de Ensayo: 07/03/2022</td> </tr> <tr> <td>Procedencia:</td> <td colspan="2">INSPECCIONADA Y MUESTREADA POR EL ORGANISMO DE INSPECCIÓN AUTORIZADO POR EL SANIPES (SGS DEL PERÚ A</td> </tr> <tr> <td>Observaciones Recep.:</td> <td colspan="2">En bolsa plástica transparente</td> </tr> <tr> <td>Fecha de Emisión:</td> <td colspan="2"></td> </tr> </table>			Análisis solicitado por:	TECNOLOGICA DE ALIMENTOS S.A. JR. VITTORE SCARPAZZA CARPACCIO NRO. 250 URB. SAN BORJA NORTE (PISO 11- INTERIOR 1,2,3,4). SAN BORJA		Solicitud de Ensayo:	414222	Cantidad Muestras: 2	Producto descrito como:	HARINA DE PESCADO	Fecha de Recepción: 07/03/2022			Fecha de Ensayo: 07/03/2022	Procedencia:	INSPECCIONADA Y MUESTREADA POR EL ORGANISMO DE INSPECCIÓN AUTORIZADO POR EL SANIPES (SGS DEL PERÚ A		Observaciones Recep.:	En bolsa plástica transparente		Fecha de Emisión:					
Análisis solicitado por:	TECNOLOGICA DE ALIMENTOS S.A. JR. VITTORE SCARPAZZA CARPACCIO NRO. 250 URB. SAN BORJA NORTE (PISO 11- INTERIOR 1,2,3,4). SAN BORJA																									
Solicitud de Ensayo:	414222	Cantidad Muestras: 2																								
Producto descrito como:	HARINA DE PESCADO	Fecha de Recepción: 07/03/2022																								
		Fecha de Ensayo: 07/03/2022																								
Procedencia:	INSPECCIONADA Y MUESTREADA POR EL ORGANISMO DE INSPECCIÓN AUTORIZADO POR EL SANIPES (SGS DEL PERÚ A																									
Observaciones Recep.:	En bolsa plástica transparente																									
Fecha de Emisión:																										
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <th style="text-align: left;">Ensayo</th> <th style="text-align: left;">Método</th> </tr> <tr> <td>Acidos Grasos Libres</td> <td>AOCS Ca 5a-40: 7th Ed. 2017 Free Fatty Acids (VALIDADO-Modificado-Aplicado fuera del alcance) 2016</td> </tr> <tr> <td>Control Muestras Etapas de Prep y/o Pulv</td> <td>Control Muestras Etapas de Preparacion y/o Pulverizado de muestras Harina de Pescado y Duversos</td> </tr> <tr> <td>Arena</td> <td>NTP 204.024: 1982(Revisada el 2020) HARINA DE PESCADO. Determinación de Arena</td> </tr> <tr> <td>Cenizas</td> <td>AOAC Official Method 942.05, 21st Ed. 2019 Ash of Animal Feed (VALIDADO - Modificado) 2016</td> </tr> <tr> <td>Nitrogeno Amoniacal</td> <td>NTP 201.032: 1982 (Revisada 2015) CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS. Determinación del contenido de nitrógeno amoniacal. (Validado) 2016</td> </tr> <tr> <td>Determinación de Etoxiquina</td> <td>AOAC Official Method 996.13, 21st Ed. 2019 Ethoxyquin in Feeds Liquid Chromatographic Method (VALIDADO - Modificado) - 2016</td> </tr> <tr> <td>Cloruro</td> <td>AOAC Official Method 976.18, 21st Ed. 2019./AOAC Official Method 971.27 21st Ed. 2019 Salt (chloride as Sodium Chloride) in Seafood - Potentiometric Method / Sodium Chloride in canned vegetables - Method III (Potentiometric Method). (VALIDADO - Modificado) - 2016</td> </tr> <tr> <td>Proteína</td> <td>AOAC Official Method 990.03, 21st Ed. 2019 Protein (Crude) in animal feed.</td> </tr> <tr> <td>Grasa</td> <td>AOCS Standard Procedure Am 1-92 Reapproved 2017 Oil, Moisture and Volatile Matter, and Protein by Near - Infrared Reflectance. (VALIDADO - Aplicado fuera del alcance) - 2016</td> </tr> <tr> <td>Histamina</td> <td>NCh 2637 Of. 2001 Productos hidrobiológicos. Determinación de histamina y otras aminas biógenas. Método HPLC con detector UV. (VALIDADO) - 2016</td> </tr> <tr> <td>Humedad</td> <td>AOCS Standard Procedure Am 1-92 Reapproved 2017 Oil, Moisture and Volatile Matter, and Protein by Near - Infrared Reflectance. (VALIDADO - Aplicado fuera del alcance) - 2016</td> </tr> </table>			Ensayo	Método	Acidos Grasos Libres	AOCS Ca 5a-40: 7th Ed. 2017 Free Fatty Acids (VALIDADO-Modificado-Aplicado fuera del alcance) 2016	Control Muestras Etapas de Prep y/o Pulv	Control Muestras Etapas de Preparacion y/o Pulverizado de muestras Harina de Pescado y Duversos	Arena	NTP 204.024: 1982(Revisada el 2020) HARINA DE PESCADO. Determinación de Arena	Cenizas	AOAC Official Method 942.05, 21st Ed. 2019 Ash of Animal Feed (VALIDADO - Modificado) 2016	Nitrogeno Amoniacal	NTP 201.032: 1982 (Revisada 2015) CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS. Determinación del contenido de nitrógeno amoniacal. (Validado) 2016	Determinación de Etoxiquina	AOAC Official Method 996.13, 21st Ed. 2019 Ethoxyquin in Feeds Liquid Chromatographic Method (VALIDADO - Modificado) - 2016	Cloruro	AOAC Official Method 976.18, 21st Ed. 2019./AOAC Official Method 971.27 21st Ed. 2019 Salt (chloride as Sodium Chloride) in Seafood - Potentiometric Method / Sodium Chloride in canned vegetables - Method III (Potentiometric Method). (VALIDADO - Modificado) - 2016	Proteína	AOAC Official Method 990.03, 21st Ed. 2019 Protein (Crude) in animal feed.	Grasa	AOCS Standard Procedure Am 1-92 Reapproved 2017 Oil, Moisture and Volatile Matter, and Protein by Near - Infrared Reflectance. (VALIDADO - Aplicado fuera del alcance) - 2016	Histamina	NCh 2637 Of. 2001 Productos hidrobiológicos. Determinación de histamina y otras aminas biógenas. Método HPLC con detector UV. (VALIDADO) - 2016	Humedad	AOCS Standard Procedure Am 1-92 Reapproved 2017 Oil, Moisture and Volatile Matter, and Protein by Near - Infrared Reflectance. (VALIDADO - Aplicado fuera del alcance) - 2016
Ensayo	Método																									
Acidos Grasos Libres	AOCS Ca 5a-40: 7th Ed. 2017 Free Fatty Acids (VALIDADO-Modificado-Aplicado fuera del alcance) 2016																									
Control Muestras Etapas de Prep y/o Pulv	Control Muestras Etapas de Preparacion y/o Pulverizado de muestras Harina de Pescado y Duversos																									
Arena	NTP 204.024: 1982(Revisada el 2020) HARINA DE PESCADO. Determinación de Arena																									
Cenizas	AOAC Official Method 942.05, 21st Ed. 2019 Ash of Animal Feed (VALIDADO - Modificado) 2016																									
Nitrogeno Amoniacal	NTP 201.032: 1982 (Revisada 2015) CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS. Determinación del contenido de nitrógeno amoniacal. (Validado) 2016																									
Determinación de Etoxiquina	AOAC Official Method 996.13, 21st Ed. 2019 Ethoxyquin in Feeds Liquid Chromatographic Method (VALIDADO - Modificado) - 2016																									
Cloruro	AOAC Official Method 976.18, 21st Ed. 2019./AOAC Official Method 971.27 21st Ed. 2019 Salt (chloride as Sodium Chloride) in Seafood - Potentiometric Method / Sodium Chloride in canned vegetables - Method III (Potentiometric Method). (VALIDADO - Modificado) - 2016																									
Proteína	AOAC Official Method 990.03, 21st Ed. 2019 Protein (Crude) in animal feed.																									
Grasa	AOCS Standard Procedure Am 1-92 Reapproved 2017 Oil, Moisture and Volatile Matter, and Protein by Near - Infrared Reflectance. (VALIDADO - Aplicado fuera del alcance) - 2016																									
Histamina	NCh 2637 Of. 2001 Productos hidrobiológicos. Determinación de histamina y otras aminas biógenas. Método HPLC con detector UV. (VALIDADO) - 2016																									
Humedad	AOCS Standard Procedure Am 1-92 Reapproved 2017 Oil, Moisture and Volatile Matter, and Protein by Near - Infrared Reflectance. (VALIDADO - Aplicado fuera del alcance) - 2016																									



LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL
ORGANISMO DE ACREDITACIÓN
INACAL – DA CON REGISTRO N° LE – 002



Interno : AG2208987 Rev. 0

Página 2 de 3

Resultados

Identificación de la muestra

Ensayo

L.D.

L.C.

AT2200130

AT2200135

Ensayo	L.D.	L.C.	AT2200130	AT2200135
Acidos Grasos Libres (como ácido oleico) (%)	-	0.80	9.51	7.80
*	-	-	AG2208987.001	AG2208987.002
* Arena (%)	-	0.04	Pend	Pend
Ceniza (%)	0.10	1.00	18.32	18.01
TBVN (mg/100g)	-	5.00	118.70	101.40
Etoxiquina (ppm)	2	7	679	710
Cloruro (%)	0.07	0.11	Pend	Pend
Proteína (%)	-	-	65.46	67.20
Grasa (%)	-	-	8.37	8.80
Histamina (ppm)	5.00	15.00	446.90	178.85
Humedad (%)	-	-	7.60	6.14

L.D. = Limite de Detección

L.C. = Limite de Cuantificación

UFC = Unidad Formadoras de colonias

(*) Los resultados obtenidos corresponden a métodos que no han sido acreditados por el INACAL-DA.

OBSERVACIONES:



LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL
ORGANISMO DE ACREDITACIÓN
INACAL – DA CON REGISTRO N° LE – 002



Interno : AG2208987 Rev. 0

Página 3 de 3

NOTAS:

* El tiempo de vigencia del presente informe es de 60 días calendario a partir de la fecha de emisión del informe de ensayo.

El informe que se presenta en la figura 26 corresponde a una solicitud de análisis para harina de pescado, para lo cual se cuenta con dos muestras. En la primera página (1 de 3) se listan los análisis realizados con su respectivo método utilizado, dentro de los cuales se encuentra la histamina y el método utilizado es por HPLC con detector UV (Validado) 2016. En la segunda página (2 de 3) se encuentran los resultados de los análisis solicitados dentro de los cuales se encuentra el de histamina cuyas unidades están en (ppm), además el Límite de Detección (L.D.) y el Límite de Cuantificación (L.C.). En la tercera página (3 de 3) indica la vigencia. Tomado de SGS del Perú SAC (2022c).

III. APORTES MAS DESTACABLES A LA EMPRESA

Durante el periodo de trabajo en la empresa SGS del Perú SAC, los aportes realizados más importantes son los siguientes:

En validación de métodos

a) Participación en la validación del Método NCh 2637 Of 2001 (Normativa Chilena 2637), Productos Hidrobiológicos. Determinación de histamina y otras aminas biógenas. Método HPLC con detector UV para los productos conserva de pescado, harina de pescado, pescado congelado, pescado fresco y semiconservas.

La validación del método implica realizar las siguientes pruebas:

- Pruebas en blanco del método
- Pruebas de límites de detección y cuantificación del método para los cinco productos.
- Pruebas de linealidad del método en el equipo HPLC con detector UV
- Pruebas de veracidad del método con materiales de referencia certificados
- Pruebas de precisión del método
- Pruebas de recuperación de estándares en las diversas matrices solicitadas (conserva de pescado, harina de pescado, pescado congelado, pescado fresco y semiconservas).
- Pruebas de selectividad con diferentes niveles de concentración e interferentes.
- Pruebas de robustez del método.
- Evaluación y cálculo de la incertidumbre del método.
- Elaboración de cartas estadísticas para los controles de calidad establecidos. (Blancos, patrones, duplicados, adicionados, duplicados de adicionados).

b) Participación en la validación del Método AOAC 996.13 Official Method, 21st Ed. 2016 (Validado - Modificado), Ethoxyquin in Feeds. Liquid Chromatographic Method, para el

producto harina de pescado.

La validación en el método implica realizar las siguientes pruebas:

- Pruebas de blancos del método
- Pruebas de límites de detección y del método cuantificación para los cinco productos.
- Pruebas de linealidad del método en el equipo HPLC con detector de fluorescencia,
- Pruebas de veracidad del método con materiales de referencia certificados
- Pruebas de precisión del método
- Pruebas de recuperación de estándares en las diversas matrices solicitadas (conserva de pescado, harina de pescado, pescado congelado, pescado fresco y semiconservas).
- Pruebas de selectividad del método en diferentes niveles de concentración e interferentes.
- Pruebas de robustez del método.
- Evaluación y cálculo de la incertidumbre del método.
- Elaboración de cartas estadísticas para los controles de calidad establecidos. (Blancos, patrones, duplicados, adicionados, duplicados de adicionados).

En auditorías para acreditación

a) Participación en auditoría del INACAL para la acreditación del Método NCh 2637 Of 2001 (Normativa Chilena 2637), Productos Hidrobiológicos. Determinación de histamina y otras aminas biógenas. Método HPLC con detector UV para los productos conserva de pescado, harina de pescado, pescado congelado, pescado fresco y semiconservas.

Para la acreditación del método en la auditoría ante el INACAL se requiere evidenciar y/o demostrar lo siguiente:

- Mostrar evidencia al auditor que se tiene competencia técnica para desarrollar el método.
- Demostrar con evidencias que se tiene competencia técnica para el manejo del equipo

HPLC con detector UV.

- Mostrar y explicar al auditor las pruebas realizadas para la validación (Limite, Precisión, Veracidad, Linealidad, Robustez, Selectividad, entre otros.).
- Realizar el ensayo y demostrar que se cumplen todos los controles de calidad para los diversos productos en que se está acreditando el método, y presentar las cartas de control obtenidas sin sesgo.
- Presentar el informe de ensayo (producto final) con todos los requisitos mínimos que solicita la NTP 17025, por ejemplo, Nombre del Cliente, Punto de Muestreo, Limite de Detección y Cuantificación, Fecha de Muestreo, Fecha de Inicio de Ensayo, Presentación de Controles de Calidad.

b) Participación en auditoria del INACAL para la acreditación del Método AOAC 996.13 Official Method, 21st Ed. 2016 (Validado - Modificado), Ethoxyquin in Feeds. Liquid Chromatographic Method, para el producto harina de pescado.

Para la acreditación del método en la auditoría ante el INACAL se requiere evidenciar y/o demostrar lo siguiente:

- Mostrar evidencia al auditor que se tiene competencia técnica para desarrollar el método.
- Demostrar con evidencias que se tiene competencia técnica para el manejo del equipo HPLC con detector de fluorescencia.
- Mostrar y explicar al auditor las pruebas realizadas para la validación (Limite, Precisión, Veracidad, Linealidad, Robustez, Selectividad, etc.).
- Realizar el ensayo y demostrar que se cumplen todos los controles de calidad para los productos que se está acreditando el método, y presentar cartas de control sin sesgo.
- Presentar el informe final con todos los requisitos mínimos que solicita la NTP 17025, por

ejemplo, Nombre del Cliente, Punto de Muestreo, Limite de Detección y cuantificación, Fecha de Muestreo, Fecha de Inicio de Ensayo, Presentación de Controles de Calidad.

IV. CONCLUSIONES

- La cromatografía es una técnica de análisis cualitativo y cuantitativo que obtiene resultados con mucha precisión y validez para diversos compuestos orgánicos e inorgánicos pudiendo detectar trazas de muchos elementos químicos.
- Una de las técnicas cromatografías es la Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) en la cual los analitos atraviesan una fase de medio líquida para luego ser identificados y cuantificados de acuerdo a la metodología establecida para cada caso.
- La histamina es un compuesto químico tóxico para la salud humana cuando sobrepasa los límites de tolerancia del cuerpo humano, por lo tanto, es necesario conocer su concentración en los alimentos o productos como la harina de pescado que se utiliza para la elaboración de alimento balanceado de animales.
- La determinación de la concentración de histamina en la harina de pescado se justifica por ser un indicador de la calidad sanitaria de la materia prima y/o del producto terminado, las harinas de pescado de calidad aceptable tienen una concentración de histamina menores a los 500 ppm, mientras que las harinas de pescado de baja calidad tienen concentraciones mayores a los 500 ppm, llegando en algunos casos a superar los 1000 ppm.
- La determinación de histamina por HPLC permite tener un alto grado de confianza en los resultados, y es por ello que actualmente las empresas productoras, así como las compradoras de harina de pescado, solicitan los valores de histamina sean determinados por HPLC.
- La experiencia preprofesional que se realiza luego de concluir los estudios universitarios es muy importante para conocer mejor las diferentes áreas de la especialidad, y de esa manera perfeccionarse en aquella que se tenga mayor capacidad o facilidades como el área de análisis orgánicos en productos pesqueros dentro del cual se encuentra la harina de pescado.

V. RECOMENDACIONES

- Los métodos de ensayo deben ser actualizados cada cierto periodo de tiempo o cuando exista un cambio significativo en las tecnologías conocidas, luego del cual deben pasar por un proceso de acreditación para alcanzar su validación para lo cual debe de intervenir el Instituto Nacional de Calidad (INACAL) como entidad acreditadora oficial.
- La universidad debe adquirir los equipos necesarios para realizar prácticas de laboratorio por HPLC de tal manera que los egresados que salen a trabajar a las empresas conozcan el método y los procedimientos de manejo del sistema.

VI. REFERENCIAS

- Albrecht, S. M. (2001). El pescado y la Histamina (escombrotoxina). *Infopesca Internacional*, 8, 10-26.
- Au, N. (1996). *Elaboracion de harina de pescado de alta calidad. Manual preparado especialmente para Esmital*. Ltda de Concepcion.
- Bliesner, J. (2006). *Validating Chromatography Methods - A Practical Guide*. Wiley Interscience.
<https://www.wiley.com/en-be/shop/general-chemistry/validating-chromatographic-methods-a-practical-guide-p-9780470042205>
- Cervantes, P. (4 de julio de 2009). *Digestion metabolismo de proteinas y aminoacidos*. Sildesharenat. <https://es.slideshare.net/Paulknew/digestion-metabolismo-de-proteinas-y-aminoacios>
- Crouch, R., Holler, J., & Skoog, A. (2008). *Principios de Analisis Instrumental*. Cengage Learning / Thomson Internacional.
- Datosperu.org. (2022). *SGS del Perú SAC*. Datosperuorg. <https://www.datosperu.org/empresa-sgs-del-peru-sac-20100114349.php#>
- Deinstrop, E. (2007). *Applied Thin- Layer Chromatography* (2nd ed.). Wiley-VCH.
- Dong, M. (2013). The essence of modern HPLC: advantage, limitations, fundamentals and opportunities. *LCGC North America*, 31(6), 472-479.
<https://doi.org/https://www.chromatographyonline.com/view/essence-modern-hplc-advantages-limitations-fundamentals-and-opportunities>

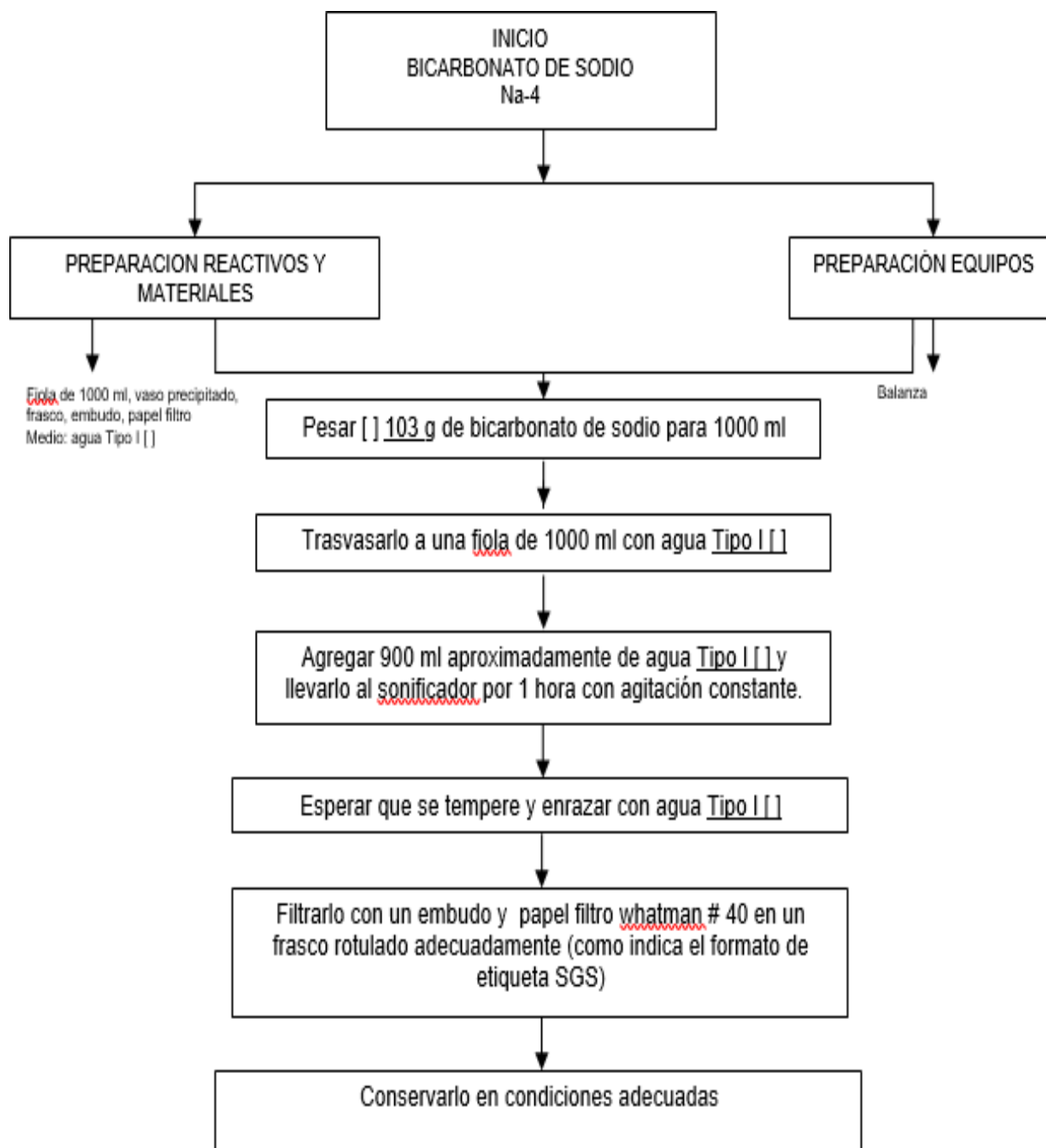
- Feng, C., Teuber, S., & Gershwin, E. (2015). Histamine (Scombroid) Fish Poisoning: a Comprehensive. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 50(1), 64-69.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12016-015-8467-x>
- Food and Drug Administration [FDA]. (2011). Scombrototoxin Histamine Formation. En *FDA Guidelines, Fish and Fishery Products Hazard and Controls Guidance* (pp. 118-149). FDA.
- Fried, B., & Sherma, J. (1999). *Thin-Layer Chromatography* (4th ed.). Marcel Dekker Inc.
- Gomez, C. (2016). *Determinación de los niveles de la Biotoxina histamina en la carne de pescado Dorado (Coryphaena Hippurus) de venta de tres mercados municipales de la ciudad de Guatemala*. [Tesis de pregrado, Universidad San Carlos de Guatemala] Repositorio USAC.
<http://www.repositorio.usac.edu.gt/id/eprint/1640>
- Instituto Nacional de Calidad [INACAL]. (2010). *Harina de pescado. Almacenamiento Norma Técnica Peruana NTP 2040391986*. Plataforma del Estado Peruano.
https://www.sanipes.gob.pe/documentos_sanipes/ds/2023/MATRIZ%20DE%20COMENTARIOS.pdf
- La Organización Internacional de la Harina y el Aceite de Pescado [IFFO]. (2008). *Alimento balanceado de calidad = alimento de calidad*. Organización de Ingredientes Marinos.
- Lancelotti, P. (2007). La cromatografía y su aplicación en alimentos. *La Alimentación Latinoamericana*, 36-38(270).
- Meyer, V. (2004). *Practical High Performance Liquid Chromatography* (4a ed.). Wiley.

- Rivera, M. (2020). *Determinacion de histamina en muestras de pescado perico (Ccryphaena hippurus) en la Empresa Pesquera Exalmar S.A Carquin 2028* [Tesis de Pregrado, Universidad Nacional Jose Fautino Sanchez Carrion]. Repositorio UNJFSC. <https://repositorio.unjfsc.edu.pe/handle/20.500.14067/4741>
- SGA del Perú SAC. (2021). *Organigrama del departamento de Organica*. <https://www.gob.pe/institucion/inacal/informes-publicaciones/2840292-173-sgs-del-peru-s-a-c>
- SGS del Perú. (2017). *Job Description Analista de Laboratorio*. SGS. <https://tsenta.com/jobs/sgs-analista-de-laboratorio-39fa9d39-1460-4d0c-b99d-f44dabbbdd329>
- SGS del Perú SAC. (2022). *Informe de ensayo a muestra de harina de pescado*. https://www.sanipes.gob.pe/archivos/entidades-apoyo/ensayo/SGS_Rev71.pdf
- SGS del Perú. (2016). *Metodo de ensayo. Determinación de histamina por HPLC enharina de pescado y productos hidrobiologicos*. <https://www.sanipes.gob.pe/archivos/entidades-apoyo/ensayo/Relacion-de-metodos-ALS-02-10-18.pdf>
- SGS del Perú. (2022). *Nuestra empresa SGS en Perú*. SGS en Perú: <https://www.sgs.pe/es-es/our-company/about-sgs/sgs-in-brief/sgs-in-peru>
- SGS del Perú SAC. (2022). *Acerca de SGS*. SGS en Resumen Nuestra historia: <https://www.sgs.pe/es-es/our-company/about-sgs/sgs-in-brief>
- Skoog, D., & Leary, J. (1994). *Analisis Instrumental*. Mc. Graw- Hill.
- Ssariglia, M., Soberon, J., Sampietro, M., & Vattuone, M. (2010). Cromatografia: Conceptos y aplicaciones . *Revista Arakuku*, 2(1), 1-6.

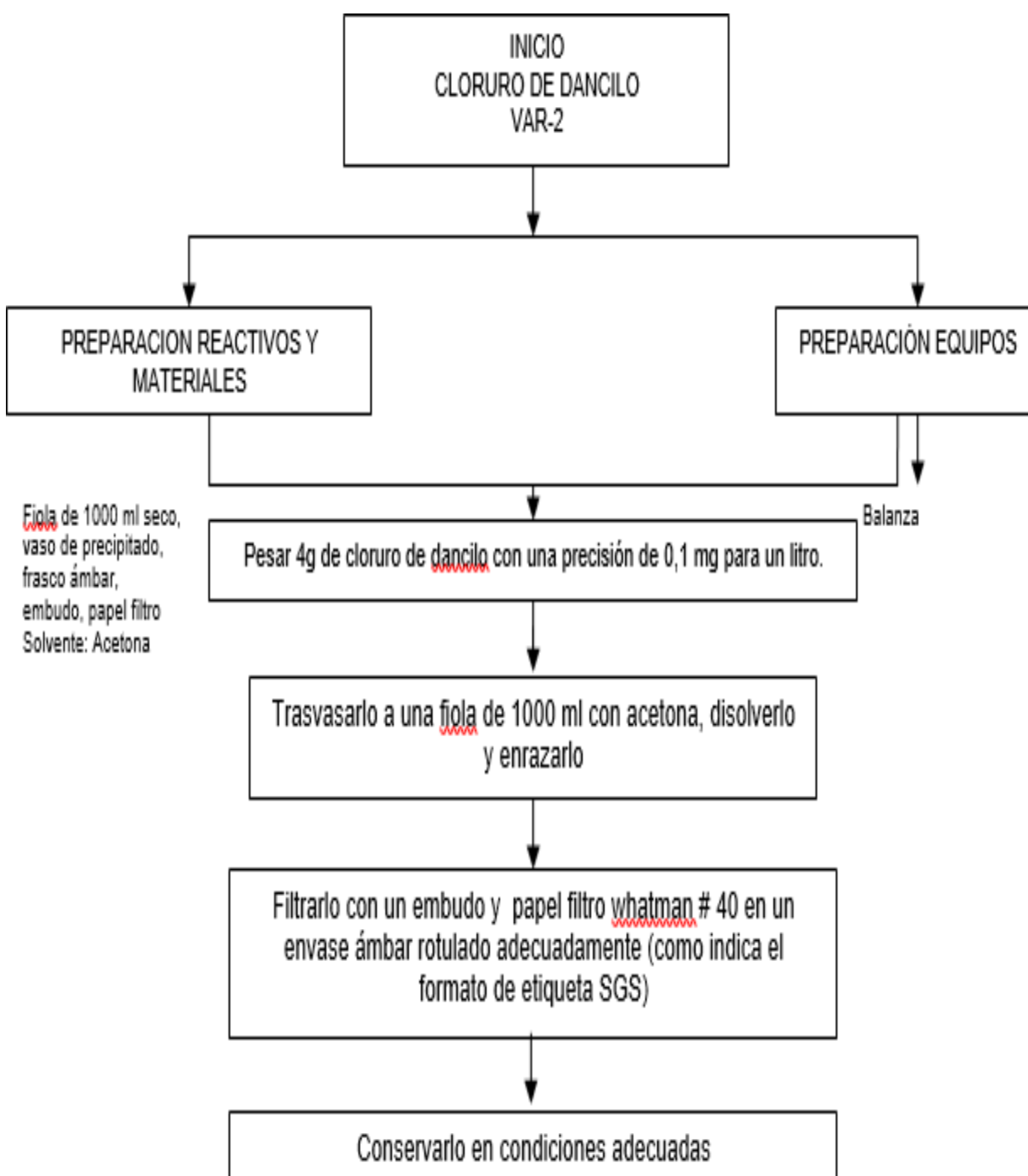
- Suarez, D., & Morales, Y. (2018). Principios basicos de la cromatografía liquida de alto rendimiento para la separación y analisis de mezclas. *Revsita Semilleros: Formacion Investigativa*, 4(1), 07-14. <http://hdl.handle.net/20.500.11839/7731>
- Thermo Fisher Scientific. (2013). Operating Instructions. Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 Series. https://documents.thermofisher.com/TFSAssets%2FSLSG%2Fmanuals%2F57747-UltiMate3000_TCC-3x00_OperatingInstructions_V1_2.pdf
- Villalobos, N. (2022). Determinación de histamina en pescado por cromatografía liquida con detección ultravioleta. [*Tesis de Pregrado*, Universidad Nacional de Costa Rica]. Repositorio UNA. <https://repositorio.una.ac.cr/bitstreams/7b9a6d7e-a8c2-4e07-8a46-91e9631fb029/download>
- Yeannes, M., & Casales, M. (1995). Influencia del proceso en el nivel de histamina en productos pesqueros. *Alimentaria: Revista de Tecnología e Higiene de los Alimentos* (262), 93-98.
- Zaldivar, J. (Noviembre de 1996). La cantidad de la harina de pescado y sus formas de control. *Revista Chile Pesquero* 95, 47-50.

VII. ANEXOS

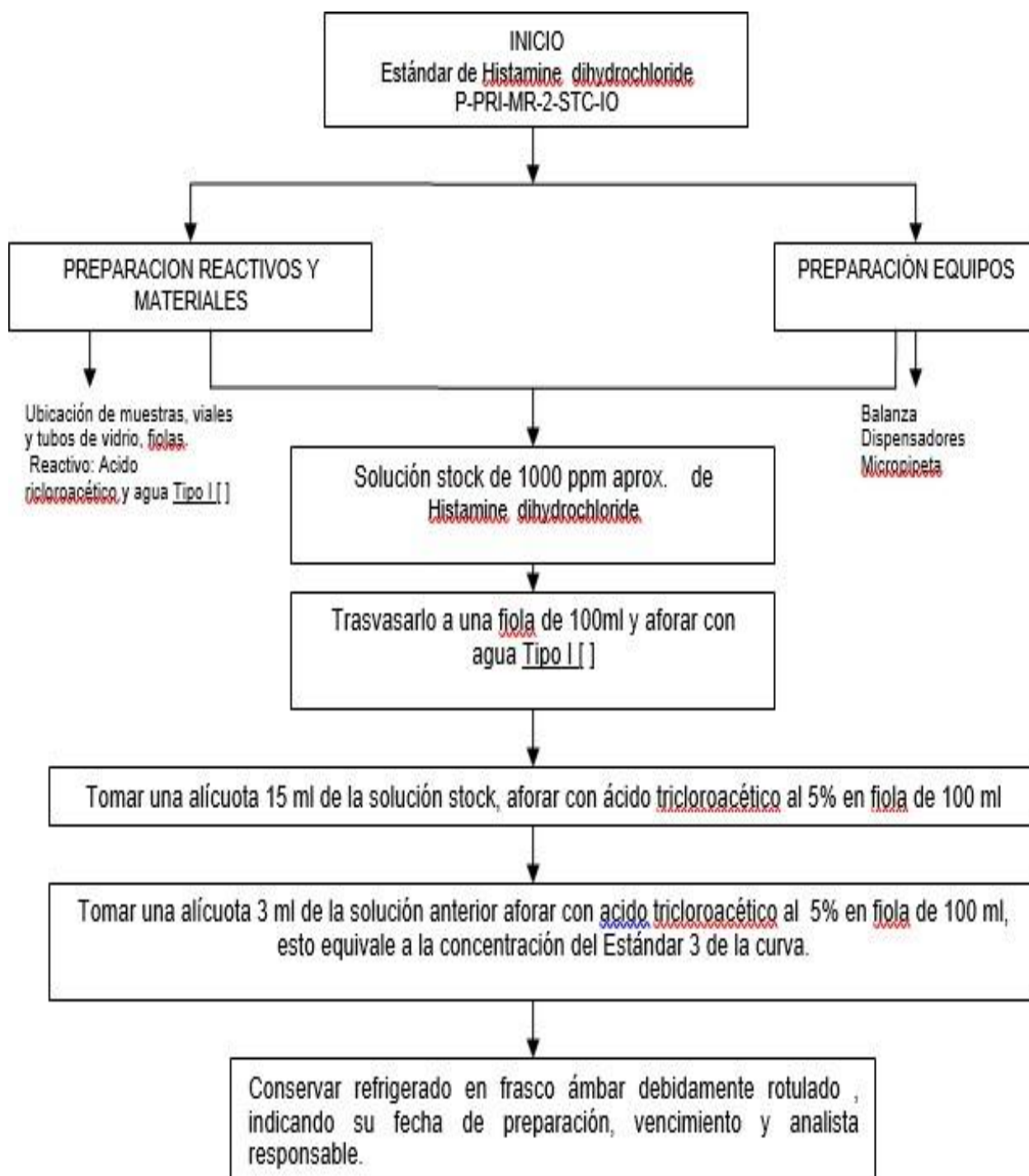
Anexo A. Preparación del bicarbonato de sodio



Anexo B. Preparación del cloruro de dancilo



Anexo C. Preparación del estándar de trabajo de control (STC)



Anexo D. Preparación de los estándares de la curva de calibración para harina de pescado

