

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS  
BIOLOGÍA



**VERIFICACIÓN DEL MÉTODO DE DETECCIÓN DE VENENO  
AMNÉSICO DE MOLUSCO (VAM) POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA  
DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECTOR DE ARREGLO DE DIODOS  
(HPLC-DAD)**

FRANCISCO JAVIER PEÑA VÁSQUEZ

HABILITACIÓN PROFESIONAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
BIÓLOGO

CONCEPCIÓN - CHILE

MARZO, 2022



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS  
BIOLOGÍA



**VERIFICACIÓN DEL MÉTODO DE DETECCIÓN DE VENENO AMNÉSICO DE  
MOLUSCO (VAM) POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON  
DETECTOR DE ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)**

Por

FRANCISCO JAVIER PEÑA VÁSQUEZ

Profesora tutora

DRA. ALLISSON ASTUYA VILLALÓN

Co-tutora

M. CS. ÁMBBAR ABALLAY GONZÁLEZ

HABILITACIÓN PROFESIONAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
BIÓLOGO

CONCEPCIÓN - CHILE

MARZO, 2022

**Universidad de Concepción**  
**Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas**

Esta Habilitación Profesional ha sido realizada en el Laboratorio de Biotoxinas UdeC, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción.

Profesora Tutora:

Dra. Allisson Astuya Villalón  
Laboratorio Biotoxinas UdeC  
Universidad de Concepción, Concepción

Co – Tutora

M. Cs. Ámbbar Aballay González  
Laboratorio Biotoxinas UdeC  
Universidad de Concepción, Concepción

Comisión Evaluadora:

M. Cs. Lorena Delgado R.  
Laboratorio de Biotoxinas  
Instituto de Salud Pública de Chile, Santiago

Dra. Claudia Pérez Manríquez  
Laboratorio de Química de Productos Naturales  
Universidad de Concepción, Concepción

Coordinador Habilitación Profesional:

Dr. Víctor Hernández Santander  
Departamento de Botánica  
Universidad de Concepción, Concepción

## DEDICATORIA

*A todos los estudiantes, pasados, presentes y futuros, que han luchado contra la adversidad: ambientes familiares hostiles, falta de dinero, enfermedades y ausencia de apoyo emocional*

*A ustedes les digo: no dejen que nadie juzgue su camino ni sus tiempos. Solo ustedes conocen las cargas que tiene que llevar.*

*A mi novia, Melissa Schulz, quien me dio la paz necesaria para terminar mi carrera, lejos de los tortuosos fantasmas del pasado.*

*A mis mascotas, Mr. Yango y Ámbar, quienes me han regalado su cariño, pelos y lamidos durante este proceso.*

*¡A todos ustedes va!*



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Mariela González Sierra, quien fue mi mentora en el área de microalgas y que me enseñó y guió con su cariño y entusiasmo durante algunos de los años más difíciles de mi pregrado. Agradezco a las profesionales de FICOLAB Ana Silvia Cifuentes, Ingrid Inostroza y María Dávila, con quienes aprendí mucho en FICOLAB. Agradezco al Dr. Víctor Hugo Ruiz y al Dr. Emmanuel Vega, con quienes trabajé como Ayudante e Instructor de Laboratorio en el curso Clasificación de los Seres Vivos. Agradezco a la curadora del herbario CONC, M. Cs. Alicia Marticorena, por su buena disposición para resolver mis dudas sobre plantas vasculares. Agradezco a mis amistades, compañeros y compañeras, que fueron importantes durante mi paso por el pregrado. Agradezco a la Tía Bárbara, de la Facultad de Farmacia, por sus consejos.

Agradezco a mi novia, Melissa Schulz, quien ha sido mi más importante apoyo desde 2019, y a quien me ayudó a independizarme. Eres mi infinita fuente de amor, paz y comprensión, todo lo que necesitaba para cerrar este ciclo.

Agradezco a la profesional Elizabeth Lara, por sugerirme escribir a la Dra. Allisson Astuya en búsqueda de opciones para terminar mi pregrado, y la Dra. Allisson Astuya, quien me dio la oportunidad de realizar mi Habilitación Profesional en el Laboratorio de Biotoxinas UdeC (LBTx UdeC). A la M. Cs. Lorena Delgado, quien me facilitó material bibliográfico y a la Dra. Viviana Ulloa, por sus correcciones.

Por último, agradezco a la M. Cs. Ámbbar Aballay, quien fue mi jefa directa durante esta Habilitación Profesional. Su buen humor, rigor científico, conocimientos profundos y manejo de la técnica de HPLC hicieron de este periodo una de mis mejores experiencias del pregrado.

Esta habilitación profesional fue financiada por FONDECYT 1200845 y COPAS COASTAL ANID FB210021.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

	<b>PÁGINA</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	9
<b>ÍNDICE DE FÓRMULAS</b>	10
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	11
<b>RESUMEN</b>	12
<b>ABSTRACT</b>	13
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	14
1.1 Inocuidad alimentaria	14
1.2 Biotoxinas marinas	15
1.3 Veneno Amnésico de Molusco (VAM)	18
1.3.1 Eventos de VAM	18
1.3.2 Ácido domoico (DA)	19
1.3.3 VAM en Chile	22
1.4 Validación de métodos en laboratorios acreditados	24
1.4.1 Selectividad	25
1.4.2 Linealidad	25
1.4.3 Límites de detección y cuantificación	26
1.4.4 Precisión	26
1.4.5 Veracidad	27
<b>2 OBJETIVOS</b>	29
<b>2.1 OBJETIVO GENERAL</b>	29

<b>2.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	29
<b>3</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	30
3.1	Soluciones	30
3.1.1	Solución extractante metanol:agua 50:50 v/v	31
3.1.2	Solución diluyente acetonitrilo:agua 1:9 v/v	31
3.1.3	Solución stock de ácido domoico 4,1 µg/mL	31
3.1.4	Solución stock de L-triptófano 1000 µg/mL	32
3.1.5	Solución mezcla de ácido domoico 2,0 µg/mL + triptófano 20 µg/mL	32
3.1.6	Solución ácido trifluoroacético 0,03% v/v	32
3.1.7	Solución fase móvil acetonitrilo:ácido trifluoroacético 0,03% 85:15 v/v	32
3.2	Muestras	33
3.3	Extractos de ácido domoico	33
3.4	Preparación del análisis	34
3.5	Condiciones cromatográficas	35
3.6	Análisis cromatográfico preliminar	36
3.7	Selectividad	36
3.7.1	Zona de elución del ácido domoico	36
3.7.2	Selectividad en matriz central	36
3.7.3	Selectividad en matriz complementaria 1	37
3.7.4	Selectividad en matriz complementaria 2	37
3.8	Linealidad	37
3.8.1	Puntos de la curva	37

3.8.2	Soluciones de la curva	38
3.8.3	Gráficos de dispersión	39
3.9	Límites	40
3.9.1	Límite crítico, límite de detección y cuantificación	40
3.10	Precisión	42
3.10.1	Fortificación a 1 LMP	42
3.10.2	Repetibilidad	43
3.10.3	Reproducibilidad	44
3.11	Veracidad	45
3.11.1	Sesgo	45
3.11.2	Recuperación en matriz central	46
3.11.3	Recuperación en matriz complementaria 1	48
3.11.4	Recuperación en matriz complementaria 2	48
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>50</b>
4.1	Análisis cromatográfico preliminar	50
4.2	Selectividad	50
4.3	Linealidad	51
4.4	Límites	52
4.5	Precisión	53
4.5.1	Repetibilidad	53
4.5.2	Reproducibilidad	53
4.6	Veracidad	53

4.6.1	Sesgo	53
4.6.2	Recuperación	54
4.7	Instructivo de detección de VAM	54
<b>5</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>55</b>
5.1	Selectividad	55
5.2	Linealidad y límites	57
5.3	Precisión	58
5.4	Veracidad	58
<b>6</b>	<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>61</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>PÁGINA</b>
<b>Figura 1</b> Representación de la relación entre FANs y la red trófica marina	17
<b>Figura 2</b> Representación del mecanismo de transferencia del ácido domoico a través de la red trófica marina	19
<b>Figura 3</b> Estructura química del ácido domoico	21
<b>Figura 4</b> Estructura química del aminoácido triptófano	22
<b>Figura 5</b> Distribución de los eventos VAM en Chile	23
<b>Figura 6</b> Cromatogramas a 242 nm de la mezcla ácido domoico 2 µg/mL + triptófano 20 µg/mL	50
<b>Figura 7</b> Cromatogramas a 242 nm del pool de selectividad de la matriz central cholga	51
<b>Figura 8</b> Curva de calibración N°1	51
<b>Figura 9</b> Relación entre el pH y el factor de capacidad (K') en la separación de los compuestos ácidos y básicos usando columnas C18	56

## ÍNDICE DE FÓRMULAS

		PÁGINA
<b>Fórmula 1</b>	Cálculo de la concentración teórica de los extractos de ácido domoico	38
<b>Fórmula 2</b>	Cálculo de la concentración de ácido domoico (DA) en las muestras de matriz central y complementarias	40
<b>Fórmula 3</b>	Cálculo del límite crítico (LC)	41
<b>Fórmula 4</b>	Cálculo del límite de detección (LOD)	41
<b>Fórmula 5</b>	Cálculo del límite de cuantificación (LOQ)	42
<b>Fórmula 6</b>	Criterio de aceptabilidad utilizado para la prueba de límites	42
<b>Fórmula 7</b>	Cálculo del coeficiente de variación porcentual (CV%)	43
<b>Fórmula 8</b>	Cálculo del coeficiente de variación Horwitz (CVh%)	44
<b>Fórmula 9</b>	Criterio de aceptabilidad utilizado en la prueba de repetibilidad	44
<b>Fórmula 10</b>	Criterio de aceptabilidad utilizado en la prueba de reproducibilidad	45
<b>Fórmula 11</b>	Cálculo del valor del sesgo (S)	46
<b>Fórmula 12</b>	Cálculo utilizado para obtener el valor t calculado ( <i>t calc</i> ) para sesgo	46
<b>Fórmula 13</b>	Cálculo utilizado para obtener el porcentaje de recuperación (%R)	47
<b>Fórmula 14</b>	Cálculo utilizado para obtener el valor t calculado ( <i>t calc</i> ) para recuperación	48

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>PÁGINA</b>
<b>Tabla 1</b>	Principales biotoxinas marinas 16
<b>Tabla 2</b>	Distribución global de las especies productoras de ácido domoico pertenecientes al género de diatomeas <i>Pseudo-nitzschia</i> 20
<b>Tabla 3</b>	Matrices utilizadas para realizar las extracciones de ácido domoico 33
<b>Tabla 4</b>	Módulos del cromatógrafo líquido Jasco 35
<b>Tabla 5</b>	Multiplicación del límite máximo permisible (LMP) del ácido domoico (DA) en moluscos por 5 factores 38
<b>Tabla 6</b>	Cálculo de la conversión de la unidad de concentración de ácido domoico (DA) en los distintos puntos de la curva 39
<b>Tabla 7</b>	Volúmenes de estándar de ácido domoico (DA) 103,3 µg/mL y solución diluyente acetonitrilo:agua 1:9 v/v usados para preparar 500 µL de solución a las concentraciones requeridas para cada punto de la curva 41
<b>Tabla 8</b>	Volúmenes de estándar de ácido domoico (DA) 103,3 µg/mL y de extractos usados para preparar 500 µL de fortificado a las concentraciones requeridas (0,5 LMP, 1 LMP y 2 LMP) 47
<b>Tabla 9</b>	Valores de las pendientes (m), intersección (b) y coeficientes de correlación (r) obtenidos en las 3 curvas de calibración 52
<b>Tabla 10</b>	Valores del límite crítico (LC), límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) calculados 52
<b>Tabla 11</b>	Resumen de los resultados de recuperación en las matrices estudiadas 54



## RESUMEN

El ácido domoico, biotoxina marina producida por diatomeas del género *Pseudonitzschia* sp., es el principal componente del veneno amnésico de molusco (VAM). Esta biotoxina suele acumularse en los tejidos blandos de moluscos bivalvos, constituyendo un peligro para la inocuidad de los alimentos. El método más utilizado para su detección es la cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). En esta habilitación profesional esta técnica fue verificada en el Laboratorio de Biotoxinas UdeC (LBTx UdeC), evaluando su selectividad, linealidad, límites, precisión y exactitud. Se discuten los resultados de los informe con bibliografía sobre validación y verificación de métodos. Se concluye que el LBTx UdeC aplica correctamente la técnica en su entorno de trabajo, y que está preparado para prestar apoyo a las Secretarías Regionales Ministeriales de Salud o empresas productoras de moluscos bivalvos en el caso de eventos de VAM en Chile.

## **ABSTRACT**

The domoic acid, a marine biotoxin produced by diatoms of the genus *Pseudonitzschia* sp., it is the main component of amnesic shellfish poisoning (ASP). This biotoxin usually accumulates in the soft tissues of bivalve mollusks, constituting a food safety hazard. The most widely used method for its detection is high performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD). In this professional qualification, this analytical technique was verified in the UdeC Biotoxins Laboratory (LBTx UdeC), evaluating the selectivity, linearity, limits, precision, and accuracy. The results of the reports are discussed with bibliography about method validation and verification. It is concluded that the LBTx UdeC correctly applies the technique in its work environment, and that is prepared to support to the Regional Ministerial Secretaries of Health or companies that produce bivalve mollusks, in case of VAM's events in Chile.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Inocuidad alimentaria

La inocuidad de los alimentos es un aspecto cada vez más relevante en la industria alimentaria a nivel mundial. Ejemplo de ello son las normas internacionales ISO 22000, IFS Food y BRC Food, que buscan regular los sistemas de gestión para la inocuidad alimentaria en empresas dedicadas al comercio internacional (Gil, 2019). Hoy, las empresas deben garantizar que sus productos son inocuos y que no representan ningún peligro para el consumidor.

Uno de los sistemas más usados por estas normas es el HACCP (análisis de peligros y control de puntos críticos). En este se reconocen tres tipos de peligros asociados a la producción de alimentos.

1. **Biológicos:** agentes patógenos presentes de forma natural o adquirida en los alimentos, y que corresponden principalmente a bacterias, virus y endoparásitos.
2. **Físicos:** vidrios, metales, madera y plásticos, que llegan de forma accidental o intencional a los alimentos a lo largo de la cadena de productiva.
3. **Químicos:** micotoxinas, biotoxinas marinas, químicos de limpieza, pesticidas, residuos veterinarios, alérgenos, entre otros.

De estos tres peligros, los químicos son tal vez los menos comprendidos y valorados por la industria alimentaria. Mientras que generalmente existe mayor disponibilidad de microbiólogos y expertos en contaminación física, los profesionales especialistas en toxicología son escasos. Esto conlleva a que los peligros químicos sean una de las áreas más descuidadas dentro de un sistema HACCP (Martimore & Wallace, 2013).

## 1.2 Biotoxinas marinas

Los productos del mar son alimentos con un alto valor nutricional y económico. Sin embargo, presentan a la vez un peligro potencial para el consumidor, ya que pueden acumular químicos capaces de causar daños a la salud (Morabito et al., 2018). Algunas de estas sustancias son producidas por microalgas (principalmente dinoflagelados y diatomeas) (ver Tabla 1) y son llamadas biotoxinas marinas (Visciano et al., 2016).

Las mayoría de las biotoxinas marinas son metabolitos secundarios de las microalgas (Ianora et al., 2011; Morabito et al., 2018). Dependiendo del criterio utilizado, han sido clasificadas bajo tres criterios (Visciano et al., 2016):

1. Según su solubilidad, en hidrofílicas y lipofílicas.
2. Según los síntomas de intoxicación que producen, en veneno paralítico de molusco (VPM), veneno diarreico de molusco (VDM), veneno amnésico de molusco (VAM), veneno neurotóxico de molusco (VNM) y veneno de pez ciguatera (VPC).
3. Según su estructura química, en azaspirácidos (AZA), brevetoxinas (BTX), iminas cíclicas (CI), ácido domoico (DA), ácido okadaico (OA), pectenotoxinas (PTX), saxitoxinas (STX) y yesotoxinas (YTX).

Su implicancia en eventos de intoxicación en humanos y/o fauna marina se relaciona con el consumo de alimentos contaminados y la ocurrencia de floraciones algales nocivas (FANs) (Ben-Gigirey et al., 2021). Al aumentar la densidad de microalgas tóxicas, aumenta la concentración de biotoxinas en el agua (Grattan et al., 2016). A través de las redes tróficas, los consumidores primarios acumulan biotoxinas, actuando como vectores al transferirlas a niveles tróficos superiores (Turner et al., 2021; ver Figura 1). Los moluscos bivalvos han sido identificados como los principales vectores de biotoxinas, ya que su alimentación filtradora les permite acumular altas concentraciones de biotoxinas en sus tejidos (Neves et al., 2021).

**Tabla 1.** Principales biotoxinas marinas. Se muestran sus nombres, grupos, especies y/o géneros de microalgas asociados a su origen y síntomas que producen. VPM corresponde a veneno paralizante de molusco, VAM a veneno amnésico de molusco, VDM a veneno diarreico de molusco, VNM a veneno neurotóxico de molusco y VPC a veneno del pez ciguatera. Traducido y modificado de Visciano et al. (2016).

<b>Biotoxina</b>	<b>Grupo</b>	<b>Origen</b>	<b>Síntomas</b>
Saxitoxina	VPM	<i>Alexandrium</i> spp. <i>Gymnodinium catenatum</i> <i>Pyrodinium bahamense</i>	Gastrointestinales Parálisis Recuperación o muerte
Ácido domoico	VAM	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	Gastrointestinal Neurológico Problemas cardiacos y respiratorios. Recuperación o muerte
Ácido Okadaico Pectenotoxina Yesotoxina Azasparácido	VDM	<i>Prorocentrum lima</i> <i>Dinophysis</i> spp. <i>Protoceratium reticulatum</i> <i>Lingulodinium polyedrum</i> <i>Gonyaulax spinifera</i> <i>Amphidoma languida</i> <i>Azadinium spinosum</i>	Gastrointestinales
Brevetoxina	VNM	<i>Karenia brevis</i>	Gastrointestinales y neurológicos Problemas respiratorios Recuperación o muerte
Ciguatoxina	VPC	<i>Gambierdiscus</i> spp.	Gastrointestinales Problemas neurológicos y cardiovasculares



**Figura 1.** Representación de la relación entre FANs y la red trófica marina. Extraído de Turner et al. (2021).

Situaciones como lo descrito son cada vez más comunes debido el aumento de la frecuencia, intensidad y rango geográfico de las FANs, como consecuencia del cambio climático, contaminación, eutrofización y actividades de la acuicultura (Glober 2020; Morabito et al., 2018; Smith et al., 2018).

Por otra parte, el tratamiento de las intoxicaciones por biotoxinas es limitado. Actualmente no existen antídotos ni test rápidos para su detección en los servicios de salud (Grattan et al., 2016). Sólo el monitoreo preventivo de las FANs y de las concentraciones de biotoxinas en los

alimentos ha demostrado ser una medida eficaz para evitar las intoxicaciones. El recuento de microalgas (Morabito et al., 2018), el bioensayo de ratón (Stewart & McLeod 2014) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Visciano et al., 2016) se encuentran entre las técnicas más usadas. De ahí la importancia de contar con equipos humanos, técnicas de laboratorio e instrumentos confiables, sensibles, precisos y exactos para la detección de las biotoxinas (Pérez 2002).

Considerando la relevancia económica y alimenticia de los bivalvos, el aumento de las FANs, el cambio climático, los limitados métodos de detección y la ausencia de tratamientos médicos específicos, se puede aseverar que las biotoxinas son un problema de salud pública mundial.

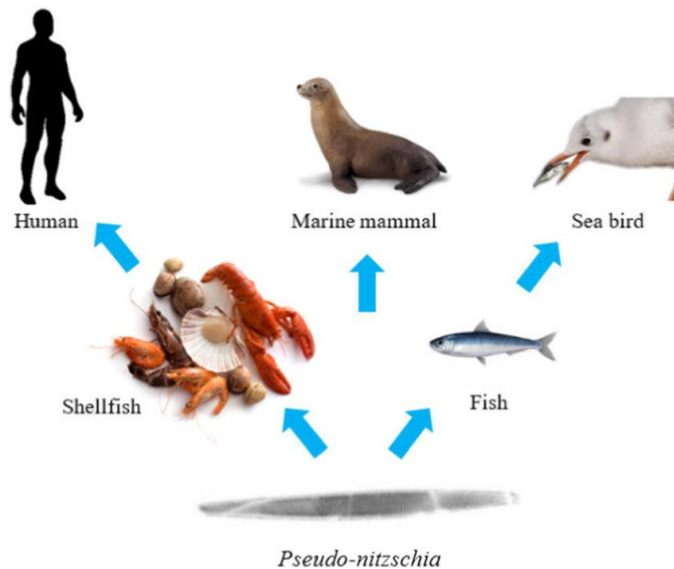
### **1.3 Veneno Amnésico de Molusco (VAM)**

#### **1.3.1 Eventos de VAM**

En Canadá, isla Prince Edward, 1987, se produjo el primer caso de intoxicación masiva de humanos por veneno amnésico de molusco (VAM), en el que se vieron afectadas al menos 150 personas (FAO 2005). Ellas presentaron síntomas gastrointestinales, pérdida de la memoria y desorientación, además de un caso de crisis epiléptica y cuatro muertes (La Barre et al., 2014). Estudios posteriores identificaron como agentes responsables al ácido domoico y a sus isómeros producidos principalmente por diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* (Visciano et al., 2016). El incidente hizo que Canadá estableciera como límite regulatorio del ácido domoico los 20 µg/g de carne de molusco, medida que ha sido replicada por otros países y organismos reguladores incluyendo a Chile (FAO, 2005; Ministerio de Salud, 1997; Pulido 2008; SERNAPESCA, 2020).

Además de este evento se han registrado intoxicaciones de aves (Ben-Gigirey et al., 2021; Gible et al., 2021) y leones marinos en Norteamérica entre 2003 y 2018 (Bargu et al., 2011; Smith et al., 2018), en ambos casos involucrando la ingesta de alimentos contaminados

(principalmente peces) y floraciones de *Pseudo-nitzschia* sp. Si bien los peces no sufren síntomas de intoxicación, es conocido que actúan como importantes vectores para aves y mamíferos marinos, dado que pueden acumular y transmitir altas concentraciones de ácido domoico (Lefebvre et al., 2012).



**Figura 2.** Representación del mecanismo de transferencia del ácido domoico a través de la red trófica marina. Extraído de Saeed et al. (2017).

Sin duda, considerando la distribución mundial de las especies del género *Pseudo-nitzschia* (ver Tabla 2) y los acontecimientos expuestos, el VAM representa un peligro para la inocuidad de los productos del mar y para vida salvaje (Pulido 2008; ver Figura 2)

### . 1.3.2 Ácido domoico (DA).

El ácido domoico fue originalmente identificado como metabolito secundario del alga roja *Chondria armata* (Takemoto & Daigo, 1958). Hoy se sabe que también es producido por especies de diatomeas del género *Pseudonitzschia* (Visciano et al., 2016). Pertenece a la

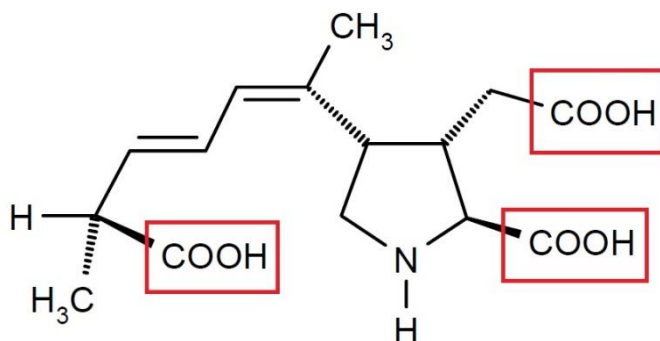


familia de los kainoides, compuestos químicos considerados excitotóxicas o neuroexcitantes (Quilliam 2003) y con gran afinidad por los receptores de glutamato (La Barre et al., 2014). Su mecanismo de acción a nivel biológico consiste en unirse a los receptores de glutamato de las neuronas y activar la apertura de los canales de calcio (Pérez 2002). Esto provoca una despolarización persistente (Clayden et al., 2005) y un daño severo en el hipocampo (área asociada a la memoria) y amígdala del cerebro (FAO, 2005); Jeffery et al., 2004; Todd, 1993), que se manifiesta en síntomas gastrointestinales, coma, daño cerebral, amnesia y en el peor de los casos la muerte (Clayden et al., 2005; Visciano et al., 2016).

**Tabla 2.** Distribución global de las especies productoras de ácido domoico pertenecientes al género de diatomeas *Pseudo-nitzschia*. Modificado de Neves et al. (2021).

Especies de <i>Pseudo-nitzschia</i>	Distribución global
<i>P. australis</i>	África Australia Europa Nueva Zelanda Norteamérica y Sudamérica
<i>P. multiseriis</i>	Asia Australia Europa Nueva Zelanda Norteamérica
<i>P. pseudodelicatissima</i>	África Asia Islas atlánticas Europa Nueva Zelanda Norteamérica y Sudamérica

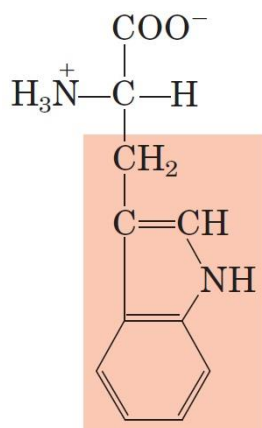
Desde el punto de vista químico, es un aminoácido y un ácido tricarboxílico (FAO, 2005; Visciano et al., 2016), lo que le confiere una fuerte ionización que determina su solubilidad en agua y relativa solubilidad en metanol (La Barre et al., 2014; ver Figura 3). Es termoestable, por lo que no puede ser destruido por altas temperatura durante la cocción de alimentos (Clayden et al., 2005). En su forma purificada su temperatura óptima de almacenamiento es de 4°C por un periodo de tiempo menor a 1 año. En moluscos contaminados no esterilizados, su temperatura óptima de almacenamiento para menos de un año es de -12°C y para más de 1 año -80°C. Para moluscos esterilizados puede conservarse a 4°C por periodos de tiempo menores a 1 año (Quilliam 2003). Por último, cabe mencionar que el ácido domoico posee una fuerte absorbancia a la longitud de onda de 242 nm, lo que facilita su identificación y cuantificación por medio de la técnica HPLC-UV/DAD (ISP, 2018; López-Rivera et al., 2005).



**Figura 3.** Estructura del ácido domoico. En los rectángulos se muestran los tres grupos carboxilos que determinan su solubilidad. Extraído y modificado de Quilliam (2003).

Existen distintos métodos para la detección del ácido domoico: electroforesis, análisis de aminoácidos, cromatografía de capa fina, cromatografía líquida (Quilliam 2003), bioensayo de ratón (FAO, 2005) y ELISA competitivo (La Barre et al., 2014), pero el más usado es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a detectores de arreglos de diodos (HPLC-DAD) o espectrómetro de masas (LC-MS). Sin embargo, este método presenta un

interferente: el triptófano (ver Figura 4), aminoácido presente de forma natural en los moluscos, y que posee un tiempo de retención similar al del ácido domoico y absorbancia a la longitud de onda de 242 nm (ISP, 2018; López-Rivera et al., 2005).



**Figura 4.** Estructura química del aminoácido triptófano, principal interferente del método de detección del ácido domoico por HPLC-DAD. En el rectángulo se destaca su grupo R, responsable de su absorbancia. Extraído de Nelson & Cox (2013).

### 1.3.3 VAM en Chile

La presencia de VAM en Chile, cercana o sobre el límite regulatorio ha sido registrada en más de una ocasión (ver Figura 5), y muchas veces con efectos económicos (Sandoval et. al, 2018). El evento más antiguo conocido ocurrió en bancos naturales y zonas de producción en 1997 (Suarez-Isla et al., 2002). Entre las zonas afectadas en las últimas dos décadas se encuentran los sectores costeros del norte de Chile (Aqua, 2007, 2008), Puerto Natales (El Pingüino, 2015), Puerto Montt y Calbuco (Soy Chile, 2020), Hualaihué (Radio Bío Bío, 2021) y Chiloé (Aqua, 2017; Radio Sago, 2021), por nombrar algunos. De hecho, en febrero de 2021 se reportó un caso sospechoso de intoxicación por VAM, correspondiente a una mujer de 58 años de edad que consumió choritos (*Mytilus chilensis*) adquiridos en Achao, y que presentó

síntomas gastrointestinales (diarrea) y neurológicos (amaurosis) (Ministerio de Salud, 2021). También se ha descrito la presencia de la toxina en el urocordado filtrador *Pyra chilensis* (López-Rivera et al., 2009), el cual es ampliamente consumido en el litoral chileno.



**Figura 5.** Distribución de los eventos VAM en Chile. Se muestran en círculos rojos las regiones afectadas (mapa extraído y modificado de los [www.losmejoresdestinos.com](http://www.losmejoresdestinos.com)).

Actualmente, se sabe que las especies productoras de ácido domoico en Chile son *P. australis* y *P. calliantha*, siendo la primera la principal responsable de los eventos de VAM (Álvarez et al., 2009). También se ha descrito una asociación entre las altas concentraciones de *Pseudonitzschia* spp. y los aumentos de temperatura en las aguas del canal Puyuhuapi en la Patagonia (Montero et al., 2017), además de una distribución en parches del ácido domoico en los fiordos australes (Moreno-Pino et al., 2018). Por otra parte, se sabe que las

*Pseudonitzschia* spp. dominan las abundancias relativas el fitoplancton en la Patagonia (Montero et al., 2017).

El método utilizado para detectar ácido domoico en los moluscos de Chile es el HPLC-UV/DAD (SERNAPESCA. 2020). Según el directorio de laboratorios de ensayo acreditados del INN (Instituto Nacional de Normalización), sólo cinco laboratorios a nivel nacional cuentan con acreditación en dicha técnica, y todos los certificados caducarán durante la primera mitad de 2022 de no ser renovados. Además, la escasa capacidad analítica de las SEREMI de Salud ha hecho que más de una vez se registren incumplimientos del programa de vigilancia de FANs en Chile (ISP, 2011), siendo las regiones que requieren mayor atención y apoyo Antofagasta, Maule y Bío Bío.

En vista de los antecedentes expuestos, es fundamental contar con nuevos laboratorios acreditados en la detección de VAM en la Región del Bío Bío, con el fin de garantizar la inocuidad alimentaria de los moluscos bivalvos, y de aumentar la capacidad analítica de la SEREMI de Salud.

#### **1.4 Validación de métodos en laboratorios acreditados**

La norma ISO 17025 establece requisitos que acreditan la competencia técnica y la calidad de los resultados de un laboratorio, como por ejemplo la validación de métodos analíticos (Ribeiro et al., 2021). La validación es la confirmación, mediante exámenes y evidencias objetivas, de que un método cumple con los requisitos particulares para su uso previsto (López et al., 2011; Magnusson & Örnemark, 2014). Este es un término a menudo confundido con la verificación, la cual es una demostración, mediante evidencia objetiva, de que un laboratorio particular aplica correctamente un método validado y estandarizado en su entorno de trabajo (Magnusson & Örnemark, 2014). El cumplimiento de ambos requisitos se demuestra, en la práctica, a través de evidencia estadística, metrológica y documental derivada de un plan de validación o de verificación (SERNAPESCA, 2018). Dichos planes, dependiendo de los

objetivos particulares de cada laboratorio, instruyen la evaluación de algunos de los parámetros definidos a continuación.

#### **1.4.1 Selectividad**

La selectividad es la aptitud de un método para separar el analito de interés de otros componentes presentes en la matriz en estudio, incluyendo sus impurezas, degradantes, u otros interferentes (Bliesner, 2006; NATA, 2018). Este es un término a menudo confundido con la especificidad, que es la propiedad de un método de dar una respuesta instrumental únicamente en presencia del analito de interés (NATA, 2018; SERNAPESCA, 2018). Existen distintos enfoques cualitativos y cuantitativos para evaluar la selectividad (Thompson et al., 2002). Estos involucran generalmente la medición de blancos de matriz, blancos reactivos y/o estándares de concentración conocida (ISP 2010, NATA, 2018), aunque también es posible añadir interferentes u otros compuestos relacionados con el analito (SERNAPESCA, 2018; Thompson et al., 2002).

#### **1.4.2 Linealidad**

La linealidad es la capacidad de un método de dar una respuesta instrumental proporcional a la concentración del analito dentro de ciertos límites (ISP, 2010). Dichos límites corresponden al rango de trabajo, el cual es el intervalo de concentraciones en el cual un método entrega resultados con una incertidumbre aceptable (Magnusson & Örnemark, 2014). Dicho rango debe ser definido y validado por cada laboratorio, según las concentraciones de interés y el propósito del método (Thompson et al., 2002).

La linealidad se determina mediante el análisis de material de referencia certificado (MRC) (NATA, 2018) o bien de material fortificado, y en al menos 5 niveles de concentración distintos (López et al., 2011), en mediciones duplicadas, o idealmente triplicadas (NATA, 2018). Los resultados se grafican a través de una regresión lineal (Magnusson & Örnemark,

2014) y se evalúa por medio de estadísticos si la respuesta instrumental del método (la variable dependiente Y) es proporcional a la concentración del analito (la variable independiente X) (SERNAPESCA, 2018).

### **1.4.3 Límites de detección y cuantificación**

El límite de detección (LOD) es la concentración más baja de analito detectable por un método en una muestra, que no es necesariamente cuantificable (López et al., 2011), pero sí es distinta de cero (Thompson et al., 2002). En cambio, el límite de cuantificación (LOQ) es la mínima concentración de analito que un método es capaz de cuantificar con seguridad en una muestra determinada (NATA, 2018). Ambas cantidades se miden en la unidad de concentración del analito, y se determinan a partir del análisis de blancos de matriz, o bien de muestras con una baja concentración del analito (ISP 2010; SERNAPESCA, 2018). Ambos conceptos no deben ser confundidos con el límite crítico (LC), el cual es un valor de referencia sobre el cual hay certeza de que la presencia del analito en la muestra es distinta de cero (Magnusson & Örnemark, 2014).

### **1.4.4 Precisión**

La precisión es una medida que describe que tan agrupados o dispersos se encuentran los resultados de análisis independientes realizados bajo ciertas condiciones definidas (NATA, 2018; Thompson 2002). Generalmente dicha medida se expresa en términos de desviación estándar, desviación estándar relativa (Magnusson & Örnemark, 2014) o coeficiente de variación (López et al., 2011).

La precisión puede ser establecida en tres niveles diferentes: repetibilidad, repetibilidad intermedia y reproducibilidad (Bliesner, 2006). A continuación se describen las características de cada nivel.

**Repetibilidad:** Es la medida de la dispersión de los resultados obtenidos por un mismo laboratorio, mismo analista y mismo instrumento, en un corto intervalo de tiempo (por ejemplo, en un mismo día) (Bliesner, 2006; Magnusson & Örnemark, 2014).

**Repetibilidad intermedia:** Es la medida de la dispersión de los resultado obtenidos por un mismo laboratorio, pero con distintos analistas y/o instrumentos y escalas de tiempo más prolongadas (por ejemplo, distintos días) (Bliesner, 2006; Magnusson & Örnemark, 2014). A menudo este término también es referido como reproducibilidad intralaboratorio (Magnusson & Örnemark, 2014).

**Reproducibilidad:** Es la medida de la dispersión de los resultados obtenidos por distintos laboratorios (Bliesner, 2006; Magnusson & Örnemark, 2014). La única forma de obtenerla es por medio del trabajo colaborativo entre distintos laboratorios (SERNAPESCA, 2018). No se considera un requisito dentro de los planes de validación (Bliesner, 2006).

Independiente del nivel de precisión evaluado y sin perjuicio de sus propios requisitos, siempre deben realizarse al menos seis mediciones o réplicas de un material homogéneo y estable en condiciones previamente estipuladas (Magnusson & Örnemark, 2014).

#### **1.4.5 Veracidad**

La veracidad es una medida del grado de concordancia entre los resultados obtenidos a través de un método analítico y un valor de referencia conocido y aceptado (Thompson et al., 2002). La veracidad es determinada por sesgo o recuperación (ISP, 2010).

**Sesgo:** Es una medida promedio de las diferencias entre el valor obtenido y el valor de referencia conocido (ISP, 2010). Es expresado como sesgo absoluto o relativo (Magnusson & Örnemark, 2014).



**Recuperación:** Es el cociente obtenido al dividir la diferencia de los valores obtenidos desde muestras fortificadas y sin fortificar por el valor de referencia conocido (ISP, 2010). Es expresado como recuperación absoluta o relativa (Magnusson & Örnemark, 2014).

Los ensayos de cualquiera de los dos estimadores de veracidad se realizan usando material de referencia certificado (CMR), o bien blancos de matriz y muestras fortificadas, cuya concentración de analito añadida artificialmente debe ser conocida (NATA, 2018; Thompson et al., 2002).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Verificar el método de detección de veneno amnésico de molusco (VAM) por HPLC-DAD para el Laboratorio de Biotoxinas UdeC.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar los parámetros analíticos requeridos para realizar la verificación del método de detección de VAM por HPLC-DAD en el Laboratorio de Biotoxinas UdeC.
2. Demostrar la correcta aplicación del método de detección de VAM por HPLC-DAD en el LBTx UdeC mediante evidencia objetiva auditable.

### **3 MATERIALES Y MÉTODOS**

Las actividades de verificación se basaron en los siguientes documentos:

- Procedimiento general validación y/o verificación de métodos PG-12 (LBTx UdeC, 2018).
- Registro técnico plan de validación/verificación de métodos RPG-12-01 (LBTx UdeC, 2018).
- Guía técnica validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: aspectos generales sobre la validación de métodos (ISP, 2010).
- Instructivo de determinación de toxina amnésica de molusco (VAM) ME-711.04-079 (ISP, 2018).

Todas las balanzas y micropipetas utilizadas se encontraban calibradas y verificadas. También se verificó y registró diariamente la temperatura de los refrigeradores.

En esta habilitación profesional, se redactaron informes internos y la versión preliminar del Instructivo para la determinación de toxina amnésica de molusco P-VAM-01 del Laboratorio de Biotoxinas UdeC. Todos estos documentos se recopilaron en el Libro de Anexos.

#### **3.1 Soluciones**

De acuerdo a los requerimientos del LBTx UdeC, las soluciones utilizadas se ingresaron en el registro de preparación de soluciones. Además, fueron rotuladas con la siguiente información:

- Nombre de la solución.
- Número de batch.
- Concentración.
- Solvente.

- Temperatura de almacenamiento.
- Fecha de preparación.
- Fecha de vencimiento.

Todas las soluciones fueron almacenadas en un refrigerador Mademsa MBF60X a temperatura de refrigeración ( $4\pm 3$  °C).

### **3.1.1 Solución extractante metanol:agua 50:50 v/v**

Es la solución con que se realizan las extracciones de ácido domoico desde las matrices de molusco. En matraces aforados se midió por separado 250 mL de metanol para análisis y 250 mL de agua ultrapura. Ambos volúmenes se mezclaron y almacenaron dentro en un frasco de vidrio.

### **3.1.2 Solución diluyente acetonitrilo:agua 1:9 v/v**

Es la solución utilizada para diluir el estándar de ácido domoico  $103,3 \mu\text{g/mL}$  y la solución stock de triptófano  $1000 \mu\text{g/mL}$ . En un matraz aforado de 5 mL se midió acetonitrilo para análisis. El volumen fue transferido a un matraz aforado de 50 mL, el cual se aforó con agua ultrapura. La solución fue transferida y almacenada en un tubo para centrifuga de 50 mL.

### **3.1.3 Solución stock de ácido domoico $4,1 \mu\text{g/mL}$**

Es la solución stock utilizada para preparar la solución mezcla de ácido domoico  $2,0 \mu\text{g/mL}$  + triptófano  $20 \mu\text{g/mL}$ . Con una micropipeta se midió  $480 \mu\text{L}$  de solución diluyente acetonitrilo:agua 1:9 v/v. Dicho volumen se transfirió a un vial de microcentrifuga. Con otra micropipeta se midió  $20 \mu\text{L}$  de estándar de ácido domoico  $103,3 \mu\text{g/mL}$  y se transfirió dentro del mismo vial. La solución fue agitada y almacenada dentro del mismo vial.

### **3.1.4 Solución stock de L-triptófano 1000 µg/mL**

En una balanza analítica se pesó 0,1 g de L-triptófano para bioquímica. Dicha masa se transfirió a un matraz aforado de 100 mL, el cual se aforó con agua ultrapura. La solución se agitó manualmente y se almacenó en un frasco de vidrio color ámbar.

### **3.1.5 Solución mezcla de ácido domoico 2,0 µg/mL + triptófano 20 µg/mL**

Con micropipetas se midió 488 µL de solución stock de ácido domoico 4,1 µg/mL y 20 µL de solución stock de L-triptófano 1000 µg/mL. Ambos volúmenes se transfirieron a un matraz aforado de 1 mL, el cual se aforó con solución diluyente acetonitrilo:agua 1:9 v/v. La solución fue transferida a un vial de microcentrífuga, agitada y almacenada dentro del mismo vial.

### **3.1.6 Solución ácido trifluoroacético 0,03% v/v**

Esta solución es parte de la fase móvil. Bajo campana de extracción con una micropipeta se midió 300 µL de ácido trifluoroacético para análisis. Dicho volumen fue transferido a un matraz aforado de 1000 mL, el cual se aforó con agua ultrapura. La solución fue filtrada con un filtro de membrana de nitrocelulosa Merck Millipore modelo HAWPO 4700 (0,45 µm) y una bomba de vacío Rocker 300 de 650 mm hg. La solución fue almacenada dentro en un frasco de vidrio.

### **3.1.7 Solución fase móvil acetonitrilo:ácido trifluoroacético 0,03% 85:15 v/v**

En matraces aforados de 50 y 100 mL se midieron 150 mL de acetonitrilo para análisis. Dichos volúmenes fueron transferidos a un matraz aforado de 1000 mL, el cual se aforó con solución ácido trifluoroacético 0,03%. La mezcla fue transferida a un frasco de vidrio y desgasificada en un sonicador Branson 1510 por 20 minutos. La solución fue almacenada en el mismo frasco de vidrio.

### 3.2 Muestras

Se utilizaron muestras de molusco previamente trituradas, congeladas y disponibles en el LBTx UdeC(ver Tabla 3). En base a las experiencia del LBTx UdeC, se consideró a la cholga (*Aulacomya ater*) como matriz central y a la almeja (*Venus antiqua*), huego (*Ensis macha*) y navajuela (*Tagelus dombeii*) como matrices complementarias.

### 3.3 Extractos de ácido domoico

Las muestras fueron descongeladas durante 24 horas a temperatura de refrigeración. Con una balanza analítica se pesó en duplicado aproximadamente 4 g de cada muestra en 12 tubos de centrífuga de 50 mL. Se registró el peso real de cada duplicado. Con una micropipeta se agregó 16 mL de solución extractante metanol:agua 50:50 v/v a cada tubo. La mezcla se agitó manualmente y se registró su volumen final: 20 mL.

**Tabla 3.** Matrices utilizadas para realizar las extracciones de ácido domoico.

<b>Matriz Central</b>	<b>Matriz Complementaria</b>
Cholga Jumbo	Almeja
Cholga Tomé	Huego
Cholga Isla Toro	Navajuela

El contenido de los 12 tubos fue homogenizado por separado con un homogeneizador analógico JSRH-270 a 15.000 rpm por 5 minutos. Desde cada tubo se tomó 12 volúmenes del homogenizado de 1,5 mL y se transfirieron por separado a 144 viales de microcentrífuga. Los viales fueron centrifugados a 10.090 rpm por 10 minutos en una microcentrífuga Smart R17 a una temperatura controlada de 4 °C.

Los sobrenadantes de cada muestra duplicada fueron transferidos a 12 tubos de centrífuga de 15 mL. Los 12 tubos fueron rotulados con los siguientes datos:

- Nombre de la muestra.
- Número de réplica
- Fecha de preparación
- Analista responsable.
- Nombre del análisis: detección de VAM.

Los extractos fueron almacenados a temperatura de congelación ( $-20 \pm 3^\circ \text{C}$ ) en un refrigerador Mademsa MBF60X.

### **3.4 Preparación del análisis**

Los 12 tubos de extractos fueron descongelados a temperatura ambiente durante 15 minutos. Desde cada tubo se tomó un volumen de 0,5 mL. El contenido fue pasado por un filtro para jeringa de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 12 mm y 0,22  $\mu\text{m}$ . El filtrado de cada extracto fue depositado individualmente dentro de insertos dispuestos en viales para HPLC. Se hizo lo mismo con la solución mezcla ácido domoico 2,0  $\mu\text{g/mL}$  + triptófano 20  $\mu\text{g/mL}$  y con un blanco compuesto de la fase móvil acetonitrilo:ácido trifluoroacético 0,03% 85:15 v/v.

### 3.5 Condiciones cromatográficas

Se utilizó un cromatógrafo líquido Jasco (ver Tabla 4) y una columna de HPLC C18 Luna® con un tamaño de partícula de 5 µm, poro de 100 Å y dimensiones de 250 x 4.6 mm. Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las descritas en el Instructivo de determinación de toxina amnésica de molusco (VAM) ME-711.04-079 (ISP, 2018):

- Flujo: 1 mL/ minuto.
- Longitud de onda ( $\lambda$ ): 242 nm
- Volumen de inyección: 20 µL.
- Horno de la columna: 40° C.
- Fase móvil A: ácido trifluoroacético 0,03% : acetonitrilo 85:15
- Elución: Isocrática.

**Tabla 4.** Módulos del cromatógrafo líquido Jasco.

Módulo	Modelo
Bomba	PU-4180
Autosampler	As-4050
Interfase	LC-NetII/DC
Detector de diodos	MD-4010
Horno	CO-4061



### **3.6 Análisis cromatográfico preliminar**

Los viales fueron tapados y colocados dentro de la gradilla del inyector. El análisis cromatográfico se realizó bajo las condiciones descritas en el punto 3.5. Se realizaron 2 inyecciones por cada vial. Los resultados del análisis fueron procesados mediante el software del cromatógrafo Jasco: Chromnav. La identificación cualitativa y distinción entre triptófano y ácido domoico se realizó en virtud del tiempo de retención ( $t_r$ ), según el método del estándar externo.

Se seleccionó a las matrices centrales y complementarias negativas al ácido domoico para usarlas como blancos de matriz y realizar las pruebas de verificación descritas a continuación.

### **3.7 Selectividad**

Se realizó el análisis cromatográfico de las muestras de matriz central y complementaria negativas al ácido domoico (blancos de matriz). El criterio de aceptabilidad usado fue la ausencia de interferentes en la zona de elución del ácido domoico.

#### **3.7.1 Zona de elución del ácido domoico**

Se preparó la solución mezcla de ácido domoico 2,0  $\mu\text{g/mL}$  + triptófano 20  $\mu\text{g/mL}$ . La solución fue procesada y analizada según lo descrito en los puntos 3.4, 3.5 y 3.6. Usando el software Chromnav se identificó el inicio y final de la señal cromatográfica del ácido domoico. Dicho rango de tiempo fue considerado como la zona de elución del ácido domoico.

#### **3.7.2 Selectividad en matriz central**

Se tomó 70 g de carne triturada y descongelada de Cholga Tomé y 70 g Cholga Jumbo. Los 140 g fueron mezclados con una batidora de inmersión para confeccionar un pool. Desde este

pool se procesaron y analizaron 3 muestras de aproximadamente 4 g en duplicado, según los procedimientos descritos en los puntos 3.4, 3.5 y 3.6.

### **3.7.3 Selectividad en matriz complementaria 1**

Se dispuso de los extractos de almeja utilizados en el análisis cromatográfico preliminar. Los 2 extractos fueron procesados y analizados según lo descrito en los puntos 3.4, 3.5 y 3.6.

### **3.7.4 Selectividad en matriz complementaria 2**

Se dispuso de los extractos de huego utilizados en el análisis cromatográfico preliminar. Los 2 extractos fueron procesados y analizados según lo descrito en los puntos 3.4, 3.5 y 3.6.

## **3.8 Linealidad**

Se realizaron 3 curvas de calibración independientes de 5 puntos en 3 días distintos, en condiciones de reproducibilidad. Se calcularon las ecuaciones de la recta, el promedio de las pendientes y de los coeficientes de correlación ( $r$ ) entre las 3 curvas. El criterio de aceptabilidad usado para evaluar linealidad fue el coeficiente de correlación promedio  $r > 0,999$ .

### **3.8.1 Puntos de la curva**

Para los distintos puntos de la curva se usó como referente el límite máximo permisible (LMP) del ácido domoico en los moluscos: 20  $\mu\text{g/g}$  de carne. Dicho valor fue multiplicado por factores para calcular la concentración de los distintos puntos de la curva (ver Tabla 5).

La concentración de ácido domoico en los distintos puntos de la curva fue transformada a  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de extracto. Para ello se calculó la concentración de los extractos (ver Fórmula 1) y se usó dicho valor como factor de conversión (ver Tabla 6).

**Tabla 5.** Multiplicación del límite máximo permisible (LMP) del ácido domoico (DA) en moluscos por 5 factores. El resultado corresponde a la concentración final de DA en los distintos puntos de la curva, expresado como microgramos por gramo de carne de molusco ( $\mu\text{g}/\text{g}$ ).

Punto de la curva	LMP del DA ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	Factor	Concentración final de DA ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )
1	20	0,2	4
2	20	0,5	10
3	20	1	20
4	20	2	40
5	20	2,5	50

**Fórmula 1.** Cálculo de la concentración teórica de los extractos de ácido domoico.

$$\text{Concentración de los extractos} = \frac{4 \text{ g de muestra}}{20 \text{ mL de extracto}} = 0,2 \text{ g/mL}$$

### 3.8.2 Soluciones de la curva

Las soluciones usadas para los distintos puntos de las curvas fueron preparadas cada día forma independiente. En viales para microcentrífuga se mezclaron volúmenes de solución diluyente acetonitrilo:agua 1:9 v/v y de estándar de ácido domoico 103,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en las cantidades indicadas en la Tabla 7. Las mezclas fueron agitadas en vortex, procesadas y analizadas según

lo descrito en los puntos 3.4, 3.5 y 3.6, con un total de 3 inyecciones por cada punto de la curva.

**Tabla 6.** Cálculo de la conversión de la unidad de concentración de ácido domoico (DA) en los distintos puntos de la curva. Se multiplicó la concentración original expresada en microgramos por gramo de carne de molusco ( $\mu\text{g/g}$ ) por el factor de conversión. El resultado final corresponde a  $\mu\text{g/mL}$  de extracto.

<b>Punto de la curva</b>	<b>Concentración de DA original (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>	<b>Factor de conversión (g/mL)</b>	<b>Concentración de DA convertida (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
1	4	0,2	0,8
2	10	0,2	2
3	20	0,2	4
4	40	0,2	8
5	50	0,2	10

### 3.8.2 Gráficos de dispersión

La información de cada curva de calibración fue procesada de forma independiente. Con el software Chromenav se obtuvo el área bajo la curva de cada cromatograma. Con el software Microsoft Excel se evaluó la función respuesta del área bajo la curva (variable dependiente) vs. concentración de ácido domoico (variable independiente) mediante un gráfico de dispersión. Se obtuvo la ecuación de la recta, el valor de la pendiente y el valor del coeficiente de determinación ( $r^2$ ). Por último, se calculó el coeficiente de correlación ( $r$ ) a partir de  $r^2$ .

### 3.9 Límites

Con el software Chromnav se integró el área bajo la curva en la zona de elución del ácido domoico en todos los cromatogramas de los blancos de matriz central analizados en la prueba de selectividad. Con los datos de las curvas 1, 2 y 3 se calculó una curva global. Usando la ecuación de la recta obtenida se despejó el valor de x para obtener la concentración de ácido domoico ( $\mu\text{g/mL}$ ) en cada uno de los extractos inyectados. Mediante la Fórmula 2 se calculó la concentración de ácido domoico ( $\mu\text{g/g}$ ) en las muestras de cholga usadas para crear el pool de selectividad (ver punto 3.7.2).

#### 3.9.1 Límite crítico, límite de detección y cuantificación

Se calculó el promedio ( $\bar{x}$ ) y la desviación estándar ( $S$ ) de la concentración de ácido domoico ( $\mu\text{g/g}$ ) de las muestras de cholga del pool de selectividad. El límite crítico (LC), límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) se obtuvo usando las Fórmulas 3, 4 y 5 respectivamente. El criterio de aceptabilidad de las pruebas se muestra en la Fórmula 6.

De forma complementaria, se realizó una medición en un fortificado del pool de cholga al nivel de 0,2 LMP y se comparó la concentración leída ( $\mu\text{g/g}$ ) con la señal del LOQ mediante el siguiente criterio: concentración leída a 0,2 LMP > LOQ.

**Fórmula 2.** Cálculo de la concentración de ácido domoico (DA) en las muestras de matriz central y complementarias.  $V_t$  corresponde al volumen total del extracto (20 mL) y  $P$  al peso de la muestra de molusco en g. El resultado se expresa en  $\mu\text{g/g}$ . (adaptado de ISP, 2010).

$$\text{Concentración DA } (\mu\text{g/g}) = \frac{\text{Concentración DA } (\mu\text{g/mL})}{P} \times V_t$$

**Tabla 7.** Volúmenes de estándar de ácido domoico (DA) 103,3 µg/mL y solución diluyente acetonitrilo:agua 1:9 v/v usados para preparar 500 µL de solución a las concentraciones requeridas para cada punto de la curva.

Punto de la curva	Concentración requerida de DA (µg/mL)	Volumen de estándar DA (µL)	Volumen de solución diluyente (µL)	Volumen final de la solución (µL)
1	0,8	4	496	500
2	2	10	490	500
3	4	19	481	500
4	8	39	461	500
5	10	48	452	500

**Fórmula 3.** Cálculo del límite crítico (LC).  $S$  y  $\bar{x}$  corresponden a la desviación estándar y promedio de la concentración de ácido domoico en las muestras de los blancos de matriz central cholga (adaptado de ISP, 2010).

$$LC = 1,645 \times S + \bar{x}$$

**Fórmula 4.** Cálculo del límite de detección (LOD).  $S$  y  $\bar{x}$  corresponden a la desviación estándar y promedio de la concentración de ácido domoico en las muestras de los blancos de matriz central cholga (adaptado de ISP, 2010).

$$LOD = 3,29 \times S + \bar{x}$$

**Fórmula 5.** Cálculo del límite de cuantificación (LOQ).  $S$  y  $\bar{x}$  corresponden a la desviación estándar y promedio de la concentración de ácido domoico en las muestras de los blancos de matriz central cholga (adaptado de ISP, 2010).

$$\text{LOQ} = 10 \times S + \bar{x}$$

**Fórmula 6.** Criterio de aceptabilidad utilizado para la prueba de límites. LC corresponde al límite crítico, LOD el límite de detección, LOQ el límite de cuantificación y LMP al límite máximo permisible del ácido domoico (adaptado de ISP, 2010).

$$\text{LC} < \text{LOD} < \text{LOQ} < \text{LMP}$$

### 3.10 Precisión

La precisión fue evaluada en condiciones de repetibilidad (6 mediciones en un mismo día) y reproducibilidad (6 mediciones divididas en 3 días). En ambos ensayos se fortificaron 6 muestras de cada extracto del pool de cholgas con ácido domoico al nivel de 1 LMP.

#### 3.10.1 Fortificación a 1 LMP

Las medidas de volúmenes necesarias para realizar la fortificación son las mismas utilizadas en la preparación del punto 1 de la curva de calibración (ver Tabla 5, 6 y 7). Se tomó 481  $\mu\text{L}$  de cada extracto del pool de cholgas. Dichos volúmenes fueron transferidos por separado a viales de microcentrífuga. Se agregó a cada vial 19  $\mu\text{L}$  de estándar ácido domoico 103,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las mezclas fueron agitadas en vórtex y dispuestas para su análisis cromatográfico.

### 3.10.2 Repetibilidad

Siguiendo el procedimiento descrito en el punto 3.10.1 se fortificó a las muestras de cada extracto del pool de cholgas. Los fortificados fueron procesados y analizados el mismo día de su preparación según los procedimientos descritos en los puntos 3.4, 3.5 y 3.6.

Usando el software Chromnav se obtuvo el área bajo la curva de la señal cromatográfica del ácido domoico en los cromatogramas de cada fortificado. Usando la ecuación de la recta n°1 y el software Microsoft Excel se despejó el valor de x para obtener la concentración de ácido domoico ( $\mu\text{g/mL}$ ) en cada fortificado. Mediante la Fórmula 2 se calculó la concentración teórica de ácido domoico ( $\mu\text{g/g}$ ) que tendría cada muestra de cholga fortificada al nivel de 1 LMP.

Se calculó el promedio ( $\bar{x}$ ), desviación estándar ( $S$ ), coeficiente de variación porcentual ( $CV\%$ ) (ver Fórmula 7) de las concentraciones de ácido domoico ( $\mu\text{g/g}$ ). También se calculó el coeficiente de variación de Horwitz ( $CVh\%$ ) (ver Fórmula 8). El criterio de aceptabilidad usado en la prueba se muestra en la Fórmula 9.

**Fórmula 7.** Cálculo del coeficiente de variación porcentual ( $CV\%$ ).  $\bar{x}$  y  $S$  corresponden al promedio y desviación estándar de las concentraciones de ácido domoico ( $\mu\text{g/g}$ ) medidas en los fortificados de la prueba de repetibilidad (adaptado de ISP, 2010).

$$CV\% = \frac{S}{\bar{x}} \times 100$$



**Fórmula 8.** Cálculo del coeficiente de variación Horwitz ( $CVh\%$ ).  $C$  corresponde al valor nominal de la concentración del ácido domoico en el fortificado a 1 LMP (20  $\mu\text{g/g}$ ) (adaptado de ISP, 2010).

$$CVh\% = 2^{(1-0,5)\text{Log } C}$$

**Fórmula 9.** Criterio de aceptabilidad utilizado en la prueba de repetibilidad.  $CV\%$  corresponde al coeficiente de variación porcentual y  $CVh\%$  al coeficiente de variación Horwitz (adaptado de ISP, 2010).

$$CV\% < \frac{CVh\%}{2}$$

### 3.10.3 Reproducibilidad

Siguiendo el procedimiento descrito en el punto 3.10.1 se fortificó los 6 extractos del pool de cholgas, distribuidos en 3 días (2 cada día). Los fortificados fueron procesados y analizados el mismo día de su preparación según los procedimientos descritos en los puntos 3.4, 3.5 y 3.6.

Para calcular la concentración de ácido domoico ( $\mu\text{g/g}$ ) que tendría teóricamente cada muestra de cholga se siguió el procedimiento descrito en el punto 3.10.2, usando la curva n°1, n°2 y n°3 para los días de ensayo 1, 2 y 3 respectivamente. Se calculó el promedio ( $\bar{x}$ ), desviación estándar (S), coeficiente de variación porcentual (CV%) (ver Fórmula 7) de las concentraciones de ácido domoico ( $\mu\text{g/g}$ ). El criterio de aceptabilidad usado en la prueba se muestra en la Fórmula 10.

**Fórmula 10.** Criterio de aceptabilidad utilizado en la prueba de reproducibilidad. CV% corresponde al coeficiente de variación porcentual y CVh% al coeficiente de variación Horwitz (adaptado de ISP, 2010).

$$CV\% < CVh\% \times \frac{2}{3}$$

### **3.11 Veracidad**

La veracidad fue evaluada por sesgo y recuperación en condiciones de repetibilidad. En ambos casos se usó la prueba t-student como criterio de aceptabilidad. También se usó como criterio de aceptabilidad adicional el rango de porcentaje de recuperación exigido por el CODEX alimentarius para el ácido domoico: 85-110% (CAC, 2012)

#### **3.11.1 Sesgo**

El sesgo fue evaluado en condiciones de repetibilidad en 6 fortificados de la matriz central al nivel de 1 LMP. Para ello se usaron los datos de las concentraciones de ácido domoico ( $\mu\text{g/g}$ ) obtenidos en la prueba de precisión bajo condiciones de repetibilidad. Se obtuvo el valor del sesgo en cada fortificado utilizando la Fórmula 11. Luego se calculó el promedio y desviación estándar del sesgo. El valor t crítico se obtuvo de ISP (2010) considerando n-1 grados de libertad (n=6) y un valor  $\alpha$  de 0,05. El valor t calculado se obtuvo con la Fórmula 12.

**Fórmula 11.** Cálculo del valor del sesgo ( $S$ ).  $X$  corresponde a la concentración ( $\mu\text{g/g}$ ) de ácido domoico (DA) leída y  $Xa$  a la concentración conocida de DA en el fortificado (1 LPM = 20  $\mu\text{g/g}$ ) (adaptado de ISP, 2010).

$$S = |X - Xa|$$

**Fórmula 12.** Cálculo utilizado para obtener el valor  $t$  calculado ( $t_{calc}$ ) para sesgo.  $Xa$  corresponde a la concentración conocida de DA en el fortificado (1 LPM = 20  $\mu\text{g/g}$ ),  $\bar{X}$  y  $S$  al promedio y desviación estándar de las concentraciones de DA leídas ( $\mu\text{g/g}$ ) y  $n$  al número de fortificados leídos (6) (adaptado de ISP, 2010).

$$t_{calc} = \frac{|Xa - \bar{X}|}{S \times \sqrt{n}}$$

### 3.11.2 Recuperación en matriz central.

El porcentaje de recuperación fue evaluado en condiciones de repetibilidad en 9 fortificados de la matriz central: 3 al nivel de 0,5 LPM, 3 al nivel de 1 LPM y 3 al nivel de 2 LPM. En cada nivel se fortificaron los blancos n°1, n° 2 y n° 3 del pool de selectividad. Los volúmenes utilizados para preparar los fortificados se muestran en la Tabla 8.

Los fortificados fueron procesados y analizados el mismo día de su preparación según los procedimientos descritos en los puntos 3.4, 3.5 y 3.6. Para calcular la concentración de ácido domoico ( $\mu\text{g/g}$ ) se siguió el procedimiento descrito en el punto 3.10.2, pero usando la curva n°3 (ver anexo 8).

**Tabla 8.** Volúmenes de estándar de ácido domoico (DA) 103,3 µg/mL y de extractos usados para preparar 500 µL de fortificado a las concentraciones requeridas (0,5 LMP, 1 LMP y 2 LMP). En cada nivel se fortificaron los extractos n°1, n°2 y n°3.

<b>Nivel de la Fortificación</b>	<b>Concentración requerida de DA (µg/mL)</b>	<b>Volumen de estándar DA (µL)</b>	<b>Volumen de extracto (µL)</b>	<b>Volumen final de la fortificación (µL)</b>
0,5 LMP	2	10	490	500
1 LMP	4	19	481	500
2 LMP	8	39	461	500

Se obtuvo la concentración de ácido (µg/g) de los blancos de matriz central a partir de los resultados de la determinación de límites (punto 3.9) y usando la curva global.

El porcentaje de recuperación fue calculado en cada lectura con la fórmula 13. El valor t crítico se obtuvo de ISP (2010), considerando n-1 grados de libertad (n=3) y un valor  $\alpha$  de 0,05. El valor t calculado se obtuvo con la fórmula 14.

**Fórmula 13.** Cálculo utilizado para obtener el porcentaje de recuperación (%R).  $C_e$  corresponde a la concentración (µg/g) de ácido domoico (DA) leída en el fortificado,  $C_o$  a la concentración (µg/g) de DA leída en el blanco y  $C_a$  a la concentración real de DA utilizada en la fortificación (adaptado de ISP, 2010).

$$\%R = \left( \frac{C_e - C_o}{C_a} \right) \times 100$$

**Fórmula 14.** Cálculo utilizado para obtener el valor  $t$  calculado ( $t_{calc}$ ) para recuperación.  $\%R$  corresponde al porcentaje de recuperación,  $S$  a la desviación estándar de los porcentajes de recuperación calculados y  $n$  al número de fortificados leídos (adaptado de ISP, 2010).

$$t_{calc} = \frac{[100 - \%R]}{S \times \sqrt{n}}$$

### 3.11.3 Recuperación en matriz complementaria 1

El porcentaje de recuperación fue evaluado en condiciones de repetibilidad en 3 fortificados de la matriz complementaria almeja al nivel 1 LPM. En cada nivel se fortificaron los extractos de almeja en el siguiente orden: n°1, n° 2 y n°1. Los volúmenes utilizados para preparar los fortificados son los mismos descritos en la Tabla 8.

Los fortificados fueron procesados y analizados el mismo día de su preparación según los procedimientos descritos en los puntos 3.4, 3.5 y 3.6. Para calcular la concentración de ácido domoico ( $\mu\text{g/g}$ ) se siguió el procedimiento descrito en el punto 3.10.2, pero usando la curva n°2 (ver anexo 8).

Con el software Chromnav se calculó del área bajo la curva en la zona de elución del ácido domoico en los cromatogramas de los blancos de almeja analizados en la prueba de selectividad. Para calcular la concentración de ácido domoico ( $\mu\text{g/g}$ ) en los blancos se siguió el procedimiento descrito en el punto 3.10.2, pero usando la curva global. El porcentaje de recuperación se calculó según el mismo procedimiento descrito para la matriz central (ver punto 3.11.2).

### 3.11.4 Recuperación en matriz complementaria 2

El porcentaje de recuperación se obtuvo según el mismo procedimiento descrito para la matriz complementaria almeja, pero utilizando los extractos de hueso y la curva n°3 para el cálculo

de la concentración de ácido domoico ( $\mu\text{g/g}$ ) en las muestras fortificadas de huevo (ver punto 3.11.3).

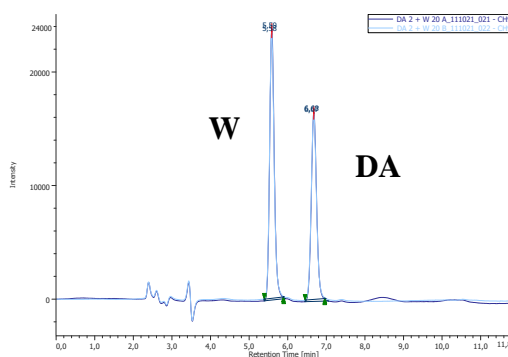
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análisis cromatográfico preliminar

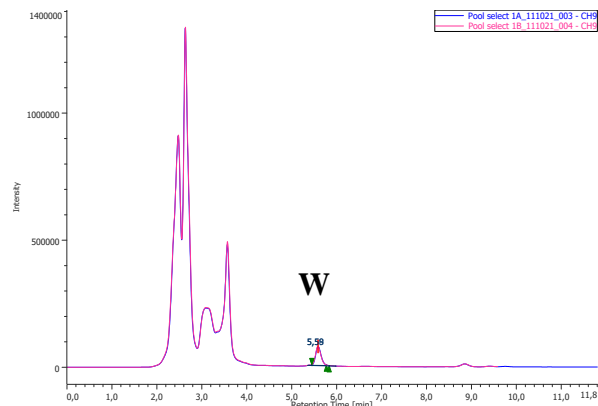
Las muestras de Cholga Tomé, Cholga Jumbo, Almeja y Huevo no presentaron señales cromatográficas atribuibles al ácido domoico (ver anexos 1, 2, 3 y 4: informes de análisis cromatográfico preliminar). Por tanto, dichas muestras fueron consideradas negativas al ácido domoico y seleccionadas para realizar los estudios de verificación.

### 4.2 Selectividad

Los cromatogramas para la solución mezcla de ácido domoico 2,0 µg/mL + triptófano 20 µg/mL mostraron una clara separación entre ambos compuestos (ver ejemplo: Figura 6) En promedio, la zona de elución del ácido domoico se distribuyó entre los 6,4 a 6,7 minutos. El tiempo de retención promedio del ácido domoico fue de 6,7 minutos y el del triptófano 5,3 minutos. Ninguno de los cromatogramas de los blancos de matriz estudiados presentó interferentes en la zona de elución del ácido domoico (ver ejemplo: Figura 7, y anexos 5, 6 y 7 para más detalles), y por tanto, se cumplió con el criterio de aceptabilidad.



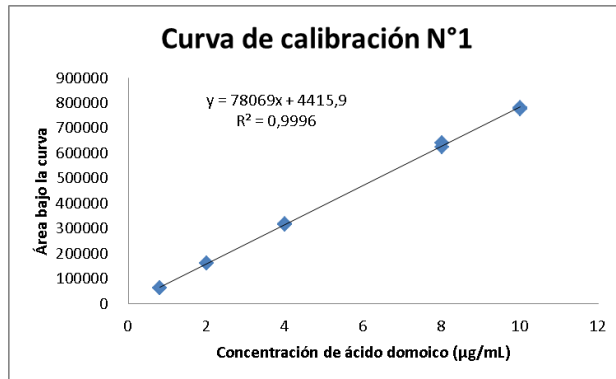
**Figura 6.** Cromatogramas a 242 nm de la mezcla ácido domoico 2 µg/mL + triptófano 20 µg/mL. Ensayo de selectividad en matriz central, inyecciones A y B. Las letras W y DA corresponden a los picos de triptófano y ácido domoico, respectivamente.



**Figura 7.** Cromatogramas a 242 nm del pool de selectividad de la matriz central cholga. Muestra 1, inyecciones A y B. La letra W corresponde a los picos de triptófano.

### 4.3 Linealidad

Se cumplió con el criterio de aceptabilidad  $r$  promedio  $> 0,999$  en el rango de trabajo de 0,2 LPM (4  $\mu\text{g/g}$ ) a los 2,5 LMP (50  $\mu\text{g/g}$ ) (ver Tabla 9). Se verificó la respuesta lineal del método y la correlación positiva entre la concentración del ácido domoico y la respuesta instrumental. Los gráficos de dispersión se encuentran en el anexo 8, y a modo de ejemplo, se muestra la curva n° 1 en la Figura 8.



**Figura 8.** Curva de calibración N°1.



**Tabla 9.** Valores de las pendientes (m), intersección (b) y coeficientes de correlación (r) obtenidos en las 3 curvas de calibración.

Curva	Coefficiente de correlación (r)	Coefficiente de determinación (R <sup>2</sup> )	Valor de la pendiente (m)	Valor del intersección (b)
1	0,9998	0,9996	78069	4415,9
2	0,9998	0,9997	75054	409,32
3	0,9988	0,9977	79642	-7761,7
	$\bar{x} = 0,9995$	$\bar{x} = 0,9990$	$\bar{x} = 77588$	$\bar{x} = -978,83$

#### 4.4 Límites

Los valores de LC, LOD Y LOQ cumplieron con el criterio de aceptabilidad (ver Tabla 10). El fortificado al nivel de 0,2 LMP tuvo una concentración de 4,11 µg/g, la cual es mayor al LOQ obtenido: 1,54 µg/g (para mayor información, ver anexo 9).

**Tabla 10.** Valores del límite crítico (LC), límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) calculados. Se cumple  $LC < LOD < LOQ < LMP$  (20µg/g).

Parámetro	Valores calculados (µg/g)
LC	0,81
LOD	0,96
LOQ	1,54

## **4.5 Precisión**

### **4.5.1 Repetibilidad**

El valor promedio y desviación estándar de la concentración de los fortificados de matriz central cholga al nivel de 1 LMP (20 µg/g) fue de 18,39 µg/g y 0,88 µg/g respectivamente. El coeficiente de variación (CV%) fue 4,76 y el coeficiente de variación de Horwitz (CVh%) fue 5,10. Se cumplió el criterio de aceptabilidad  $CV\% < CVh\%$ . Los cromatogramas y mayores detalles sobre los resultados se encuentran disponibles en el Anexo 10.

### **4.5.2 Reproducibilidad**

El valor promedio y desviación estándar de la concentración de los fortificados de matriz central cholga al nivel de 1 LMP (20 µg/g) fue de 18,80 µg/g y de 0,65 µg/g respectivamente. El coeficiente de variación (CV%) fue 3,47 y el coeficiente de variación de Horwitz (CVh%) fue 6,80, cumpliéndose  $CV\% < CVh\%$ . Los cromatogramas y mayores detalles sobre los resultados se encuentran disponibles en el Anexo 11.

## **4.6 Veracidad**

### **4.6.1 Sesgo**

El sesgo tuvo un valor promedio de 1,77. El valor t calculado fue 0,58 y el valor t crítico 2,57, cumpliéndose el criterio de aceptabilidad  $t_{\text{calc}} < t_{\text{crit}}$ . Los cromatogramas y mayores detalles sobre los resultados se encuentran disponibles en el Anexo 12.

#### 4.6.2 Recuperación

En todos los niveles y matrices se cumplió con el criterio de aceptabilidad  $t_{\text{calc}} < t_{\text{crit}}$  (ver Tabla 11) y con el rango de recuperación (%R) exigido por el Codex Alimentarius: 85-110%. El %R promedio del método fue de 90,83%. Los cromatogramas y mayores detalles sobre los resultados se encuentran disponibles en los Anexo 13, 14 y 15.

**Tabla 11.** Resumen de los resultados de recuperación en las matrices estudiadas. %R promedio corresponde al porcentaje de recuperación promedio para el respectivo nivel LMP.

Matriz	Nivel LMP	% R promedio	t calculado	t crítico
Central	0,5	87,00	0,67	4,30
Central	1	91,67	1,47	4,30
Central	2	93,32	1,20	4,30
Complementaria 1	1	90,1	3,35	4,30
Complementaria 2	1	92,1	1,68	4,30
		$\bar{x} = 90,83$		

#### 4.7 Instructivo de detección de VAM

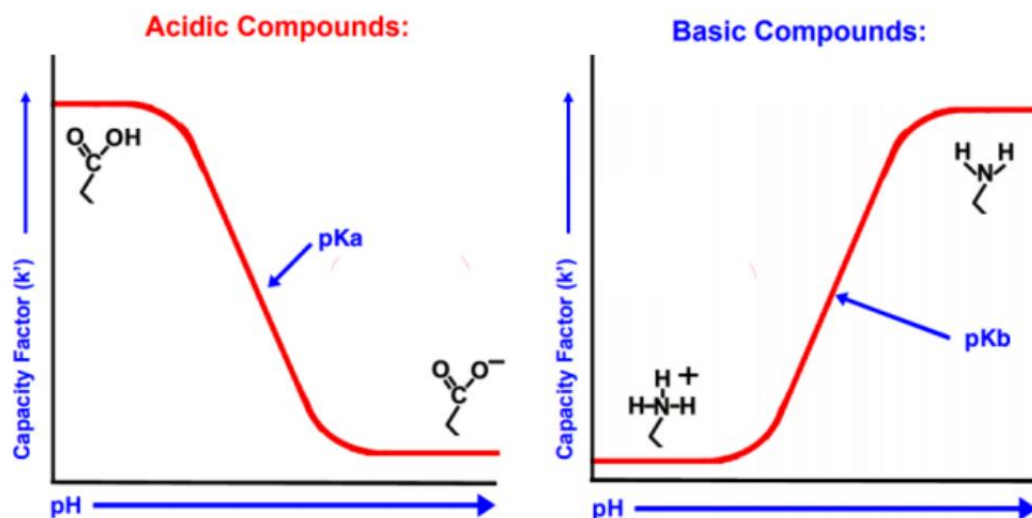
Finalmente, a partir de las experiencias realizadas y resultados obtenidos en esta habilitación profesional, se redactó la versión preliminar del Instructivo para la determinación de toxina amnésica de molusco (P-VAM-01) del LBTx UdeC. Este documento se encuentra disponible en el Anexo 16.

## 5 DISCUSIÓN

### 5.1 Selectividad

Los resultados demuestran que el método de detección de VAM por HPLC-DAD aplicado en el LBTX es selectivo para el ácido domoico. Los cromatogramas a 242 nm de las matrices estudiadas (anexos 5, 6 y 7) muestran picos cromatográficos sobrepuestos, con tiempos de retención menores a los del ácido domoico y triptófano. Es probable que dichas señales sean causadas por compuestos hidrosolubles presentes de forma natural en las matrices estudiadas (Sadjadi, 2019). Estos compuestos presentarían una mayor afinidad por la fase móvil, lo que explicaría sus menores tiempos de retención y exitosa separación del ácido domoico y triptófano dentro de la columna C18. El mayor tiempo de retención del triptófano y ácido domoico se explica por sus respectivas estructuras químicas. El triptófano posee un grupo aromático (Nelson & Cox, 2013), y el ácido domoico una cadena hidrocarbonada y un grupo aromático (La Barre et al., 2014). Estas características determinan su relativa apolaridad y mayor interacción con las cadenas de carbono de la columna C18.

La separación de las señales cromatográficas del ácido domoico y el triptófano, principal interferente del método (ISP, 2018; La Barre et al., 2014; Quilliam, 2003), se logró con éxito. Esta afirmación se demuestra en los cromatogramas de la mezcla de ácido domoico 2,0 µg/mL + triptófano 20 µg/mL (anexos 5, 6 y 7), donde no hay sobreposición de los picos cromatográficos para estos dos compuestos. La separación exitosa podría explicarse por diversos factores. Es conocido que en HPLC de fase reversa el pH afecta el factor de capacidad (K) de los ácidos: a menor pH, mayor es el valor de K (Saxena, 2020; ver Figura 9). La presencia de ácido trifluoroacético en la fase móvil pudo contribuir regular la ionización de los grupos carboxilo del ácido domoico, afectando así su solubilidad y tiempo de retención en la columna C18. Lo anterior es congruente con los resultados de López-Rivera et al. (2005), quien consiguió mejorar la separación del ácido domoico y triptófano controlando el pH de la fase móvil.



**Figura 9.** Relación entre el pH y el factor de capacidad ( $K'$ ) en la separación de los compuestos ácidos y básicos usando columnas C18. Extraído de Saxena (2020).

Algunos autores señalan que para evaluar la selectividad deben añadirse de forma intencionada los interferentes del método y considerarse que los analitos presentan más de una forma química (Magnusson & Örnemark, 2014; NATA, 2018; SERNAPESCA, 2018). En este sentido, en esta verificación se cumplió con la adición del principal interferente del método, pero no se consideró la presencia de los isómeros del ácido domoico, como el ácido epi-domoico (La Barre et al., 2014). Sin embargo, esto último no significa un problema, dado que se ha reportado que bajo ciertas circunstancias el ácido domoico y epi-domoico coeluyen en el método de detección de VAM por HPLC-DAD (ISP, 2018). De hecho, es probable que esto ocurriera, dado que en los cromatogramas de la mezcla de ácido domoico 2,0  $\mu\text{g/mL}$  + triptófano 20  $\mu\text{g/mL}$  no se observan signos de picos cromatográficos significativos alrededor del ácido domoico.

Por último, cabe señalar que si bien es posible evaluar la selectividad de modo cualitativo, también existen métodos cuantitativos como el índice de selectividad (Thompson et al., 2002) y la resolución (ISP, 2010). Por tanto, estos resultados deberían ser complementados con

alguno de estos otros criterios a futuro, para enriquecer la verificación del método.

## 5.2 Linealidad y límites

Los resultados han verificado la linealidad del método de detección de VAM por HPLC-DAD aplicado en el LBTx UdeC en el rango de los 0,2 LMP (4 µg/g) a los 2,5 LMP (50µg/g). Dicho rango cumple con las exigencias del Codex alimentarius (intervalo de trabajo mínimo de 13,2 µg/g a 26,8 µg/g) (CAC, 2012) e incluye valores sobre y bajo el LMP (20 µg/g) (Ministerio de Salud, 1997), por lo que satisface completamente las necesidades de las normas alimentarias vigentes sobre el veneno amnésico de molusco, tanto a nivel nacional como internacional (FAO, 2005). Además, el rango verificado se encuentra por sobre el LOQ (1,54 µg/g), LOD (0,96 µg/g) y LC (0,81 µg/g) calculados, valores que coinciden ligeramente con lo mencionado en ISP (2018): LOD de 0,5 µg/g y LOQ de 1,5 µg/g.

Las pruebas de linealidad cumplieron con los requisitos de diversos autores: usar material de referencia certificado (NATA, 2018), medir 5 niveles de concentración diferentes en triplicado (López et al., 2011; NATA, 2018), graficar los resultados mediante una regresión lineal (Magnusson & Örnemark, 2014), y usar estadísticos para evaluar la linealidad (SERNAPESCA, 2018). Así, es posible afirmar que el LBTx UdeC cumplió con los principales objetivos de una prueba de linealidad: establecer el rango de trabajo del método y demostrar que dentro de dicho rango, la respuesta instrumenta es proporcional a la concentración del analito (SERNAPESCA, 2018).

Por último, cabe mencionar que si bien el LBTx UdeC usó el coeficiente de correlación ( $r$ ) por ser un método común para determinar la linealidad (ISP, 2010), existen muchas críticas al mismo (SERNAPESCA, 2018). Por tanto, estos resultados deberían ser complementados a futuro con algunas pruebas como un gráfico de residuos (Thompson et al., 2002),  $t$  de student (ISP, 2010)-y test de carencia de ajuste (SERNAPESCA, 2018).

### **5.3 Precisión**

Los resultados han verificado la precisión de las mediciones realizadas por el método de detección de VAM por HPLC-DAD en el LBTx UdeC, en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio.

Los ensayos realizados cumplieron con los requisitos metodológicos sugeridos por varios autores: mínimo de 6 réplicas (Magnusson & Örnemark, 2014), medición de la dispersión mediante el coeficiente de variación (ISP, 2010; López et al., 2011) y evaluación de la precisión en el nivel de repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio (Bliesner, 2006). Sin embargo estas pruebas podrían ser complementadas con otros criterios metodológicos. Por ejemplo, evaluar el efecto de la concentración del analito sobre la precisión del método (Thompson et al., 2002), la precisión en distintas concentraciones dentro del rango de trabajo, y otras fuentes de variabilidad existentes dentro del laboratorio (Magnusson & Örnemark, 2014). En cuanto a criterios estadísticos, los resultados podrían ser complementados con un ANOVA (Magnusson & Örnemark, 2014; SERNAPESCA, 2018) o Prueba F de Fisher (Thompson et al., 2002).

### **5.4 Veracidad**

Los resultados de sesgo y recuperación permiten verificar la veracidad de las mediciones realizadas por el método de detección de VAM por HPLC-DAD en el LBTx UdeC. Los porcentaje de recuperación obtenidos en todas las matrices se ajustaron al rango exigido por el Codex alimentarius 85-110%. (CAC, 2012).

En la evaluación de la veracidad se recomienda usar matrices que sean material de referencia certificado (CRM), pero en su reemplazo también es posible usar fortificados hechos en el laboratorio (ISP, 2010; Magnusson & Örnemark, 2014). Si bien en los ensayos realizados no se usaron matrices certificadas, sí se usó la solución de calibración certificada de ácido

domoico del National Research Council Canada (CRM-DA-g). Se cumplió el mínimo de 6 réplicas en la determinación del sesgo (ISP 2010, SERNAPESCA, 2018), pero no fue igual para la recuperación. Sin embargo, esto no constituye un problema, dado que se analizaron distintas matrices, en días y concentraciones diferentes, como sugiere NATA (2018). En total, se analizaron triplicados en tres niveles de concentración en la matriz central (9 mediciones totales) y en una sola concentración en las dos matrices complementarias (6 mediciones totales), sumando un total de 15 mediciones.

Se cumplió con el uso de una prueba de significancia como criterio de aceptabilidad (Magnusson & Örnemark ,2014), que en este caso fue la ampliamente recomendada t de student (ISP, 2010; NATA, 2018; Thompson, 2002). Sin embargo, no se realizó un control de la homogeneidad de varianzas y la normalidad como recomienda Thompson (2002), por lo que estos supuestos deberían ser confirmados a futuro o en próximas evaluaciones.



## 6 CONCLUSIÓN

Los resultados de todos los parámetros evaluados en esta verificación han entregado evidencia objetiva suficiente para asegurar que el Laboratorio de Biotoxinas UdeC aplica correctamente el método de detección de VAM por HPLC-DAD en su entorno de trabajo. Sin embargo, en futuras verificaciones, la evaluación de dichos parámetros debería ser complementada con otras pruebas y criterios de aceptabilidad.

En el contexto de cambio climático y calentamiento de los océanos, es de esperarse que las floraciones de *Pseudonitzschia* sp. sean cada vez más frecuentes en el corto plazo, sobrepasando las capacidades analíticas de las SEREMIs de Salud. Si esto ocurre, el Laboratorio de Biotoxinas UdeC está listo para prestar apoyo en la Región del Bío Bío y/o donde las circunstancias nacionales así lo requieran.

Por último, cabe destacar que contar con una técnica analítica verificada, y que será prontamente acreditada bajo la norma ISO 17025, garantizará la calidad de los resultados del LBTx. Por tanto, las empresas productoras o exportadoras de moluscos bivalvos que contraten sus servicios también serán garantes de la inocuidad de sus productos.

## 7 LITERATURA CITADA

Álvarez, G., Uribe, E., Quijano-Scheggia, S. López-Rivera, A., Mariño, C. & Blanco, J. 2009. Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia australis* and *Pseudo-nitzschia calliantha* isolated from North Chile. Harmful Alga 8: 938-945.

Aqua. 2007. Levantan veda ante fin de emergencia por FANs en Tongoy. <https://www.aqua.cl/2007/05/14/levantan-veda-ante-fin-de-emergencia-por-fans-en-tongoy/>, consultado el 12 de enero de 2022.

Aqua. 2008. Veneno Amnésico aumento su presencia en las costas de Atacama. <https://www.aqua.cl/2008/12/31/veneno-amnesico-aumenta-su-presencia-en-las-costas-de-atacama/>, consultado el 12 de enero de 2022.

Aqua. 2017. Quellón: Seremi de Salud decreta cierre preventivo por toxina amnésica de los mariscos. <https://www.aqua.cl/2017/02/14/quellon-seremi-salud-decreta-cierre-preventivo-toxina-amnesica-los-mariscos/>, consultado el 12 de enero de 2022.

Bargu, S., Goldstein, T., Roberts, K., Li, C. & Gulland, F. 2011. Pseudo-nitzschia blooms, domoic acid, and related California sea lion strandings in Monterey Bay, California. Marine Mammal Science. Vol. 36, issue 3: 828-845.

Ben-Gigirey, B., Soliño, L., Bravo, I., Rodríguez, F. & Casero, M.V.M. 2021. Paralytic and Amnesic Shellfish Toxins Impacts on Seabirds, Analyses and Management. Toxins 13: 454.

Bliesner, D. 2006. Validating Chromatographic Methods. John Willey & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey, USA. 291 pp.

Clayden, J., Read, B. & Kebditch, K. 2005. Chemistry of domoic acid, isodomoic acids, and their analogues. Tetrahedron 61: 5713–5724.

Comisión del Codex Alimentarius (CAC). 2012. Informe de la trigésimosegunda reunión del Comité del Codex sobre pescado y los productos pesqueros. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. Bali, Indonesia. 81 pp.

El Pingüino. 2015. Detectan peligroso veneno amnésico en moluscos de Magallanes. <https://elpinguino.com/noticia/2015/12/19/detectan-peligroso-veneno-amnesico-en-moluscos-de-magallanes->, consultado el 12 de enero de 2022.

Gibble, C., Kudela, R., Knowles, S., Bodenstein, B. & Lafeyvre, K. 2021. Domoic acid and saxitoxin in seabirds in the United States between 2007 and 2018. *Harmful Algae* 103: 101981.

Gil, L. 2019. Estudio sobre las normas de calidad y seguridad de la industria alimentaria: avances y desafíos: Tesis doctoral. Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia. Valencia, España. 225 pp.

Glober, C. 2020. Climate Change and Harmful Algal Blooms: Insights and perspective. *Harmful algae* 91 (2020) 101731.

Grattan, L., Holobaugh, S. & Morris, J. G. 2016. Harmful algal blooms and public health. *Harmful algae* 57: 2-8.

Instituto de Salud Pública (ISP). 2010. Guía técnica validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: aspectos generales sobre la validación de métodos. Santiago, Chile.

Instituto de Salud Pública (ISP). 2011. Informe Programa de Vigilancia de Fenómenos Algales Nocivos (FAN) en Chile. Ministerio de Salud. Santiago, Chile.

Instituto de Salud Pública (ISP). 2018. Instructivo de determinación de toxina amnésica de molusco (VAM) ME-711.04-079. Santiago, Chile.

Jeffery, B., Barlow, T., Moizer, K., Paul, S. & Boyle, C. 2004. Amnesic shellfish poison. *Food and Chemical Toxicology* 42: 545–557.

La Barre, S., Bates, S. & Quilliam, M.A. 2014. Domoic Acid. En: La Barre, S. & Kornprobst, J. M. Outstanding Marine Molecules: Chemistry, Biology, Analysis (First Edition). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim, Germany. 511 pp.

Laboratorio de Biotoxinas UdeC (LBTx UdeC). 2018a. Procedimiento general Validación y/o verificación de métodos PG-12. Concepción, Chile.

Laboratorio de Biotoxinas UdeC (LBTx UdeC). 2018b. Registro técnico Plan de validación/verificación de métodos RPG-12-01. Concepción, Chile.

Lafevre, K., Frame, R. & Kendrick, P. 2012. Domoic acid and fish behavior: A review. Harmful Algae 13: 126–130.

López-Rivera, A., Pinto, M., Insinilla, A., Suarez-Isla, B., Uribe, E., Álvarez G., Lehane, M., Furey, K. & James, K. 2009. The occurrence of domoic acid linked to a toxic diatom bloom in a new potential vector: the tunicate *Pyura chilensis* (piure). Toxicon 54: 754-762.

Lopez, P., Buffonil, E., Pereira, F. & Vilches, J. 2011. Analytical Method Validation. En Wide Spectral Quality Control. InTech. Rijeca, Croatia. 332 pp.

López-Rivera, A., Suárez-Isla, B., Eilers, P., Beaudry, C. Hall, S. Fernández, M. Furey, A. & James, K. 2005. Improved high-performance liquid chromatographic method for the determination of domoic acid and analogues in shellfish: effect of pH. Analytical and Bioanalytical Chemistry 381: 1540–154.

Magnusson, B. & Örnemark, U. 2014. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. [https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV\\_guide\\_2nd\\_ed\\_EN.pdf](https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf), consultado el 7 de febrero de 2022.

Martimore, S. & Wallace, C. 2013. HACCP. A practical approach. Third edition. Springer. New York, EE.UU. 475 pp.

Ministerio de Salud. 1997. Decreto supremo 997. Diario oficial de la República de Chile. Santiago, Chile.

Ministerio de Salud. 2021. Decreto 11 Decreta Alerta Sanitaria por el periodo que señala y otorga facultades extraordinarias que indica por presencia de veneno amnésico de los mariscos. Diario Oficial de la República de Chile. Santiago, Chile.

Montero, P., Daneril, G., Tapia, F., Iriarte, J., Crawford, D. 2017. Diatoms blooms and primary production in a channel ecosystem. *Latin American Journal of Aquatic Research* 45(5): 999-1016.

Morabito, S., Silvestro S. & Faggio, C. 2018. How the marine biotoxins affect human health. *Natural Product Research*. Vol. 32, n° 6, 621-631.

Moreno-Pino, M., Krock, B., De la Iglesia, R., Echenique-Subiabre, I., Pizarro, G., Vásquez, M. & Trefault, N. 2018. Next Generation Sequencing and mass spectrometry reveal high taxonomic diversity and complex phytoplankton-phycotoxins patterns in Southern Pacific fjords. *Toxicon* 151: 5-14.

National Association of Testing Authorities (NATA). 2018. Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods test methods. <https://nata.com.au/files/2021/05/Validation-and-Verification-of-Quantitative-and-Qualitative-Test-Methods.pdf>, consultado el 7 de febrero de 2022.

Nelson, D. & Cox, M. 2013. *Lehninger. Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman and Company. New York, USA. 1328 pp.

Neves, R., Nascimineto, S. & Santos, L. 2021. Harmful algal blooms and shellfish in the marine environment: an overview of the main molluscan responses, toxin dynamics, and risks for human health. *Environmental Science and Pollution Research*. 28, 55846-55868 (2021).

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2005. Biotoxinas Marinas. Estudio FAO: alimentación y nutrición. <https://www.fao.org/3/y5486s/y5486s00.htm>, consultado el 6 de marzo de 2022.

Pérez, R. 2002. Validación de la metodología para la determinación de ácido domoico en moluscos bivalvos por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública 19 (3): 142-145.

Pulido, O. 2008. Domoic Acid Toxicologic Pathology: A Review. Marine Drugs. 6: 180-219.

Quilliam, M. 2003. Chemical methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin. En Hallegraeff, G., Anderson, D., Cembella, A. Manual on Harmful Marine Microalgae. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO). Paris, France. 793 pp.

Radio Bío Bío. 2021. Levantan prohibición para extraer mariscos tras presencia de marea roja en zona de Hualaihue. <https://www.biobiochile.cl/noticias/nacional/region-de-los-lagos/2021/11/11/levantan-prohibicion-para-extraer-mariscos-tras-presencia-de-marea-roja-en-zona-de-hualaihue.shtml>, consultado el 12 de enero de 2022.

Radio Sago. 2021. Sernapesca informó nuevas aperturas y cierres de áreas por presencia de marea roja. <https://www.radiosago.cl/sernapesca-informo-nuevas-aperturas-y-cierres-de-areas-por-presencia-de-marea-roja/>, consultado el 12 de enero de 2022.

Ribeiro, A., Lopes, R. & de Oliveira. 2021. ISO/IEC 17025: History, and introduction of concepts. Química Nova. Vol. 44, N°6: 792-796.

Saeed, A., Awan, S., Ling S., Wang, R. & Wang S. 2017. Domoic acid: Attributes, exposure risks, innovative detection techniques and therapeutics. Algal Research 24: 97–110.

Sadjadi, S. 2019. ¿Por qué C18 es la fase estacionaria más popular par fase reversa?. <https://phenomenex.blog/2019/10/09/fase-estacionaria/>, consultado el 6 de marzo de 2022.

Sandoval, M., Parada, C. & Torres, R. 2018. Proposal of an integrated system for forecasting Harmful Algal Blooms (HAB) in Chile. *Latin American Journal of Aquatic Research* 46(2): 424-451.

Saxena, N. 2020. pH ¿Por qué es crítico para su desarrollo del método de la fase móvil?. Phenomenex. <https://phenomenex.blog/2020/09/08/ph-2/>, consultado el 12 de febrero de 2022.

Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA). 2018. Guía de Validación de Métodos Analíticos. En: Manual de Inocuidad y Certificación. Ministerio de Economía, Fomento y Turismo. Santiago, Chile.

Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA). 2020. Manual de Inocuidad y Certificación. Ministerio de Economía, Fomento y Turismo. Santiago, Chile.

Smith, J., Connel, P., Evans, R., Gellene, A., Howard, M., Jones, B., Kaveggia, S., Palmer, L., Schnetzer, A., Seegers, B., Seubert, E., Tatters, A & Caron. D. 2018. A decade and a half of *Pseudo-nitzschia* spp. and domoic acid along the coast of southern California. *Harmful Algae* 79: 87–104.

Soy Chile. 2020. Detectan veneno amnésico de los moluscos en sector costero entre Puerto Montt y Calbuco. <https://www.soychile.cl/Puerto-Montt/Vision-Acuicola/2020/12/19/686466/Detectan-veneno-amnesico-de-los-moluscos-en-sector-costero-de-Puerto-Montt.aspx>, consultado el 12 de enero de 2022.

Stewart, T. & McLeod, C. 2014. The Laboratory Mouse in Routine Food Safety Testing for Marine Algal Biotoxins and Harmful Algal Bloom Toxin Research: Past, Present and Future. *Journal of AOAC International* Vol. 97, N° 2.

Suarez-Isla, B., López, A., Hernández, C., Clément, A. & Guzmán, L. 2002. Impacto económico de las microalgas nocivas en Chile y datos recientes sobre la ocurrencia de veneno amnésico de los mariscos. En: Sar, E., Ferrario, M. & Reguera, B. *Floraciones Algas Nocivas en el Cono Sur Americano (Primera Edición)*. Instituto Español de Oceanografía. Madrid, España. 311 pp.

Takemoto, T. & Daigo, K. 1958. Constituent of *Chondria armata*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 6: 578-580.

Thompson, M., Ellison, S. & Wood, R. 2002. Harmonized Guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. Pure and Applied Chemistry. Vol. 75, N°5: 835-855.

Todd, E. 1993. Domoic acid and amnesic shellfish poisoning – a review. Journal of Food Protection Vol. 56, N° I: 69-83.

Turner, D., Lewis, A., Bradley, K., Maskrey, B. 2021. Marine invertebrate interaction with Harmful Algal Blooms. Implications for One Health. Journal of Invertebrate Pathology 186: 107555.

Visciano, P., Schirone M., Berti M., Milandri A., Tofalo R. & Suzzi, G. 2016. Marine Biotoxins: Occurrence, Toxicity, Regulatory Limits and Reference Methods. Frontiers in Microbiology. 7: 1051.



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS  
BIOLOGÍA



**LIBRO DE ANEXOS**

**VERIFICACIÓN DEL MÉTODO DE DETECCIÓN DE VENENO  
AMNÉSICO DE MOLUSCO (VAM) POR CROMATOGRAFÍA  
LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECTOR DE ARREGLO  
DE DIODOS (HPLC-DAD)**

FRANCISCO JAVIER PEÑA VÁSQUEZ

HABILITACIÓN PROFESIONAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
BIÓLOGO

CONCEPCIÓN - CHILE

MARZO, 2022

## ÍNDICE LIBRO DE ANEXOS

		PÁGINA
	<b>INTRODUCCIÓN</b>	2
<b>Anexo 1</b>	Informe Análisis preliminar VAM: Matriz central cholga	3
<b>Anexo 2</b>	Informe Análisis preliminar VAM: Matriz complementaria almeja	8
<b>Anexo 3</b>	Informe Análisis preliminar VAM: Matriz complementaria huepo	11
<b>Anexo 4</b>	Informe Análisis preliminar VAM: Matriz complementaria navajuela	14
<b>Anexo 5</b>	Informe Selectividad VAM: Matriz central cholga	18
<b>Anexo 6</b>	Informe Selectividad VAM: Matriz complementaria almeja	26
<b>Anexo 7</b>	Informe Selectividad VAM: Matriz complementaria huepo	30
<b>Anexo 8</b>	Informe linealidad VAM	34
<b>Anexo 9</b>	Informe Límites VAM	50
<b>Anexo 10</b>	Informe Repetibilidad VAM: Matriz central cholga	64
<b>Anexo 11</b>	Informe Reproducibilidad VAM: Matriz central cholga	70
<b>Anexo 12</b>	Informe Sesgo VAM: Matriz central cholga	85
<b>Anexo 13</b>	Informe Recuperación: VAM Matriz central cholga	91
<b>Anexo 14</b>	Informe Recuperación VAM Matriz complementaria almeja	102
<b>Anexo 15</b>	Informe Recuperación VAM Matriz complementaria huepo	112
<b>Anexo 16</b>	Instructivo para determinación de toxina amnésica de molusco (VAM) Método HPLC/DAD basado en Quilliam et al. (1995)	122

## **INTRODUCCIÓN**

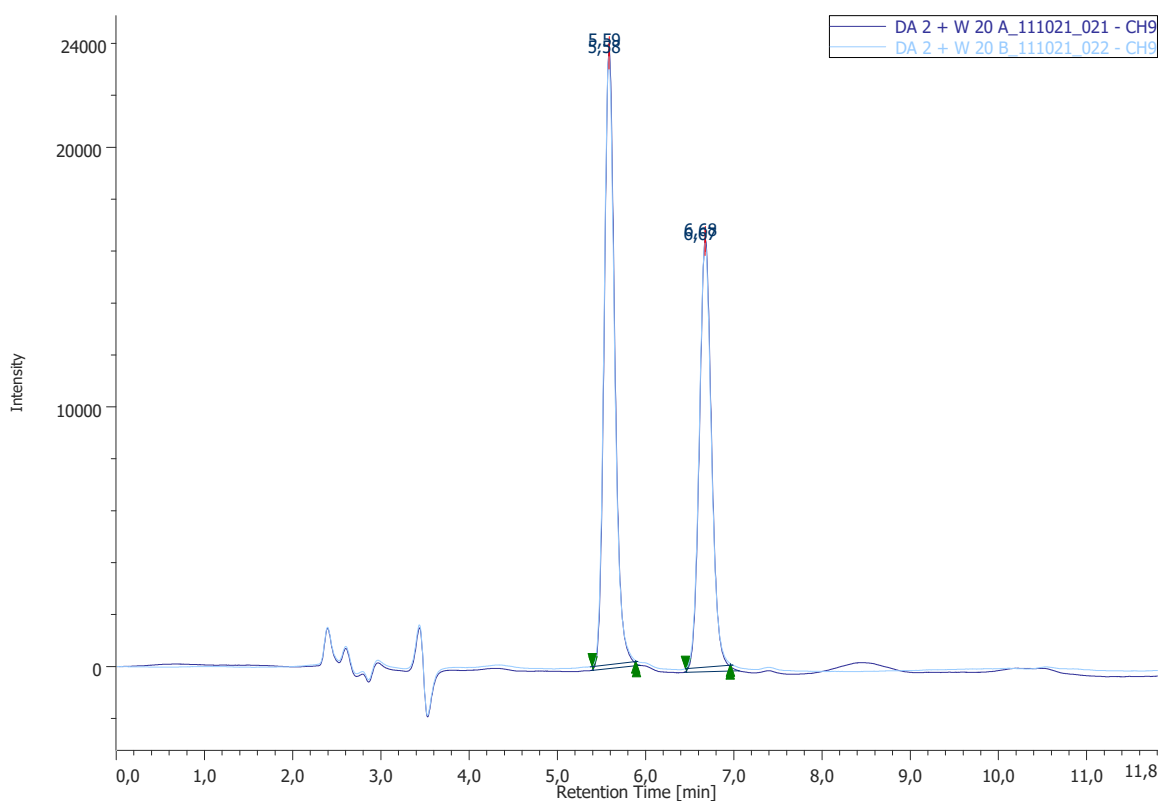
En este libro de anexos se recopilan todos los informes y cromatogramas generados durante la Habilitación Profesional “Verificación del método de detección de VAM por HPLC-DAD” realizada en el Laboratorio de Biotoxinas UdeC (LBTx-UdeC)

Se decidió crear un libro independiente para facilitar al lector la revisión simultánea del Informe de Habilitación Profesional y de los demás productos generados durante este trabajo.

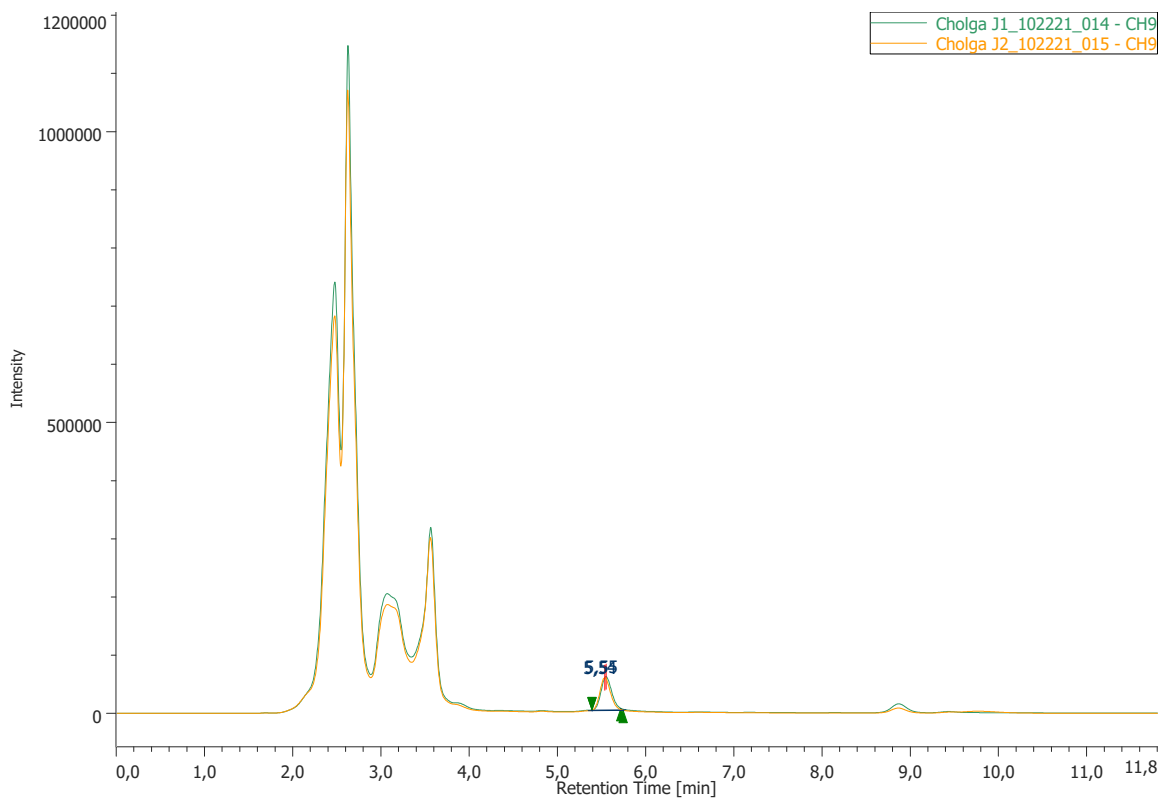
La Habilitación Profesional es una vía de titulación nueva y distinta para los estudiantes de Biología. Por tanto, se consideró oportuno recopilar todo el trabajo profesional que hay detrás de la misma, el cual es sumamente distinto pero igualmente exigente y riguroso que el de un trabajo de investigación.

**Objetivo:** Determinar la ausencia de señales cromatográficas atribuibles al ácido domoico en las distintas muestras de matriz central cholga.

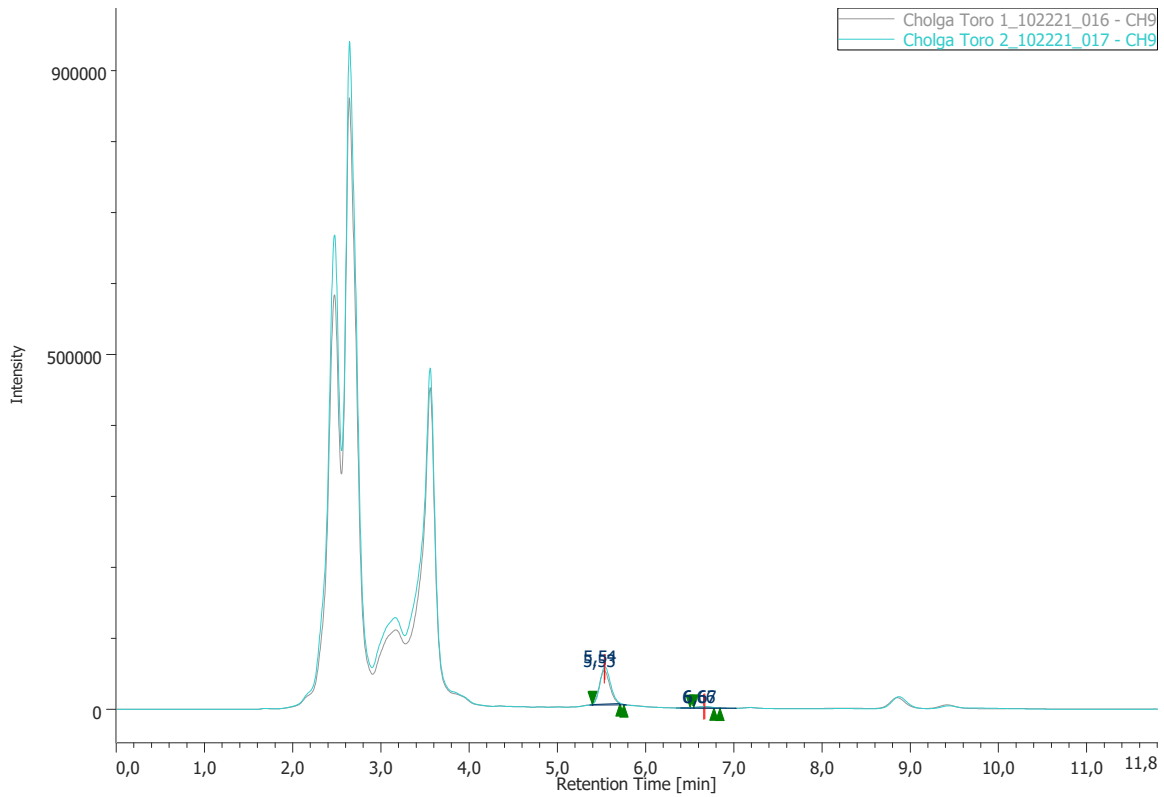
**Metodología:** Se realizaron extracciones y análisis de ácido domoico en 3 muestras duplicadas de cholga de distinta procedencia según el Instructivo P-VAM-01. La presencia o ausencia del ácido domoico fue determinada según el método del patrón externo. Para ello, se analizó una muestra la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL.



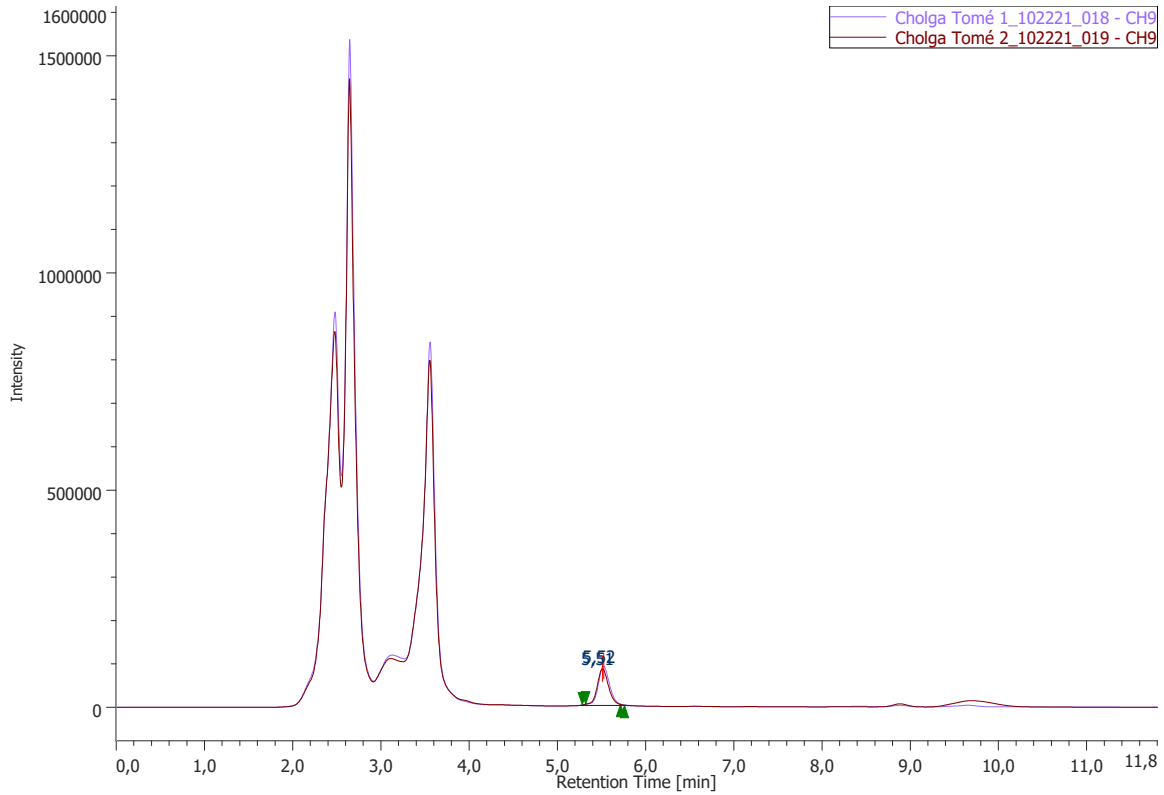
**Figura 1.** Cromatogramas a 242 nm de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL, inyecciones A y B.




**Figura 2.** Cromatogramas a 242 nm de la muestra de Cholga Jumbo (J), réplicas 1 y 2.



**Figura 3.** Cromatogramas a 242 nm de la muestra de Cholga Isla Toro, réplicas 1 y 2.



**Figura 4.** Cromatogramas a 242 nm de las muestra de Cholga Tomé, réplicas 1 y 2.

	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME ANÁLISIS PRELIMINAR VAM</b> <b>Matriz central Cholga</b>  <b>Fecha: 22-10-2021</b>

**Tabla 1.** Identificación de picos cromatográficos de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL, inyecciones A y B. Las letras W y DA corresponden a Triptófano y Ácido domoico respectivamente.

Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
DA 2 + W 20 A	W	5,59	202181	23853	55,554	58,875	N/A	10675	4,691	1,180
DA 2 + W 20 A	DA	6,68	161753	16662	44,446	41,125	N/A	11444	N/A	1,108
DA 2 + W 20 B	W	5,58	197824	23413	55,707	58,916	N/A	10692	4,701	1,179
DA 2 + W 20 B	DA	6,67	157294	16327	44,293	41,084	N/A	11497	N/A	1,103

**Tabla 2.** Identificación de picos cromatográficos de las muestras de Cholga Jumbo, Isla Toro y Tomé con sus réplicas 1 y 2. Las letras W y DA corresponden a Triptófano y Ácido domoico respectivamente.

Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor	Warning
Cholga J1	W	5,55	481092	57216	100,000	100,000	N/A	9990	N/A	1,165	
Cholga J2	W	5,54	476600	56619	100,000	100,000	N/A	10016	N/A	1,149	
Cholga Toro 1	W	5,53	388107	47367	94,343	95,701	N/A	10248	4,167	1,125	
Cholga Toro 1	DA	6,66	23272	2128	5,657	4,299	N/A	6766	N/A	N/A	
Cholga Toro 2	W	5,54	457041	53497	94,932	96,036	N/A	9859	4,178	1,198	
Cholga Toro 2	DA	6,67	24400	2208	5,068	3,964	N/A	6911	N/A	N/A	
Cholga Tomé 1	W	5,52	812530	90606	100,000	100,000	N/A	9438	N/A	1,026	
Cholga Tomé 2	W	5,51	760509	84315	100,000	100,000	N/A	9482	N/A	1,055	

**Conclusión:** Las muestra de Cholgas de Isla Toro presenta una pequeña señal cromatográficas, cuyo tiempo de retención coincide con el del Ácido Domoico (DA) de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL.

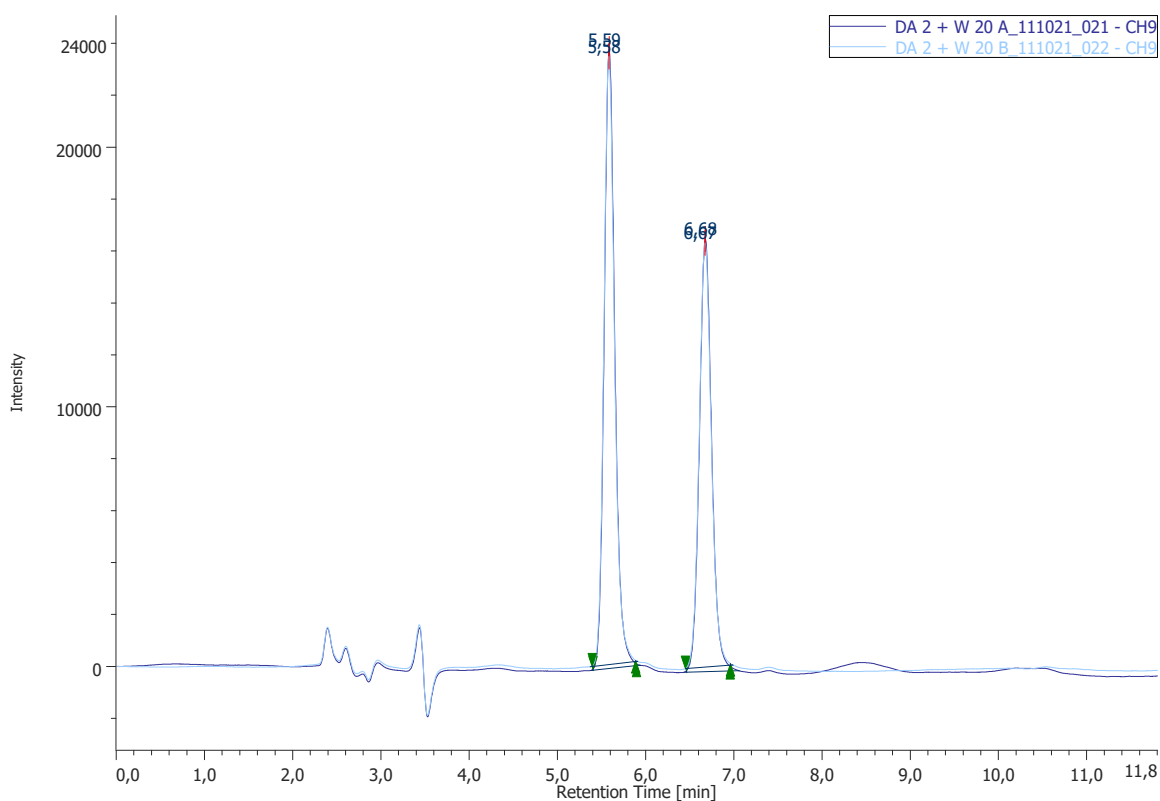
Las muestras Cholga Jumbo y Tomé presentan señales cromatográficas que coinciden con el tiempo de retención del triptófano (W) presente en la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL.

Se concluye que las muestras sin señales cromatográficas atribuibles al ácido domoico son Cholgas Jumbo y Tomé.

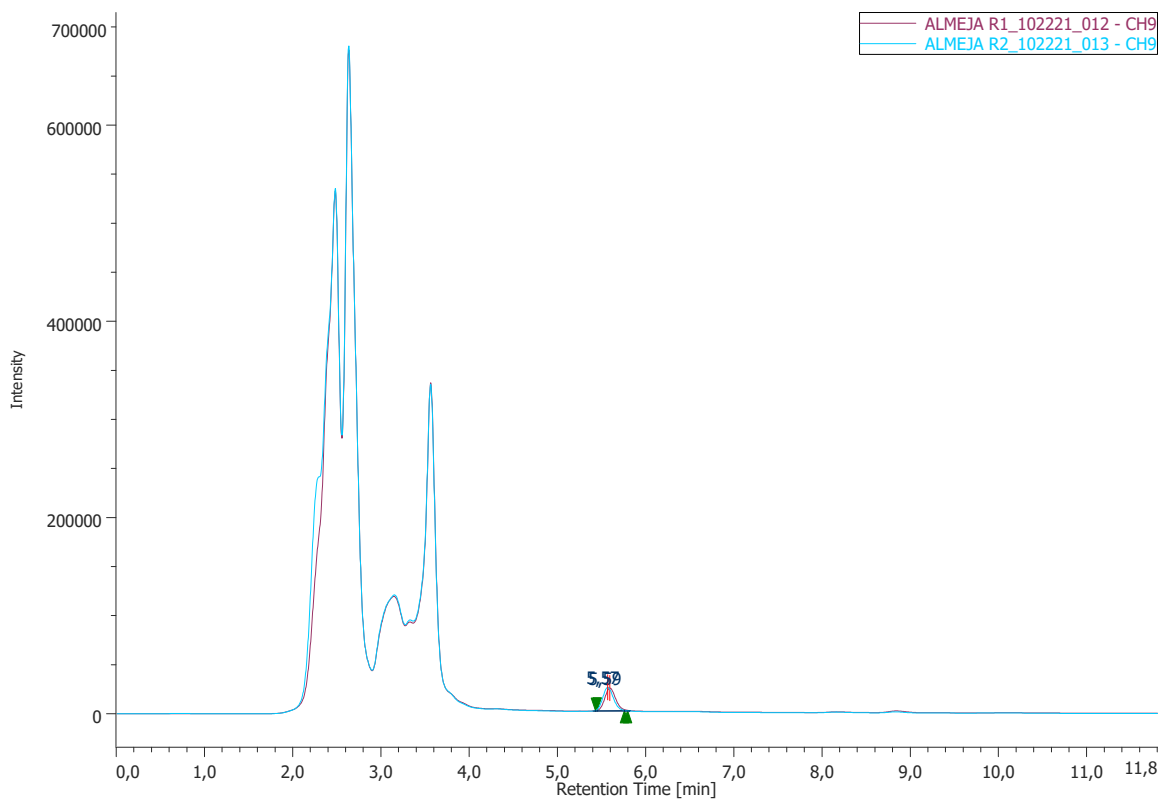


**Objetivo:** Determinar la ausencia de señales cromatográficas atribuibles al ácido domoico en las distintas muestras de matriz complementaria almeja.


**Metodología:** Se realizaron extracciones y análisis de ácido domoico en una muestra duplicada de Almeja de la misma procedencia según el Instructivo P-VAM-01. La presencia o ausencia del ácido domoico fue determinada según el método del patrón externo. Para ello, se analizó una muestra de la mezcla 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL (ver anexo 1 del Instructivo P-VAM-01).



**Figura 1.** Cromatogramas a 242 nm de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL, inyecciones A y B.



**Figura 2.** Cromatogramas a 242 nm de la muestra 1 del pool de selectividad. Réplica 1, Inyecciones A y B.

	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME ANÁLISIS PRELIMINAR VAM</b> <b>Matriz complementaria Almeja</b>  <b>Fecha: 22-10-2021</b>

**Tabla 1.** Identificación de picos cromatográficos de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL, inyecciones A y B. Las letras W y DA corresponden a Triptófano y Ácido domoico respectivamente.

Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
DA 2 + W 20 A	W	5,59	202181	23853	55,554	58,875	N/A	10675	4,691	1,180
DA 2 + W 20 A	DA	6,68	161753	16662	44,446	41,125	N/A	11444	N/A	1,108
DA 2 + W 20 B	W	5,58	197824	23413	55,707	58,916	N/A	10692	4,701	1,179
DA 2 + W 20 B	DA	6,67	157294	16327	44,293	41,084	N/A	11497	N/A	1,103

**Tabla 2.** Identificación de picos cromatográficos de la muestra de Almeja, replicas 1 y 2 (R1 y R2). La letras W corresponden a Triptófano.

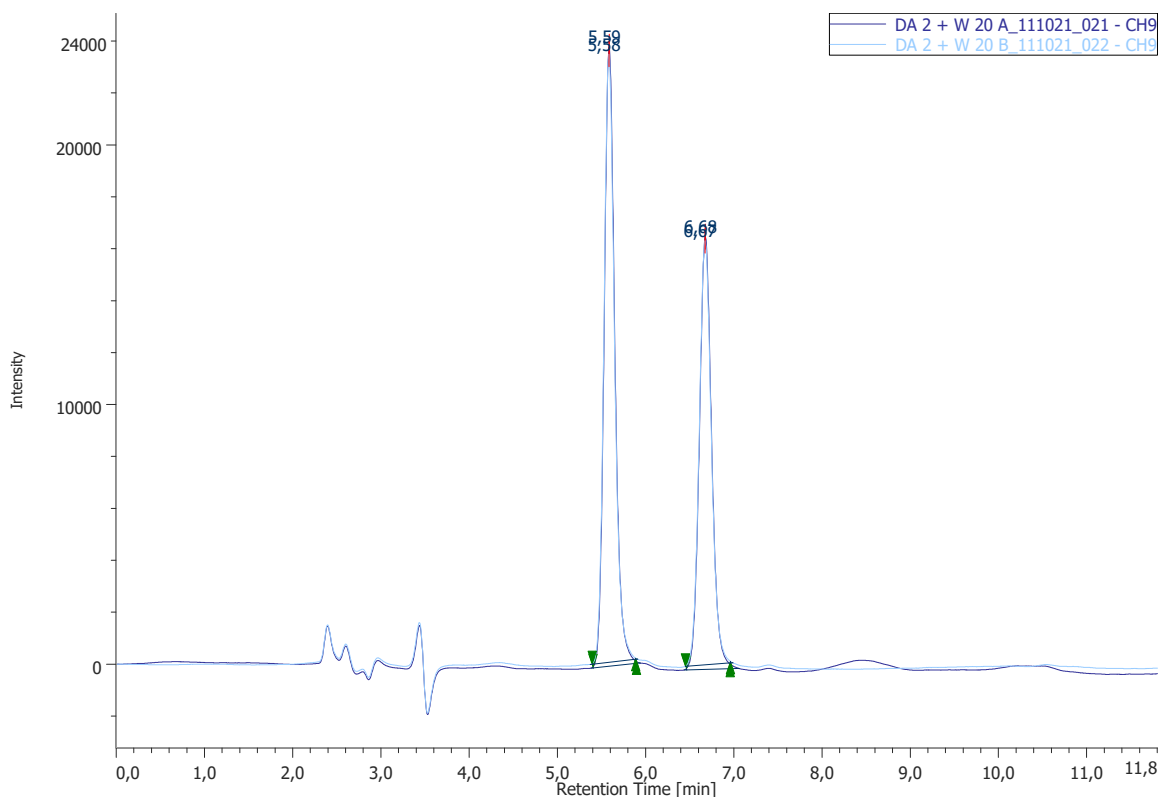
Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
Almeja R1	W	5,59	197259	23143	100,000	100,000	N/A	10019	N/A	1,143
Almeja R2	W	5,57	205084	24123	100,000	100,000	N/A	9984	N/A	1,155

**Conclusión:** La muestra de almeja, replicas 1 y 2, presenta señales cromatográficas que coinciden con el tiempo de retención del triptófano (W) presente en la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL. Mas no presenta señales cromatográficas que coincidan con el tiempo de retención del Ácido Domoico (DA) de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL.

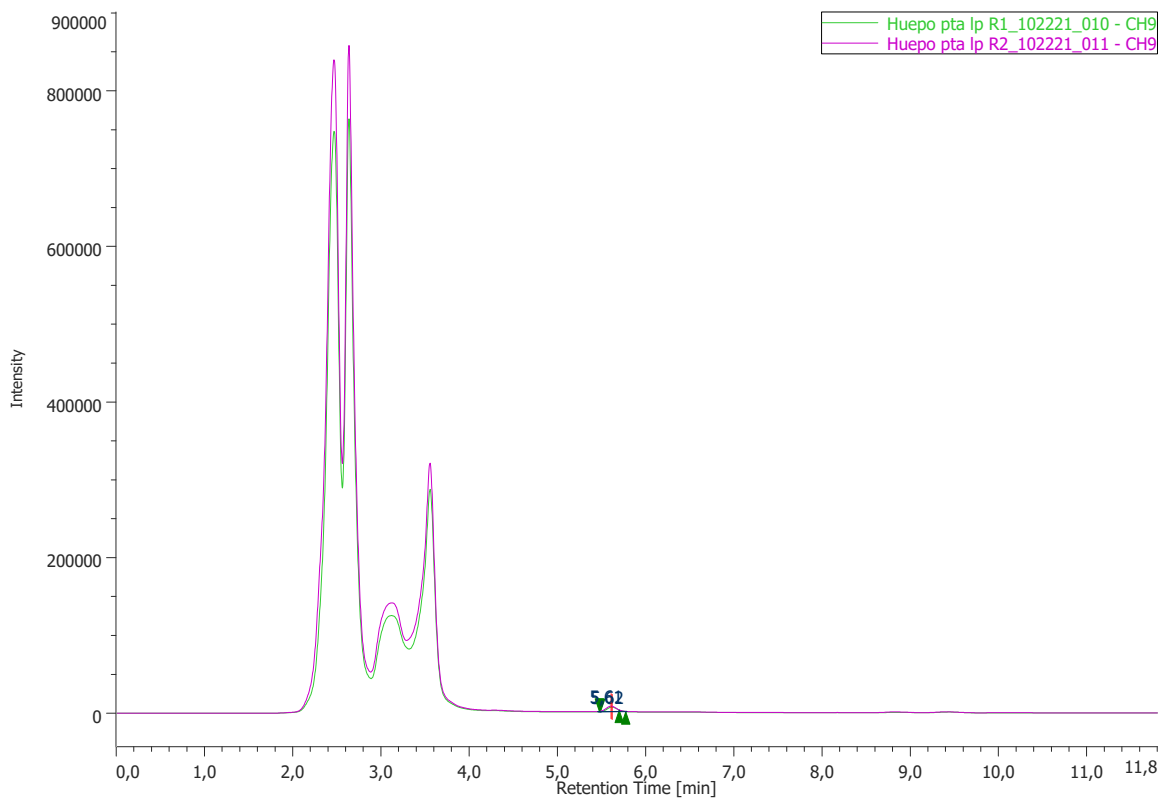
Por tanto, se concluye que la muestra de almeja no presenta señales cromatográficas atribuibles al ácido domoico.

**Objetivo:** Determinar la ausencia de señales cromatográficas atribuibles al ácido domoico en las distintas muestras de matriz complementaria Huevo.


**Metodología:** Se realizaron extracciones y análisis de ácido domoico en una muestra duplicada de Huevo de la misma procedencia según el Instructivo P-VAM-01. La presencia o ausencia del ácido domoico fue determinada según el método del patrón externo. Para ello, se analizó una muestra de la mezcla 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL (ver anexo 1 del Instructivo P-VAM-01).



**Figura 1.** Cromatogramas a 242 nm de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL, inyecciones A y B.



**Figura 2.** Cromatogramas a 242 nm de la muestras de Huevo, Réplicas 1 y 2 (R1 y R2).

	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME ANÁLISIS PRELIMINAR VAM</b> <b>Matriz complementaria Huevo</b>  <b>Fecha: 22-10-2021</b>

**Tabla 1.** Identificación de picos cromatográficos de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL, inyecciones A y B. Las letras W y DA corresponden a Triptófano y Ácido domoico respectivamente.

Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
DA 2 + W 20 A	W	5,59	202181	23853	55,554	58,875	N/A	10675	4,691	1,180
DA 2 + W 20 A	DA	6,68	161753	16662	44,446	41,125	N/A	11444	N/A	1,108
DA 2 + W 20 B	W	5,58	197824	23413	55,707	58,916	N/A	10692	4,701	1,179
DA 2 + W 20 B	DA	6,67	157294	16327	44,293	41,084	N/A	11497	N/A	1,103

**Tabla 2.** Identificación de picos cromatográficos de la muestra de Huevo, réplicas 1 y 2 (R1 y R2). La letras W corresponden a Triptófano.

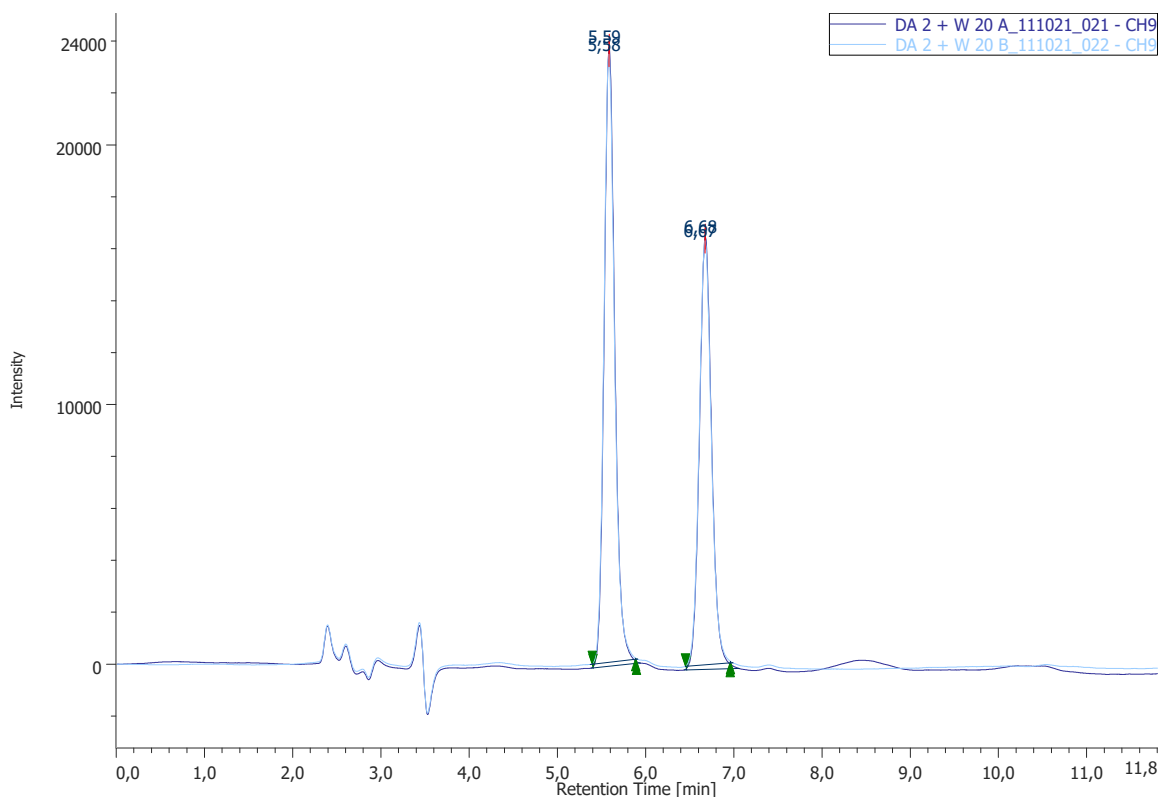
Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
Huevo R1	W	5,62	48971	6052	100,000	100,000	N/A	10648	N/A	1,037
Huevo R2	W	5,61	53396	6901	100,000	100,000	N/A	10414	N/A	N/A

**Conclusión:** La muestra de Huevo, replicas 1 y 2, presenta señales cromatográficas que coinciden con el tiempo de retención del triptófano (W) presente en la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL. Mas no presenta señales cromatográficas que coincidan con el tiempo de retención del Ácido Domoico (DA) de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL.

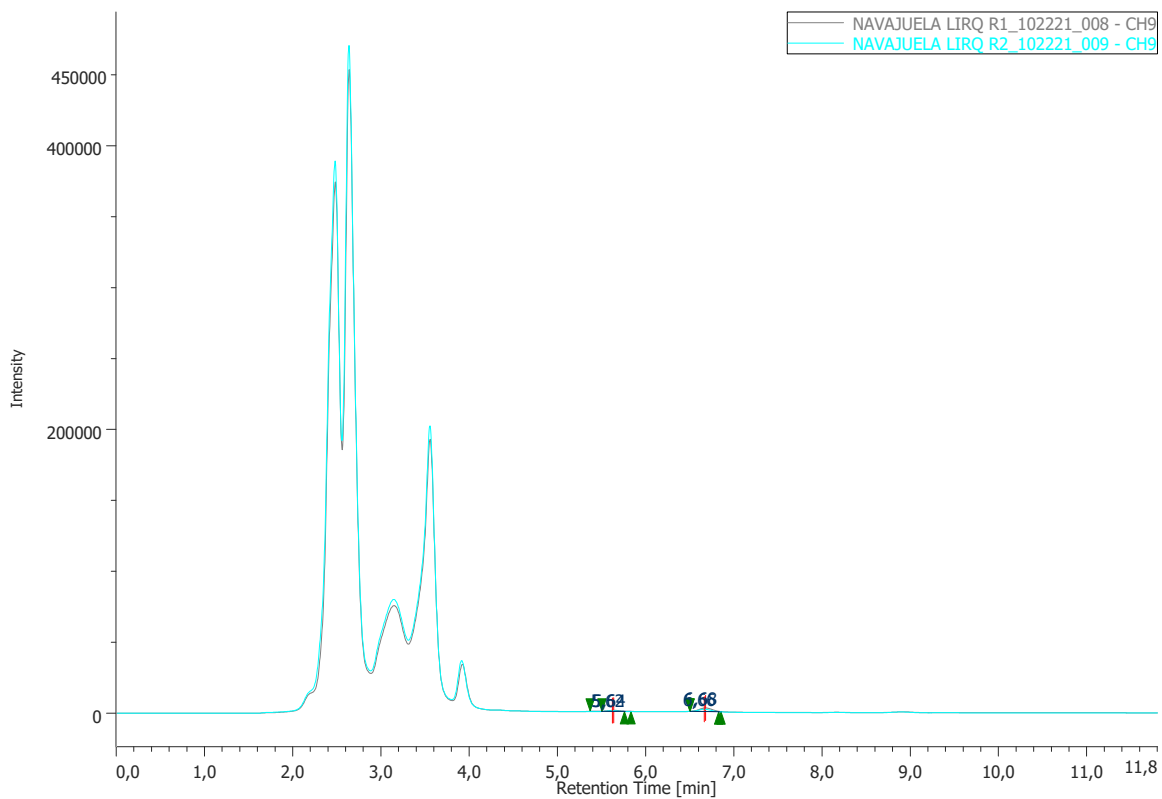
Por tanto, se concluye que la muestra de Huevo no presenta señales cromatográficas atribuibles al ácido domoico.

**Objetivo:** Determinar la ausencia de señales cromatográficas atribuibles al ácido domoico en las distintas muestras de matriz complementaria Navajuela.

**Metodología:** Se realizaron extracciones y análisis de ácido domoico en una muestra duplicada de Navajuela de la misma procedencia según el Instructivo P-VAM-01. La presencia o ausencia del ácido domoico fue determinada según el método del patrón externo. Para ello, se analizó una muestra de la mezcla 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL (ver anexo 1 del Instructivo P-VAM-01).

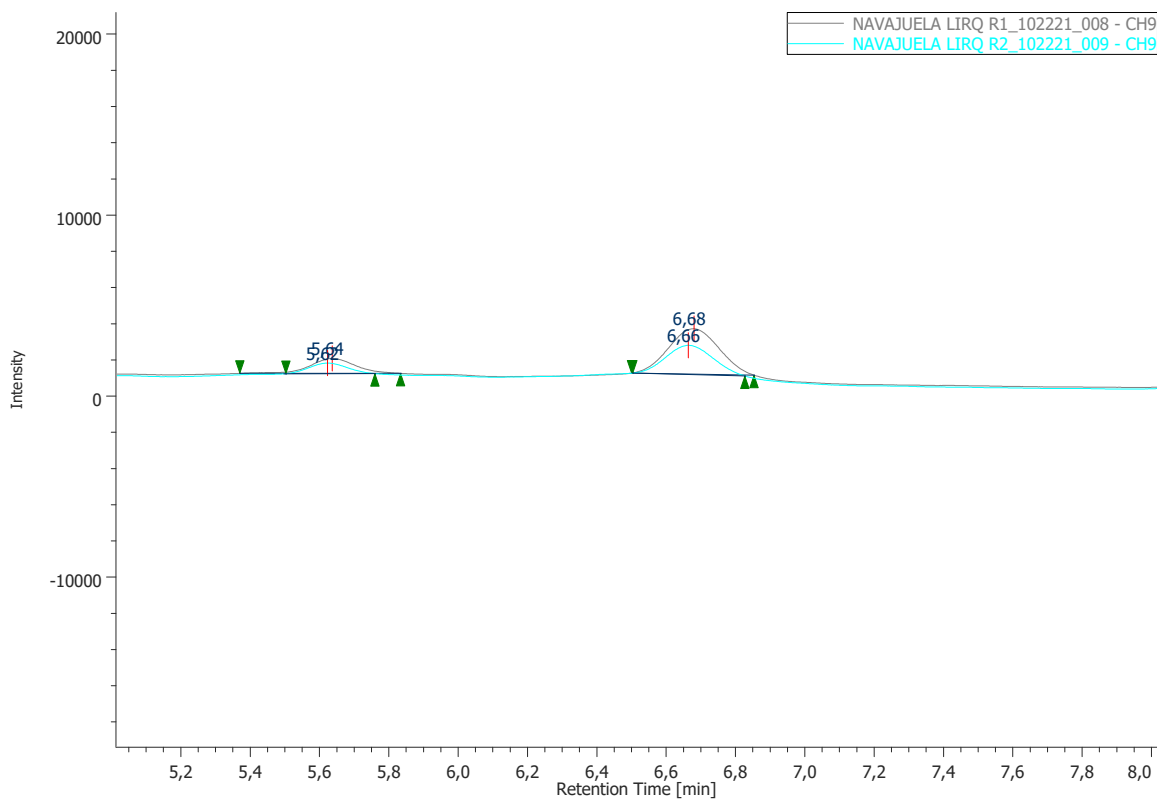


**Figura 1.** Cromatogramas a 242 nm de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL, inyecciones A y B.




**Figura 2.** Cromatogramas a 242 nm de la muestras de Navajuela, Réplicas 1 y 2 (R1 y R2).





**Figura 3.** Cromatogramas a 242 nm de la muestras de Navajuela, Réplicas 1 y 2 (R1 y R2). Vista ampliada de los 5 a 8 minutos.

	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME ANÁLISIS PRELIMINAR</b> <b>Matriz complementaria Navajuela</b>  <b>Fecha: 22-10-2021</b>

**Tabla 1.** Identificación de picos cromatográficos de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL, inyecciones A y B. Las letras W y DA corresponden a Triptófano y Ácido domoico respectivamente.

Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
Navajuela R1	W	5,64	7400	819	22,620	24,557	N/A	9765	4,158	1,024
Navajuela R1	DA	6,68	25315	2516	77,380	75,443	N/A	9437	N/A	1,003
Navajuela R2	W	5,62	4485	590	22,821	26,870	N/A	11703	4,459	1,054
Navajuela R2	DA	6,66	15167	1606	77,179	73,130	N/A	10528	N/A	1,043

**Tabla 2.** Identificación de picos cromatográficos de la muestra de Navajuela, réplicas 1 y 2 (R1 y R2). La letras W y DA corresponden a Triptófano y Ácido Domoico respectivamente.

Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
DA 2 + W 20 A	W	5,59	202181	23853	55,554	58,875	N/A	10675	4,691	1,180
DA 2 + W 20 A	DA	6,68	161753	16662	44,446	41,125	N/A	11444	N/A	1,108
DA 2 + W 20 B	W	5,58	197824	23413	55,707	58,916	N/A	10692	4,701	1,179
DA 2 + W 20 B	DA	6,67	157294	16327	44,293	41,084	N/A	11497	N/A	1,103

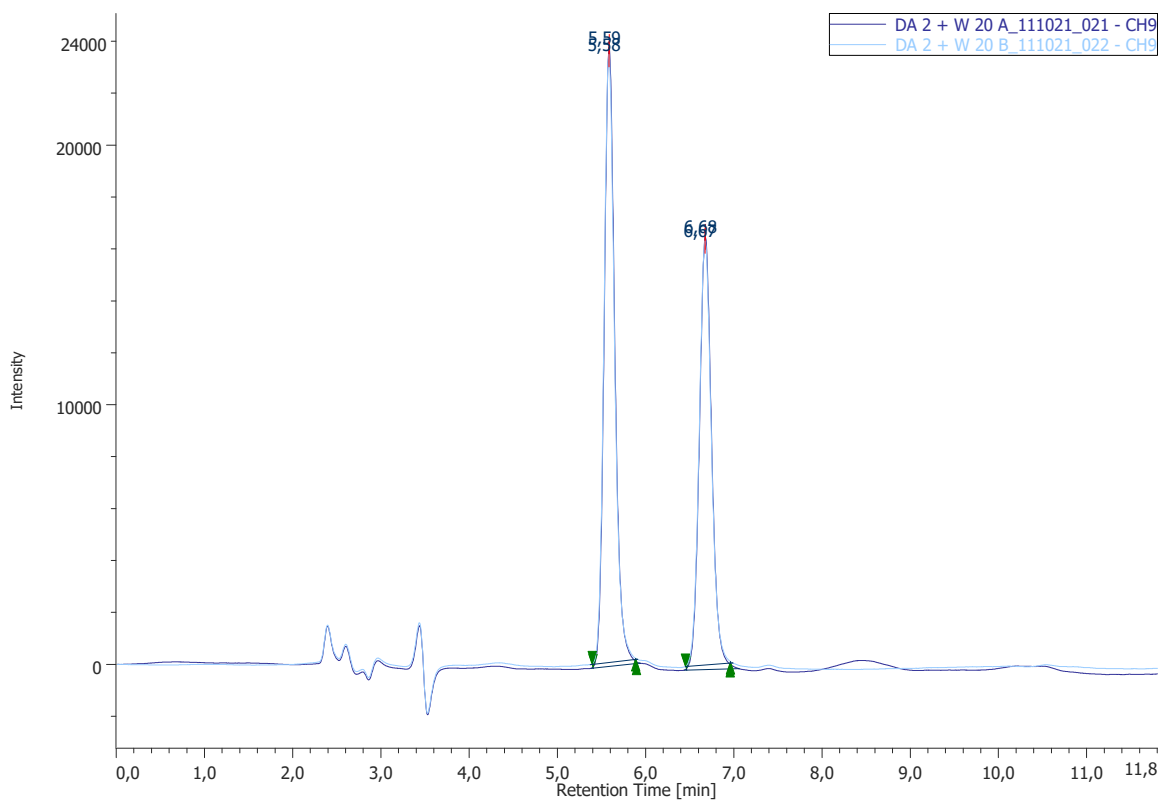
**Conclusión:** La muestra de Navajuela, replicas 1 y 2, presenta señales cromatográficas que coinciden con el tiempo de retención del triptófano (W) presente en la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL. También presenta señales cromatográficas que coinciden con el tiempo de retención del Ácido Domoico (DA) de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL.

Por tanto, se concluye que la muestra de Navajuela sí presenta señales cromatográficas atribuibles al ácido domoico.

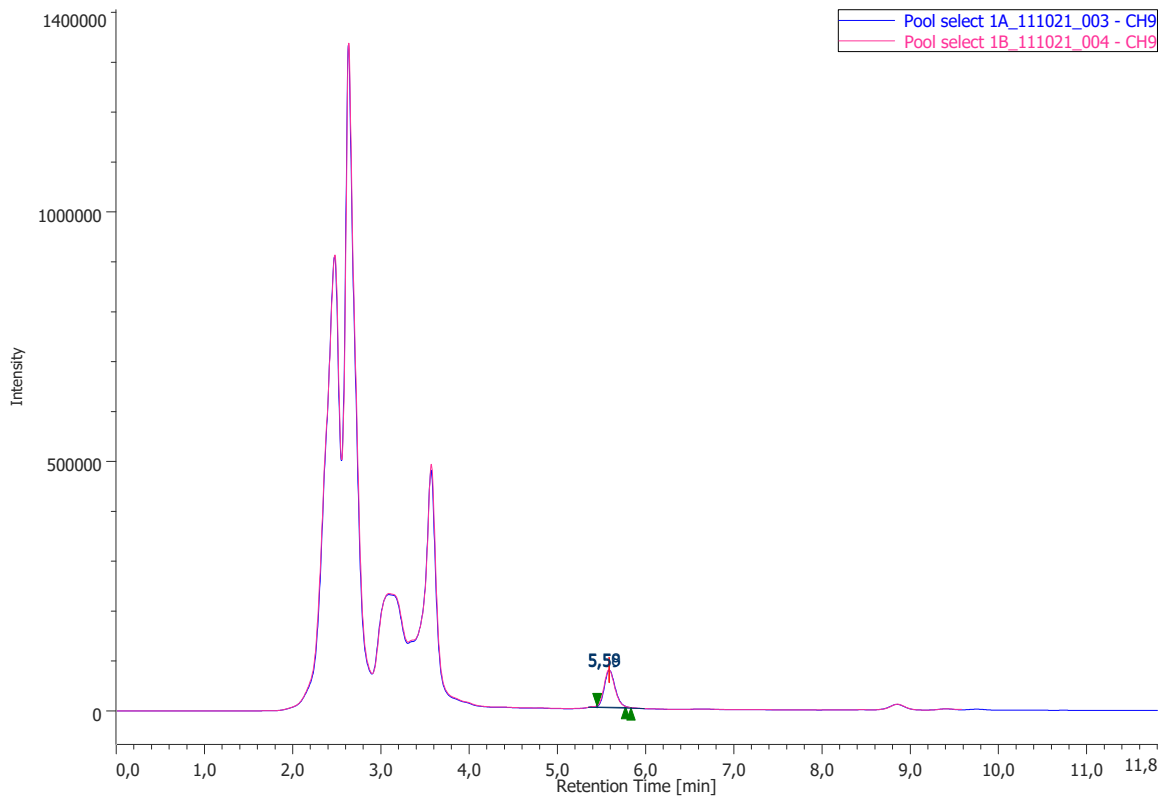
**Objetivo:** Evaluar la selectividad del método de detección de VAM por HPLC-DAD en la matriz central cholga en base a la ausencia de interferentes en la zona del Ácido Domoico.

**Metodología:** Se realizaron extracciones y análisis de ácido domoico en 3 muestras duplicadas de cholga de diferentes orígenes (supermercado Jumbo, Isla Toro y Tomé), según el Instructivo P-VAM-01. Se determinó la presencia o ausencia del ácido domoico comparando respecto una muestra de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL (ver anexo 1 del Instructivo P-VAM-0)

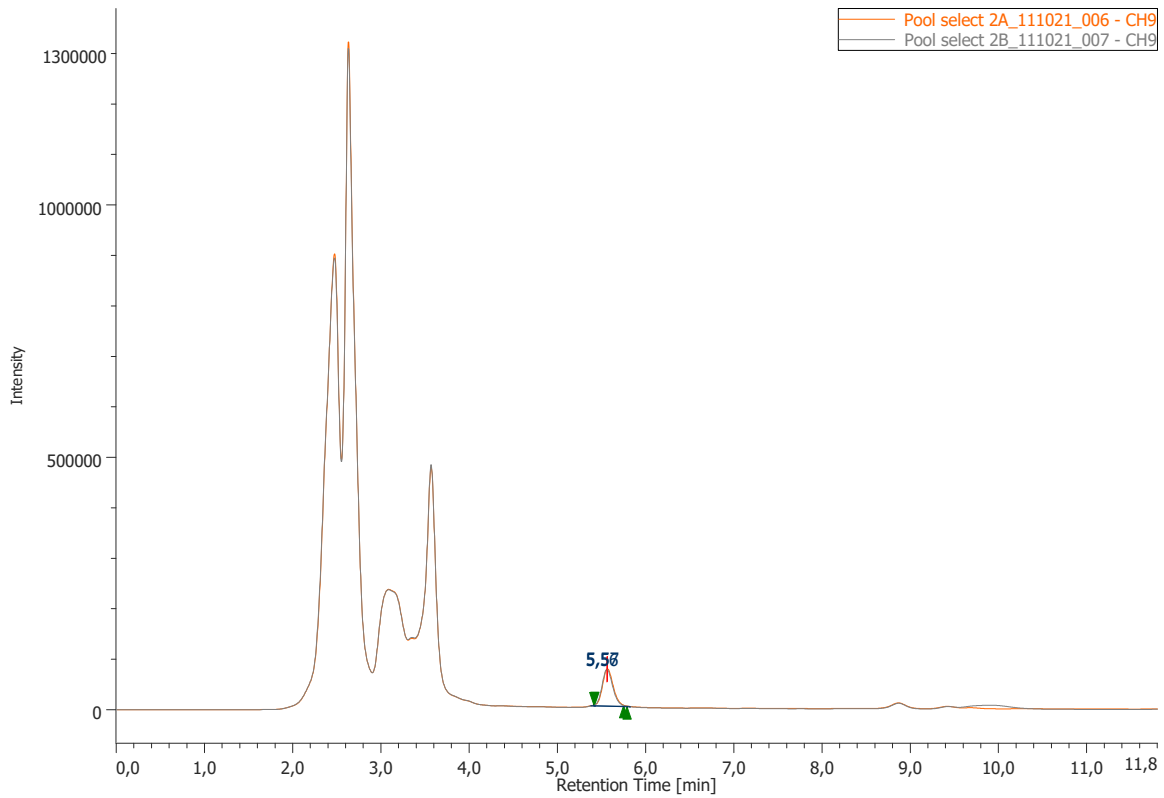
Determinadas las muestras negativas, se realizó un pool con las muestras negativas al ácido domoico. La ausencia de interferentes fue evaluada en los extractos negativos al ácido domoico analizando las señales cromatográficas de cada muestra en la zona de elusión del ácido domoico.



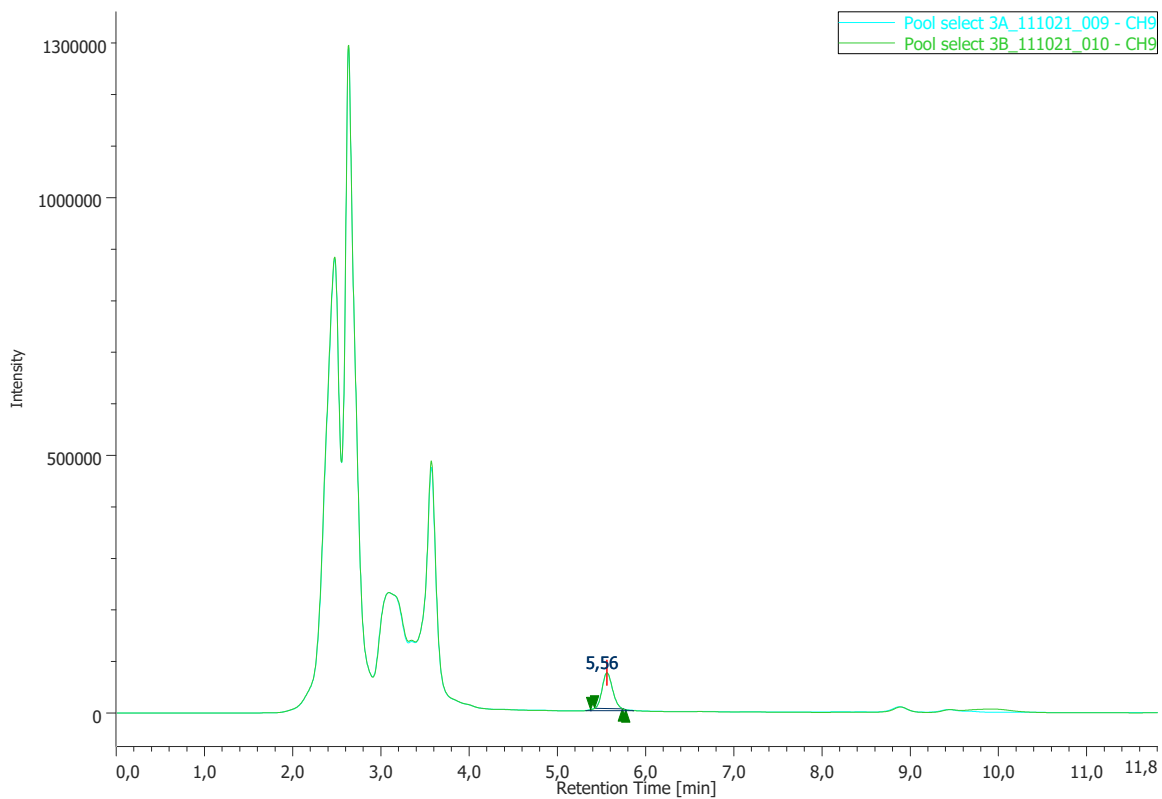
**Figura 1.** Cromatogramas a 242 nm de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL, inyecciones A y B.



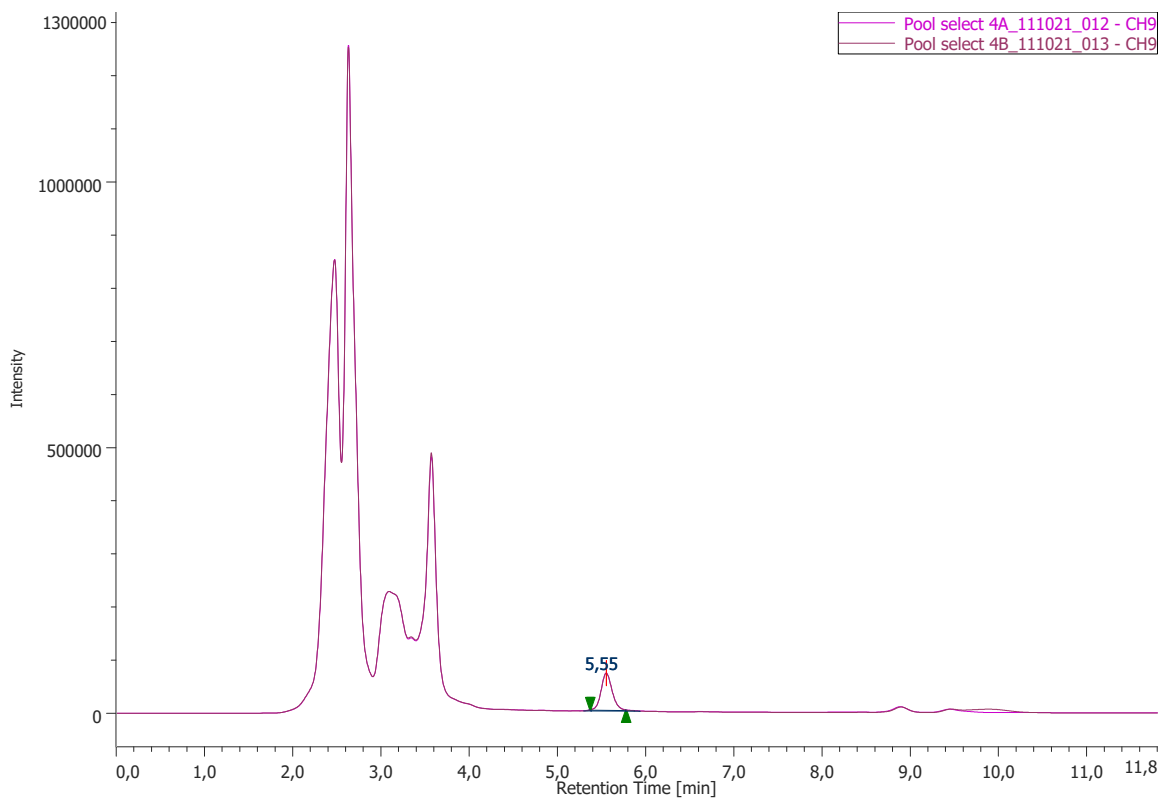
**Figura 2.** Cromatogramas a 242 nm del pool de selectividad. Muestra 1, inyecciones A y B.



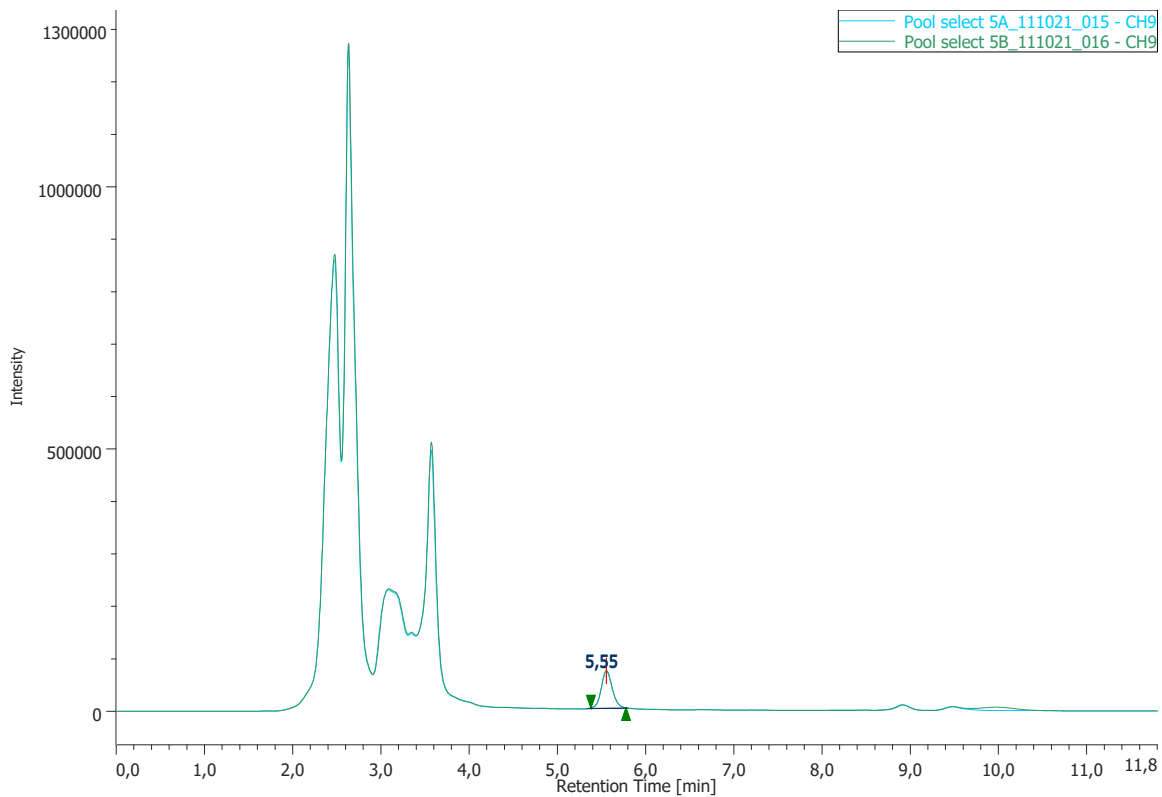
**Figura 3.** Cromatogramas a 242 nm del pool de selectividad. Muestra 2, inyecciones A y B.



**Figura 4.** Cromatogramas a 242 nm del pool de selectividad. Muestra 3, inyecciones A y B.

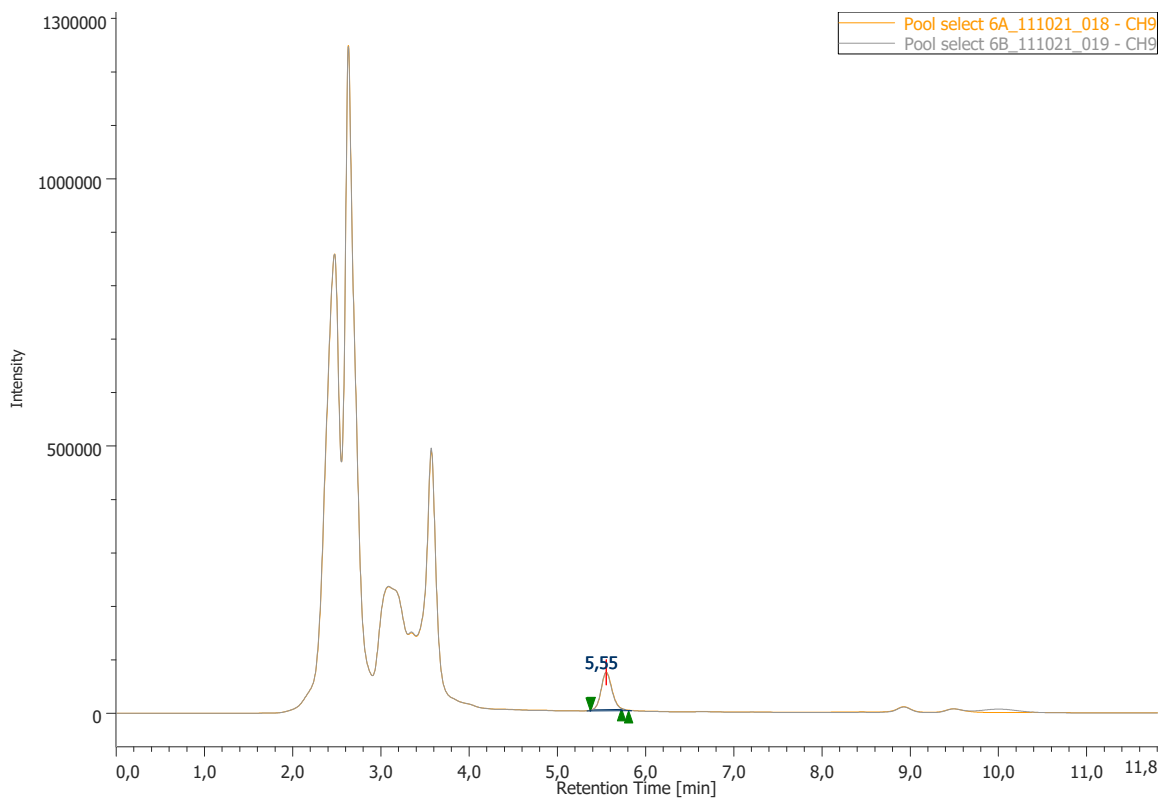


**Figura 5.** Cromatogramas a 242 nm del pool de selectividad. Muestra 4, inyecciones A y B.

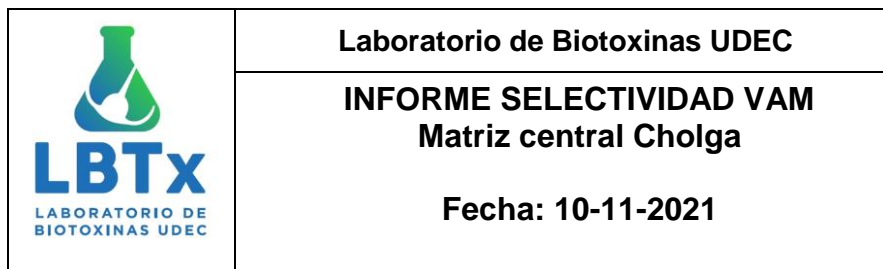


**Figura 6.** Cromatogramas a 242 nm del pool de selectividad. Muestra 5, inyecciones A y B.





**Figura 7.** Cromatogramas a 242 nm del pool de selectividad. Muestra 6, inyecciones A y B.



**Tabla 1.** Identificación de picos cromatográficos de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL, inyecciones A y B. Las letras W y DA corresponden a Triptófano y Ácido domoico respectivamente.

Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
DA 2 + W 20 A	W	5,59	202181	23853	55,554	58,875	N/A	10675	4,691	1,180
DA 2 + W 20 A	DA	6,68	161753	16662	44,446	41,125	N/A	11444	N/A	1,108
DA 2 + W 20 B	W	5,58	197824	23413	55,707	58,916	N/A	10692	4,701	1,179
DA 2 + W 20 B	DA	6,67	157294	16327	44,293	41,084	N/A	11497	N/A	1,103

**Tabla 2.** Identificación de picos cromatográficos en las muestras del pool de cholgas. Las letras W al corresponden al Triptófano.

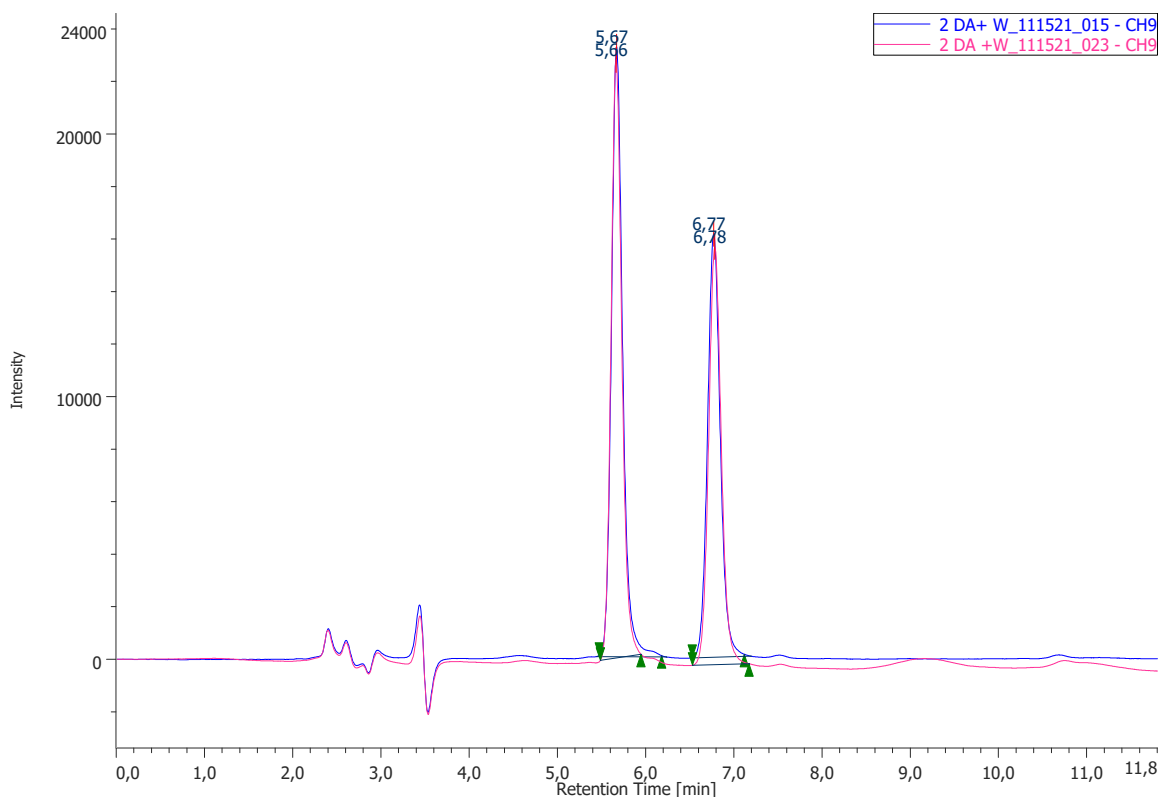
Chromatogram Name	Peak Name	CH	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
Pool select 1A	W		9 5,59	629268	74619	98,231	99,187	N/A	10203	2,854	1,240
Pool select 1B	W		9 5,58	591162	72582	97,898	99,076	N/A	10685	2,802	1,245
Pool select 2A	W		9 5,57	598344	72522	98,436	99,139	N/A	10458	3,053	1,159
Pool select 2B	W		9 5,56	540067	68949	98,191	99,094	N/A	11062	2,966	1,212
Pool select 3A	W		9 5,56	542861	68386	98,430	99,168	N/A	10859	3,096	1,156
Pool select 3B	W		9 5,56	498509	65944	98,179	99,085	N/A	11556	3,150	1,127
Pool select 4A	W		9 5,55	530525	66795	98,476	99,195	N/A	10732	3,186	N/A
Pool select 4B	W		9 5,55	537155	66844	98,358	99,137	N/A	10665	3,160	1,122
Pool select 5A	W		9 5,55	550623	68028	98,496	99,153	N/A	10610	3,313	1,113
Pool select 5B	W		9 5,55	596310	71153	98,557	99,162	N/A	10048	3,273	N/A
Pool select 6A	W		9 5,55	592543	70598	98,630	99,182	N/A	9987	3,314	N/A
Pool select 6B	W		9 5,55	538357	67358	98,405	99,127	N/A	10668	3,300	1,166

**Conclusión:** La zona de elusión del ácido domoico se distribuye entre los 6,4 a 6,9 minutos.

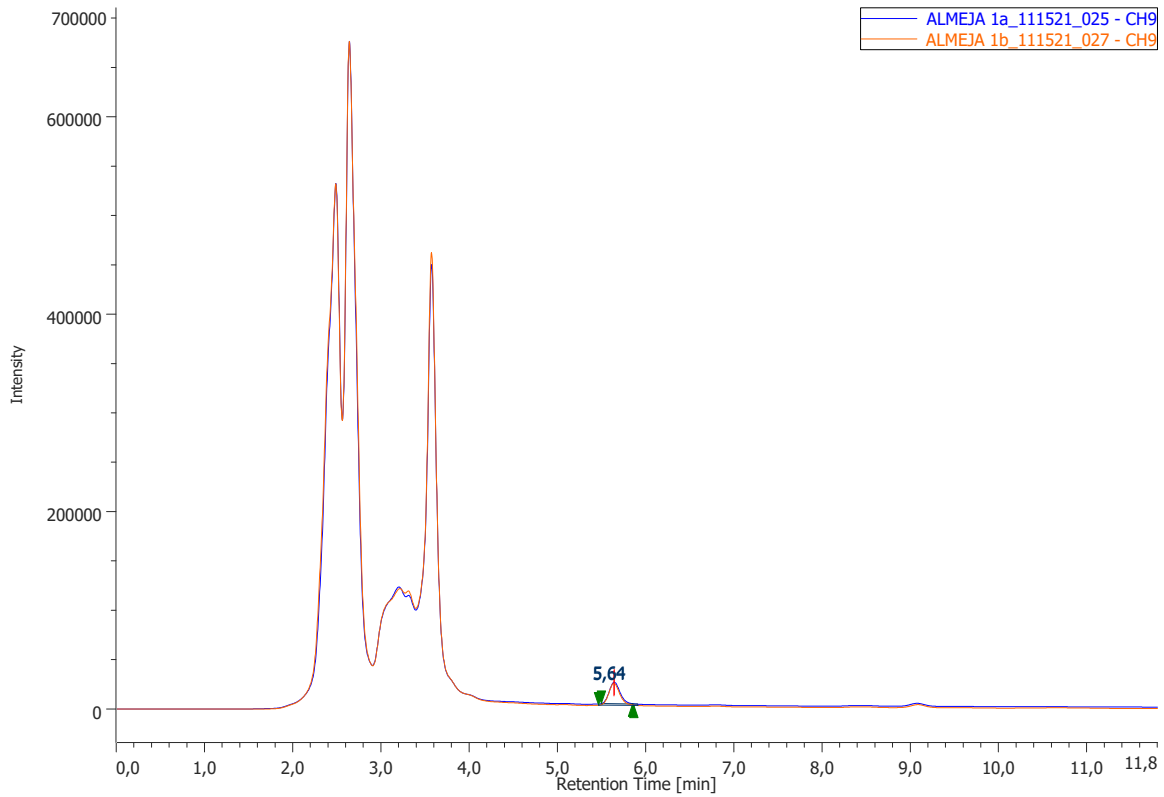
Los cromatogramas de las muestras del Pool de Cholgas negativas al ácido domoico no presentan interferentes en la zona de elusión del Ácido Domoico. Por tanto, se concluye que el método de detección de VAM por HPLC-DAD es selectivo para el analito Ácido Domoico en la matriz central cholga.

**Objetivo:** Evaluar la selectividad del método de detección de VAM por HPLC-DAD en la matriz complementaria almeja en base a la ausencia de interferentes en la zona del Ácido Domoico.

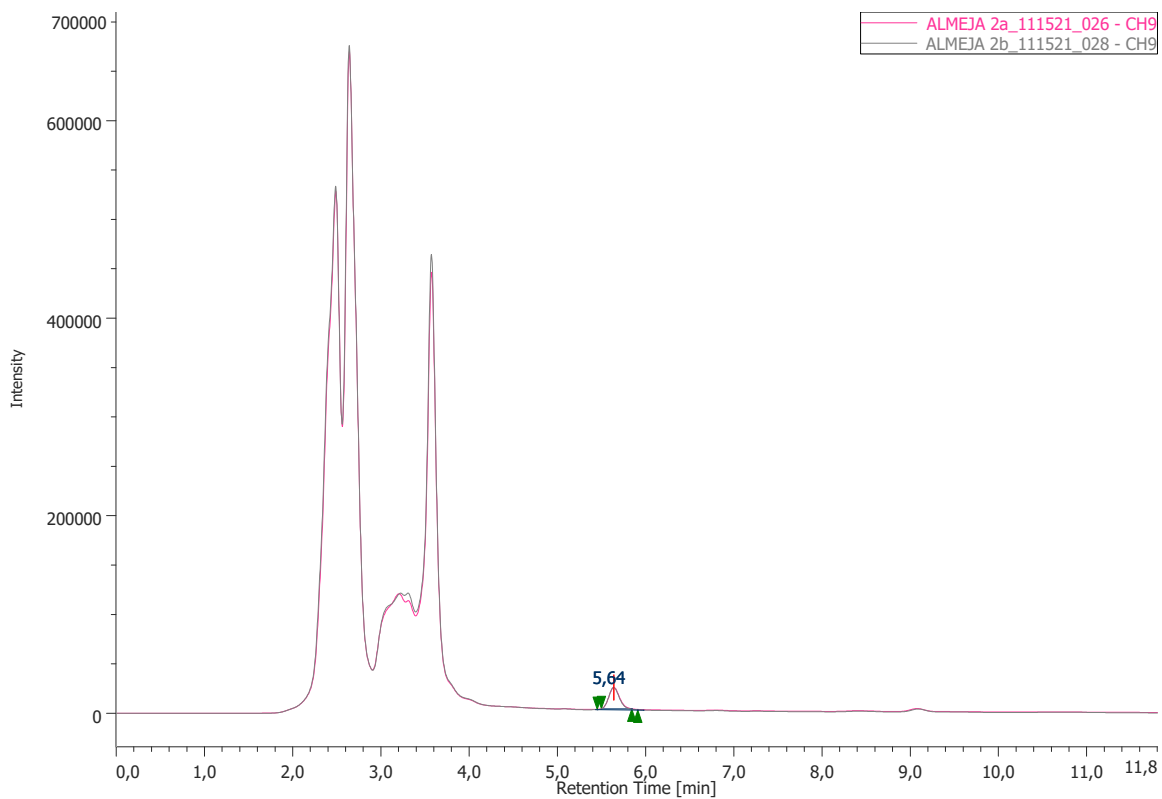
**Metodología:** Se realizaron extracciones y análisis de ácido domoico en una muestra de almeja duplicada, según el Instructivo P-VAM-01. Se determinó la presencia o ausencia del ácido domoico comparando respecto una muestra de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL (ver anexo 1 del Instructivo P-VAM-01). La ausencia de interferentes fue evaluada en los extractos negativos al ácido domoico analizando las señales cromatográficas de cada muestra en la zona de elusión del ácido domoico.




**Figura 1.** Cromatogramas a 242 nm de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL, inyecciones A y B.



**Figura 2.** Cromatogramas a 242 nm de la muestra de Almeja. Réplica 1, inyecciones A y B.



**Figura 3.** Cromatogramas a 242 nm de la muestra de Almeja. Réplica 2, inyecciones A y B.

	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME SELECTIVIDAD VAM</b> <b>Matriz complementaria 2 Almeja</b>  <b>Fecha: 15-11-2021</b>

**Tabla 1.** Identificación de picos cromatográficos de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL, inyecciones A y B. Las letras W y DA corresponden a Triptófano y Ácido domoico, respectivamente.

Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
2 DA+ 20 W	W	5,67	207311	23218	56,194	59,020	N/A	10340	4,600	1,207
2 DA+ 20 W	DA	6,77	161607	16121	43,806	40,980	2,00649	11144	N/A	1,115
2 DA +20 W	W	5,66	195109	22761	55,081	58,871	N/A	10517	4,702	1,175
2 DA +20 W	DA	6,78	159111	15901	44,919	41,129	1,97476	11166	N/A	1,103

**Tabla 2.** Identificación de picos cromatográficos en las muestras de almeja duplicadas. Las letras W corresponden al Triptófano.

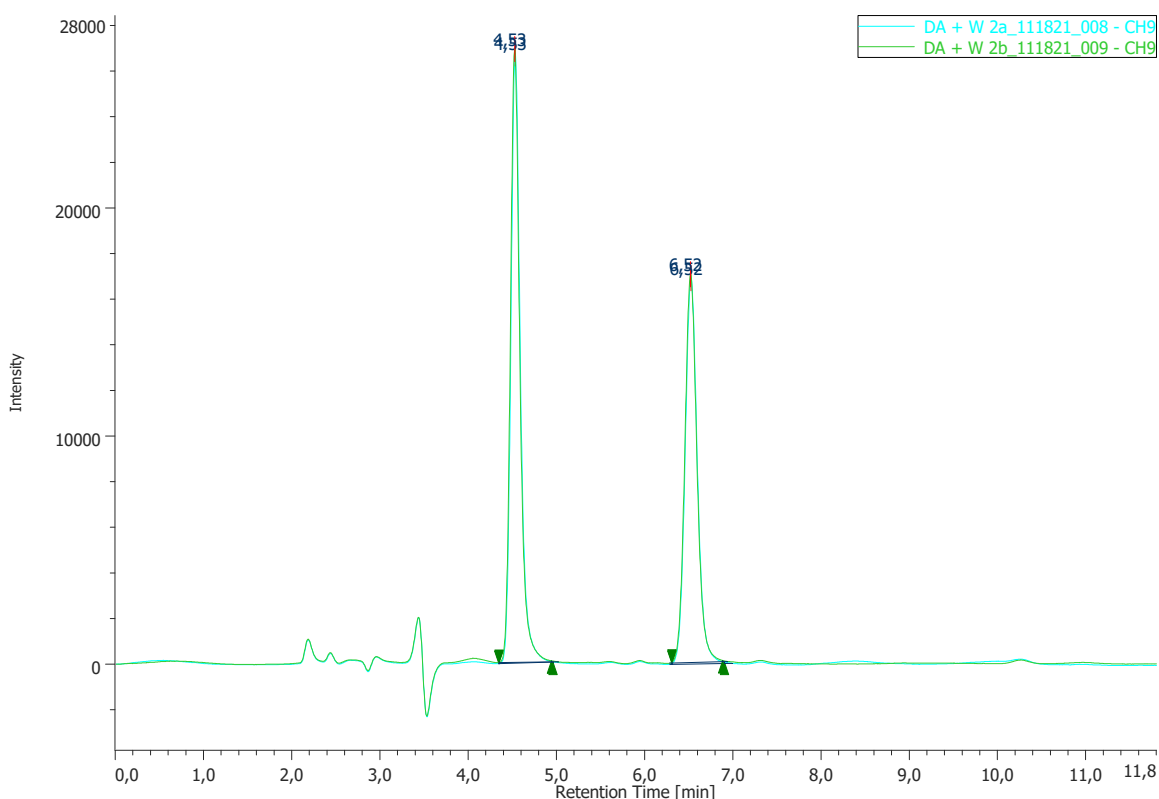
Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
ALMEJA 1a	W	5,64	187610	22003	96,284	97,493	N/A	10247	4,122	1,191
ALMEJA 1b	W	5,64	193360	22230	96,588	97,666	N/A	10058	4,110	1,170
ALMEJA 2a	W	5,64	180902	21671	96,270	97,509	N/A	10443	4,167	1,144
ALMEJA 2b	W	5,64	200920	22591	96,728	97,645	N/A	9918	4,189	1,195

**Conclusión:** La zona de elusion del Ácido Domoico se distribuye entre los 6,5 a 7,1 minutos.

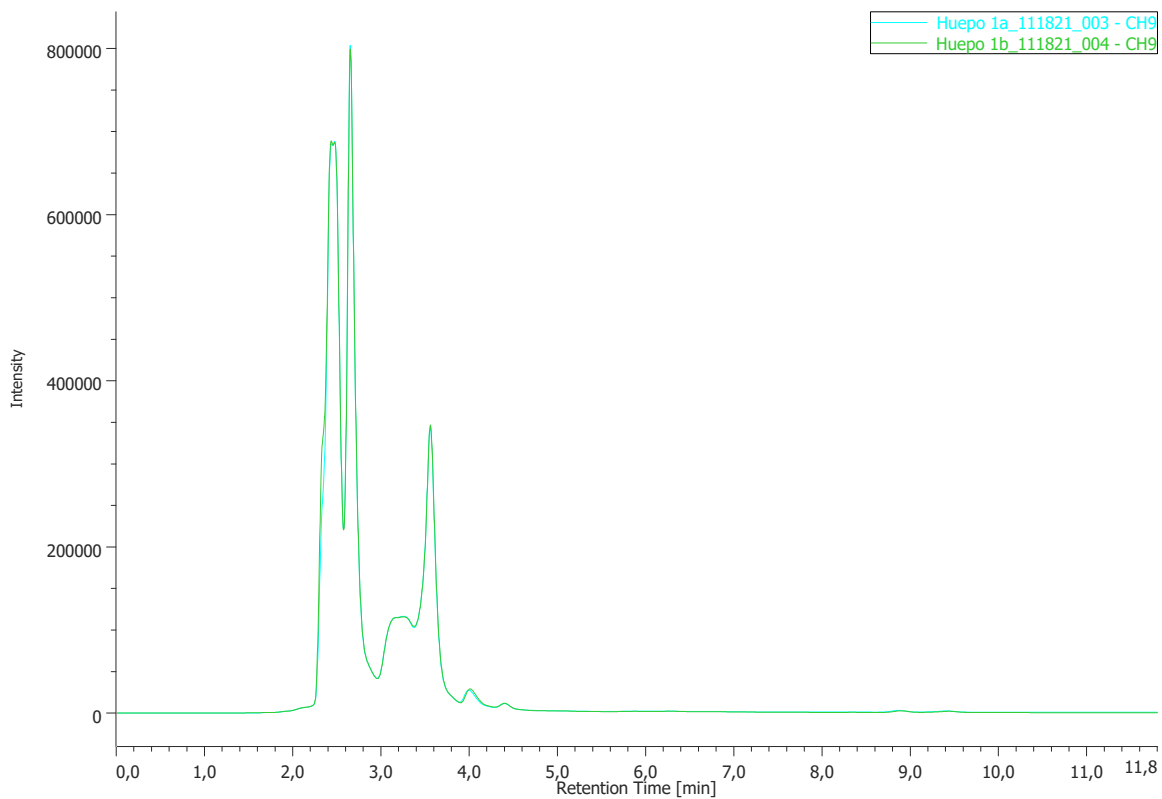
Los cromatogramas de las muestras de almeja negativas al Ácido Domoico no presentan interferentes en la zona de elusion del Ácido Domoico. Por tanto, se concluye que el método de detección de VAM por HPLC-DAD es selectivo para el analito Ácido Domoico para la matriz complementaria almeja.

**Objetivo:** Evaluar la selectividad del método de detección de VAM por HPLC-DAD en la matriz complementaria huevo en base a la ausencia de interferentes en la zona del Ácido Domoico.

**Metodología:** Se realizaron extracciones y análisis de ácido domoico en una muestra de huevo en duplicado, según el Instructivo P-VAM-01. Se determinó la presencia o ausencia del ácido domoico comparando respecto una muestra de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL (ver anexo 1 del Instructivo P-VAM-0). La ausencia de interferentes fue evaluada en los extractos negativos al ácido domoico analizando las señales cromatográficas de cada muestra en la zona de elusión del ácido domoico.

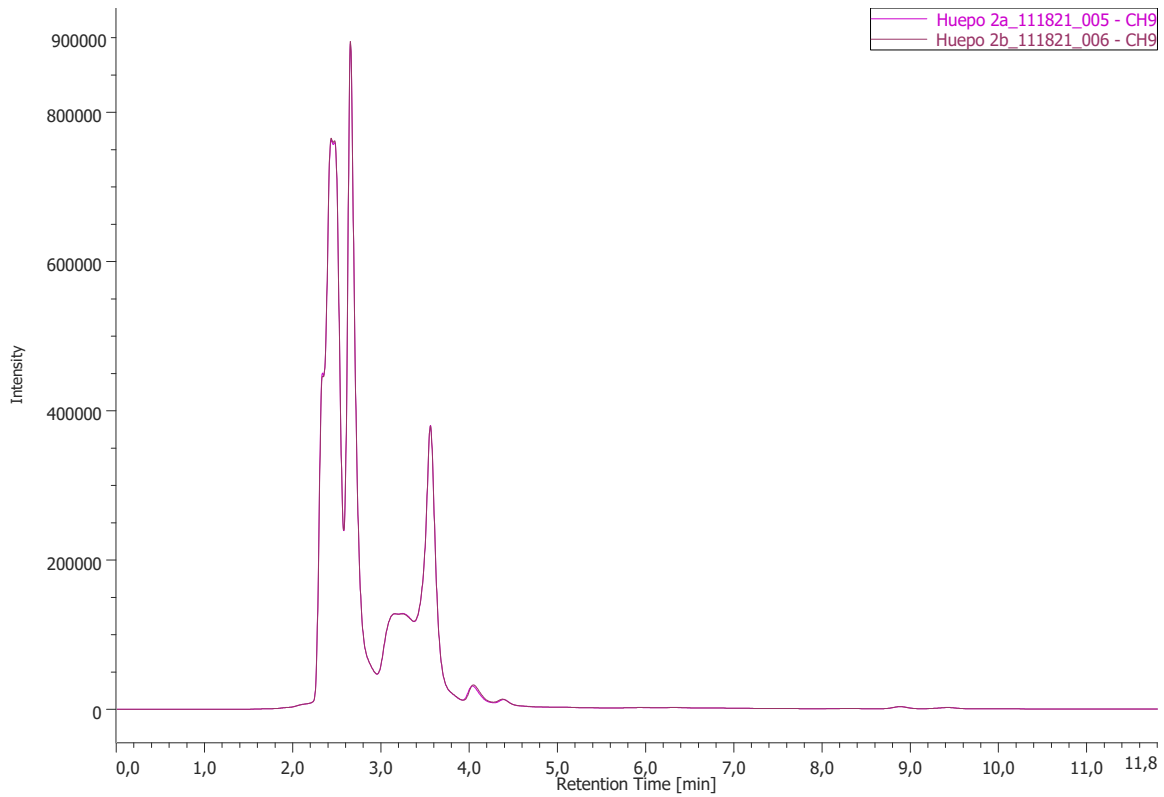


**Figura 1.** Cromatogramas a 242 nm de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL, inyecciones A y B.

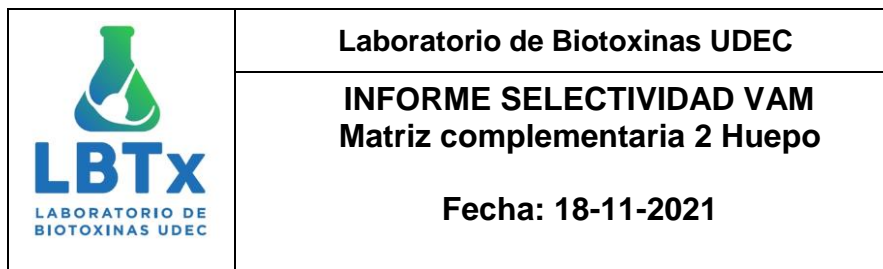


**Figura 2.** Cromatogramas a 242 nm de la muestra de Huevo. Réplica 1, inyecciones A y B.





**Figura 3.** Cromatogramas a 242 nm de la muestra de Huevo. Réplica 2, inyecciones A y B.



**Tabla 1.** Identificación de picos cromatográficos de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL, inyecciones A y B. Las letras W y DA corresponden a Triptófano y Ácido domoico, respectivamente.

Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Fa
DA + W 2a	W	4,53	200406	26717	55,133	61,248	N/A	9371	9,203	1,262
DA + W 2a	DA	6,52	163092	16904	44,867	38,752	N/A	11226	N/A	1,143
DA + W 2b	W	4,53	201761	26879	55,234	61,243	N/A	9358	9,232	1,274
DA + W 2b	DA	6,52	163524	17010	44,766	38,757	N/A	11256	N/A	1,131

**Conclusión:** La zona de elusion del ácido domoico se distribuye entre los 6,3 a 6,9 minutos.

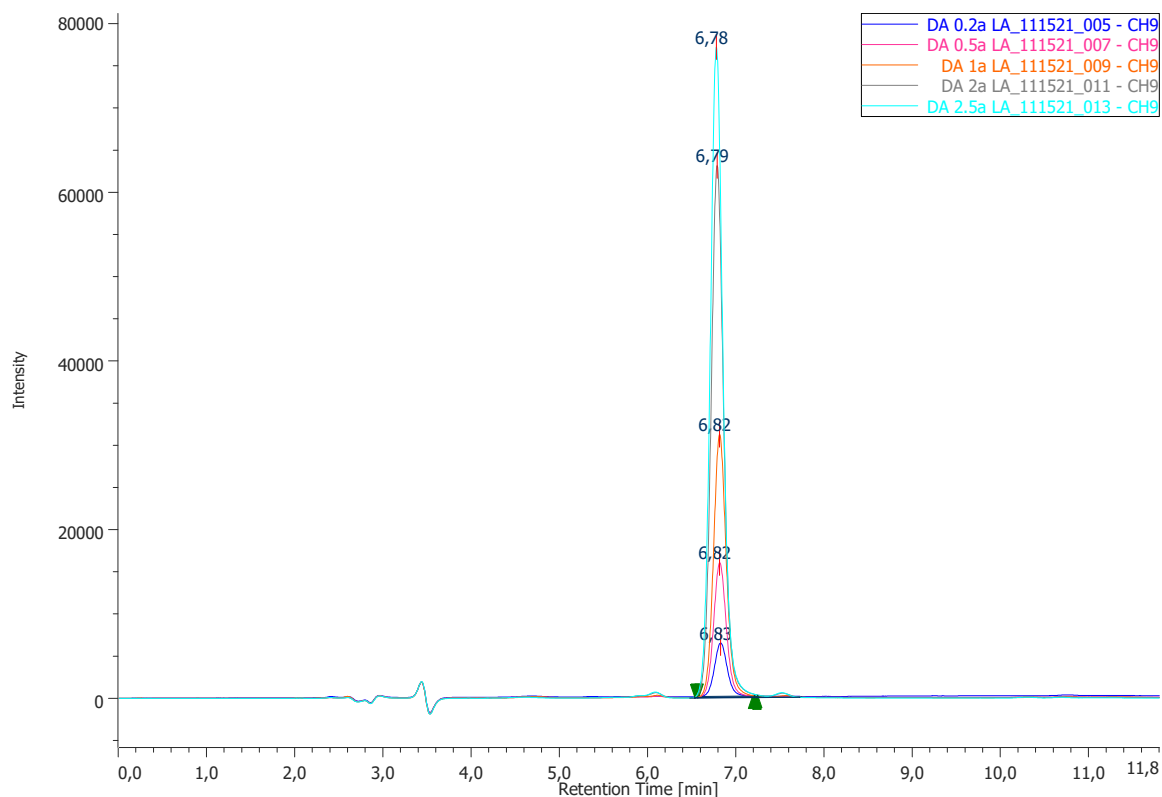
Los cromatogramas de las muestras de huevo negativas al ácido domoico no presentan interferentes en la zona de elusion del Ácido Domoico. Por tanto, se concluye que el método de detección de VAM por HPLC-DAD es selectivo para el analito Ácido Domoico en la matriz complementaria huevo.

Nota: El triptófano no presentó buena resolución de peaks en los cromatogramas de las muestras de Huevo, por ello no se incluyó una tabla con su identificación.

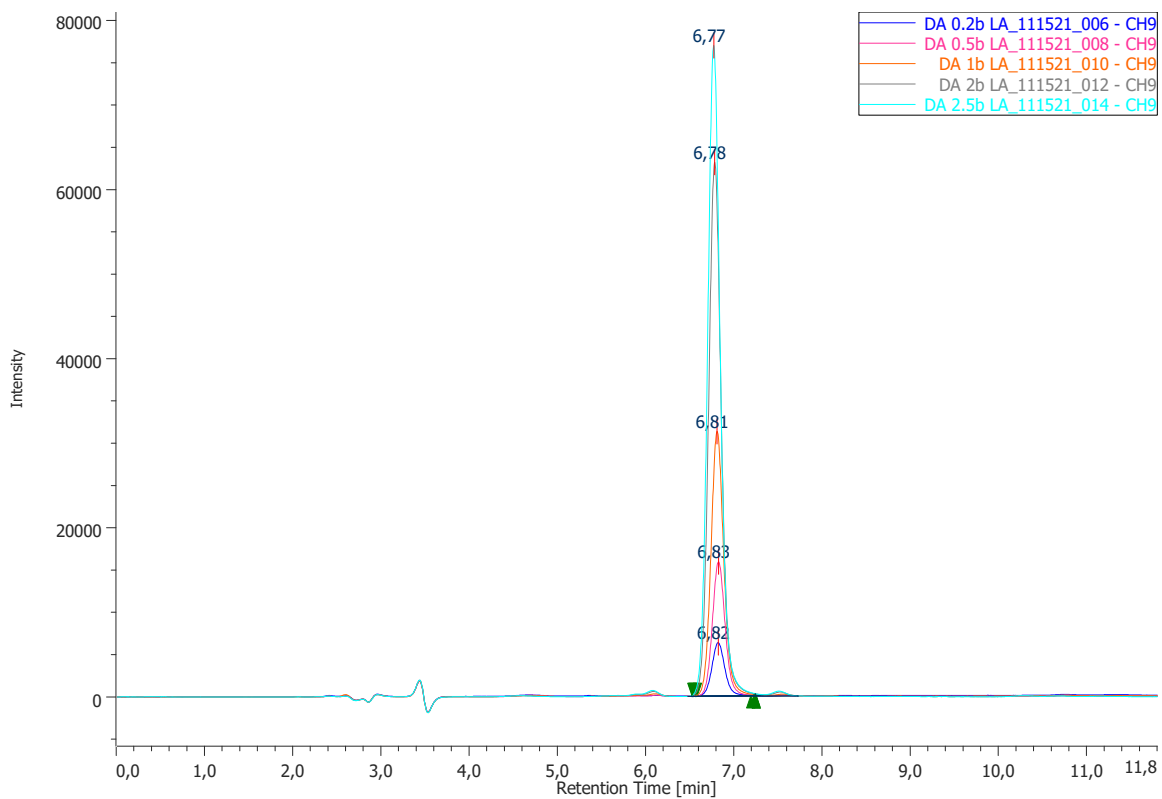
**Objetivo:** Evaluar la linealidad del método de detección de VAM por HPLC.

**Metodología:** Se realizaron 3 curvas de calibración independientes de 5 puntos distribuidas en 3 sets de trabajo. Para ello se realizaron diluciones del estándar ácido domoico 103,3 µg/mL en solución diluyente acetonitrilo:agua 1:9 v/v a distintas concentraciones (0,2 LA, 0,5 LA, 1 LA, 2 LA, 2,5 LA). Se calculó la ecuación de la recta mediante un gráfico de dispersión. Se obtuvo la pendiente, el coeficiente de determinación  $R^2$  y el coeficiente de correlación  $r$ . Se calculó el promedio de las pendientes y del coeficiente de correlación  $r$ . El criterio de aceptabilidad usado fue  $r > 0,999$ .

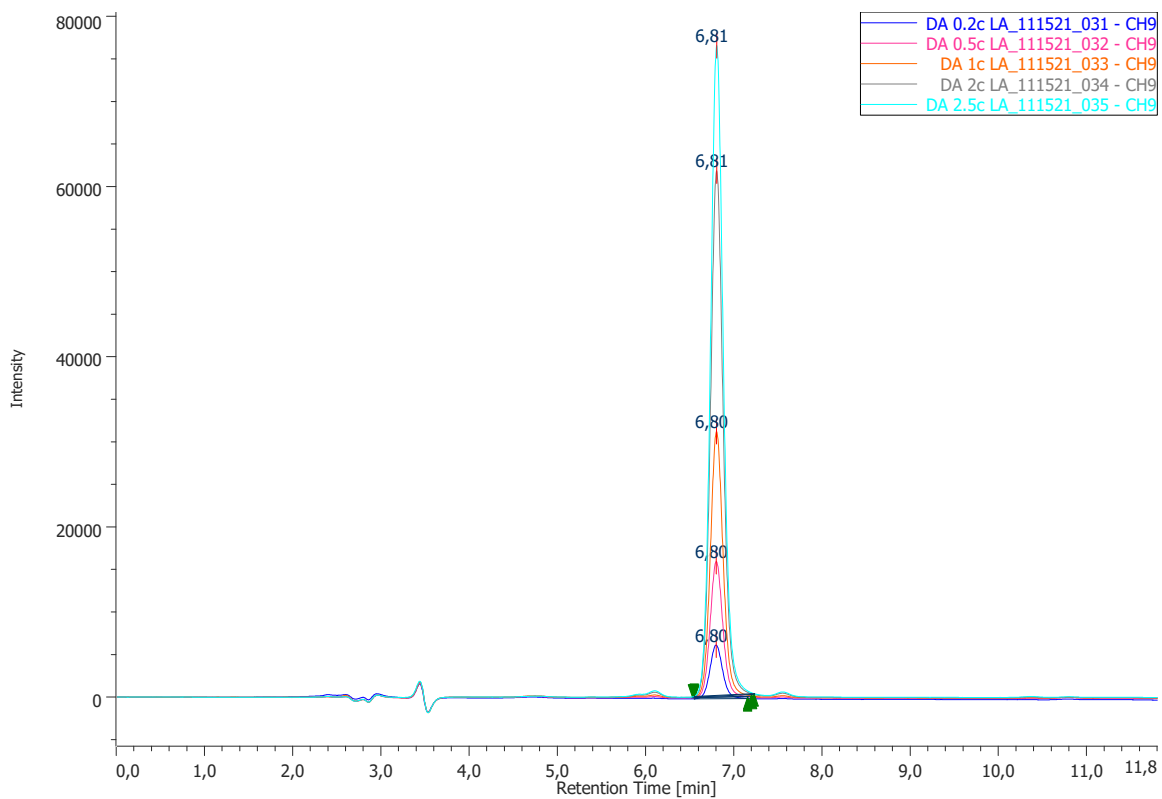
### CURVA DE CALIBRACIÓN 1 (SET 2)



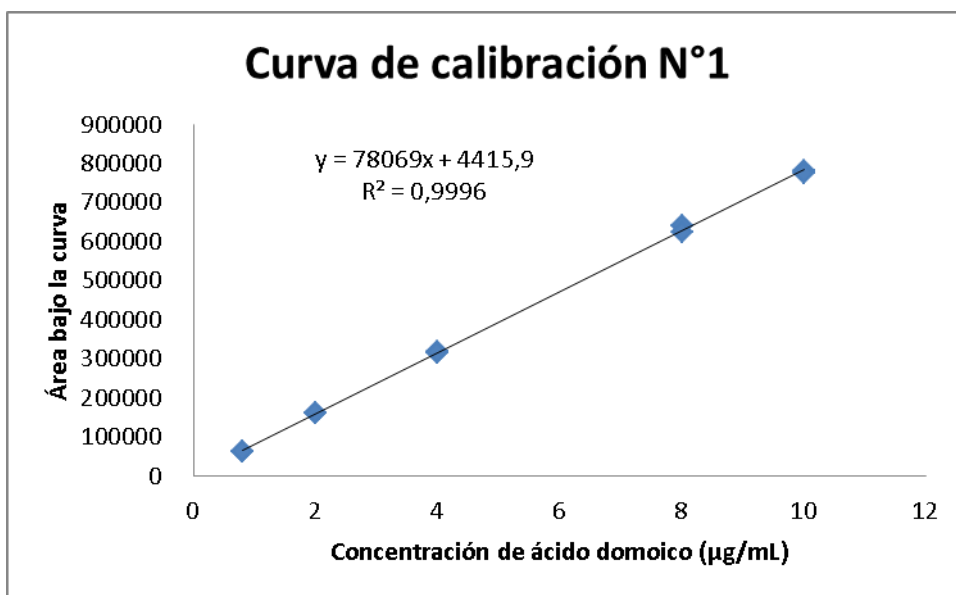
**Figura 1.** Cromatogramas a 242 nm de diluciones de ácido domoico en acetonitrilo:agua 1:9 a las concentraciones de 0.2 LA (0.8 µg/mL); 0.5 LA (2 µg/mL); 1 LA (4 µg/mL); 2 LA (8 µg/mL) 2.5 LA (10 µg/mL). Curva N° 1, inyecciones A.




**Figura 2.** Cromatogramas a 242 nm de diluciones de ácido domoico en acetonitrilo:agua 1:9 a las concentraciones de 0.2 LA (0.8 µg/mL); 0.5 LA (2 µg/mL); 1 LA (4 µg/mL); 2 LA (8 µg/mL) 2.5 LA (10 µg/mL). Curva N°1, inyecciones B.



**Figura 3.** Cromatogramas a 242 nm de diluciones de ácido domoico en acetonitrilo:agua 1:9 a las concentraciones de 0.2 LA (0.8  $\mu\text{g/mL}$ ); 0.5 LA (2  $\mu\text{g/mL}$ ); 1 LA (4  $\mu\text{g/mL}$ ); 2 LA (8  $\mu\text{g/mL}$ ) 2.5 LA (10  $\mu\text{g/mL}$ ). Curva N°1, inyecciones C.



**Figura 4.** Gráfico de dispersión de la curva de calibración N°1. Inyecciones a, b y c.

 <b>LBTx</b> <small>LABORATORIO DE BIOTOXINAS UDEC</small>	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME LINEALIDAD VAM</b>  <b>Fecha: 15-11-2021</b>

**Tabla 1.** Tabla de concentración de ácido domoico vs. área bajo la curva N°1. Inyecciones a, b y c.

Límite de acción (LA)	Concentración DA ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área bajo la curva	Tiempo de retención (min)
0.2 LA a	0,8	64118	6,83
0.2 LA b	0,8	63272	6,82
0.2 LA c	0,8	63470	6,80
0.5 LA a	2	162180	6,82
0.5 LA b	2	161898	6,83
0.5 LA c	2	161248	6,80
1 LA a	4	318802	6,82
1 LA b	4	317951	6,81
1 LA c	4	316566	6,80
2 LA a	8	640179	6,79
2 LA b	8	641133	6,78
2 LA c	8	626109	6,81
2.5 LA a	10	783042	6,78
2.5 LA b	10	779987	6,77
2.5 LA c	10	774650	6,81

**m= 78069**

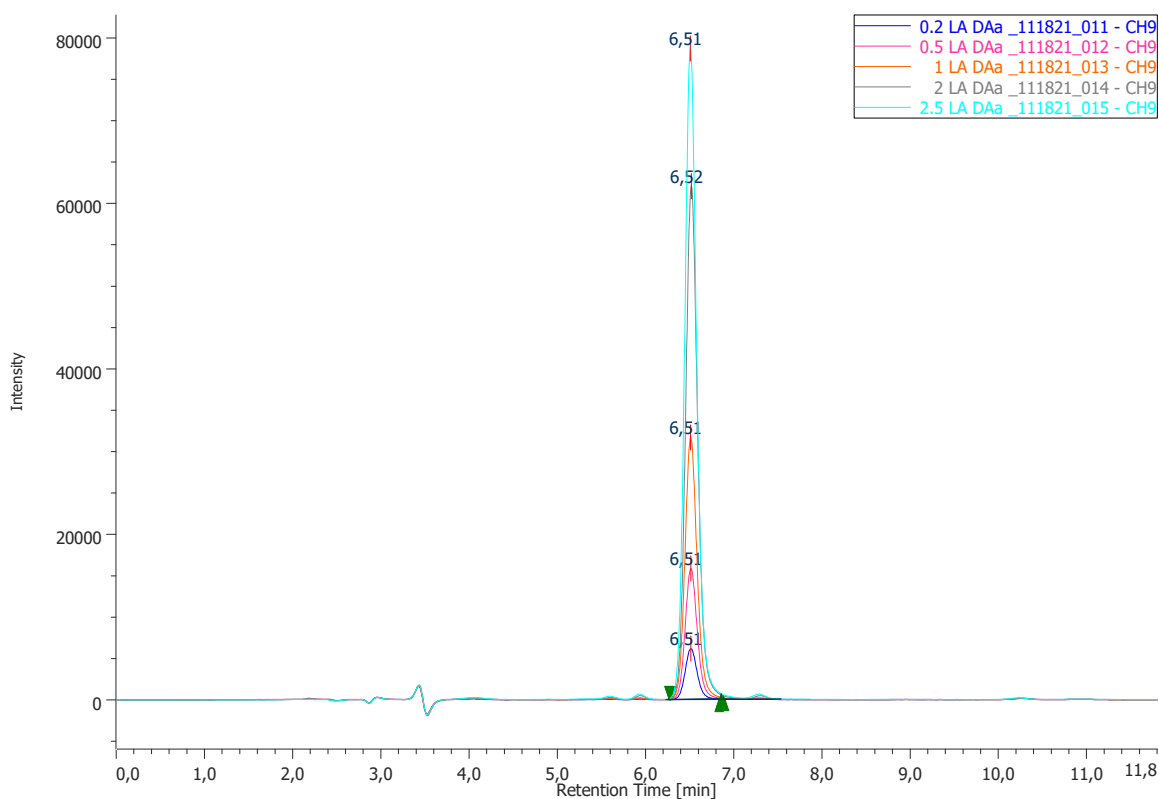
**b= 4415,9**

**Coefficiente de determinación  $R^2 = 0,9996$**

**$\sqrt{R^2} = 0,9998$**

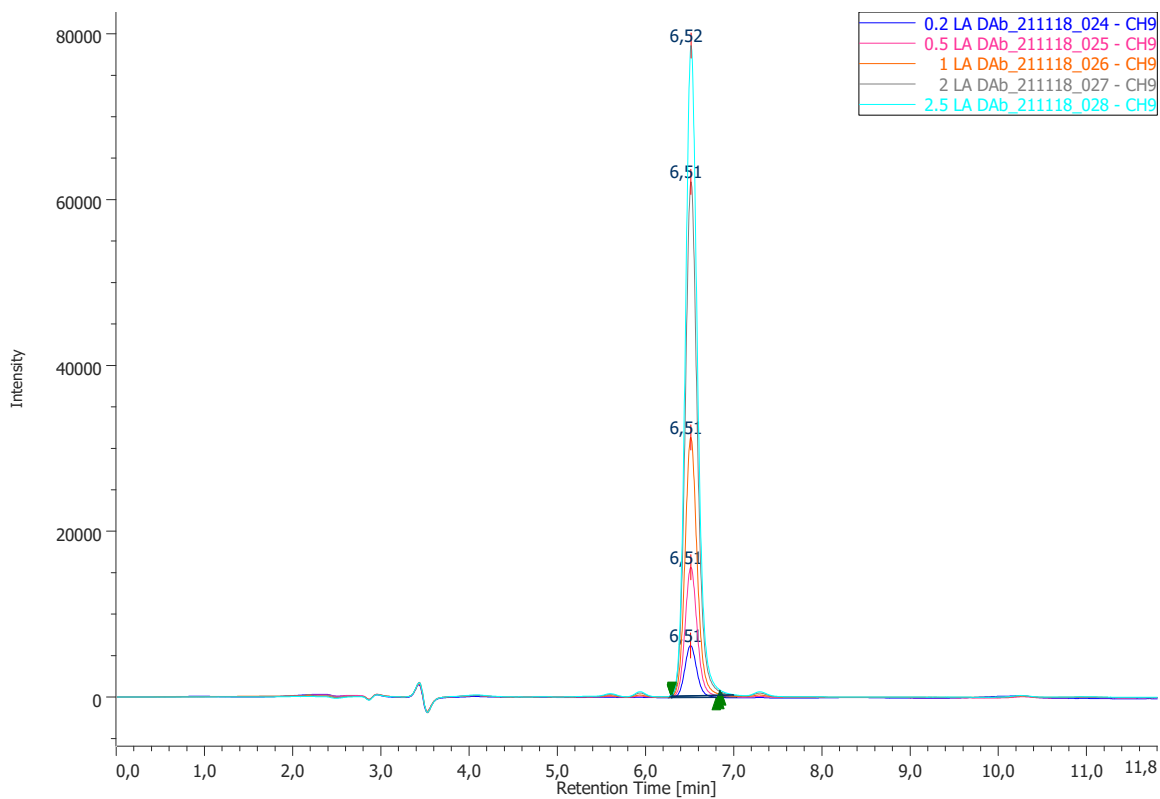
**Coefficiente de correlación  $r = 0.9998 > 0.999$**

### CURVA DE CALIBRACIÓN 2 (SET 3)

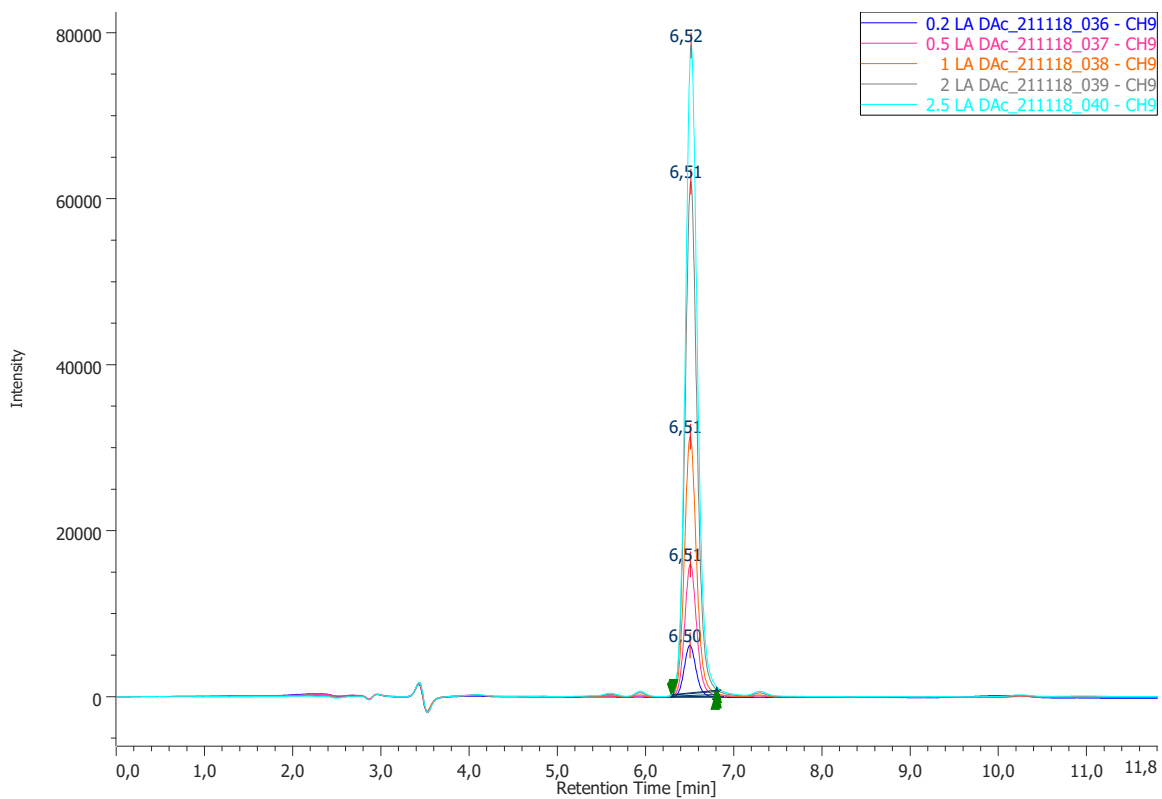


**Figura 5.** Cromatogramas a 242 nm de diluciones de ácido domoico en acetonitrilo:agua 1:9 a las concentraciones de 0.2 LA (0.8  $\mu\text{g/mL}$ ); 0.5 LA (2  $\mu\text{g/mL}$ ); 1 LA (4  $\mu\text{g/mL}$ ); 2 LA (8  $\mu\text{g/mL}$ ) 2.5 LA (10  $\mu\text{g/mL}$ ). Curva N°2, inyecciones A.

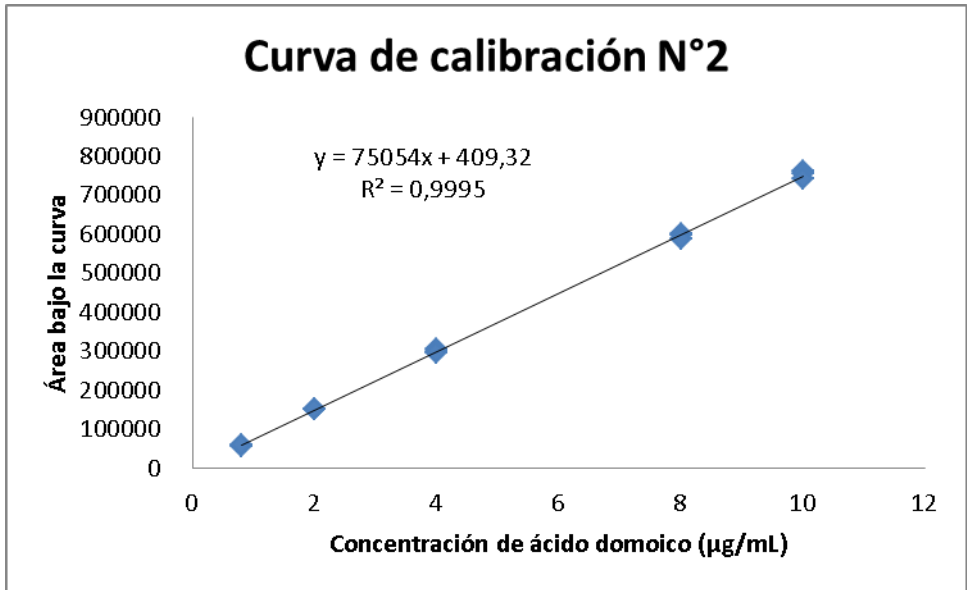





**Figura 6.** Cromatogramas a 242 nm de diluciones de ácido domoico en acetonitrilo:agua 1:9 a las concentraciones de 0.2 LA (0.8  $\mu\text{g/mL}$ ); 0.5 LA (2  $\mu\text{g/mL}$ ); 1 LA (4  $\mu\text{g/mL}$ ); 2 LA (8  $\mu\text{g/mL}$ ) 2.5 LA (10  $\mu\text{g/mL}$ ). Curva N°2, inyecciones B.



**Figura 7.** Cromatogramas a 242 nm de diluciones de ácido domoico en acetonitrilo:agua 1:9 a las concentraciones de 0.2 LA (0.8 µg/mL); 0.5 LA (2 µg/mL); 1 LA (4 µg/mL); 2 LA (8 µg/mL) 2.5 LA (10 µg/mL). Curva N° 2, inyecciones C.



**Figura 8.** Gráfico de dispersión de la curva de calibración N°2. Inyecciones a, b y c.

	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME LINEALIDAD VAM</b>  <b>Fecha: 15-11-2021</b>

**Tabla 1.** Tabla de concentración de ácido domoico vs. área bajo la curva N°2. Inyecciones a, b y c.

Límite de acción (LA)	Concentración DA ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área bajo la curva	Tiempo de retención (min)
0.2 LA a	0,8	58941	6,51
0.2 LA b	0,8	60330	6,51
0.2 LA c	0,8	59763	6,50
0.5 LA a	2	152461	6,51
0.5 LA b	2	151527	6,51
0.5 LA c	2	152590	6,51
1 LA a	4	306627	6,51
1 LA b	4	299107	6,51
1 LA c	4	297473	6,51
2 LA a	8	603005	6,52
2 LA b	8	598722	6,51
2 LA c	8	587388	6,51
2.5 LA a	10	762392	6,51
2.5 LA b	10	756846	6,52
2.5 LA c	10	742985	6,52

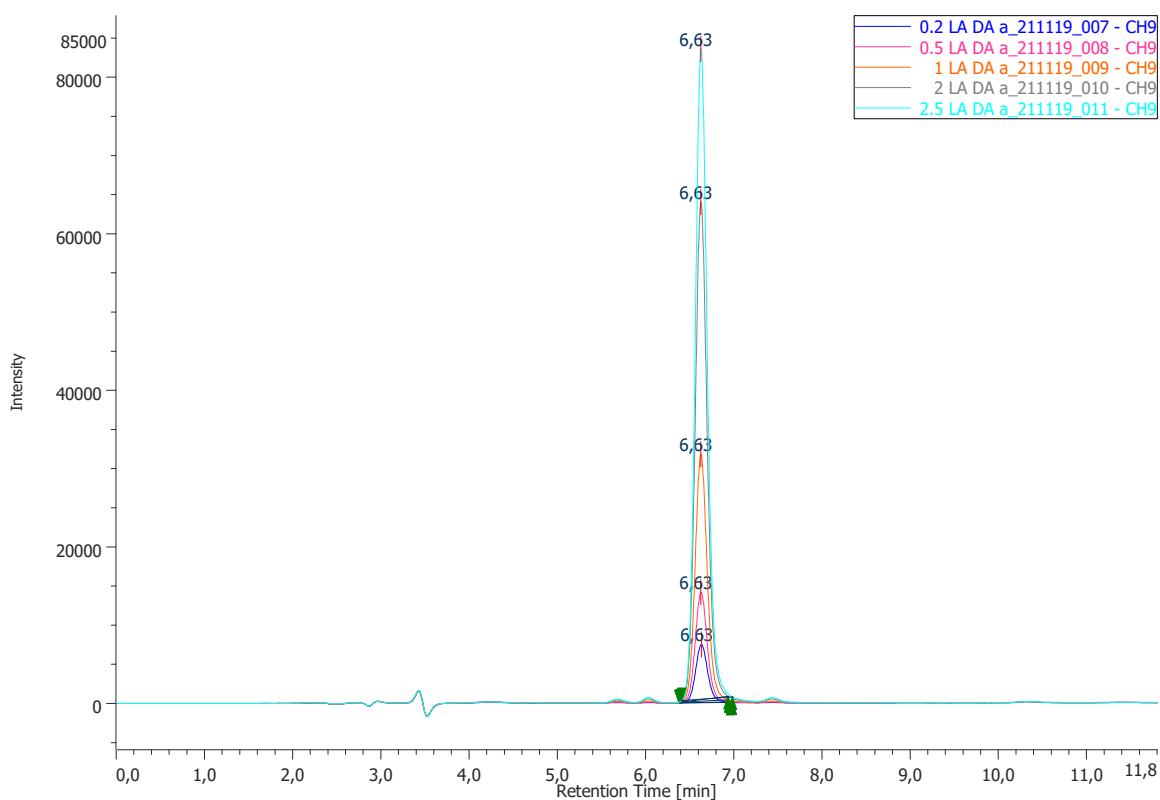
**m= 75054**  
**b= 409,32**

**Coefficiente de determinación  $R^2 = 0.9995$**

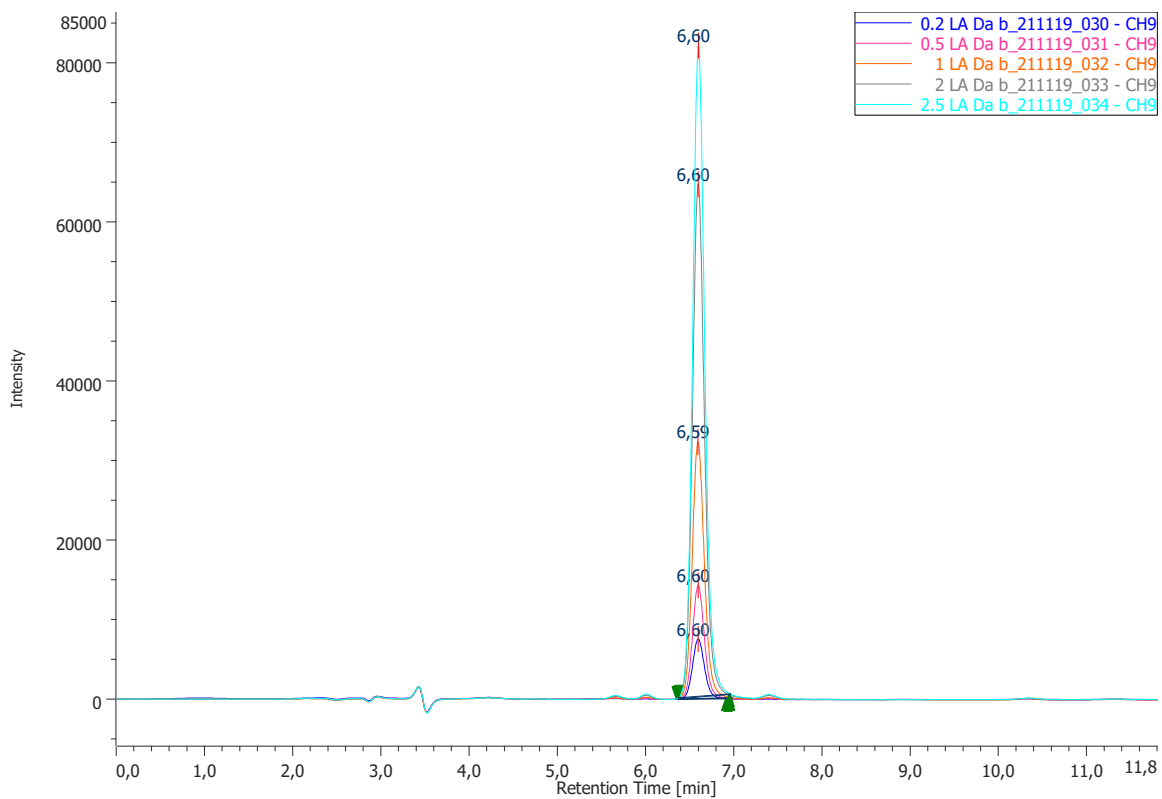
**$\sqrt{R^2} = 0,9997$**

**Coefficiente de correlación  $r = 0.9998 > 0.999$**

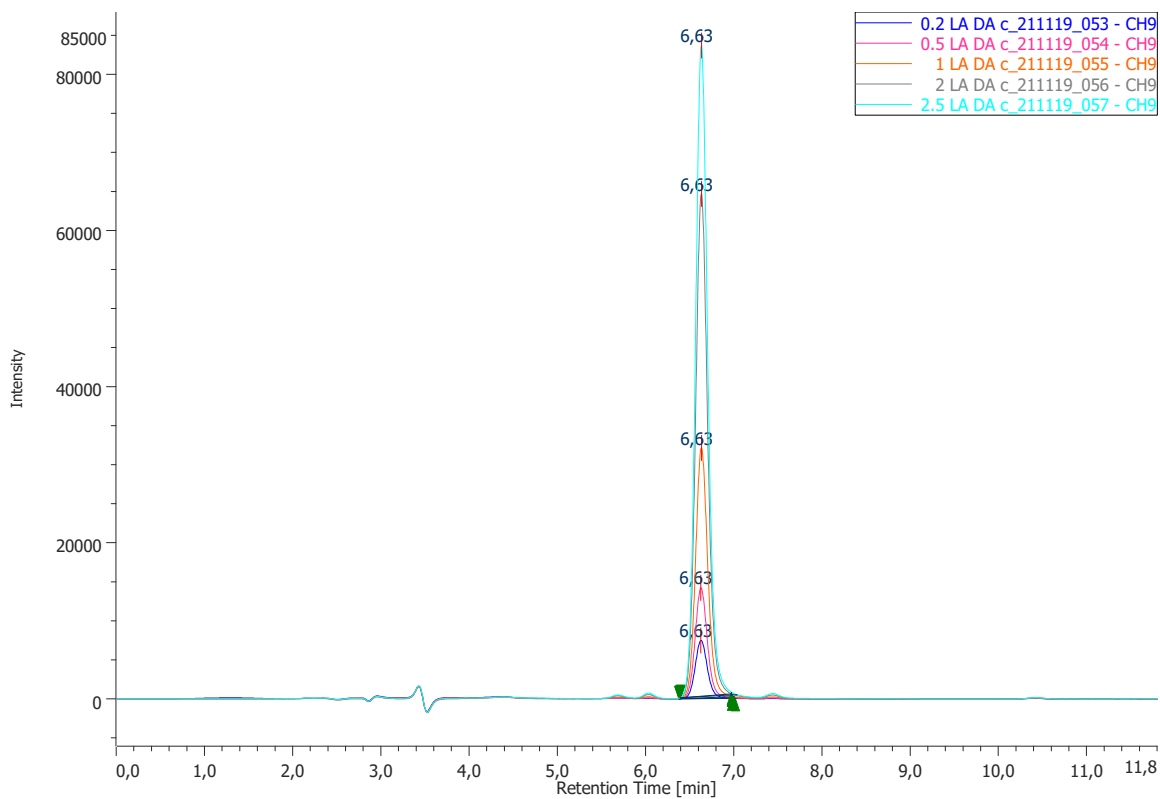
**CURVA 3 (SET 4)**



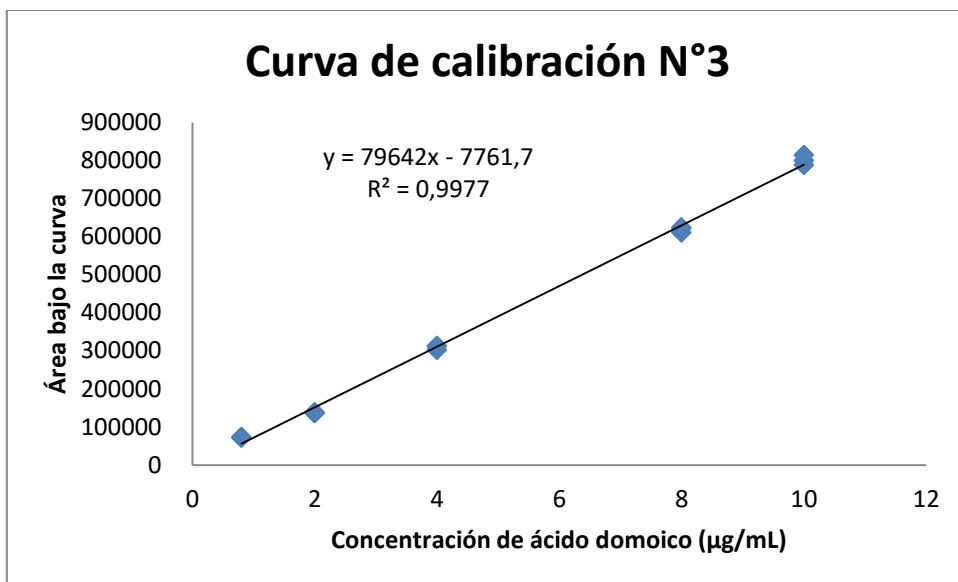
**Figura 9.** Cromatogramas a 242 nm de diluciones de ácido domoico en acetonitrilo:agua 1:9 a las concentraciones de 0.2 LA (0.8 µg/mL); 0.5 LA (2 µg/mL); 1 LA (4 µg/mL); 2 LA (8 µg/mL) 2.5 LA (10 µg/mL). Curva N°3, inyecciones A.



**Figura 10.** Cromatogramas a 242 nm de diluciones de ácido domoico en acetonitrilo:agua 1:9 a las concentraciones de 0.2 LA (0.8  $\mu\text{g/mL}$ ); 0.5 LA (2  $\mu\text{g/mL}$ ); 1 LA (4  $\mu\text{g/mL}$ ); 2 LA (8  $\mu\text{g/mL}$ ) 2.5 LA (10  $\mu\text{g/mL}$ ). Curva N°3, inyecciones B.




**Figura 11.** Cromatogramas a 242 nm de diluciones de ácido domoico en acetonitrilo:agua 1:9 a las concentraciones de 0.2 LA (0.8 µg/mL); 0.5 LA (2 µg/mL); 1 LA (4 µg/mL); 2 LA (8 µg/mL) 2.5 LA (10 µg/mL). Curva N°3, inyecciones C.



**Figura 12.** Gráfico de dispersión de la curva de calibración N°3. Inyecciones a, b y c.



	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME LINEALIDAD VAM</b>  <b>Fecha: 15-11-2021</b>

**Tabla 3.** Tabla de concentración de ácido domoico vs. área bajo la curva N°3. Inyecciones a, b y c.

Límite de acción (LA)	Concentración DA ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Área bajo la curva	Tiempo de retención (min)
0.2 LA a	0,8	71645	6,63
0.2 LA b	0,8	72619	6,60
0.2 LA c	0,8	72723	6,63
0.5 LA a	2	136291	6,63
0.5 LA b	2	136175	6,60
0.5 LA c	2	138450	6,63
1 LA a	4	302293	6,63
1 LA b	4	312152	6,59
1 LA c	4	312072	6,63
2 LA a	8	609864	6,63
2 LA b	8	620801	6,60
2 LA c	8	623727	6,63
2.5 LA a	10	799073	6,63
2.5 LA b	10	787815	6,60
2.5 LA c	10	813211	6,63


**m=** 79642

**b=** -7761,7

**Coefficiente de determinación  $R^2 = 0.9977$**

**$\sqrt{R^2} = 0,9988$**

**Coefficiente de correlación  $r = 0.9988 > 0.999$**

	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME LINEALIDAD VAM</b>  <b>Fecha: 15-11-2021</b>

**Tabla 4.** Planilla de cálculos de validación de métodos. Se muestran los resultados de la prueba de linealidad.

LINEALIDAD Y SENSIBILIDAD				
Curva de Calibración	FECHA	Valor Pendiente	Valor coeficiente correlación ( r )	
1	15/11/2021	78069,0000	0,9998	<b>Promedio de pendientes: 77588,3333</b> <b>Desviación estandar 0,0006</b> <b>Promedio r: 0,9995</b> <b>Evaluación linealidad: Se acepta</b>
2	18/11/2021	75054,0000	0,9998	
3	19/11/2021	79642,0000	0,9988	
<b>Criterio aceptabilidad:</b> Para linealidad se debe obtener un $r > 0,99$ o fijar este valor en el proceso de validación				


### Conclusión:

En las 3 curvas de calibración independientes se cumplió con el criterio de aceptabilidad  $r > 0,999$ .

El coeficiente correlación promedio fue  $0,9995 > 0,999$

La pendiente promedio fue 77588,33

Lo anterior permite concluir que la concentración de ácido domoico y el área bajo el peak cromatográfico se correlacionan de forma positiva y lineal. Por tanto, el método de detección de VAM por HPLC-DAD cumple con el criterio de aceptabilidad de la linealidad.

	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME LÍMITES VAM</b>  <b>Fecha: 10-11-2021</b>

**Objetivo:** Calcular los límites críticos (LC), de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) del método de detección de VAM por HPLC-DAD en la matriz central cholga.

**Metodología:** Se integró el área bajo la curva en la zona de elusión del ácido domoico en todos los cromatogramas de los blancos de matriz central cholga analizados en la prueba de selectividad. Se calculó la concentración de ácido domoico ( $\mu\text{g/g}$ ) en cada área de integración según el Instructivo P-VAM-01 y usando la curva de calibración global (figura 8). Se calculó el promedio ( $\bar{x}$ ) y la desviación estándar ( $S$ ) de las concentraciones en los sextuplicados. El valor crítico, límite de detección y cuantificación se obtuvo usando las fórmulas 1, 2 y 3 respectivamente. Se analizaron 3 fortificados del pool de cholga al nivel de 0,2 LA ( $4\mu\text{g/g}$ ), y se comparó el promedio ( $\bar{x}$ ) de la concentración medida con el LOQ. El criterio de aceptabilidad de las pruebas fue  $\text{LC} < \text{LOD} < \text{LOQ} < \text{LA}$  ( $20 \mu\text{g/g}$ ), y  $\text{LOQ} < \text{Concentración promedio del fortificado de } 0,2 \text{ LA}$ .

**Fórmula 1.** Fórmula del cálculo del valor crítico (LC).  $S$  y  $\bar{x}$  corresponden a la desviación estándar y promedio de la concentración teórica de ácido domoico en las muestras de los blancos de matriz (adaptado de ISP, 2010).

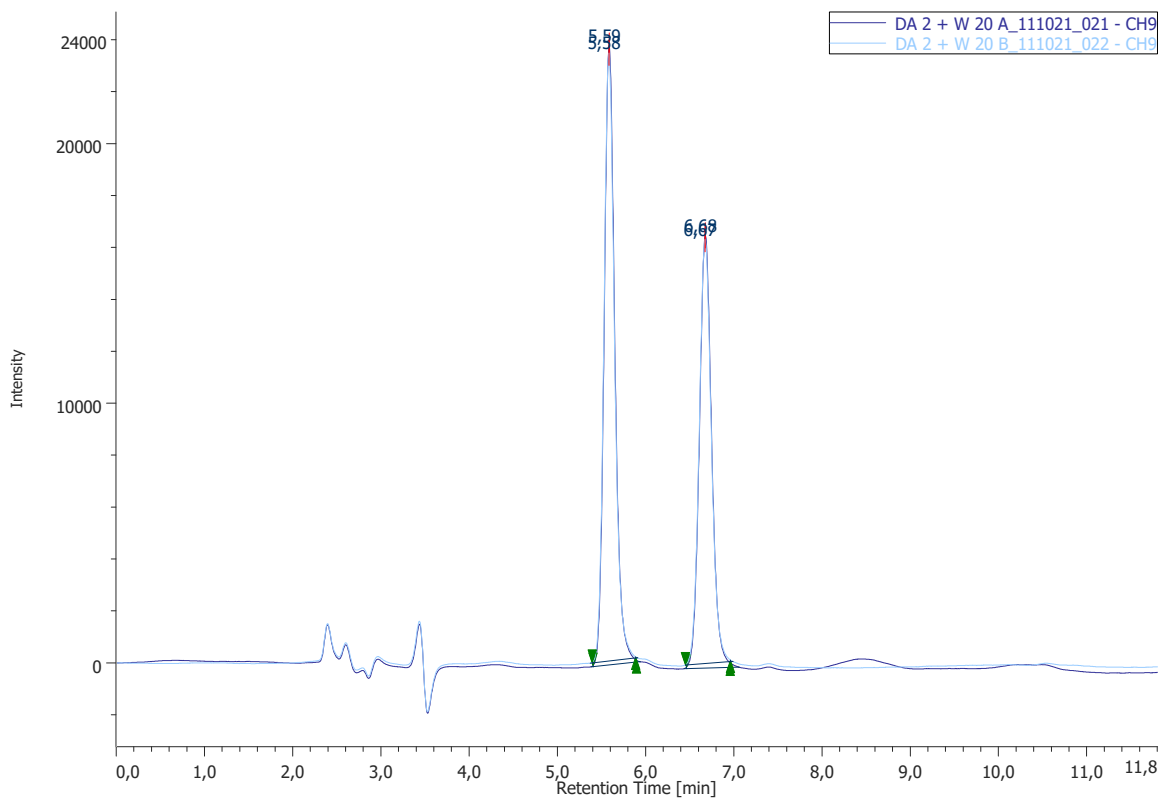
$$\text{LC} = \bar{x} + 1,645 \times S$$

**Fórmula 2.** Fórmula del cálculo del límite de detección (LOD).  $S$  y  $\bar{x}$  corresponden a la desviación estándar y promedio de la concentración teórica de ácido domoico en las muestras de los blancos de matriz (adaptado de ISP, 2010).

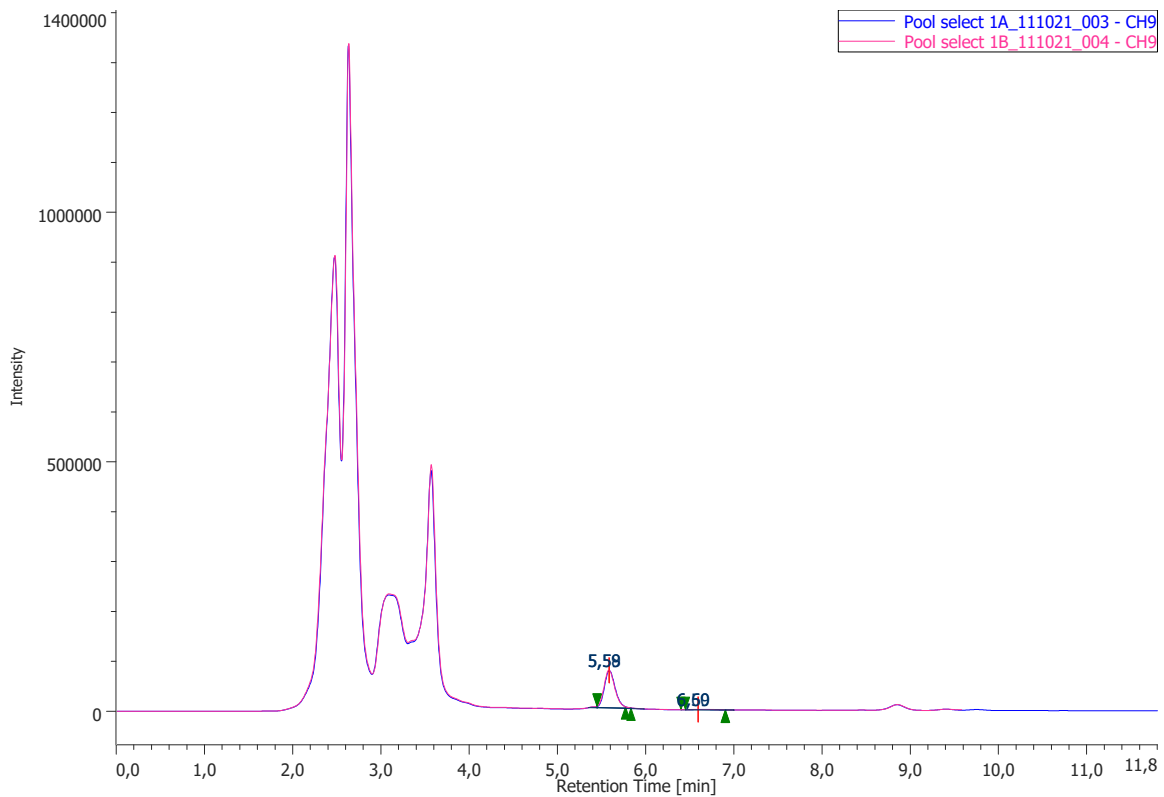
$$\text{LOD} = \bar{x} + 3,29 \times S$$

**Fórmula 3.** Fórmula del cálculo del límite de detección (LOD).  $S$  y  $\bar{x}$  corresponden a la desviación estándar y promedio de la concentración teórica de ácido domoico en las muestras de los blancos de matriz (adaptado de ISP, 2010).

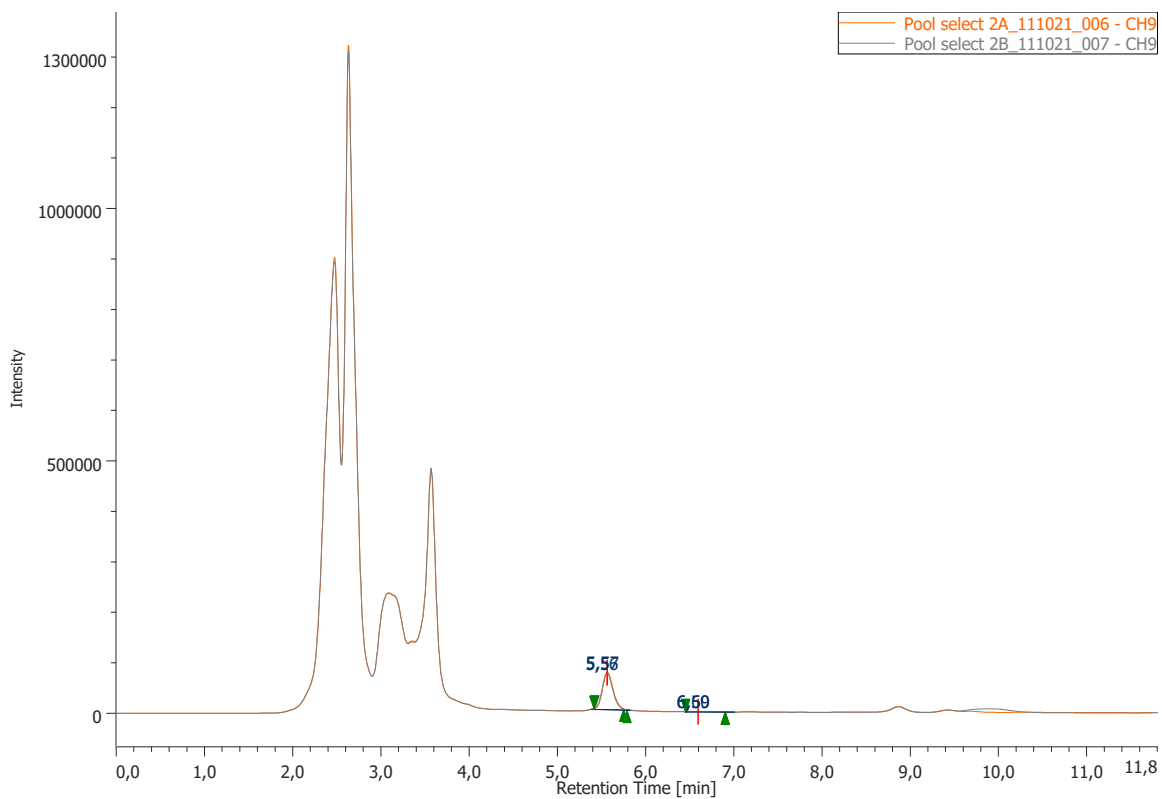
$$\text{LOQ} = \bar{x} + 10 \times S$$



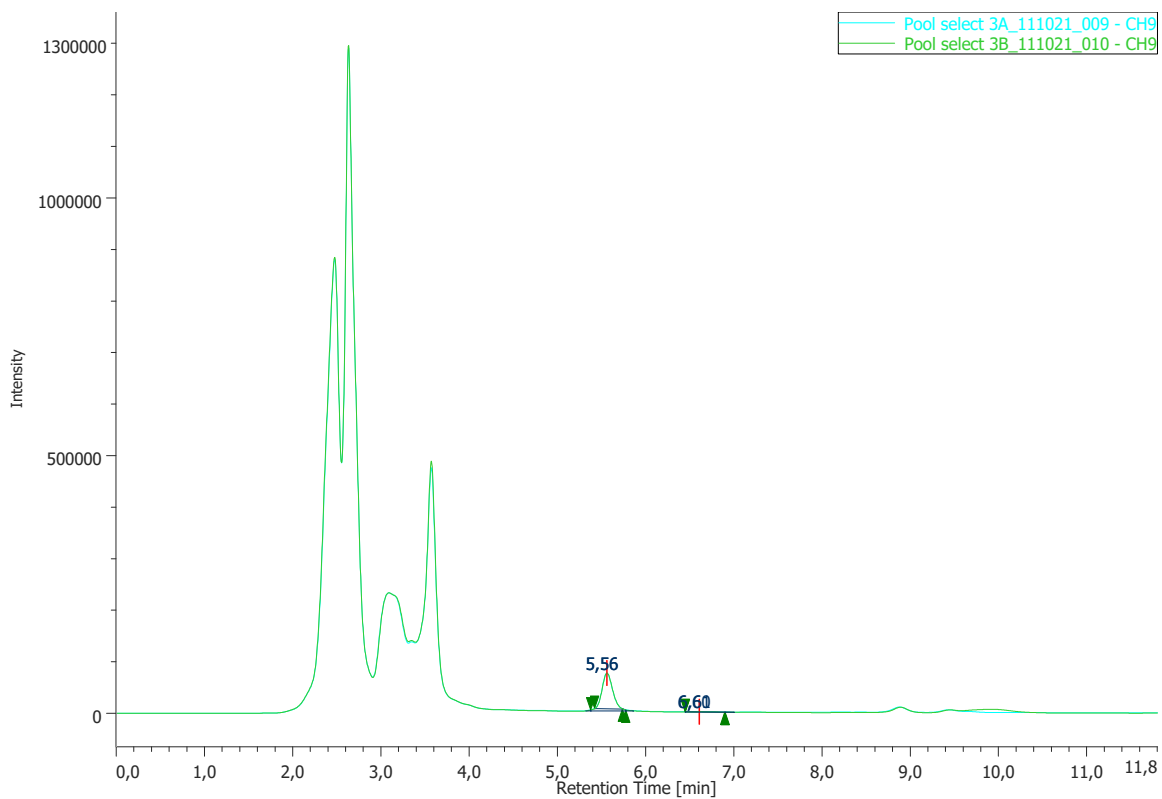
**Figura 1.** Cromatogramas a 242 nm de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL, inyecciones A y B.



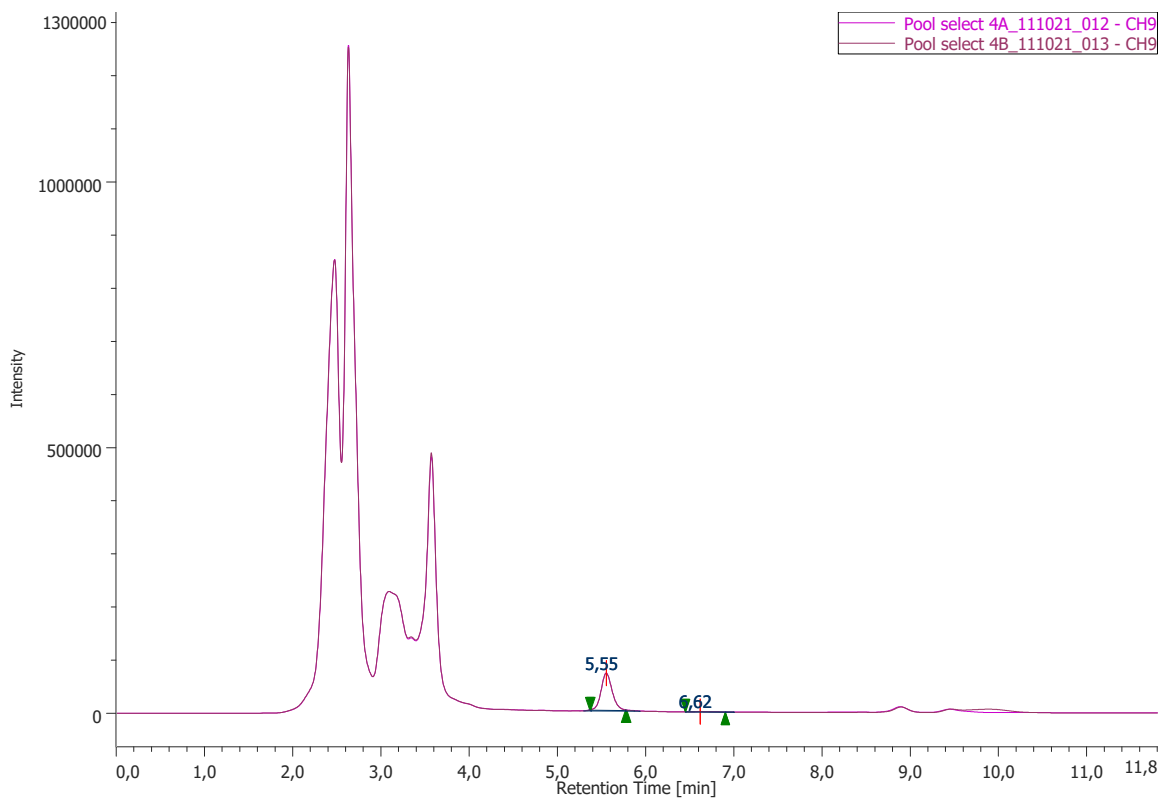
**Figura 2.** Cromatogramas a 242 nm del pool de selectividad. Muestra1, inyecciones A y B.



**Figura 3.** Cromatogramas a 242 nm del pool de selectividad. Muestra 2, inyecciones A y B.

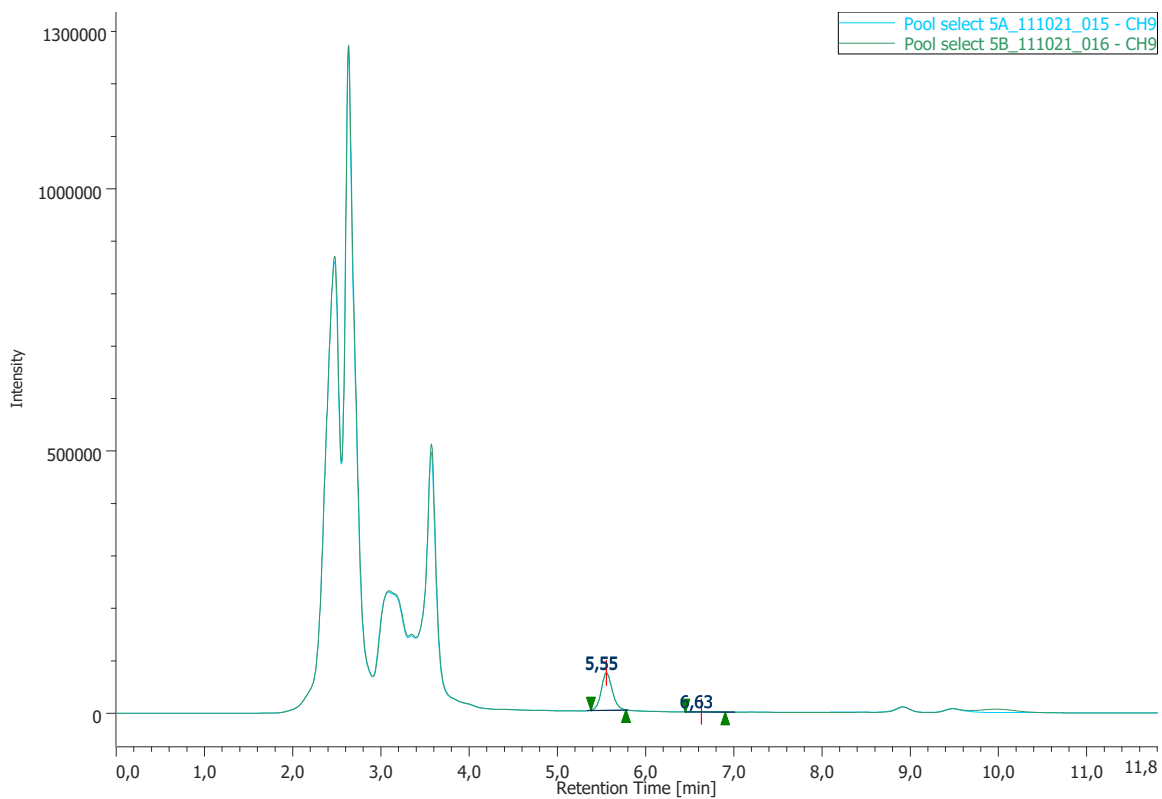


**Figura 4.** Cromatogramas a 242 nm del pool de selectividad. Muestra 3, inyecciones A y B.

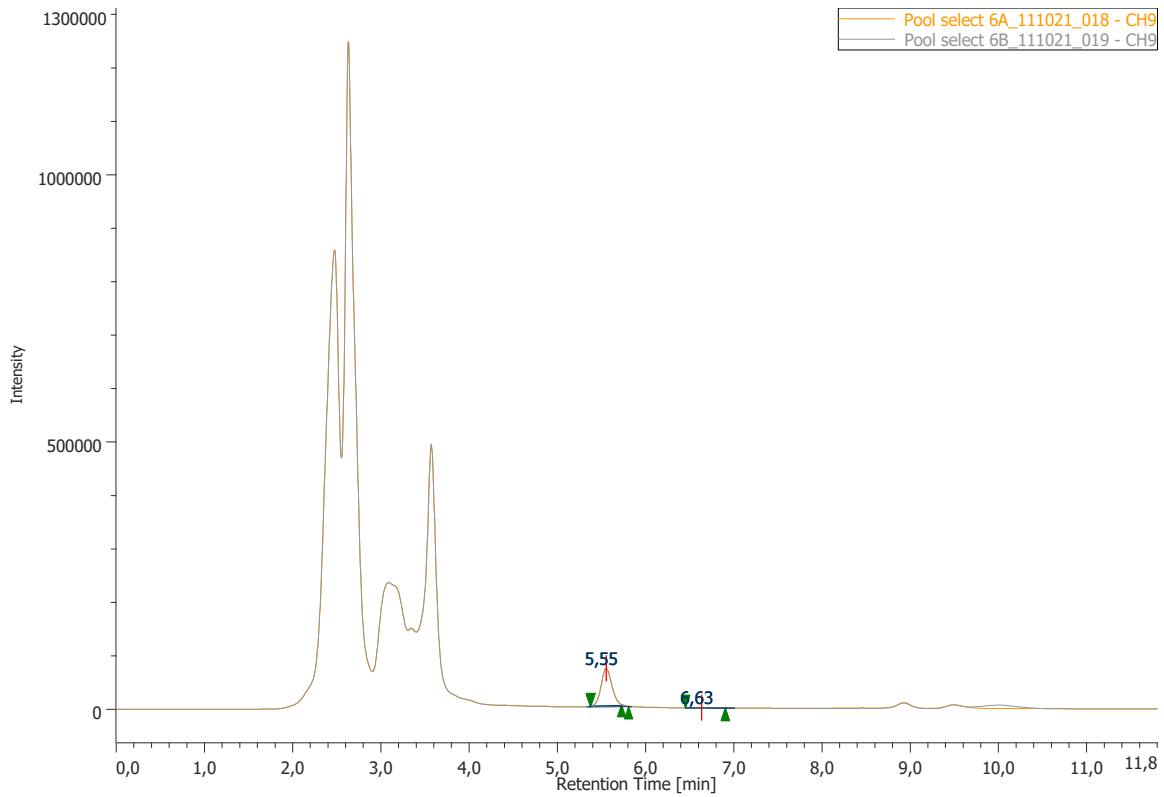


**Figura 5.** Cromatogramas a 242 nm del pool de selectividad. Muestra 4, inyecciones A y B.






**Figura 6.** Cromatogramas a 242 nm del pool de selectividad. Muestra 5, inyecciones A y B.



**Figura 7.** Cromatogramas a 242 nm del pool de selectividad. Muestra 6, inyecciones A y B.

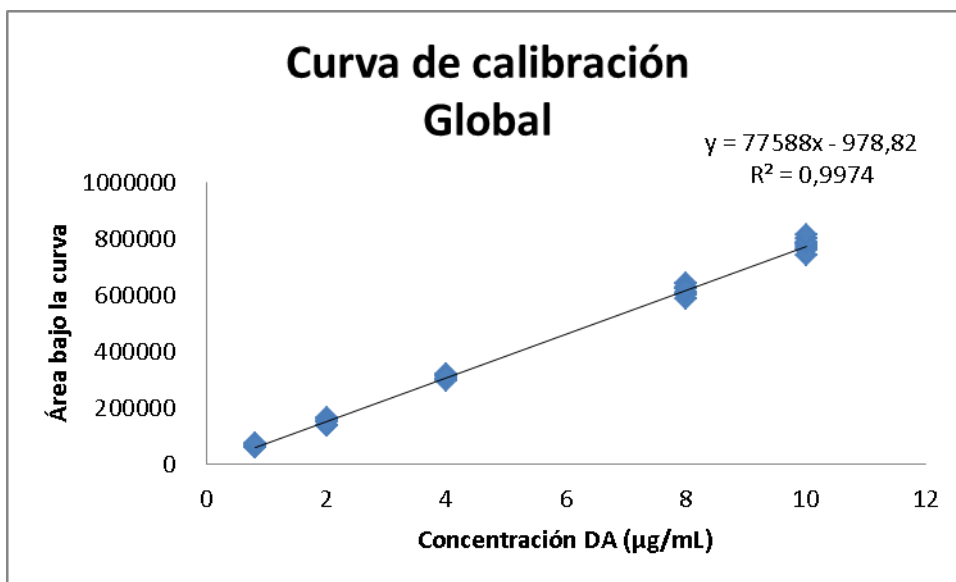
	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME LÍMITES VAM</b>  <b>Fecha: 10-11-2021</b>

**Tabla 1.** Identificación de picos cromatográficos de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL, inyecciones A y B. Las letras W y DA corresponden a Triptófano y Ácido domoico respectivamente.

Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
DA 2 + W 20 A	W	5,59	202181	23853	55,554	58,875	N/A	10675	4,691	1,180
DA 2 + W 20 A	DA	6,68	161753	16662	44,446	41,125	N/A	11444	N/A	1,108
DA 2 + W 20 B	W	5,58	197824	23413	55,707	58,916	N/A	10692	4,701	1,179
DA 2 + W 20 B	DA	6,67	157294	16327	44,293	41,084	N/A	11497	N/A	1,103

**Tabla 2.** Identificación de picos cromatográficos en los blancos de matriz central cholga. Las letras IF corresponden a la integración de la zona de elusion del ácido domoico.

Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
Pool 1A	IF	6,60	11335	611	1,769	0,813	N/A	2918	N/A	N/A
Pool 1B	IF	6,59	12690	677	2,102	0,924	N/A	2709	N/A	N/A
Pool 2A	IF	6,60	9505	630	1,564	0,861	N/A	3307	N/A	N/A
Pool 2B	IF	6,59	9952	630	1,809	0,906	N/A	2931	N/A	N/A
Pool 3A	IF	6,60	8657	574	1,570	0,832	N/A	3264	N/A	N/A
Pool 3B	IF	6,61	9249	609	1,821	0,915	N/A	3282	N/A	N/A
Pool 4A	IF	6,62	8209	542	1,524	0,805	N/A	3385	N/A	N/A
Pool 4B	IF	6,62	8966	582	1,642	0,863	N/A	3288	N/A	N/A
Pool 5A	IF	6,63	8409	581	1,504	0,847	N/A	3698	N/A	N/A
Pool 5B	IF	6,63	8731	601	1,443	0,838	N/A	3665	N/A	N/A
Pool 6A	IF	6,63	8233	582	1,370	0,818	N/A	3786	N/A	N/A
Pool 6B	IF	6,63	8727	593	1,595	0,873	N/A	3582	N/A	N/A




**Figura 8.** Curva de calibración global, utilizada para los cálculos de concentración de ácido domoico.

$m = 77588$

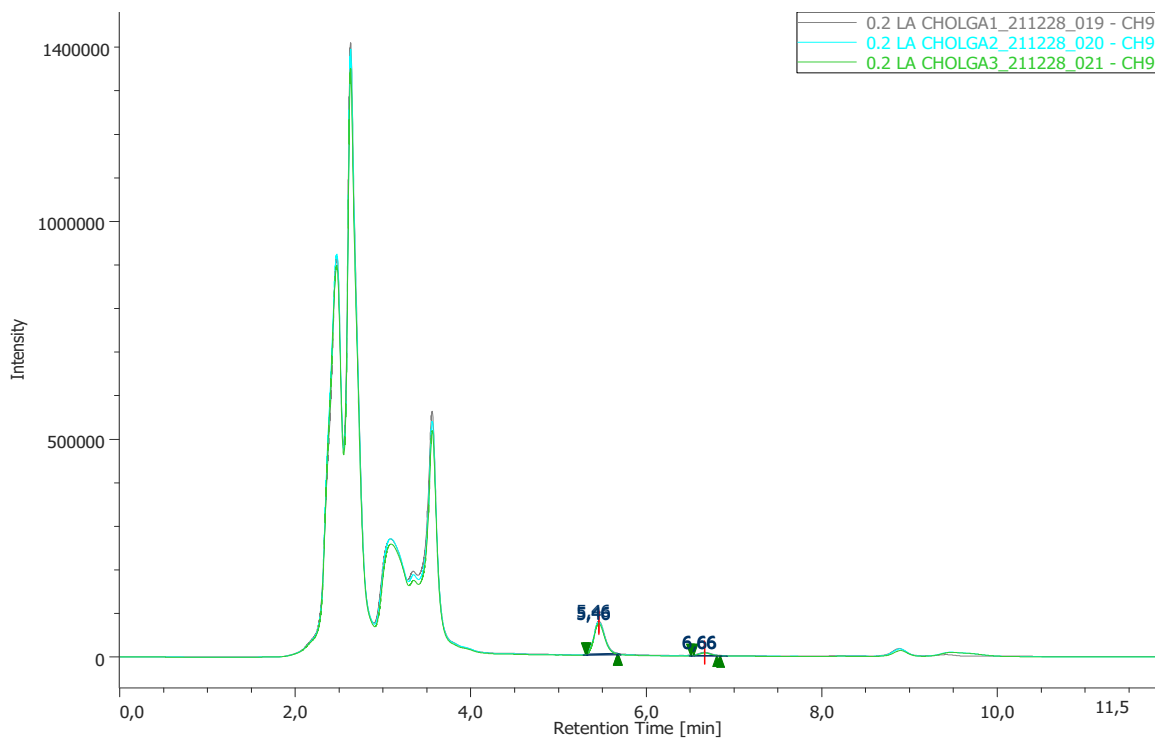
$b = -978,82$

$R^2 = 0,9974$

	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME LÍMITES VAM</b>  <b>Fecha: 10-11-2021</b>

**Tabla 3.** Cálculo de las concentraciones de ácido domoico ( $\mu\text{g}/\text{mL}$  y  $\mu\text{g}/\text{g}$ ) obtenidas con la curva global. Se muestran los valores del promedio, desviación estándar, LC, LOD y LOQ.

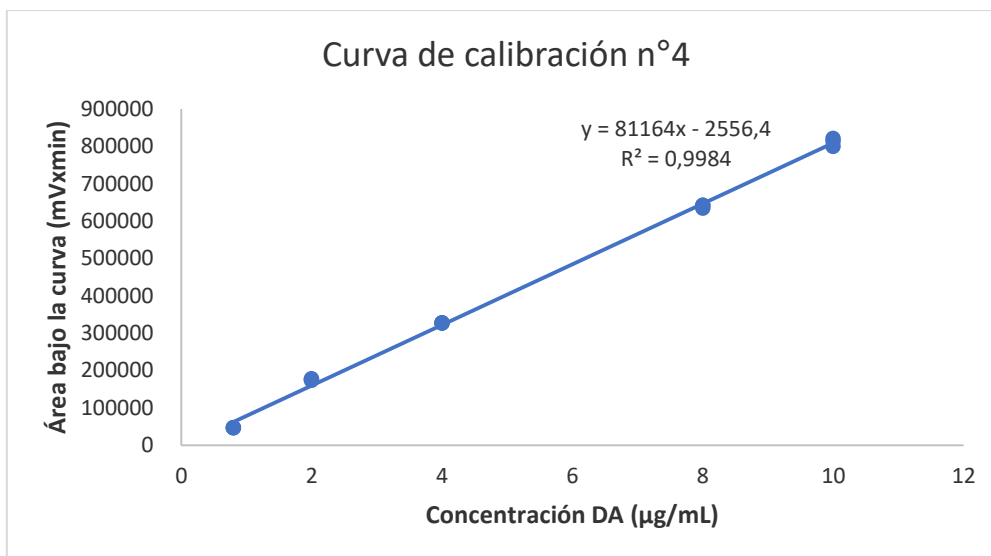
Blanco	Área prom	$\mu\text{g}/\text{ml}$	$\mu\text{g}/\text{g}$
Blanco 1	12013	0,17	0,84
Blanco 2	9729	0,14	0,69
Blanco 3	8953	0,13	0,64
Blanco 4	8588	0,12	0,61
Blanco 5	8570	0,12	0,61
Blanco 6	8480	0,12	0,61
		<b>Promedio</b>	0,67
		<b>D. estándar</b>	0,09
		<b>LC</b>	0,81
		<b>LoD</b>	0,96
		<b>LoQ</b>	1,54



**Figura 9.** Cromatogramas a 242 nm de los 3 fortificados del pool de cholga al nivel de 0,2 LA.

**Tabla 4.** Identificación de picos cromatográficos en los fortificados de matriz central cholga al nivel de 0,2 LA. Las letras DA y W corresponden al ácido domoico y triptófano, respectivamente.

Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
0.2 LA CHOLGA 1	W	5,46	643364	75135	89,705	90,962	N/A	9476	4,915	1,165
0.2 LA CHOLGA 1	DA	6,66	73834	7465	10,295	9,038	N/A	10090	N/A	1,075
0.2 LA CHOLGA 2	W	5,46	647622	74746	91,618	92,112	N/A	9383	4,998	1,196
0.2 LA CHOLGA 2	DA	6,66	59247	6401	8,382	7,888	N/A	10709	N/A	N/A
0.2 LA CHOLGA 3	W	5,46	624462	72054	89,813	90,993	N/A	9373	4,948	1,208
0.2 LA CHOLGA 3	DA	6,66	70832	7132	10,187	9,007	N/A	10221	N/A	N/A



**Figura 10.** Curva de calibración N°4, utilizada para los cálculos de concentración de ácido domoico en los fortificados de cholga al nivel de 0,2 LA.


**m = 81164**

**b= -2556,4**

**R<sup>2</sup> = 0,9984**

**Tabla 5.** Cálculo de las concentraciones de ácido domoico (µg/mL y µg/g) de los 3 fortificados del pool de cholga al nivel de 0,2 LA. Se muestra el valor promedio y desviación estándar.

Cromatogram name	Peak name	Área	Peso muestra (g)	Volumen total extracto (mL)	Concentración DA (µg/mL)	Concentración DA (µg/g)
0.2 LA CHOLGA 1	DA	73834	4,24	20	0,941	4,44
0.2 LA CHOLGA 2	DA	59247	4,23	20	0,761	3,60
0.2 LA CHOLGA 3	DA	70832	4,22	20	0,904	4,29
					<b>Promedio</b>	4,11
					<b>D. Estándar</b>	0,45

 <p><b>LBTx</b> LABORATORIO DE BIOTOXINAS UDEC</p>	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME LÍMITES VAM</b>  <b>Fecha: 10-11-2021</b>

**Conclusión:**

1.  $0,81 \mu\text{g/g (LC)} < 0,96 \mu\text{g/g (LOD)} < 1,54 \mu\text{g/g (LOQ)} < 20 \mu\text{g/g (LA)}$
2.  $1,54 \mu\text{g/g (LOQ)} < 4,11 \mu\text{g/g (}\bar{x}\text{ concentración leída fortificados } 0,2 \text{ LA)}$

Por tanto, los límites críticos (LC), de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) calculados cumplen con los criterios de aceptabilidad requeridos para el método de detección de VAM por HPLC-DAD.



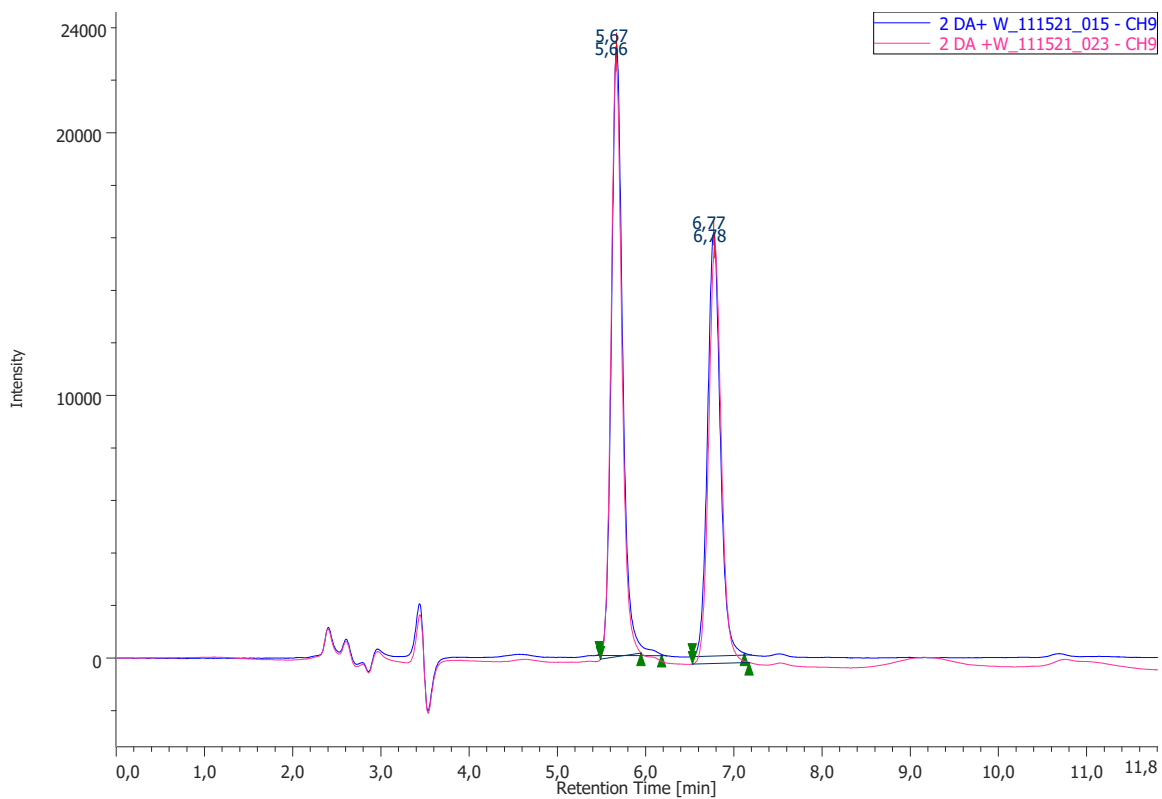
	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME REPETIBILIDAD VAM</b> <b>Matriz Central Cholga</b>  <b>Fecha: 15-11-2021</b>

**Objetivo:** Evaluar la precisión por repetibilidad del método de detección de VAM por HPLC-DAD en la matriz central cholga.

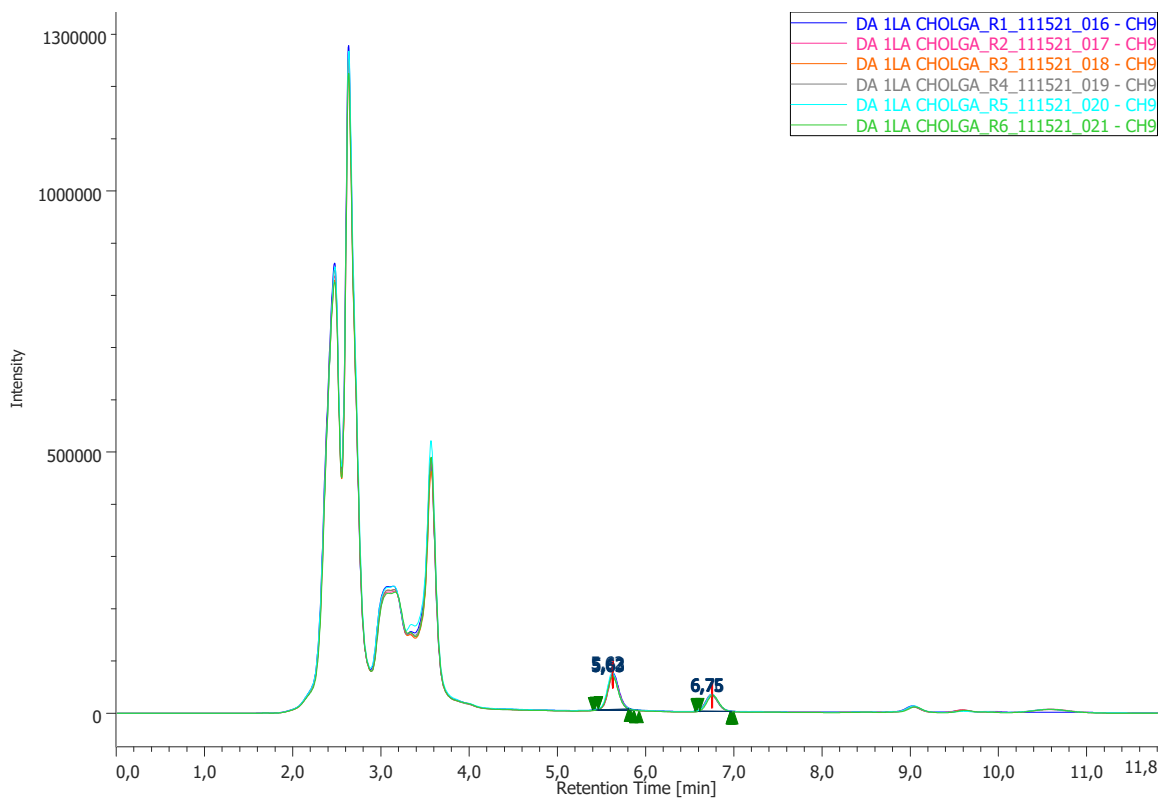
**Metodología:** Se realizaron 6 fortificaciones de los extractos del pool de selectividad de cholga al nivel de 1 LA. Se analizaron los 6 fortificados en condiciones de repetibilidad según el Instructivo P-VAM-01. La concentración del ácido domoico fue determinada según el método del patrón externo. Para ello, se analizó una muestra de la mezcla de Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL (ver Anexo 1 del Instructivo P-VAM-01). Se calculó el promedio ( $\bar{x}$ ), desviación estándar ( $S$ ) y coeficiente de variación porcentual (CV%) de las concentraciones de ácido domoico (µg/g). También se calculó el coeficiente de variación de Horwitz (CVh%). El criterio de aceptabilidad usado en la prueba se muestra en la fórmula 1.

**Fórmula 1.** Criterio de aceptabilidad utilizado en la prueba de repetibilidad. CV% corresponde al coeficiente de variación porcentual y CVh% al coeficiente de variación de Horwitz (adaptado de ISP, 2010).


$$CV\% < \frac{CVh\%}{2}$$



**Figura 1.** Cromatogramas a 242 nm de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL, inyecciones A y B.



**Figura 2.** Cromatogramas a 242 nm de los 6 fortificados de matriz central cholga al nivel de 1 LA.

	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME REPETIBILIDAD VAM</b> <b>Matriz Central Cholga</b>  <b>Fecha: 15-11-2021</b>

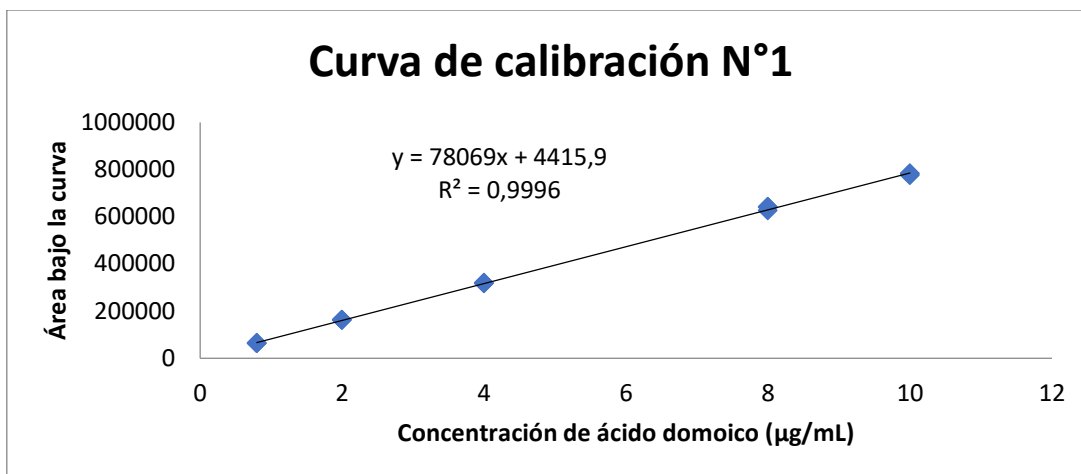
**Tabla 1.** Identificación de picos cromatográficos de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL, inyecciones A y B. Las letras W y DA corresponden a triptófano y ácido domoico, respectivamente.

Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
2 DA+ 20 W	W	5,67	207311	23218	56,194	59,020	N/A	10340	4,600	1,207
2 DA+ 20 W	DA	6,77	161607	16121	43,806	40,980	2,00649	11144	N/A	1,115
2 DA +20 W	W	5,66	195109	22761	55,081	58,871	N/A	10517	4,702	1,175
2 DA +20 W	DA	6,78	159111	15901	44,919	41,129	1,97476	11166	N/A	1,103

**Tabla 2.** Identificación de picos cromatográficos en los 6 fortificados de matriz central al nivel de 1 LA. La letras W y DA corresponden al triptófano y ácido domoico respectivamente.

Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
1LA CHOLGA R1	W	5,63	627966	69875	66,443	68,552	N/A	9827	4,574	1,147
1LA CHOLGA_R1	DA	6,75	317149	32055	33,557	31,448	3,98420	10708	N/A	1,124
1LA CHOLGA_R2	W	5,63	579107	66415	64,537	67,122	N/A	9952	4,621	1,100
1LA CHOLGA_R2	DA	6,75	318221	32532	35,463	32,878	3,99783	10890	N/A	1,101
1LA CHOLGA_R3	W	5,63	586405	66035	65,191	67,206	N/A	9876	4,653	1,106
1LA CHOLGA_R3	DA	6,75	313114	32222	34,809	32,794	3,93290	10983	N/A	1,085
1LA CHOLGA_R4	W	5,62	595617	67680	67,346	69,203	N/A	9895	4,673	1,104
1LA CHOLGA_R4	DA	6,75	288799	30119	32,654	30,797	3,62374	11114	N/A	1,098
1LA CHOLGA_R5	W	5,62	644743	71746	66,220	68,441	N/A	9700	4,632	1,125
1LA CHOLGA_R5	DA	6,75	328901	33082	33,780	31,559	4,13362	10704	N/A	1,115
1LA CHOLGA_R6	W	5,63	539800	64031	65,122	67,709	N/A	10252	4,770	1,052
1LA CHOLGA_R6	DA	6,76	289102	30537	34,878	32,291	3,62758	11318	N/A	1,098

 <b>LBTx</b> <small>LABORATORIO DE BIOTOXINAS UDEC</small>	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME REPETIBILIDAD VAM</b> <b>Matriz Central Cholga</b>  <b>Fecha: 15-11-2021</b>



**Figura 4.** Curva de calibración n°1, utilizada para los cálculos de concentración de ácido domoico según el método del patrón externo.

**Tabla 3.** Planilla de cálculos de la concentración de ácido domoico (µg/g) en los fortificados de matriz central al nivel de 1 LA.

Chromatogram	Peak Name	tR	Area	peso muestra (g)	Volumen total extracto (mL)	Concentración DA (µg/mL)	Concentración DA (µg/g)
1 LA Cholga R1	DA	6,75	315182	4,24	20	3,98	18,78
1 LA Cholga R2	DA	6,75	311663	4,23	20	3,94	18,61
1 LA Cholga R3	DA	6,75	306861	4,22	20	3,87	18,36
1 LA Cholga R4	DA	6,75	295183	4,08	20	3,72	18,26
1 LA Cholga R5	DA	6,75	320064	4,15	20	4,04	19,49
1 LA Cholga R6	DA	6,76	284388	4,26	20	3,59	16,84

	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME REPETIBILIDAD VAM</b> <b>Matriz Central Cholga</b>  <b>Fecha: 15-11-2021</b>

**Tabla 4.** Promedio, Desviación Estándar, CV y CV% de las concentraciones de ácido domoico ( $\mu\text{g/g}$ ) en los fortificados de matriz central al nivel de 1 LA . Inyecciones A y B.

<b>Prom.</b>	18,39
<b>Desv. E.</b>	0,87
<b>CV</b>	0,05
<b>CV%</b>	4,76

**Tabla 5.** Planilla de cálculos de Validación de métodos. Se muestran los resultados de la prueba de repetibilidad.

1) REPETIBILIDAD		
VALOR TEÓRICO: <input type="text" value="20,00"/>		Unidad: <input type="text" value="ug/g"/>
(10 días, misma muestra ó estándares dentro de la matriz)		
Ensayo	Fecha	Valor Obtenido ug/g
1	15/11/2021	18,78
2	15/11/2021	18,61
3	15/11/2021	18,36
4	15/11/2021	18,26
5	15/11/2021	19,49
6	15/11/2021	16,84

Promedio: 18,387  
 Desv. Estándar: 0,8750  
 n: 6  
 CVr%: 4,76  
 CVr% horwitz:   
 Evaluación **Se acepta**

**Conclusión:**

$$CV\% = 4,76 < CVh\% = 5,10$$

Por tanto, se concluye que el método de detección de VAM por HPLC-DAD en la matriz central cholga es preciso en condiciones de repetibilidad.

	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME REPRODUCIBILIDAD VAM</b> <b>Matriz Central Cholga</b>  <b>Fecha: 19-11-2021</b>

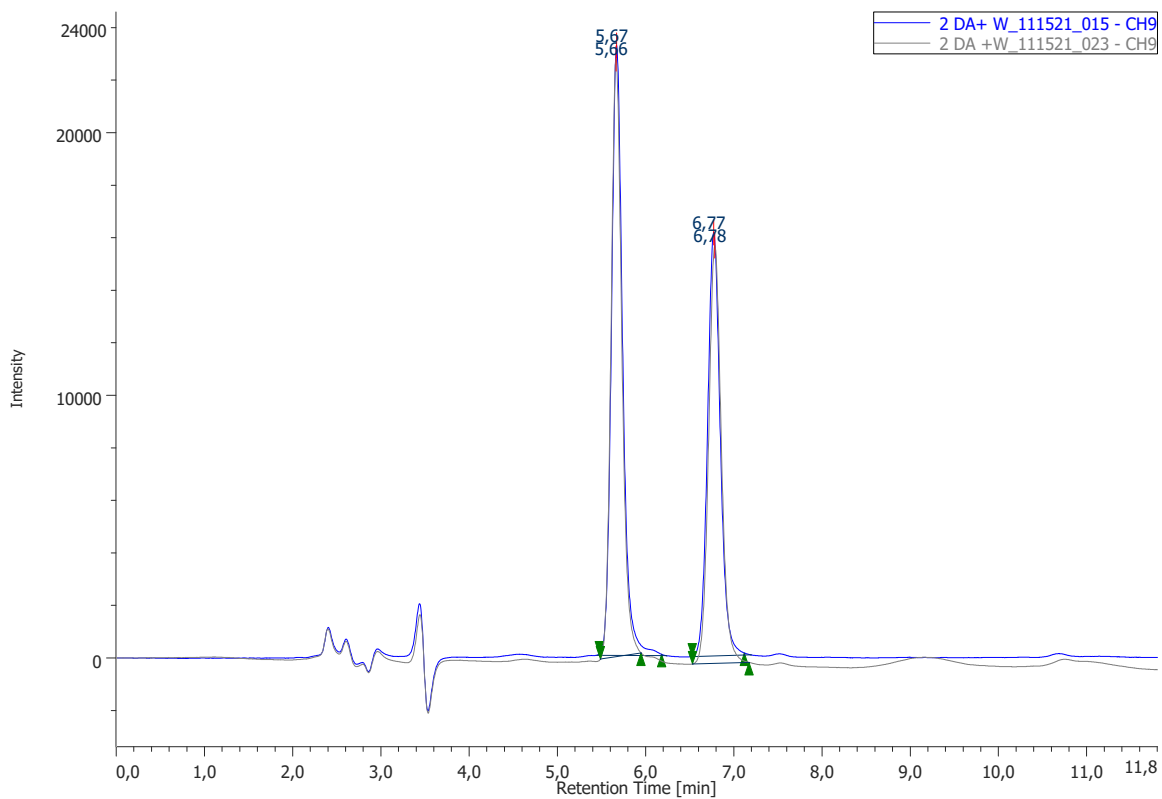
**Objetivo:** Evaluar la precisión por reproducibilidad del método de detección de VAM por HPLC-DAD en la matriz central cholga.

**Metodología:** Se realizaron 6 fortificaciones de los extractos del pool de selectividad de cholga al nivel de 1 LA. Se analizaron los 6 fortificados en condiciones de reproducibilidad (2 análisis por día) según el Instructivo P-VAM-01. La concentración del ácido domoico fue determinada según el método del patrón externo. Para ello, cada día se analizó una muestra de la mezcla de Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL (ver Anexo 1 del Instructivo P-VAM-01). Se calculó el promedio ( $\bar{x}$ ), desviación estándar ( $S$ ), coeficiente de variación porcentual (CV%) de las concentraciones de ácido domoico (µg/g). También se calculó el coeficiente de variación de Horwitz (CVh%). El criterio de aceptabilidad usado en la prueba se muestra en la fórmula 1.

**Fórmula 1.** Criterio de aceptabilidad utilizado en la prueba de reproducibilidad. CV% corresponde al coeficiente de variación porcentual y CVh% al coeficiente de variación Horwitz (adaptado de ISP, 2010).

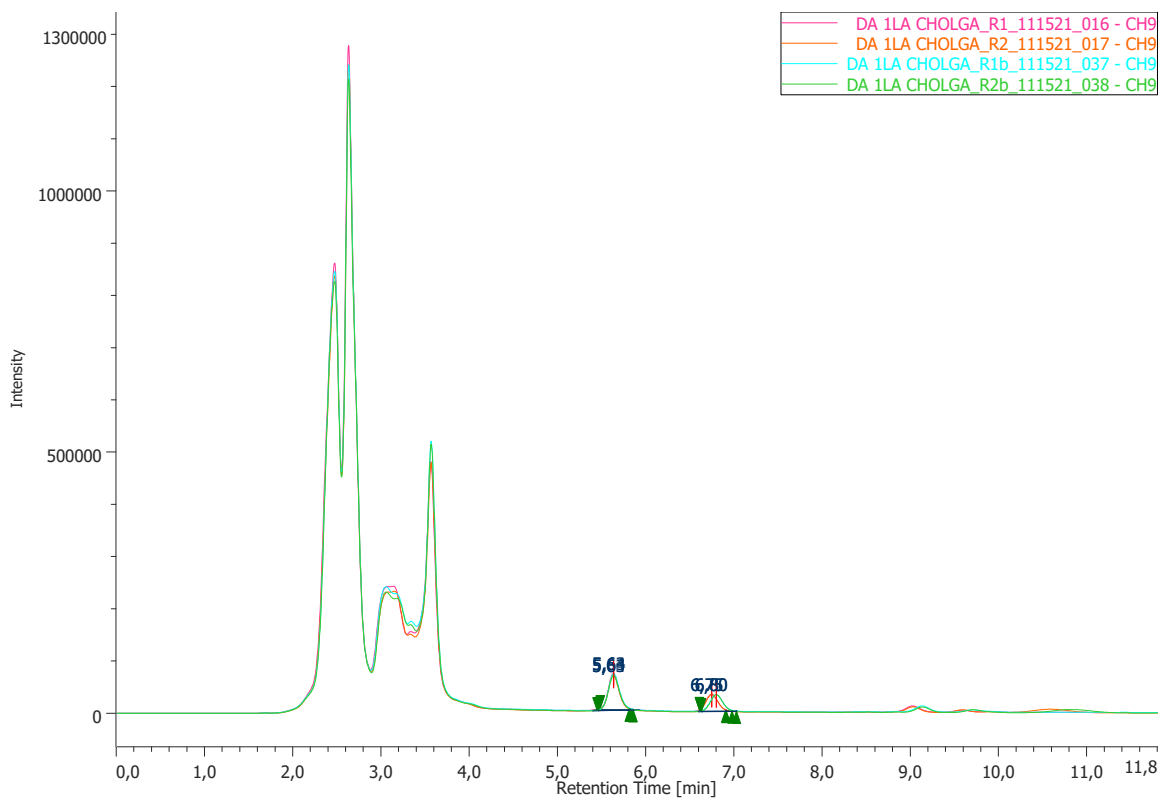
$$CV\% < CVh\% \times \frac{2}{3}$$

**PRIMER DÍA (SET 2)**



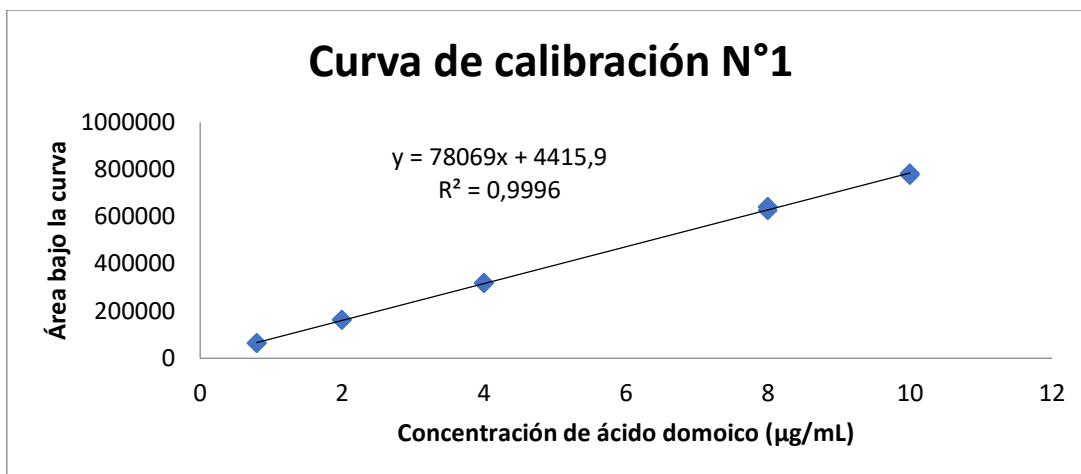
**Figura 1.** Cromatogramas a 242 nm de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL. Día 1, inyecciones A y B.






**Figura 2.** Cromatogramas a 242 nm de los 2 fortificados de matriz central cholga al nivel de 1 LA. Día 1, inyecciones A y B.

	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME REPRODUCIBILIDAD VAM</b> <b>Matriz Central Cholga</b>  <b>Fecha: 19-11-2021</b>



**Figura 3.** Curva de calibración n°1, utilizada para los cálculos de concentración de ácido domoico en el día 1.

	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME REPRODUCIBILIDAD VAM</b> <b>Matriz Central Cholga</b>  <b>Fecha: 19-11-2021</b>

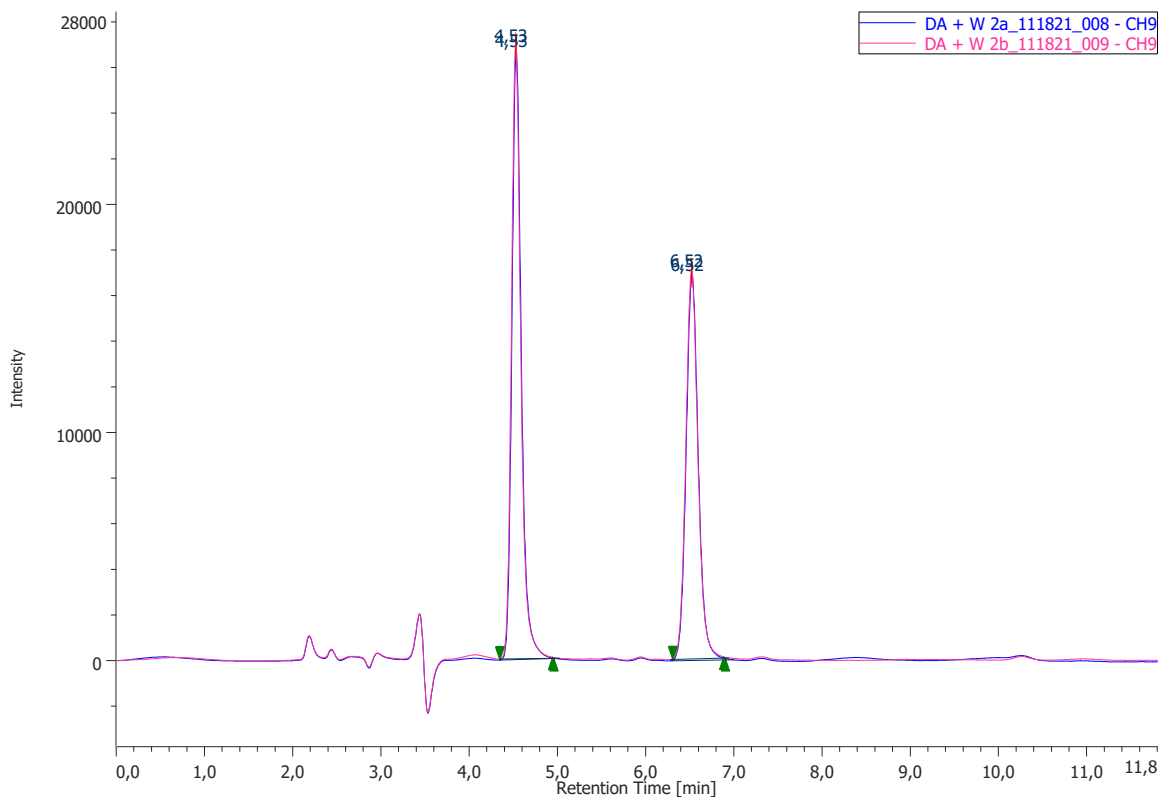
**Tabla 1.** Identificación de picos cromatográficos de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL. Día 1, inyecciones A y B. Las letras W y DA corresponden a triptófano y ácido domoico, respectivamente.

Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
2 DA+ 20 W	W	5,67	207311	23218	56,194	59,020	N/A	10340	4,600	1,207
2 DA+ 20 W	DA	6,77	161607	16121	43,806	40,980	2,00649	11144	N/A	1,115
2 DA +20 W	W	5,66	195109	22761	55,081	58,871	N/A	10517	4,702	1,175
2 DA +20 W	DA	6,78	159111	15901	44,919	41,129	1,97476	11166	N/A	1,103

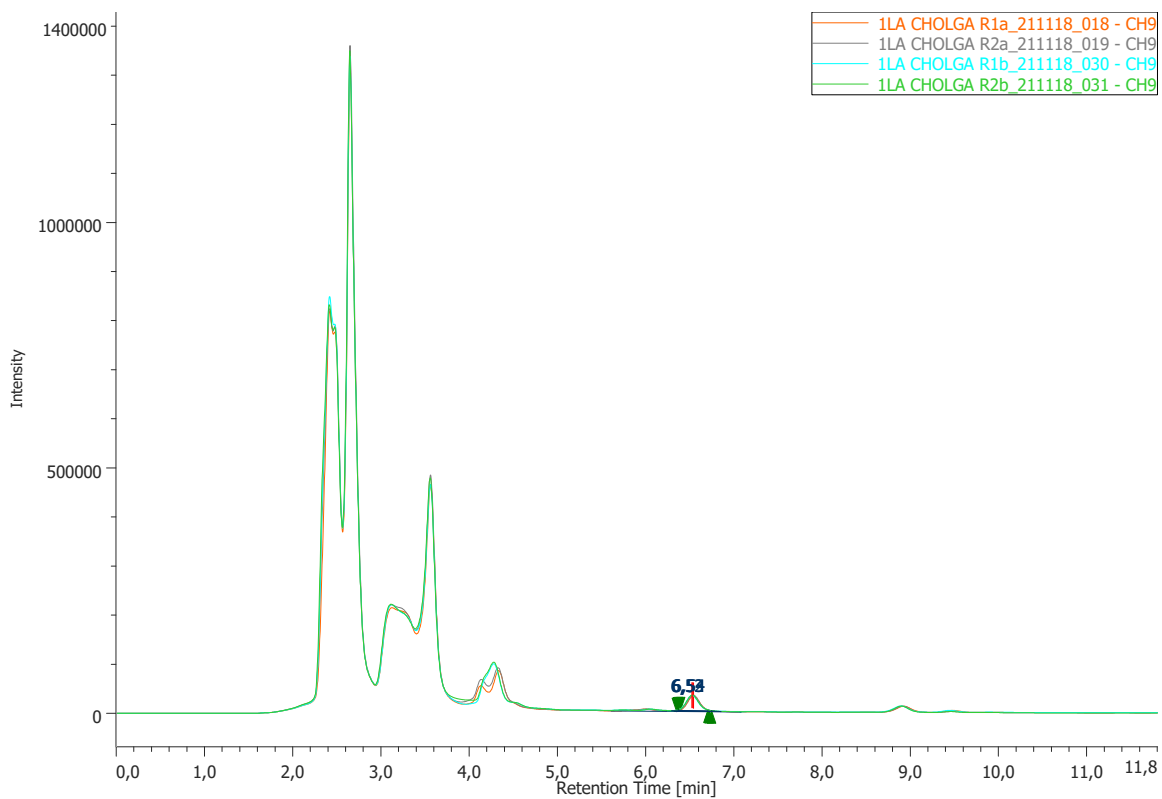
**Tabla 2.** Identificación de picos cromatográficos en los 2 fortificados de matriz central cholga al nivel de 1 LA. Día 1, inyecciones A y B. Las letras DA corresponden al ácido domoico.

Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
1LA CHOLGA_R1a	DA	6,75	311596	32055	33,497	31,448	3,91359	10708	N/A	N/A
1LA CHOLGA_R1b	DA	6,80	310252	31591	33,044	31,103	3,89651	10709	N/A	N/A
1LA CHOLGA_R2a	DA	6,75	312175	32532	35,112	32,878	3,92096	10890	N/A	N/A
1LA CHOLGA_R2b	DA	6,80	317628	32344	34,874	32,576	3,99029	10737	N/A	N/A

**SEGUNDO DÍA (SET 3)**

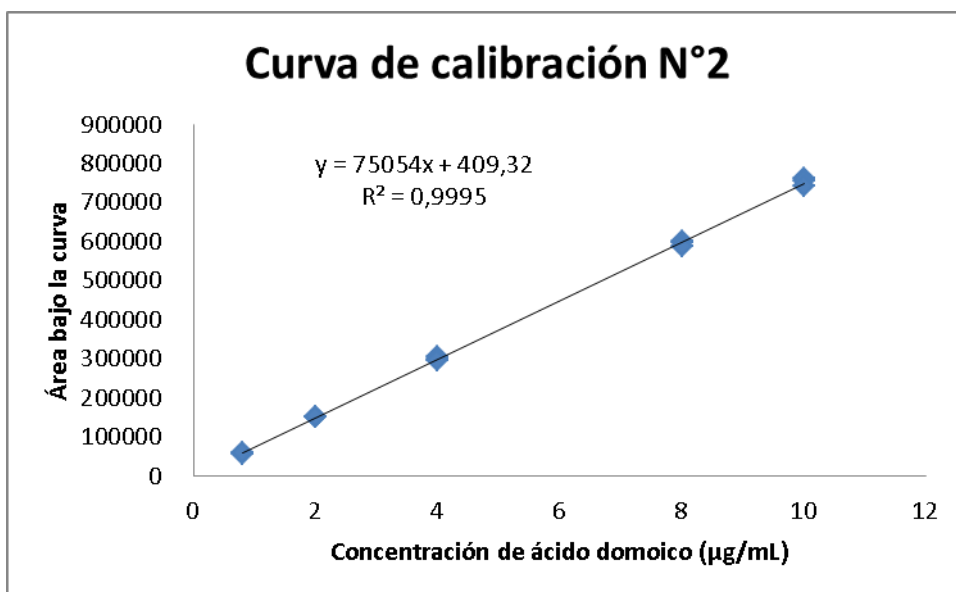


**Figura 4.** Cromatogramas a 242 nm de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL. Día 2, inyecciones A y B.



**Figura 5.** Cromatogramas a 242 nm de los 2 fortificados de matriz central cholga al nivel de 1 LA. Día 2, inyecciones A y B.

	Laboratorio de Biotoxinas UDEC
	<b>INFORME REPRODUCIBILIDAD VAM</b> <b>Matriz Central Cholga</b>  <b>Fecha: 19-11-2021</b>



**Figura 6.** Curva de calibración n°2, utilizada para los cálculos de concentración de ácido domoico en el día 2.

	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME REPRODUCIBILIDAD VAM</b> <b>Matriz Central Cholga</b>  <b>Fecha: 19-11-2021</b>

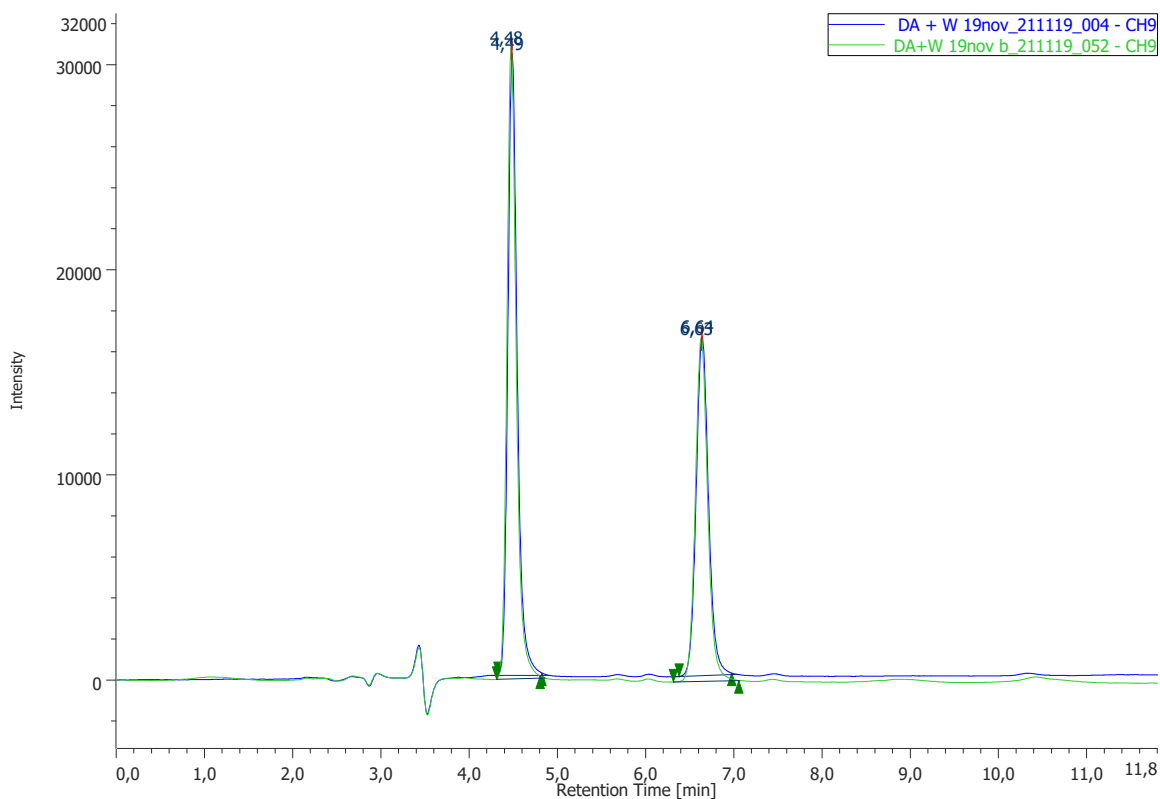
**Tabla 3.** Identificación de picos cromatográficos de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL. Día 2, inyecciones A y B. Las letras W y DA corresponden a triptófano y ácido domoico, respectivamente.

Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
2 DA + 20 W a	W	4,53	200283	26717	55,117	61,248	N/A	9371	9,203	1,262
2 DA + 20 W a	DA	6,52	163092	16904	44,883	38,752	N/A	11226	N/A	1,143
2 DA + 20 W b	W	4,53	199928	26879	55,008	61,243	N/A	9358	9,232	1,274
2 DA + 20 W b	DA	6,52	163524	17010	44,992	38,757	N/A	11256	N/A	1,131

**Tabla 4.** Identificación de picos cromatográficos en los 2 fortificados de matriz central cholga al nivel de 1 LA. Día 2, inyecciones A y B. Las letras DA corresponden al ácido domoico.

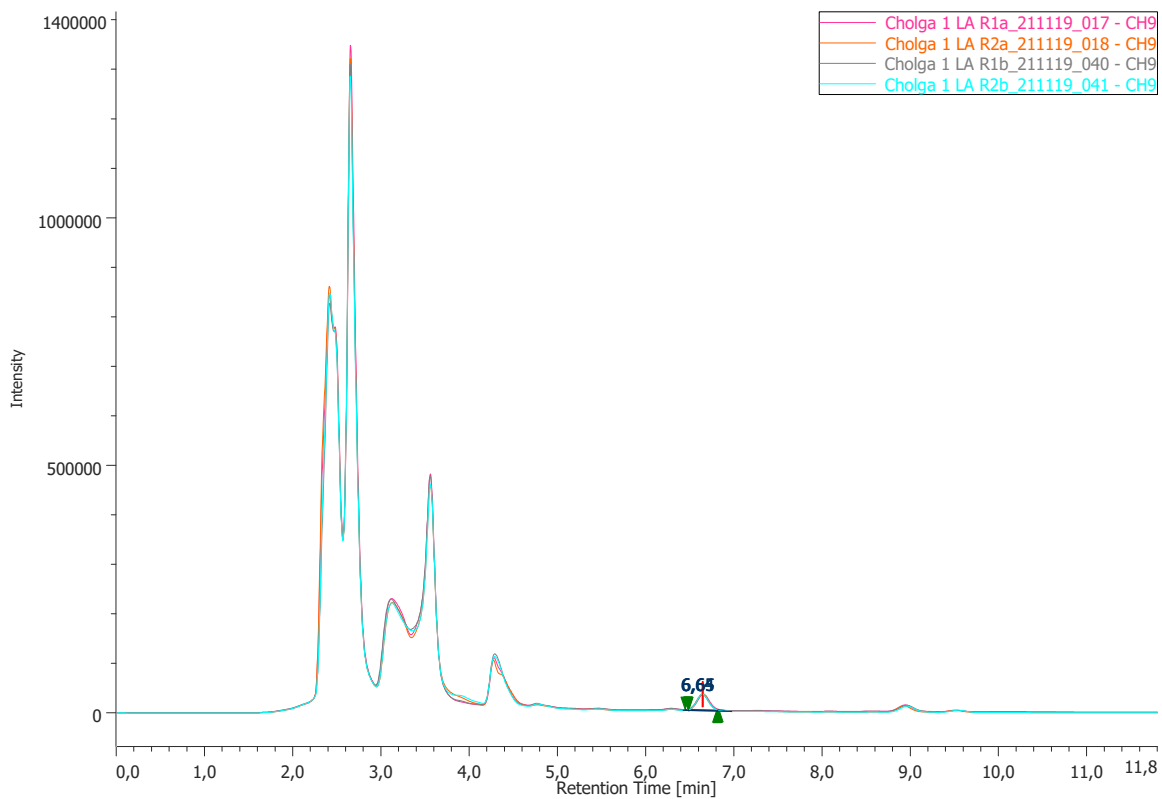
Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
1LA CHOLGA_R1a	DA	6,54	305083	31370	100,000	100,000	N/A	10212	N/A	N/A
1LA CHOLGA_R1b	DA	6,52	300845	31180	100,000	100,000	N/A	10520	N/A	1,132
1LA CHOLGA_R2a	DA	6,54	338869	33363	100,000	100,000	N/A	9909	N/A	N/A
1LA CHOLGA_R2b	DA	6,53	320975	32176	100,000	100,000	N/A	10182	N/A	N/A

**TERCER DÍA (SET 4)**



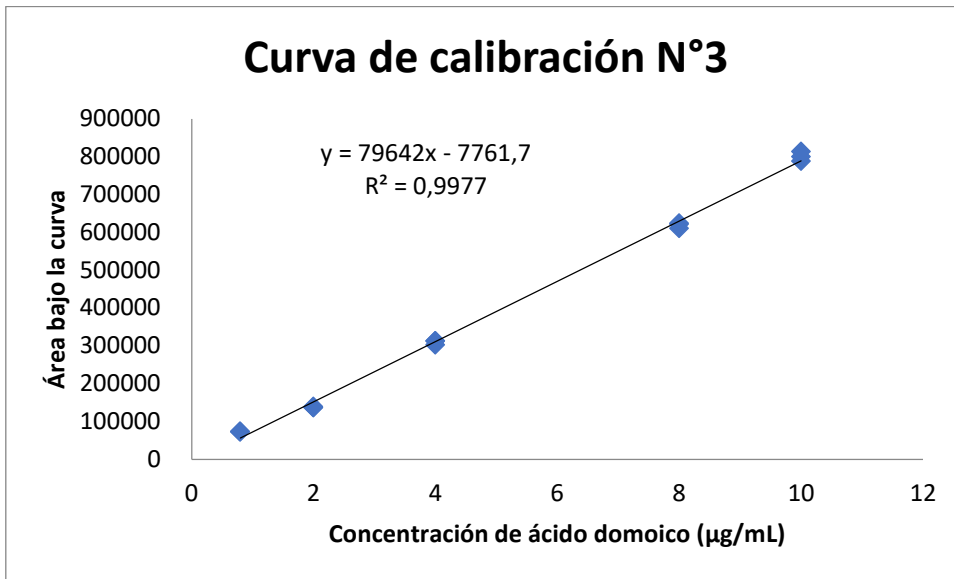
**Figura 7.** Cromatogramas a 242 nm de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL. Día 3, inyecciones A y B.






**Figura 8.** Cromatogramas a 242 nm de los 2 fortificados de matriz central cholga al nivel de 1 LA. Día 3, inyecciones A y B.

	Laboratorio de Biotoxinas UDEC
	<b>INFORME REPRODUCIBILIDAD VAM</b> <b>Matriz Central Cholga</b>  <b>Fecha: 19-11-2021</b>



**Figura 9.** Curva de calibración n°3, utilizada para los cálculos de concentración de ácido domoico en el día 3.

	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME REPRODUCIBILIDAD VAM</b> <b>Matriz Central Cholga</b>  <b>Fecha: 19-11-2021</b>

**Tabla 5.** Identificación de picos cromatográficos de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL. Día 3, inyecciones A y B. Las letras W y DA corresponden a triptófano y ácido domoico, respectivamente.

Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
2 DA + 20 W a	W	4,49	225297	30313	58,287	64,724	N/A	9279	9,905	1,269
2 DA + 20 W a	DA	6,64	161232	16521	41,713	35,276	N/A	11318	N/A	1,117
2 DA + 20 W b	W	4,48	228166	30788	58,175	64,786	N/A	9264	9,899	1,254
2 DA + 20 W b	DA	6,63	164041	16735	41,825	35,214	N/A	11236	N/A	1,123

**Tabla 6.** Identificación de picos cromatográficos en los 2 fortificados de matriz central cholga al nivel de 1 LA. Día 3, inyecciones A y B. Las letras DA corresponden al ácido domoico.

Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
1LA CHOLGA_R1a	DA	6,65	308272	31929	100,000	100,000	N/A	10874	N/A	1,075
1LA CHOLGA_R1b	DA	6,64	300558	31315	100,000	100,000	N/A	10980	N/A	1,085
1LA CHOLGA_R2a	DA	6,65	322996	33985	100,000	100,000	N/A	10976	N/A	N/A
1LA CHOLGA_R2b	DA	6,64	323260	33756	100,000	100,000	N/A	10930	N/A	N/A

	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME REPRODUCIBILIDAD VAM</b> <b>Matriz Central Cholga</b>  <b>Fecha: 19-11-2021</b>

**Tabla 7.** Planilla de cálculos de la concentración de ácido domoico ( $\mu\text{g/g}$ ) en los fortificados de matriz central cholga al nivel de 1 LA.

Set	Chromatogram name	Peak Name	tR prom	Área prom	peso muestra (g)	Volumen total extracto (mL)	Concentración DA ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración DA ( $\mu\text{g/g}$ )
2	Cholga 1 LA	DA	6,77	314740	4,24	20	3,97	18,75
2	Cholga 2 LA	DA	6,78	315481	4,23	20	3,98	18,84
3	Cholga 3 LA	DA	6,53	302964	4,24	20	3,82	18,04
3	Cholga 4 LA	DA	6,53	329922	4,23	20	4,17	19,71
4	Cholga 5 LA	DA	6,65	304415	4,24	20	3,84	18,13
4	Cholga 6 LA	DA	6,65	323128	4,23	20	4,08	19,30

**Tabla 8.** Promedio, Desviación Estándar, CV y CV% de las concentraciones de ácido domoico ( $\mu\text{g/g}$ ) en los fortificados de matriz central al nivel de 1 LA . Inyecciones A y B.

<b>Promedio</b>	18,79
<b>Desviación E.</b>	0,65
<b>CV</b>	0,03
<b>CV%</b>	3,47

	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME REPRODUCIBILIDAD VAM</b> <b>Matriz Central Cholga</b>  <b>Fecha: 19-11-2021</b>

**Tabla 9.** Planilla de cálculos de Validación de métodos. Se muestran los resultados de la prueba de reproducibilidad.


2) REPRODUCIBILIDAD		
VALOR TEÓRICO: <input type="text" value="20,00"/>		Unidad: <input type="text" value="ug/g"/>
(10 días totales, misma muestra ó estándares dentro de la matriz)		
Ensayo	Fecha	Valor Obtenido ug/g
1	15/11/2021	18,75
2	15/11/2021	18,84
3	18/11/2021	18,04
4	18/11/2021	19,71
5	19/11/2021	18,13
6	19/11/2021	19,30

Promedio: 18,795  
 Desv. Estándar: 0,6520  
 n: 6  
 CVRi%: 3,47  
 CVRi% horwitz:   
 Evaluación **Se acepta**

**Conclusión:**

$$CV\% = 3,47 < CVh\% = 6,80$$

Por tanto, se concluye que el método de detección de VAM por HPLC-DAD en la matriz central cholga es preciso bajo condiciones de reproducibilidad.

	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME SESGO VAM</b> <b>Matriz Central Cholga</b>  <b>Fecha: 19-11-2021</b>

**Objetivo:** Evaluar el sesgo del método de detección de VAM por HPLC-DAD en la matriz central cholga.

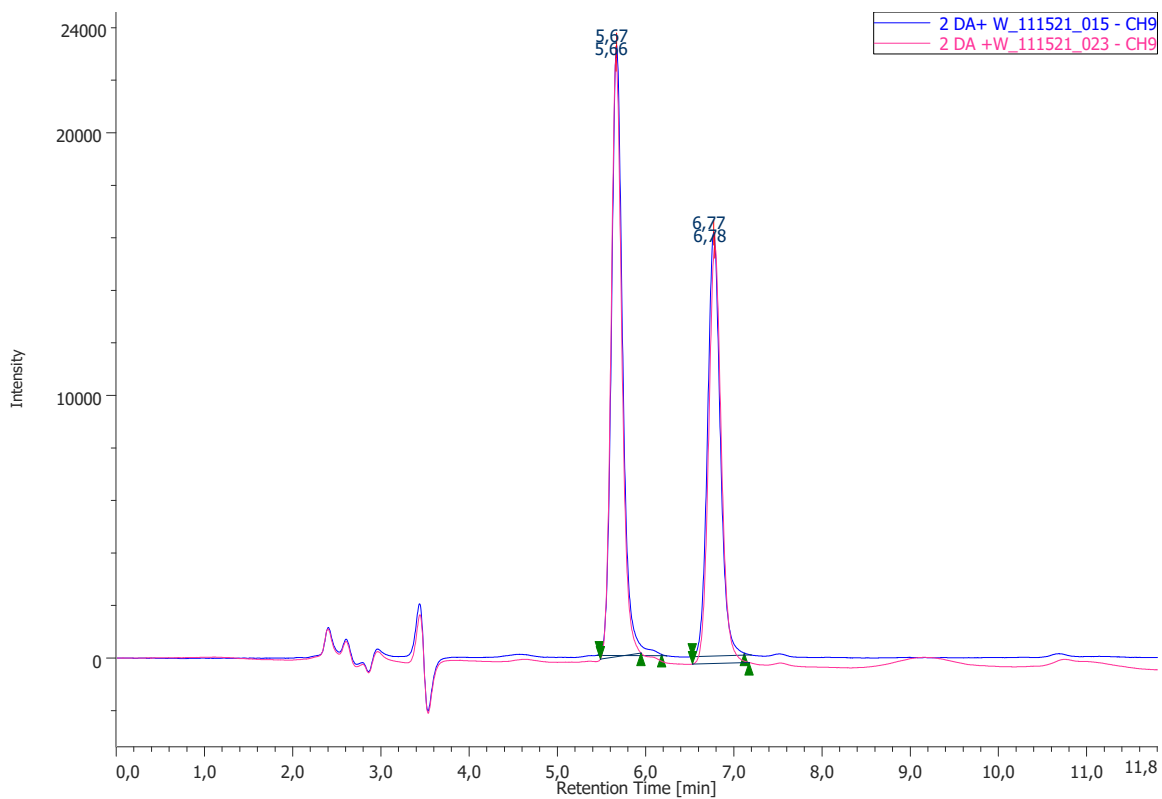
**Metodología:** Se realizaron 6 fortificaciones de los extractos del pool de selectividad de cholga al nivel de 1 LA. Se analizaron los 6 fortificados en condiciones de repetibilidad según el Instructivo P-VAM-01. La concentración del ácido domoico fue determinada según el método del patrón externo. Para ello, se analizó una muestra de la mezcla de Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL (ver Anexo 1 del Instructivo P-VAM-01). Se calculó el promedio ( $\bar{x}$ ) y desviación estándar ( $S$ ) de las concentraciones de ácido domoico (µg/g). El sesgo de cada lectura se calculó con la fórmula 1. Se calculó el promedio del sesgo. El criterio de aceptabilidad usado para evaluar el sesgo fue la prueba  $t$  de student, con valor  $t$  calculado < valor  $t$  crítico.

**Fórmula 1.** Fórmula utilizada para el calcular el valor del sesgo ( $S$ ).  $X$  corresponde a la concentración (µg/g) de ácido domoico (DA) leída y  $Xa$  a la concentración conocida de DA en el fortificado (1 LA = 20 µg/g) (adaptado de ISP, 2010).

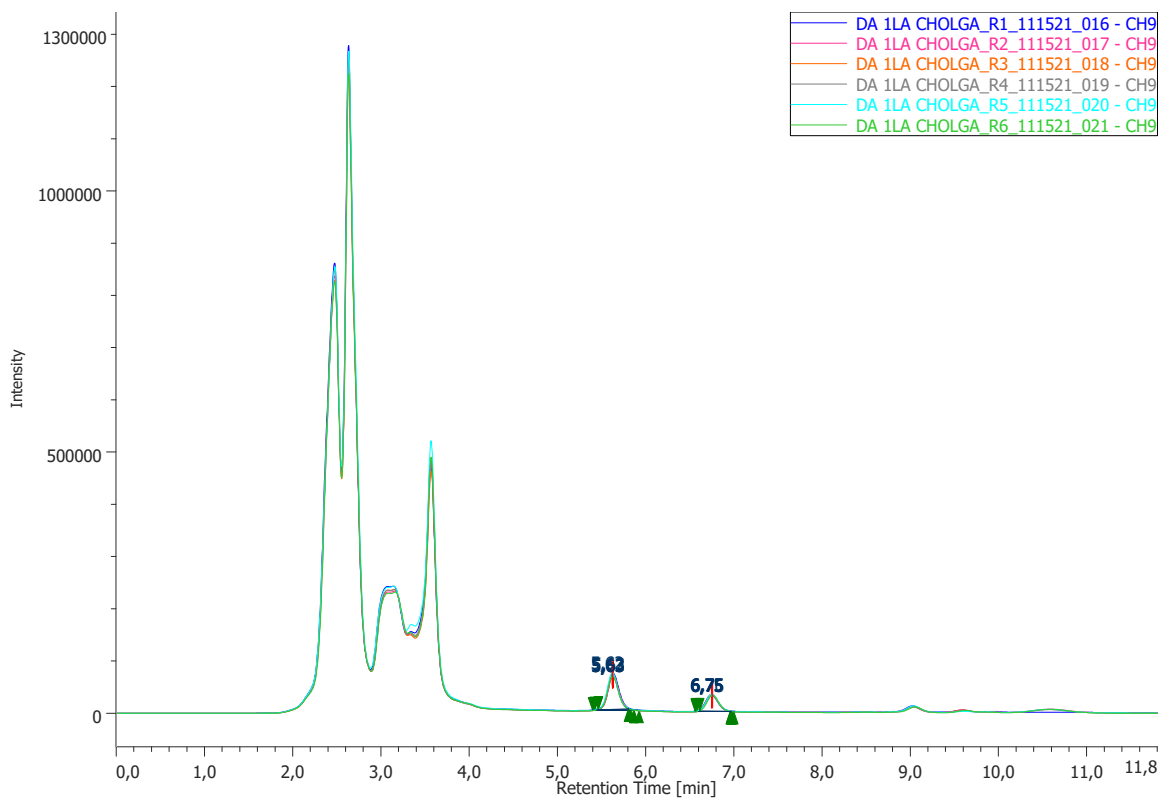
$$S = |X - Xa|$$

**Fórmula 2.** Fórmula utilizada para obtener el valor  $t$  calculado ( $t_{calc}$ ).  $Xa$  corresponde a la concentración conocida de DA en el fortificado (1 LA = 20 µg/g),  $\bar{X}$  y  $S$  al promedio y desviación estándar de las concentraciones de DA leídas (µg/g) y  $n$  al número de fortificados leídos (6) (adaptado de ISP, 2010).

$$t_{calc} = \frac{|Xa - \bar{X}|}{S \times \sqrt{n}} > t_{crit}$$

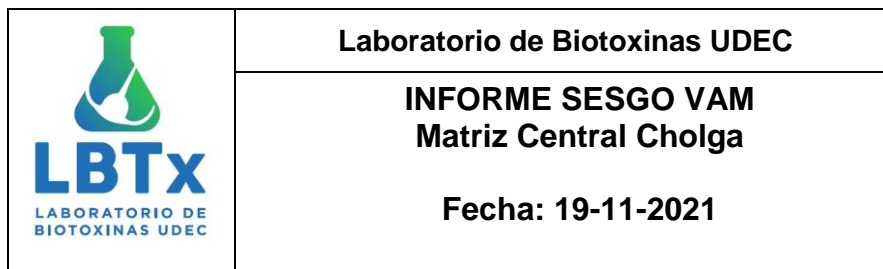


**Figura 1.** Cromatogramas a 242 nm de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL, inyecciones A y B.



**Figura 2.** Cromatogramas a 242 nm de los 6 fortificados de matriz central cholga al nivel de 1 LA.






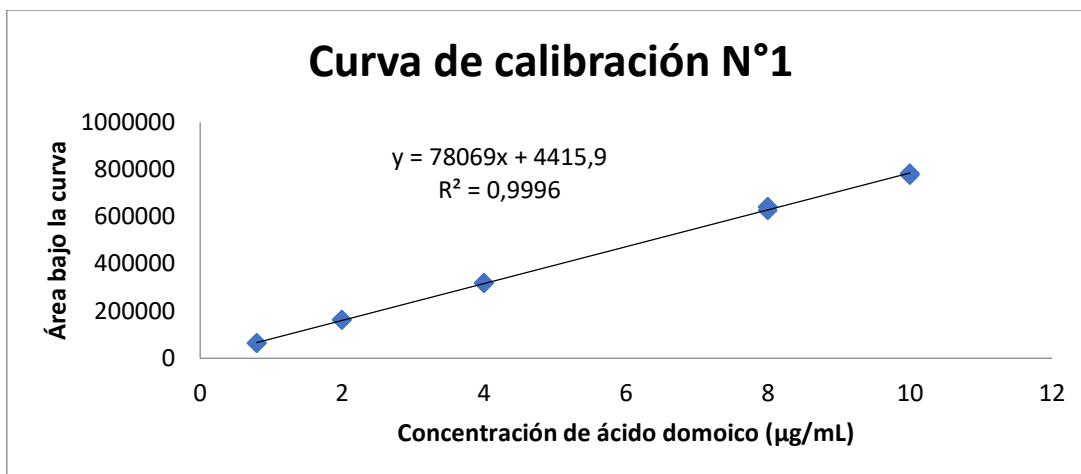
**Tabla 1.** Identificación de picos cromatográficos de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL, inyecciones A y B. Las letras W y DA corresponden a triptófano y ácido domoico, respectivamente.

Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
2 DA+ 20 W	W	5,67	207311	23218	56,194	59,020	N/A	10340	4,600	1,207
2 DA+ 20 W	DA	6,77	161607	16121	43,806	40,980	2,00649	11144	N/A	1,115
2 DA +20 W	W	5,66	195109	22761	55,081	58,871	N/A	10517	4,702	1,175
2 DA +20 W	DA	6,78	159111	15901	44,919	41,129	1,97476	11166	N/A	1,103

**Tabla 2.** Identificación de picos cromatográficos en los 6 fortificados de matriz central al nivel de 1 LA. La letras W y DA corresponden al triptófano y ácido domoico respectivamente.

Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
1LA CHOLGA R1	W	5,63	627966	69875	66,443	68,552	N/A	9827	4,574	1,147
1LA CHOLGA_R1	DA	6,75	317149	32055	33,557	31,448	3,98420	10708	N/A	1,124
1LA CHOLGA_R2	W	5,63	579107	66415	64,537	67,122	N/A	9952	4,621	1,100
1LA CHOLGA_R2	DA	6,75	318221	32532	35,463	32,878	3,99783	10890	N/A	1,101
1LA CHOLGA_R3	W	5,63	586405	66035	65,191	67,206	N/A	9876	4,653	1,106
1LA CHOLGA_R3	DA	6,75	313114	32222	34,809	32,794	3,93290	10983	N/A	1,085
1LA CHOLGA_R4	W	5,62	595617	67680	67,346	69,203	N/A	9895	4,673	1,104
1LA CHOLGA_R4	DA	6,75	288799	30119	32,654	30,797	3,62374	11114	N/A	1,098
1LA CHOLGA_R5	W	5,62	644743	71746	66,220	68,441	N/A	9700	4,632	1,125
1LA CHOLGA_R5	DA	6,75	328901	33082	33,780	31,559	4,13362	10704	N/A	1,115
1LA CHOLGA_R6	W	5,63	539800	64031	65,122	67,709	N/A	10252	4,770	1,052
1LA CHOLGA_R6	DA	6,76	289102	30537	34,878	32,291	3,62758	11318	N/A	1,098


	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME SESGO VAM</b> <b>Matriz Central Cholga</b>  <b>Fecha: 19-11-2021</b>



**Figura 3.** Curva de calibración n°1, utilizada para los cálculos de concentración de ácido domoico según el método del patrón externo.

**Tabla 3.** Planilla de cálculos de la concentración de ácido domoico ( $\mu\text{g/g}$ ) en los fortificados de matriz central al nivel de 1 LA.

Chromatogram	Peak Name	tR	Area	peso muestra (g)	Volumen total extracto (mL)	Concentración DA ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración DA ( $\mu\text{g/g}$ )
1 LA Cholga R1	DA	6,75	315182	4,24	20	3,98	18,78
1 LA Cholga R2	DA	6,75	311663	4,23	20	3,94	18,61
1 LA Cholga R3	DA	6,75	306861	4,22	20	3,87	18,36
1 LA Cholga R4	DA	6,75	295183	4,08	20	3,72	18,26
1 LA Cholga R5	DA	6,75	320064	4,15	20	4,04	19,49
1 LA Cholga R6	DA	6,76	284388	4,26	20	3,59	16,84

	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME SESGO VAM</b> <b>Matriz Central Cholga</b>  <b>Fecha: 19-11-2021</b>

**Tabla 4.** Planilla de cálculos del sesgo de las concentraciones de ácido domoico ( $\mu\text{g/g}$ ) en los fortificados de matriz central al nivel de 1 LA.

Muestra	Concentración DA leída ( $\mu\text{g/g}$ )	Concentración DA conocida ( $\mu\text{g/mL}$ )	Valor del sesgo
1 LA Cholga R1	18,78	20,00	1,22
1 LA Cholga R2	18,61	20,00	1,39
1 LA Cholga R3	18,36	20,00	1,64
1 LA Cholga R4	18,26	20,00	1,74
1 LA Cholga R5	19,49	20,00	0,51
1 LA Cholga R6	16,84	20,00	3,16
		<b>Promedio</b>	1,77
		<b>D. estándar</b>	1,09

**Tabla 5.** Planilla de cálculos de Validación de métodos. Se muestran los resultados de la prueba de sesgo.


1) SESGO			Unidad:
VALOR TEÓRICO:	20,00		$\mu\text{g/g}$
( mismo día, 10 veces cert.)			
Ensayo	Fecha	Valor Obtenido $\mu\text{g/g}$	
1	15/11/2021	18,78	
2	15/11/2021	18,61	
3	18/11/2021	18,17	
4	18/11/2021	20,26	
5	19/11/2021	18,36	
6	19/11/2021	19,29	
			<b>Promedio:</b> 18,910 <b>Desv. Estándar:</b> 0,765 n 6 <b>Ön</b> 2,449 <b>t<sub>calc</sub></b> 0,582 <b>t<sub>crit</sub> (<math>\alpha=0,05; n-1</math>)</b> 2,571 <b>Evaluación Se acepta</b>

**Conclusión:**

Sesgo promedio = 1,77

t calculado = 0,58 < t crítico =2,57

El sesgo cumple con el criterio de aceptabilidad  $t_{\text{calc}} < t_{\text{crit}}$ . Por tanto, se concluye que el método de detección de VAM por HPLC-DAD en la matriz central cholga posee un sesgo aceptable de 1,77, y que cumple con las exigencias de veracidad.

	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME RECUPERACIÓN VAM</b> <b>Matriz Central Cholga</b>  <b>Fecha: 19-11-2021</b>

**Objetivo:** Evaluar el porcentaje de recuperación del método de detección de VAM por HPLC-DAD en la matriz central cholga.

### Metodología:

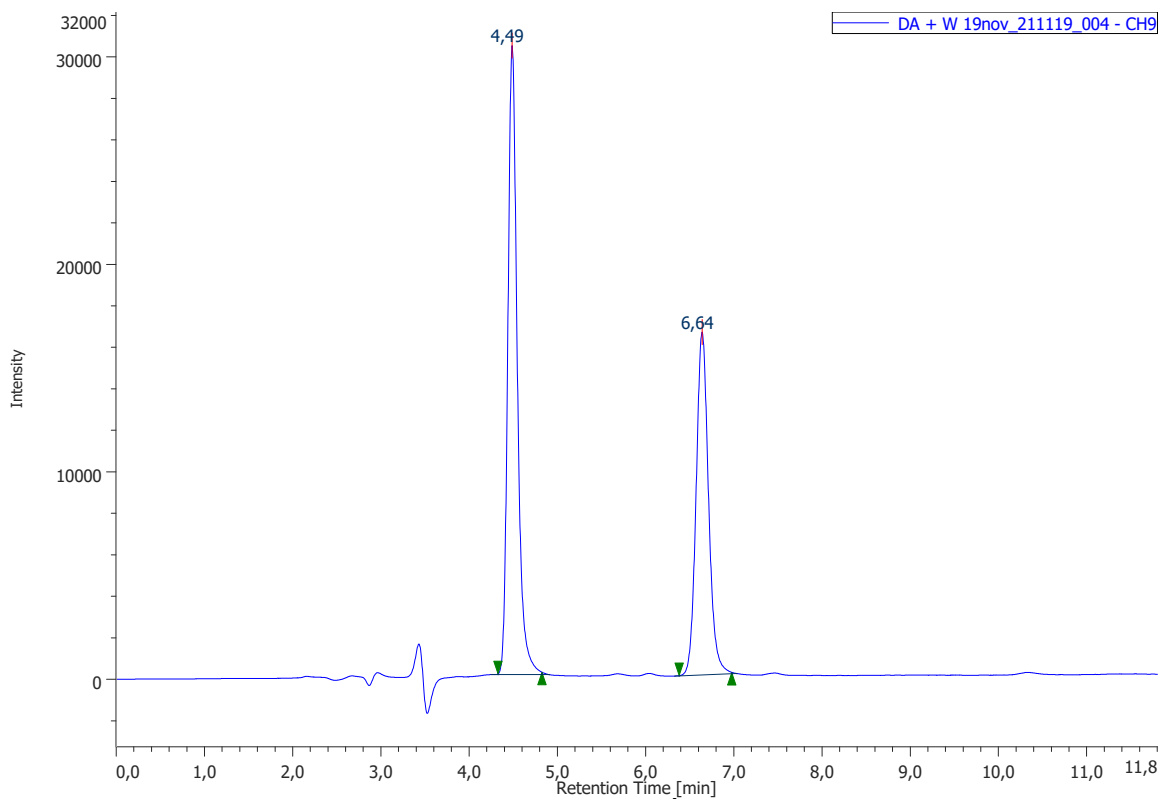
Se realizaron 9 fortificaciones de los extractos del pool de cholga: 3 al nivel de 0,5 LA, 3 al nivel de 1 LA y 3 al nivel de 2 LA. Se analizaron los fortificados en condiciones de repetibilidad según el Instructivo P-VAM-01. La concentración del ácido domoico fue determinada según el método del patrón externo. Para ello, se analizó una muestra de la mezcla de Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL (ver Anexo 1 del Instructivo P-VAM-01). El % de recuperación se calculó con la fórmula 1. El criterio de aceptabilidad utilizado fue la prueba t de student, con valor t calculado (fórmula 2) < valor t crit.

**Fórmula 1.** Fórmula utilizada para calcular el porcentaje de recuperación (%R). Ce corresponde a la concentración (µg/g) de ácido domoico (DA) leída en el fortificado, Co a la concentración (µg/g) de DA leída en los blancos y Ca a la concentración teórica de DA utilizada en la fortificación (adaptado de ISP, 2010).

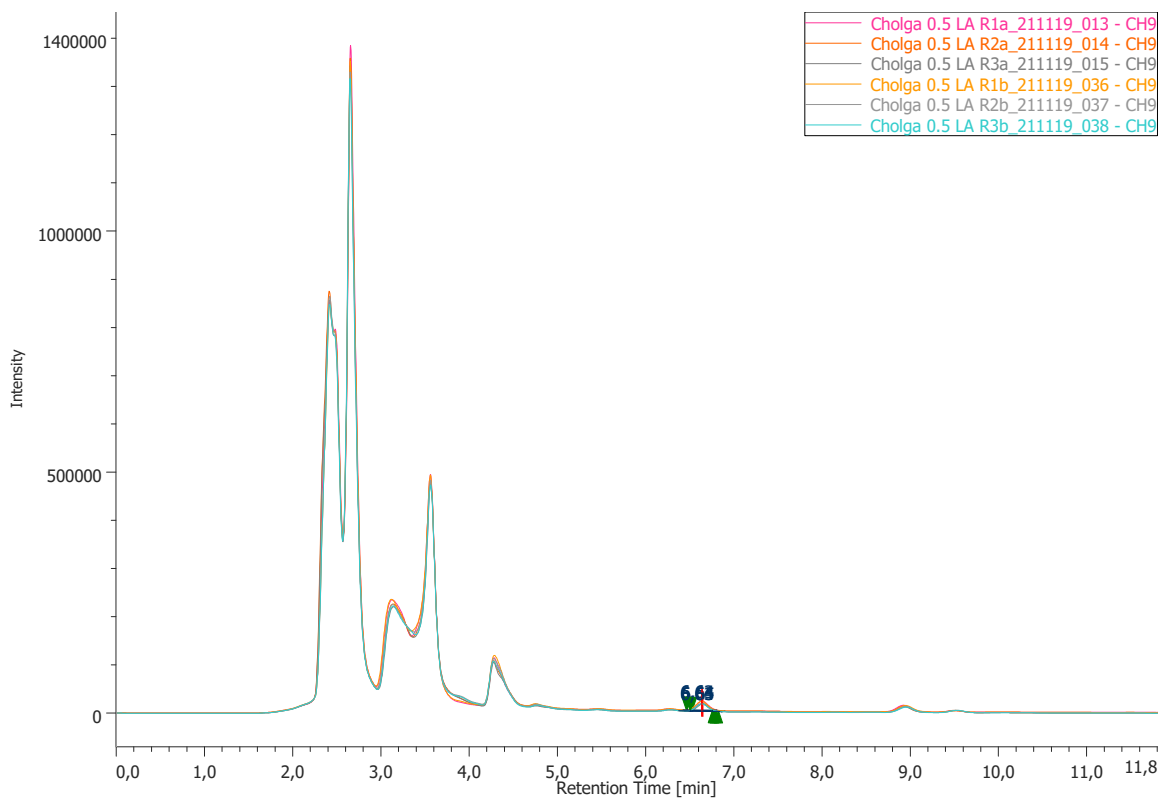
$$\%R = \left( \frac{C_e - C_o}{C_a} \right) \times 100$$

**Fórmula 2.** Fórmula utilizada para obtener el valor t calculado (*t calc*). %R corresponde al porcentaje de recuperación, S a la desviación estándar de los porcentajes de recuperación calculados y n al número de fortificados leídos (adaptado de ISP, 2010).

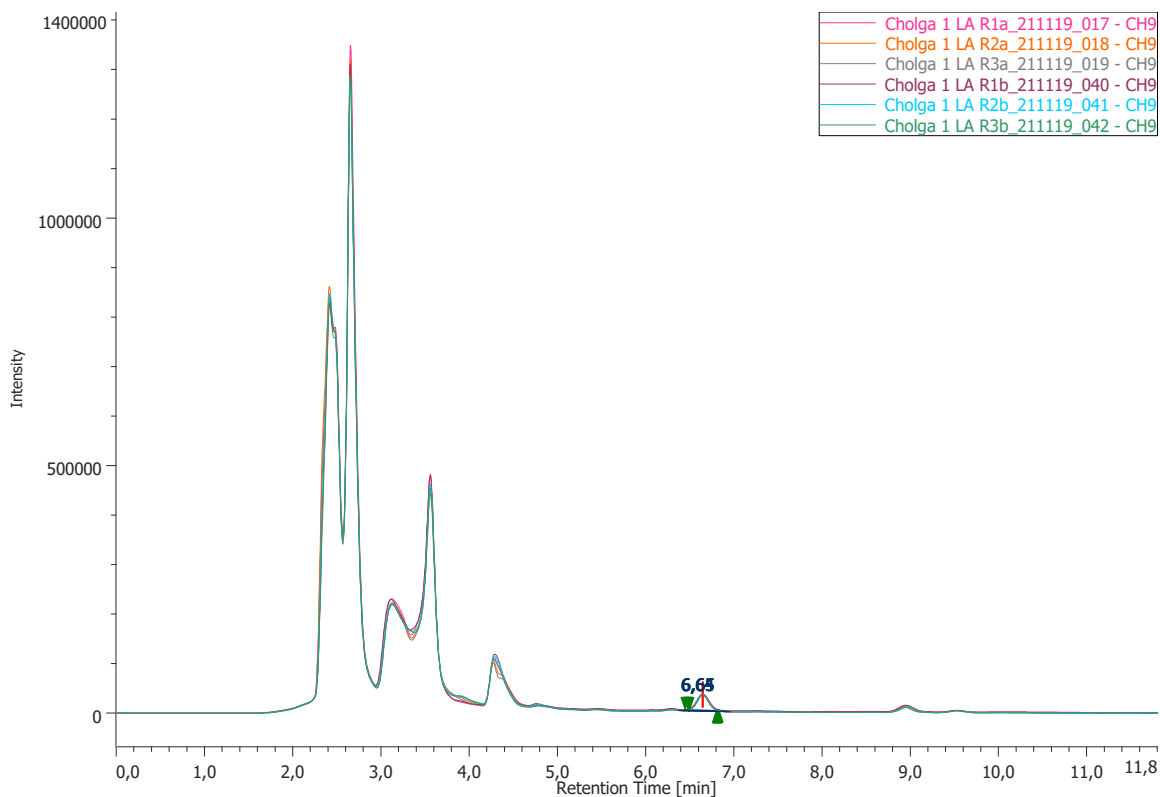
$$t \text{ calc} = \frac{[100 - \%R]}{S \times \sqrt{n}}$$



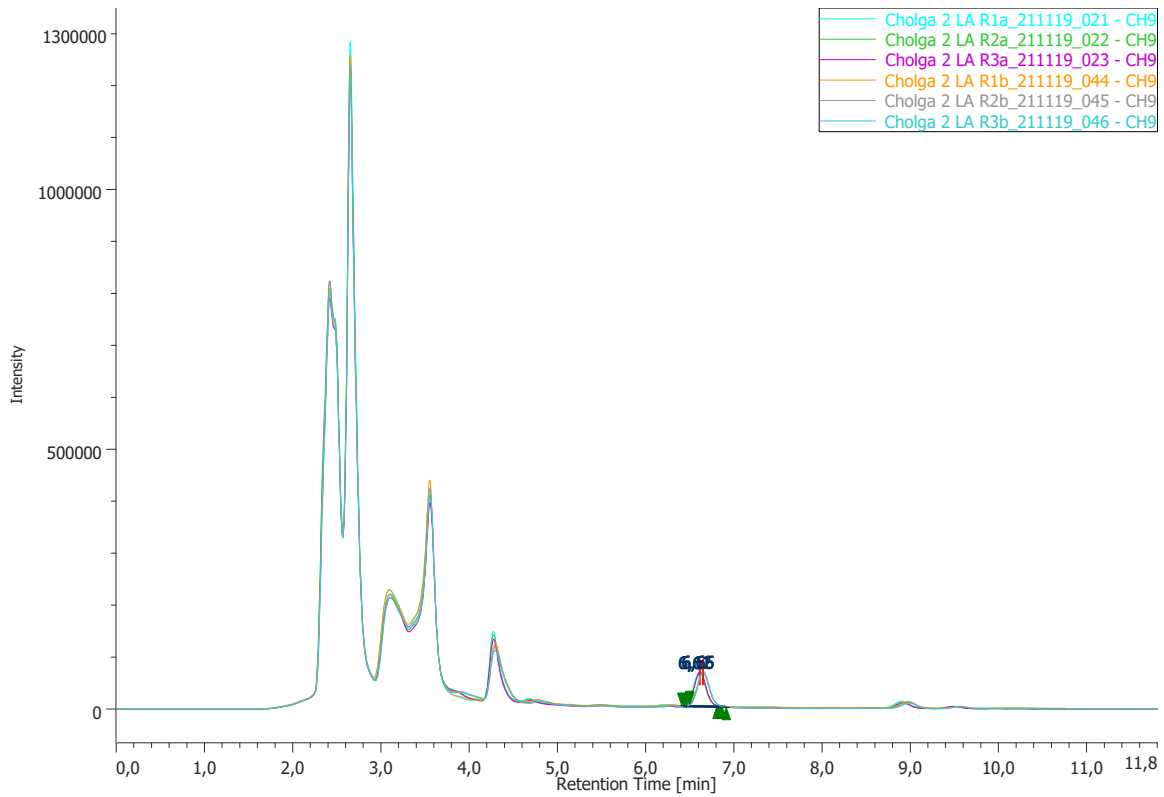
**Figura 1.** Cromatogramas a 242 nm de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL. Inyecciones A y B.



**Figura 2.** Cromatogramas a 242 nm de los 3 fortificados de matriz central cholga al nivel de 0,5 LA. Inyecciones A y B.




**Figura 3.** Cromatogramas a 242 nm de los 3 fortificados de matriz central cholga al nivel de 1 LA. Inyecciones A y B.



**Figura 4.** Cromatogramas a 242 nm de los 3 fortificados de matriz central cholga al nivel de 0,5 LA. Inyecciones A y B.



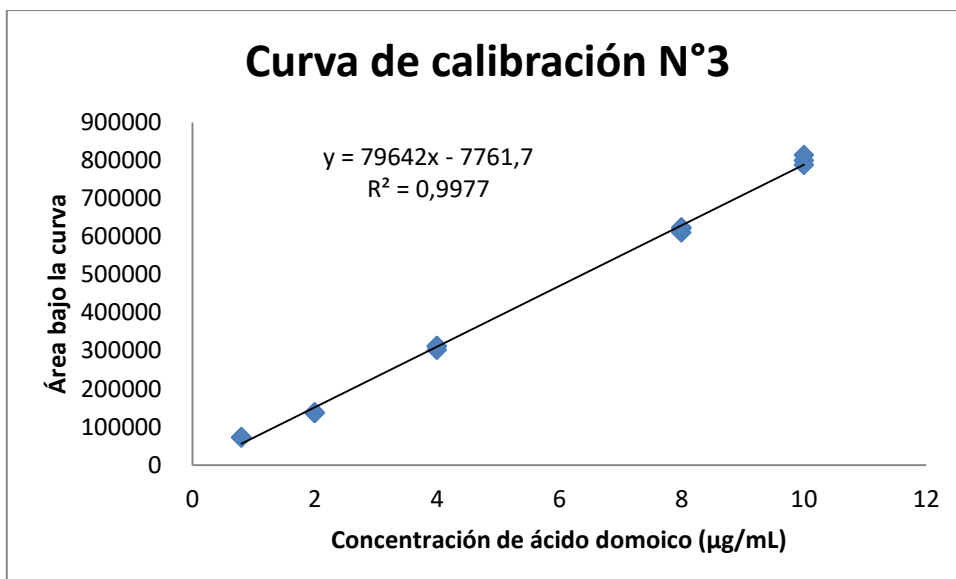
	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME RECUPERACIÓN VAM</b> <b>Matriz Central Cholga</b>  <b>Fecha: 19-11-2021</b>

**Tabla 1.** Identificación de picos cromatográficos de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL, inyecciones A y B. Las letras W y DA corresponden a triptófano y ácido domoico, respectivamente.

Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
2 DA + 20 W a	W	4,49	225297	30313	58,287	64,724	N/A	9279	9,905	1,269
2 DA + 20 W a	DA	6,64	161232	16521	41,713	35,276	N/A	11318	N/A	1,117
2 DA + 20 W b	W	4,48	228166	30788	58,175	64,786	N/A	9264	9,899	1,254
2 DA + 20 W b	DA	6,63	164041	16735	41,825	35,214	N/A	11236	N/A	1,123

**Tabla 2.** Identificación de picos cromatográficos en los fortificados de matriz central cholga al nivel de 0,5 LA, 1 LA y 2 LA. Las letras DA corresponden al ácido domoico.


Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor	Warning
Cholga 0.5 LA R1a	DA	6,64	182525	19115	100,000	100,000	N/A	10641	N/A	N/A	
Cholga 0.5 LA R1b	DA	6,63	167316	18142	100,000	100,000	N/A	11419	N/A	0,992	
Cholga 0.5 LA R2a	DA	6,64	143374	15484	100,000	100,000	N/A	10811	N/A	N/A	
Cholga 0.5 LA R2b	DA	6,63	141006	15294	100,000	100,000	N/A	10865	N/A	N/A	
Cholga 0.5 LA R3a	DA	6,65	136468	15205	100,000	100,000	N/A	11308	N/A	N/A	
Cholga 0.5 LA R3b	DA	6,64	135178	15147	100,000	100,000	N/A	11296	N/A	N/A	
Cholga 1 LA R1a	DA	6,65	308272	31929	100,000	100,000	N/A	10874	N/A	1,075	
Cholga 1 LA R1b	DA	6,64	300558	31315	100,000	100,000	N/A	10980	N/A	1,085	
Cholga 1 LA R2a	DA	6,65	322996	33985	100,000	100,000	N/A	10976	N/A	N/A	
Cholga 1 LA R2b	DA	6,64	323260	33756	100,000	100,000	N/A	10930	N/A	N/A	
Cholga 1 LA R3a	DA	6,65	307994	32826	100,000	100,000	N/A	11146	N/A	N/A	
Cholga 1 LA R3b	DA	6,64	316263	33321	100,000	100,000	N/A	11080	N/A	N/A	
Cholga 2 LA R1a	DA	6,61	617767	64538	100,000	100,000	N/A	11069	N/A	1,074	
Cholga 2 LA R1b	DA	6,65	614099	64205	100,000	100,000	N/A	11119	N/A	1,082	
Cholga 2 LA R2a	DA	6,61	643747	66956	100,000	100,000	N/A	11025	N/A	1,085	
Cholga 2 LA R2b	DA	6,65	617427	65466	100,000	100,000	N/A	11320	N/A	1,115	
Cholga 2 LA R3a	DA	6,62	644106	67337	100,000	100,000	N/A	11064	N/A	1,094	
Cholga 2 LA R3b	DA	6,65	661489	67861	100,000	100,000	N/A	11036	N/A	1,097	



**Figura 5.** Curva de calibración n°3, utilizada para los cálculos de concentración de ácido domoico en los fortificados de la matriz central cholga.

**Tabla 3.** Planilla de cálculos de las concentraciones de ácido domoico ( $\mu\text{g/g}$ ) en los fortificados de matriz central al nivel de 0,5 LA, 1 LA y 2 LA. Las letras DA corresponden al ácido domoico.

Chromatogram name	Peak Name	tR prom	Área prom	peso muestra (g)	Volumen total extracto (mL)	Concentración DA ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración DA ( $\mu\text{g/g}$ )
Cholga 0.5 LA R1	DA	6,64	174920	4,24	20	2,29	10,82
Cholga 0.5 LA R2	DA	6,64	142190	4,23	20	1,88	8,90
Cholga 0.5 LA R3	DA	6,64	135823	4,22	20	1,80	8,54
Cholga 1 LA R1	DA	6,65	304415	4,24	20	3,92	18,49
Cholga 1 LA R2	DA	6,65	323128	4,23	20	4,15	19,64
Cholga 1 LA R3	DA	6,65	312129	4,22	20	4,02	19,04
Cholga 3 LA R1	DA	6,60	615933	4,24	20	7,83	36,94
Cholga 3 LA R2	DA	6,63	630587	4,23	20	8,02	37,90
Cholga 3 LA R3	DA	6,64	652798	4,22	20	8,29	39,31

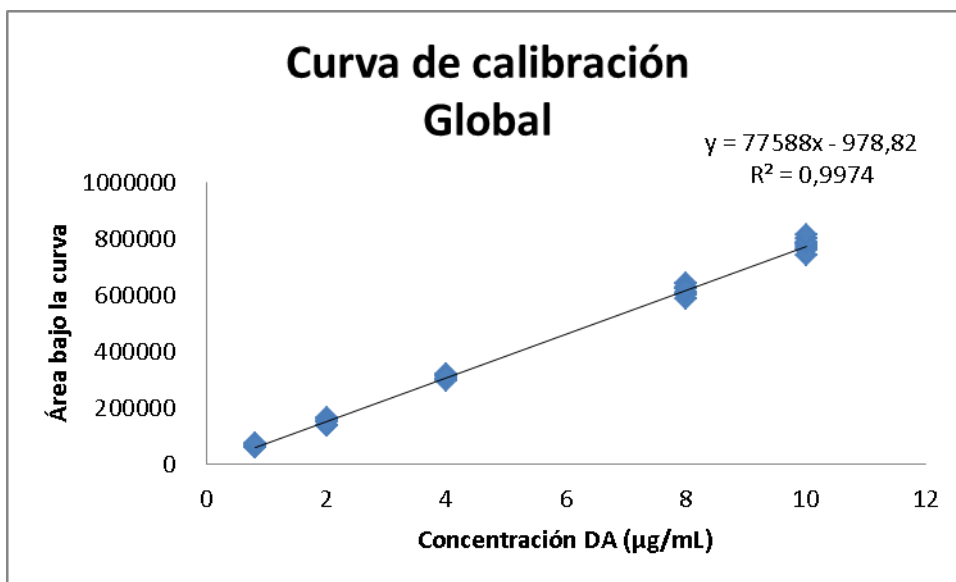
	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME RECUPERACIÓN VAM</b> <b>Matriz Central Cholga</b>  <b>Fecha: 19-11-2021</b>

**Tabla 4.** Identificación de picos cromatográficos en los blancos de matriz central cholga. Las letra IF corresponden a la integración en la zona de elusión del Ácido Domoico.

Chromatogram name	Peak Name	tR	Area	peso muestra (g)	Volumen total extracto (mL)	Concentración DA (µg/mL)	Concentración DA (µg/g)
Blanco 1a	IF	6,60	11335	4	20	0,16	0,79
Blanco 1b	IF	6,59	12690	4	20	0,18	0,88
Blanco 2a	IF	6,60	9505	4	20	0,14	0,68
Blanco 2b	IF	6,59	9952	4	20	0,14	0,70
Blanco 3a	IF	6,60	8657	4	20	0,12	0,62
Blanco 3b	IF	6,61	9249	4	20	0,13	0,66


**Tabla 5.** Planilla de cálculos de la concentración de ácido domoico (µg/g) en los blancos de matriz central cholga.


Chromatogram name	Peak Name	tR prom	Área prom	peso muestra (g)	Volumen total extracto (mL)	Concentración DA (µg/mL)	Concentración DA (µg/g)
Blanco 1	IF	6,60	12013	4	20	0,17	0,84
Blanco 2	IF	6,60	9729	4	20	0,14	0,69
Blanco 3	IF	6,61	8953	4	20	0,13	0,64




**Figura 6.** Curva de calibración global, utilizada para los cálculos de concentración de ácido domoico en los blancos de matriz central cholga.

**Tabla 6.** Planilla de cálculos de Validación de métodos. Se muestran los resultados de la prueba de recuperación en la matriz central cholga al nivel de 0,5 LA.


2) RECUPERACION					
Nivel 1		Conc. Adicionada: 10,00		Unidad: µg/g	
Ensayo	Fecha	Conc. muestra fortificada µg/g	Conc. muestra sola µg/g	Conc. muestra adicionada µg/g	Recuperación %
1	19/11/2021	10,82	0,84	10,00	100
2	19/11/2021	8,90	0,69	10,00	82
3	19/11/2021	8,54	0,64	10,00	79
Rango de concentración: 					%R Promedio: 87,00
% R máx 110					Desv. Estándar: 11,216
% R mín 85					n 3
Evaluación Se acepta					† calc 0,669
					† crit (α=0,05; n-1) 4,30
					Evaluación Se acepta


	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME RECUPERACIÓN VAM</b> <b>Matriz Central Cholga</b>  <b>Fecha: 19-11-2021</b>

**Tabla 7.** Planilla de cálculos de Validación de métodos. Se muestran los resultados de la prueba de recuperación en la matriz central cholga al nivel de 1 LA.

Nivel 2		Conc. Adicionada:	20,00		Unidad:	µg/g	
Ensayo	Fecha	Conc. muestra fortific. µg/g	Conc. muestra sola µg/g	Conc. muestra adicionada µg/g	Recuperación %		
1	19/11/2021	18,49	0,84	20,000	88		
2	19/11/2021	19,64	0,69	20,000	95		
3	19/11/2021	19,04	0,64	20,000	92		
Rango de concentración:						Promedio:	91,67
% R máx	110					Desv. Estándar:	3,266
% Rmin	85					n	3
Evaluación	Se acepta					Ön	1,732
						t <sub>calc</sub>	1,473
						t <sub>crit</sub> (α=0,05; n-1)	4,30
						Evaluación	Se acepta

**Tabla 8.** Planilla de cálculos de Validación de métodos. Se muestran los resultados de la prueba de recuperación en la matriz central cholga al nivel de 2 LA.

2) RECUPERACIÓN							
Nivel 3		Conc. Adicionada:	40,00		Unidad:	µg/g	
Ensayo	Fecha	Conc. muestra fortificada µg/g	Conc. muestra sola µg/g	Conc. muestra adicionada µg/g	Recuperación %		
1	19/11/2021	36,94	0,84	40,00	90		
2	19/11/2021	37,90	0,69	40,00	93		
3	19/11/2021	39,31	0,64	40,00	97		
Rango de concentración:						%R Promedio:	93,32
% R máx	110					Desv. Estándar:	3,218
% Rmin	85					n	3
Evaluación	Se acepta					Ön	1,732
						t <sub>calc</sub>	1,199
						t <sub>crit</sub> (α=0,05; n-1)	4,30
						Evaluación	Se acepta

 <b>LBTx</b> <small>LABORATORIO DE BIOTOXINAS UDEC</small>	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME RECUPERACIÓN VAM</b> <b>Matriz Central Cholga</b>  <b>Fecha: 19-11-2021</b>

**Tabla 9.** Resumen de los resultados de las pruebas de recuperación.

<b>Nivel de LA</b>	<b>%R prom.</b>	<b>t calc</b>	<b>Mayor o menor</b>	<b>t crit</b>
0,5	87,00	0,669	<	4,30
1	91,67	1,473	<	4,30
2	93,32	1,199	<	4,30

**Conclusión:**


0,5 LA:  $t \text{ calc} = 0,643 < t \text{ crit} = 4,30$

1 LA:  $t \text{ calc} = 1,587 < t \text{ crit} = 4,30$

2 LA:  $t \text{ calc} = 1,289 < t \text{ crit} = 4,30$

En todos los niveles de concentración se cumplió con el criterio de aceptabilidad  $t \text{ calc} < t \text{ crit}$ .

Se concluye que los porcentajes de recuperación obtenidos desde la matriz central cholga a través del método de detección de VAM por HPLC-DAD cumplen con las exigencias de veracidad.

	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME RECUPERACIÓN VAM</b> <b>Matriz complementaria almeja</b>  <b>Fecha: 19-11-2021</b>

**Objetivo:** Evaluar el porcentaje de recuperación del método de detección de VAM por HPLC-DAD en la matriz complementaria almeja.

### **Metodología:**

Se realizaron 3 fortificaciones de los extractos de almeja al nivel de 1 LA. Se analizaron los fortificados en condiciones de repetibilidad según el Instructivo P-VAM-01. La concentración del ácido domoico fue determinada según el método del patrón externo. Para ello, se analizó una muestra de la mezcla de Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL (ver Anexo 1 del Instructivo P-VAM-01). El % de recuperación se calculó con la fórmula 1. El criterio de aceptabilidad utilizado fue la prueba t de student, con el valor t calculado (fórmula 2) < valor t crit.

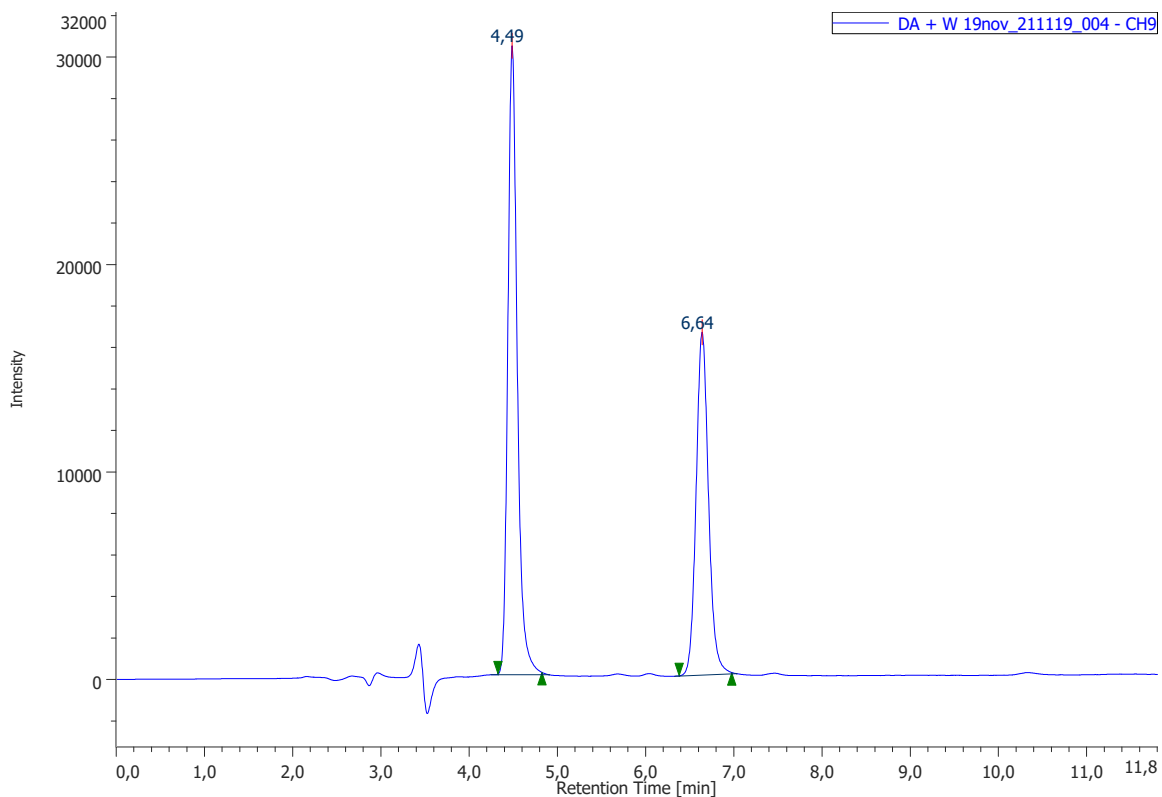
**Fórmula 1.** Fórmula utilizada para calcular el porcentaje de recuperación (%R). Ce corresponde a la concentración (µg/g) de ácido domoico (DA) leída en el fortificado, Co a la concentración (µg/g) de DA leída en los blancos y Ca a la concentración teórica de DA utilizada en la fortificación (adaptado de ISP, 2010).

$$\%R = \left( \frac{C_e - C_o}{C_a} \right) \times 100$$

**Fórmula 2.** Fórmula utilizada para obtener el valor t calculado (*t calc*). %R corresponde al porcentaje de recuperación, S a la desviación estándar de los porcentajes de recuperación calculados y n al número de fortificados leídos (adaptado de ISP, 2010).

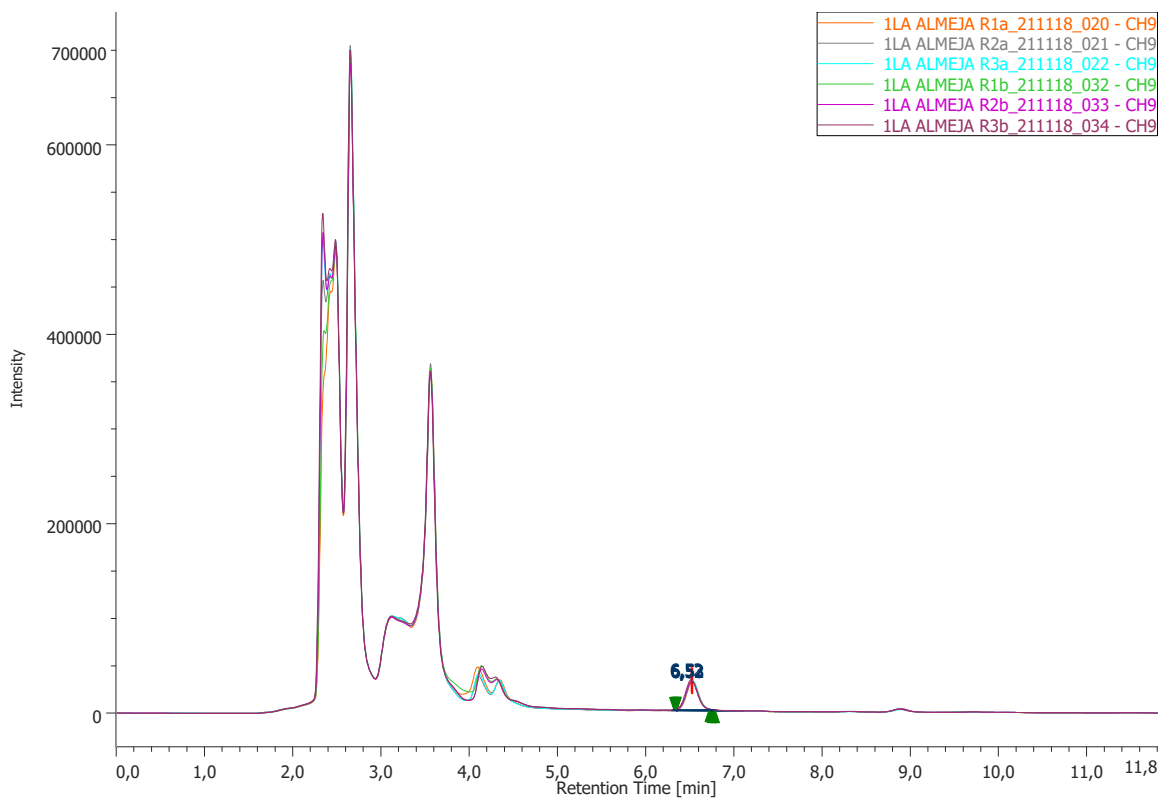
$$t \text{ calc} = \frac{[100 - \%R]}{S \times \sqrt{n}}$$

### FORTIFICADOS




**Figura 1.** Cromatogramas a 242 nm de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL. Inyecciones A y B.





**Figura 2.** Cromatogramas a 242 nm de los 3 fortificados de matriz complementaria almeja al nivel de 1 LA. Inyecciones A y B.

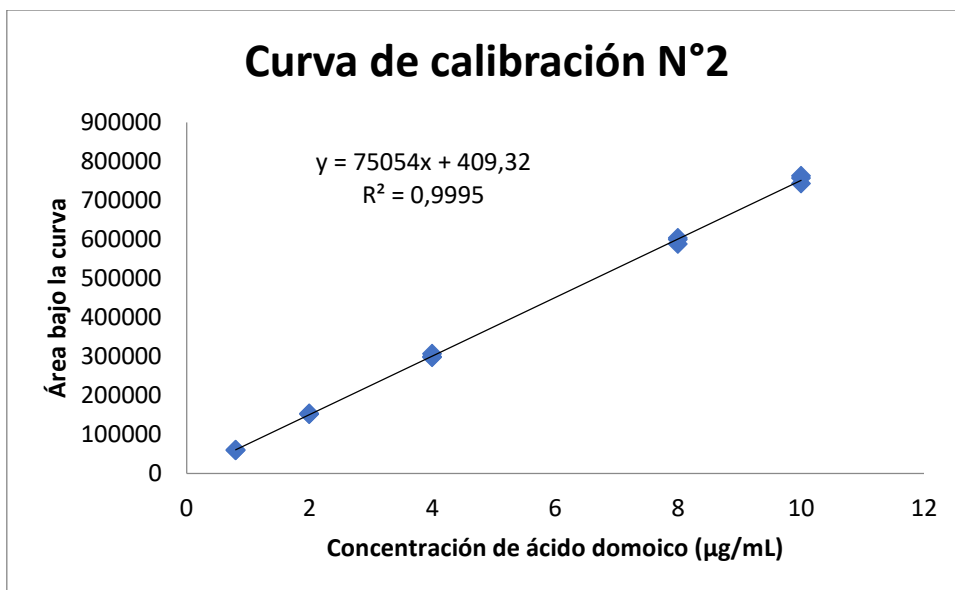
	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME RECUPERACIÓN VAM</b> <b>Matriz complementaria almeja</b>  <b>Fecha: 19-11-2021</b>

**Tabla 1.** Identificación de picos cromatográficos de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL, inyecciones A y B. Las letras W y DA corresponden a triptófano y ácido domoico, respectivamente.

Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
2 DA + 20 W a	W	4,53	200406	26717	55,133	61,248	N/A	9371	9,203	1,262
2 DA + 20 W a	DA	6,52	163092	16904	44,867	38,752	N/A	11226	N/A	1,143
2 DA + 20 W b	W	4,53	201761	26879	55,229	61,243	N/A	9358	9,232	1,274
2 DA + 20 W b	DA	6,52	163554	17010	44,771	38,757	N/A	11256	N/A	1,131

**Tabla 2.** Identificación de picos cromatográficos en los 3 fortificados de matriz complementaria huepo al nivel de 1 LA. Las detras DA corresponden al ácido domoico.

Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
1LA HUEPO R1a	DA	6,62	290792	31081	100,000	100,000	N/A	11376	N/A	1,056
1LA HUEPO R1b	DA	6,66	304900	31655	100,000	100,000	N/A	11168	N/A	1,066
1LA HUEPO R2a	DA	6,61	328560	34968	100,000	100,000	N/A	11237	N/A	N/A
1LA HUEPO R2b	DA	6,66	336869	35247	100,000	100,000	N/A	11241	N/A	1,082
1LA HUEPO R3a	DA	6,62	285124	31583	100,000	100,000	N/A	11889	N/A	1,107
1LA HUEPO R3b	DA	6,66	306903	32635	100,000	100,000	N/A	11493	N/A	1,073

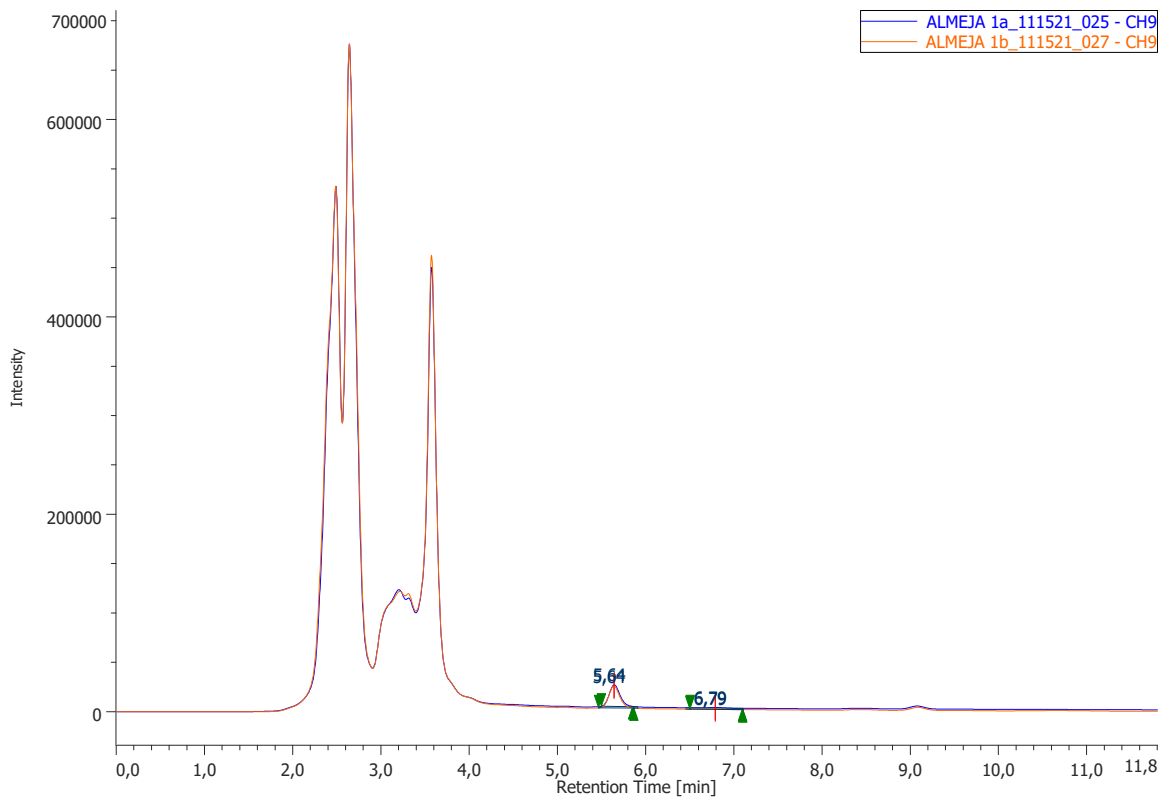


**Figura 3.** Curva de calibración n°2, utilizada para los cálculos de concentración de ácido domoico en los 3 fortificados de la matriz complementaria almeja al nivel de 1 LA.

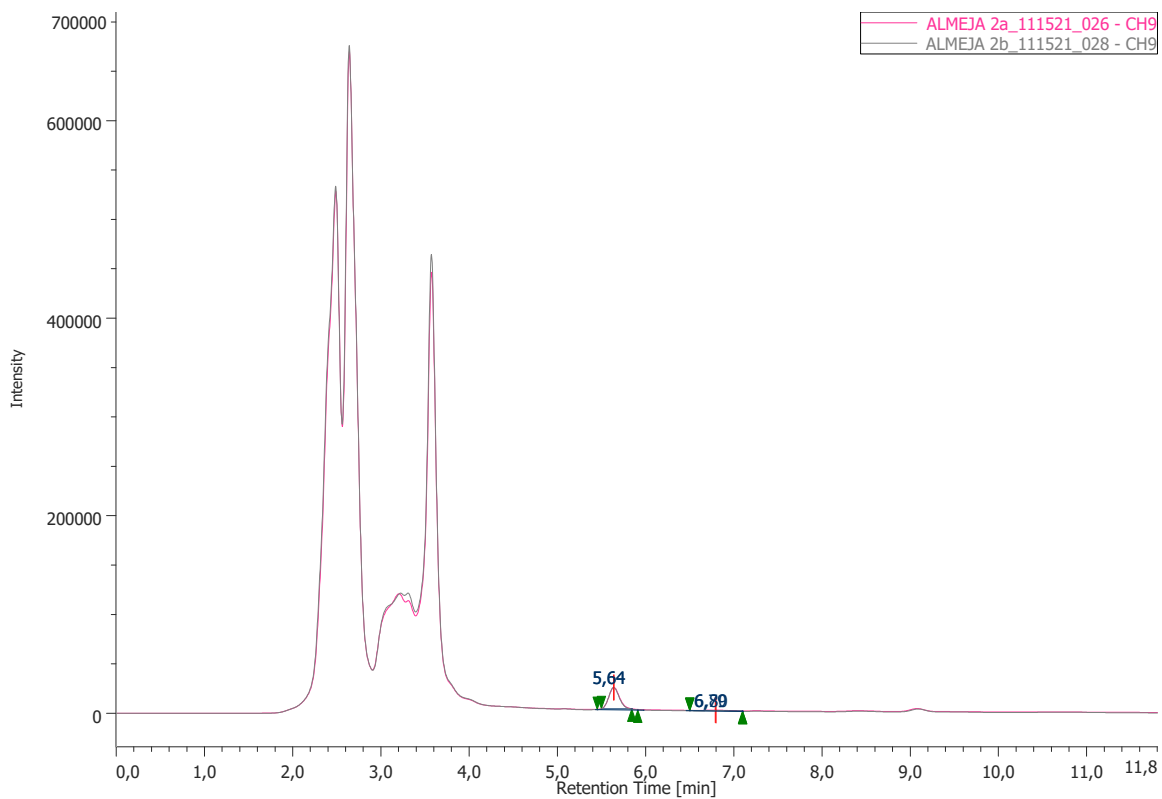
**Tabla 3.** Planilla de cálculos de la concentración de ácido domoico ( $\mu\text{g/g}$ ) en los fortificados de matriz complementaria almeja al nivel de 1 LA. Las letras DA corresponden al ácido domoico.

Chromatogram name	Peak Name	tR prom	Área prom	peso muestra (g)	Volumen total extracto (mL)	Concentración DA ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración DA ( $\mu\text{g/g}$ )
1 LA Almeja R1	DA	6,53	305050	4,42	20	4,06	18,37
1 LA Almeja R2	DA	6,52	301754	4,41	20	4,02	18,21
1 LA Almeja R3	DA	6,52	313372	4,42	20	4,17	18,87
						<b>Promedio</b>	18,29
						<b>Desviación E.</b>	0,11


### BLANCOS



**Figura 4.** Cromatogramas a 242 nm de la muestra 1 de blancos de matriz complementaria almeja. Inyecciones A y B.



**Figura 5.** Cromatogramas a 242 nm de la muestra 2 de blancos de matriz complementaria almeja. Inyecciones A y B.

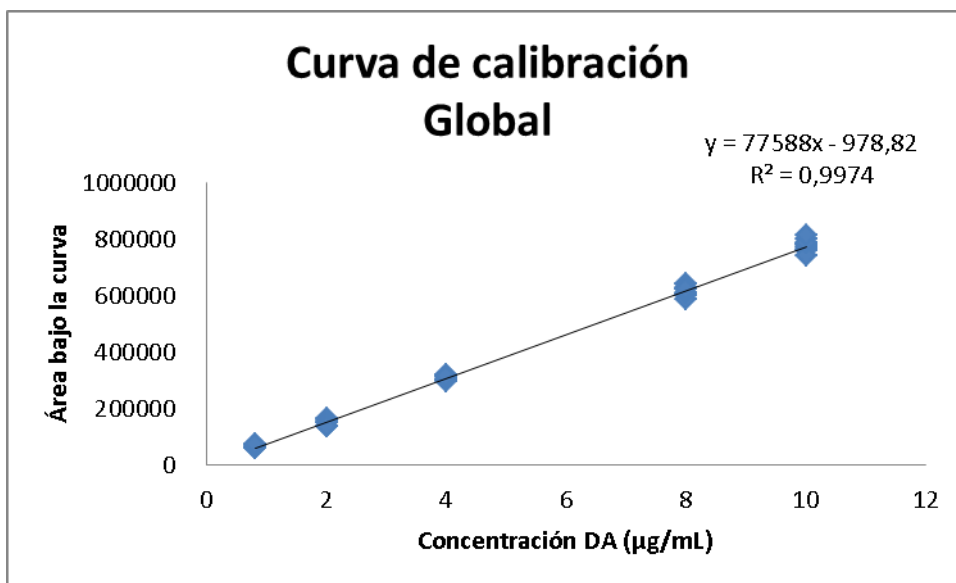
	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME RECUPERACIÓN VAM</b> <b>Matriz complementaria almeja</b>  <b>Fecha: 19-11-2021</b>

**Tabla 4.** Identificación de picos cromatográficos de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL, inyecciones A y B. Las letras W y DA corresponden a Triptófano y Ácido domoico, respectivamente.

Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
2 DA+ 20 W	W	5,67	207311	23218	56,194	59,020	N/A	10340	4,600	1,207
2 DA+ 20 W	DA	6,77	161607	16121	43,806	40,980	2,00649	11144	N/A	1,115
2 DA +20 W	W	5,66	195109	22761	55,081	58,871	N/A	10517	4,702	1,175
2 DA +20 W	DA	6,78	159111	15901	44,919	41,129	1,97476	11166	N/A	1,103

**Tabla 5.** Identificación de picos cromatográficos en los blancos de matriz complementaria almeja. Las letras IF corresponden a Triptófano y a la integración de la zona de elusion del Ácido Domoico, respectivamente.


Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
ALMEJA 1a	W	5,64	187610	22003	96,284	97,493	N/A	10247	4,122	1,191
ALMEJA 1a	IF	6,79	7240	566	3,716	2,507	0,0437300	6581	N/A	0,953
ALMEJA 1b	W	5,64	193360	22230	96,588	97,666	N/A	10058	4,110	1,170
ALMEJA 1b	IF	6,79	6830	531	3,412	2,334	0,0385163	6528	N/A	0,947
ALMEJA 2a	W	5,64	180902	21671	96,270	97,509	N/A	10443	4,167	1,144
ALMEJA 2a	IF	6,79	7010	554	3,730	2,491	0,0408015	6666	N/A	0,961
ALMEJA 2b	W	5,64	200920	22591	96,728	97,645	N/A	9918	4,189	1,195
ALMEJA 2b	IF	6,80	6796	545	3,272	2,355	0,0380860	6833	N/A	0,980



**Figura 6.** Curva de calibración global, utilizada para los cálculos de concentración de ácido domoico en los blancos de matriz complementaria almeja.

**Tabla 6.** Planilla de cálculos de la concentración de ácido domoico ( $\mu\text{g/g}$ ) en los blancos de matriz complementaria almeja.

Chromatogram name	Peak Name	tR prom	Área prom	peso muestra (g)	Volumen total extracto (mL)	Concentración DA ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración DA ( $\mu\text{g/g}$ )
Blanco Almeja R1	DA	6,79	7035	4,42	20	0,10	0,47
Blanco Almeja R2	DA	6,79	6903	4,41	20	0,10	0,46
						<b>Promedio</b>	0,46
						<b>Desviación E.</b>	0,00

	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME RECUPERACIÓN VAM</b> <b>Matriz complementaria almeja</b>  <b>Fecha: 19-11-2021</b>

**Tabla 7.** Planilla de cálculos de Validación de métodos. Se muestran los resultados de la prueba de recuperación en la matriz complementaria almeja al nivel de 1 LA.

<b>2) RECUPERACIÓN</b>					
<b>Nivel 1</b>	<b>Conc. Adici</b>	<b>20,00</b>	<b>Unidad: µg/g</b>		
<b>Ensayo</b>	<b>Fecha</b>	<b>Conc. muestra fortificada µg/g</b>	<b>Conc. muestra sola µg/g</b>	<b>Conc. muestra adicionada µg/g</b>	<b>Recuperación %</b>
<b>1</b>	<b>18/11/2021</b>	18,37	0,47	20,000	89
<b>2</b>	<b>18/11/2021</b>	18,21	0,46	20,000	89
<b>3</b>	<b>18/11/2021</b>	18,87	0,47	20,000	92
					<b>%R Promedio:</b> 90,1
					<b>Desv. Estándar:</b> 1,708
					<b>n</b> 3
					<b>Ön</b> 1,732
					<b>t<sub>calc</sub></b> 3,35
					<b>t<sub>crit</sub> (α=0,05; n-1)</b> 4,30
					<b>Evaluación</b> <b>Se acepta</b>
Rango de concentra	<b>FALSO</b>				
% R máx	110				
% Rmin	85				
<b>Evaluación</b>	<b>Se acepta</b>				

### Conclusión:


%R promedio: 90,1

$t_{calc} = 3,35 < t_{crit} = 4,30$

El %R promedio obtenido cumple con el criterio de aceptabilidad  $t_{calc} < t_{crit}$  y con las exigencias del codex alimentarius para el ácido domoico (R%: 85-110%).

Por tanto, se concluye que el método de detección de VAM por HPLC-DAD en la matriz complementaria almeja posee un %R aceptable que cumple con las exigencias de veracidad.



	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME RECUPERACIÓN VAM</b> <b>Matriz complementaria huevo</b>  <b>Fecha: 19-11-2021</b>

**Objetivo:** Evaluar el porcentaje de recuperación del método de detección de VAM por HPLC-DAD en la matriz complementaria huevo.

**Metodología:**

Se realizaron 3 fortificaciones de los extractos de huevo al nivel de 1 LA. Se analizaron los fortificados en condiciones de repetibilidad según el Instructivo P-VAM-01. La concentración del ácido domoico fue determinada según el método del patrón externo. Para ello, se analizó una muestra de la mezcla de Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL (ver Anexo 1 del Instructivo P-VAM-01). El % de recuperación se calculó con la fórmula 1. El criterio de aceptabilidad utilizado fue la prueba t de student, con el valor t calculado (fórmula 2) < valor t crit.

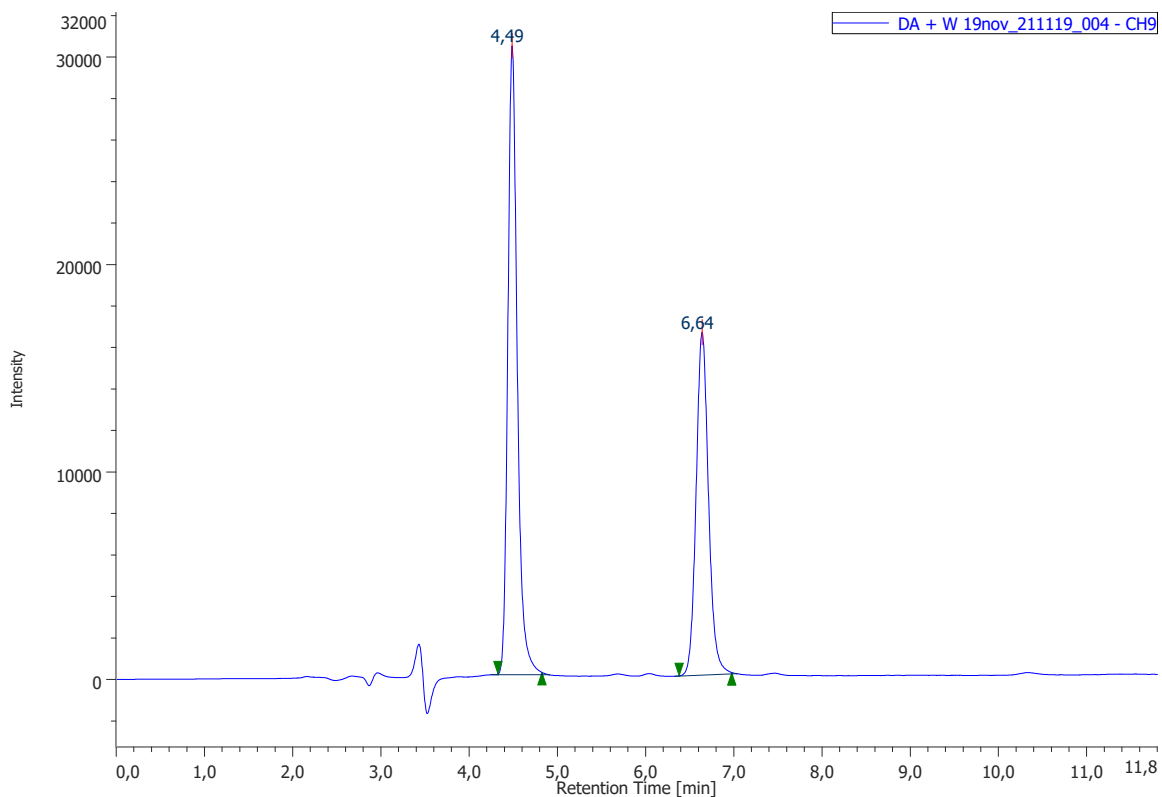
**Fórmula 1.** Fórmula utilizada para calcular el porcentaje de recuperación (%R). Ce corresponde a la concentración (µg/g) de ácido domoico (DA) leída en el fortificado, Co a la concentración (µg/g) de DA leída en los blancos y Ca a la concentración teórica de DA utilizada en la fortificación (adaptado de ISP, 2010).

$$\%R = \left( \frac{C_e - C_o}{C_a} \right) \times 100$$

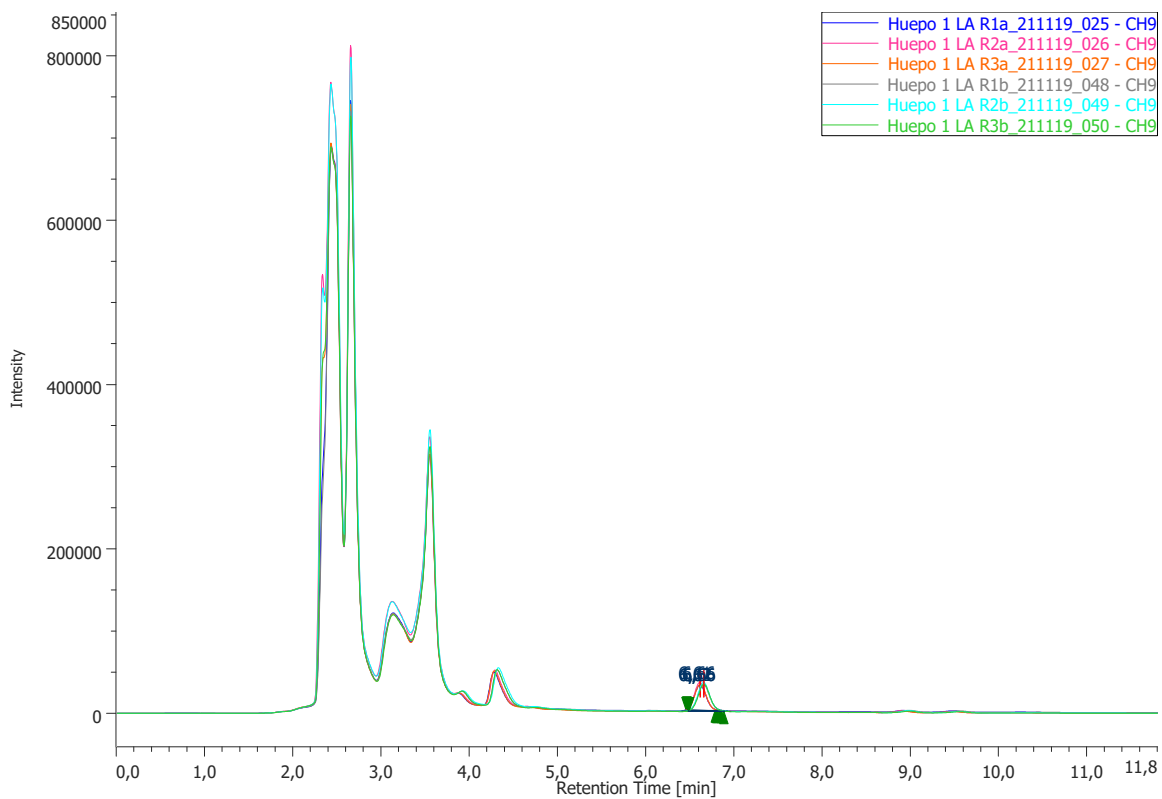
**Fórmula 2.** Fórmula utilizada para obtener el valor t calculado (*t calc*). %R corresponde al porcentaje de recuperación, S a la desviación estándar de los porcentajes de recuperación calculados y n al número de fortificados leídos (adaptado de ISP, 2010).

$$t \text{ calc} = \frac{[100 - \%R]}{S \times \sqrt{n}}$$


### FORTIFICADOS



**Figura 1.** Cromatogramas a 242 nm de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL. Inyecciones A y B.



**Figura 2.** Cromatogramas a 242 nm de los 3 fortificados de matriz complementaria hueso al nivel de 1 LA. Inyecciones A y B.

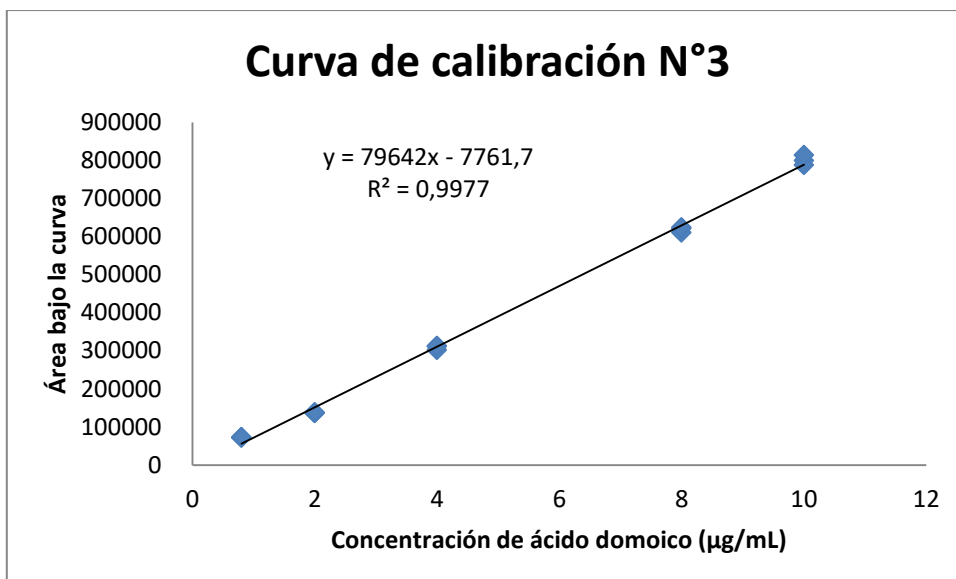
	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME RECUPERACIÓN VAM</b> <b>Matriz complementaria huego</b>  <b>Fecha: 19-11-2021</b>

**Tabla 1.** Identificación de picos cromatográficos de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL, inyecciones A y B. Las letras W y DA corresponden a triptófano y ácido domoico, respectivamente.

Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
2 DA + 20 W a	W	4,49	225297	30313	58,287	64,724	N/A	9279	9,905	1,269
2 DA + 20 W a	DA	6,64	161232	16521	41,713	35,276	N/A	11318	N/A	1,117
2 DA + 20 W b	W	4,48	228166	30788	58,175	64,786	N/A	9264	9,899	1,254
2 DA + 20 W b	DA	6,63	164041	16735	41,825	35,214	N/A	11236	N/A	1,123

**Tabla 2.** Identificación de picos cromatográficos en los 3 fortificados de matriz complementaria Huego al nivel de 1 LA. Las letras DA corresponden al ácido domoico.

Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
1LA HUEPO R1a	DA	6,62	290792	31081	100,000	100,000	N/A	11376	N/A	1,056
1LA HUEPO R1b	DA	6,66	304900	31655	100,000	100,000	N/A	11168	N/A	1,066
1LA HUEPO R2a	DA	6,61	328560	34968	100,000	100,000	N/A	11237	N/A	N/A
1LA HUEPO R2b	DA	6,66	336869	35247	100,000	100,000	N/A	11241	N/A	1,082
1LA HUEPO R3a	DA	6,62	285124	31583	100,000	100,000	N/A	11889	N/A	1,107
1LA HUEPO R3b	DA	6,66	306903	32635	100,000	100,000	N/A	11493	N/A	1,073

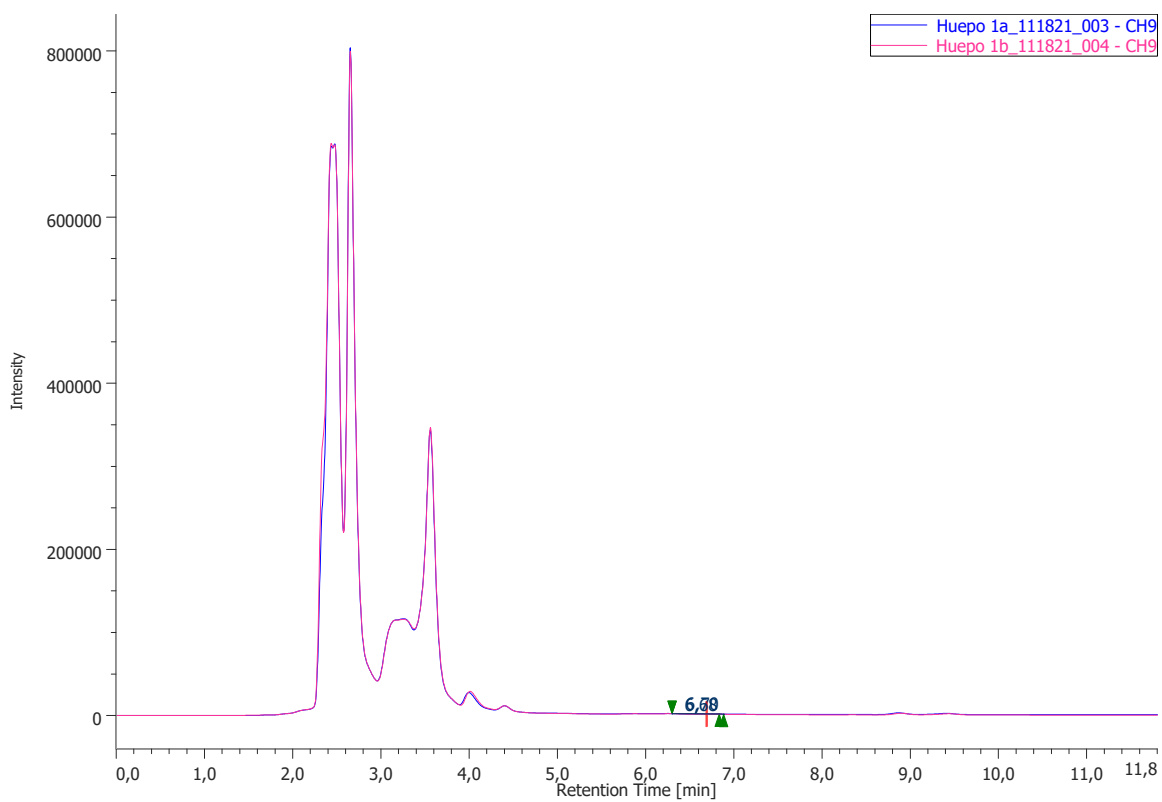


**Figura 3.** Curva de calibración n°3, utilizada para los cálculos de concentración de ácido domoico en los fortificados de la matriz complementaria huego.

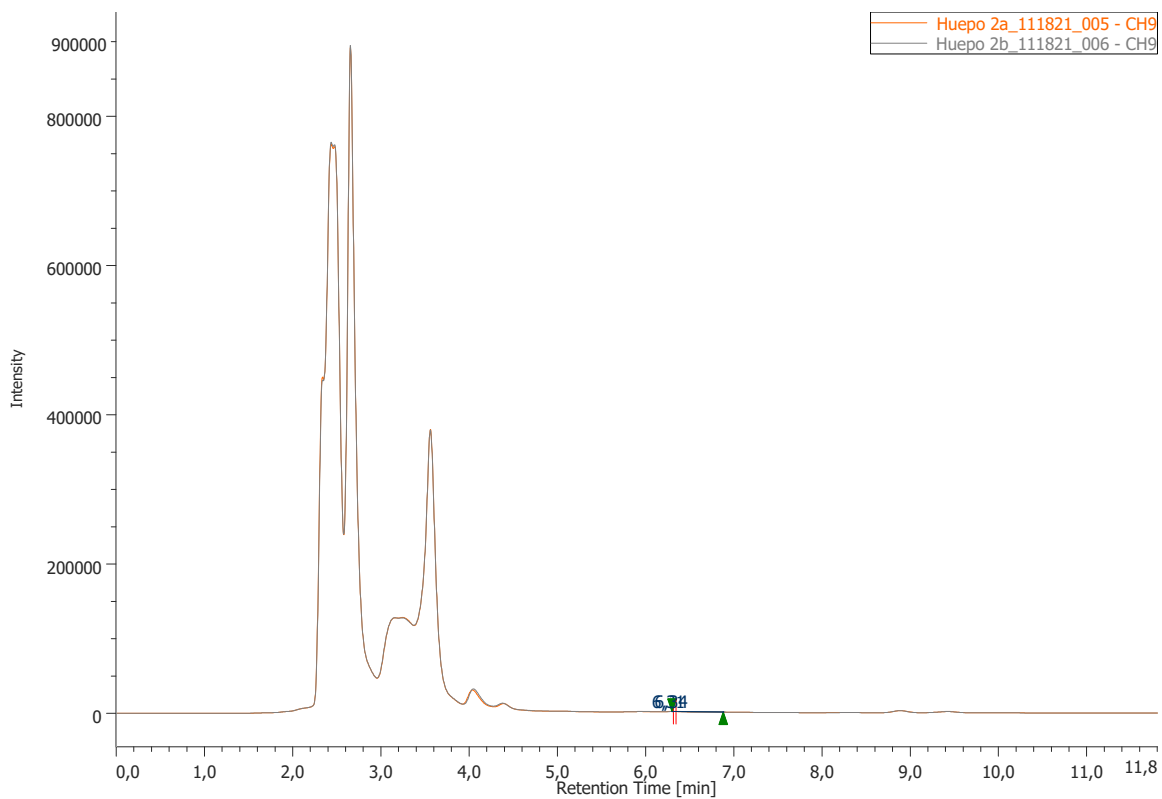
**Tabla 3.** Planilla de cálculos de la concentración de ácido domoico (µg/g) en los fortificados de matriz complementaria huego al nivel de 1 LA. Las letras DA corresponden al ácido domoico.

Chromatogram name	Peak Name	tR prom	Área prom	peso muestra (g)	Volumen total extracto (mL)	Concentración DA (µg/mL)	Concentración DA (µg/g)
1 LA Huego R1	DA	6,64	297846	4,14	20	3,84	18,54
1 LA Huego R2	DA	6,64	332714	4,47	20	4,28	19,13
1 LA Huego R3	DA	6,64	296014	4,14	20	3,81	18,43
						<b>Promedio</b>	18,70
						<b>Desviación E.</b>	0,38


### BLANCOS



**Figura 4.** Cromatogramas a 242 nm de la muestra 1 de blancos de matriz complementaria huego. Inyecciones A y B.



**Figura 5.** Cromatogramas a 242 nm de la muestra 2 de blancos de matriz complementaria huego. Inyecciones A y B.

	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME RECUPERACIÓN VAM</b> <b>Matriz complementaria huego</b>  <b>Fecha: 19-11-2021</b>

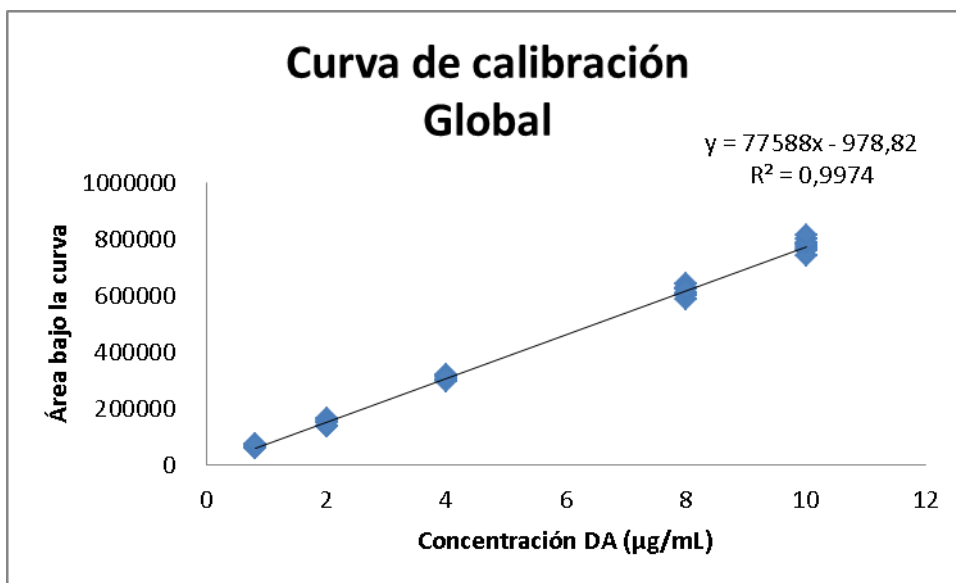
**Tabla 4.** Identificación de picos cromatográficos de la mezcla Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL, inyecciones A y B. Las letras W y DA corresponden a Triptófano y Ácido domoico, respectivamente.

Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
2 DA + 20 W a	W	4,53	200406	26717	55,133	61,248	N/A	9371	9,203	1,262
2 DA + 20 W a	DA	6,52	163092	16904	44,867	38,752	N/A	11226	N/A	1,143
2 DA + 20 W b	W	4,53	201761	26879	55,234	61,243	N/A	9358	9,232	1,274
2 DA + 20 W b	DA	6,52	163524	17010	44,766	38,757	N/A	11256	N/A	1,131

**Tabla 5.** Identificación de picos cromatográficos en los blancos de matriz complementaria Huego. Las letra IF corresponden a la integración de la zona de elusion del Ácido Domoico.

Chromatogram Name	Peak Name	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor
Huego 1a	IF	6,70	5223	140	100,000	100,000	N/A	1448	N/A	0,622
Huego 1b	IF	6,68	4725	154	100,000	100,000	N/A	1758	N/A	0,639
Huego 2a	IF	6,31	138	18	100,000	100,000	N/A	724	N/A	30,181
Huego 2b	IF	6,34	697	99	100,000	100,000	N/A	21925	N/A	6,381






**Figura 6.** Curva de calibración global, utilizada para los cálculos de concentración de ácido domoico en los blancos de matriz complementaria hueso.

**Tabla 6.** Planilla de cálculos de la concentración de ácido domoico ( $\mu\text{g/g}$ ) en los blancos de matriz complementaria hueso.

Chromatogram name	Peak Name	tR prom	Área prom	peso muestra (g)	Volumen total extracto (mL)	Concentración DA ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración DA ( $\mu\text{g/g}$ )
Blanco Hueso R1	DA	6,69	4974	4,14	20	0,08	0,37
Blanco Hueso R2	DA	6,33	417,2	4,47	20	0,02	0,08
						<b>Promedio</b>	0,23
						<b>Desviación E.</b>	0,21

 <b>LBTx</b> <small>LABORATORIO DE BIOTOXINAS UDEC</small>	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>
	<b>INFORME RECUPERACIÓN VAM</b> <b>Matriz complementaria huego</b>  <b>Fecha: 19-11-2021</b>

**Tabla 7.** Planilla de cálculos de Validación de métodos. Se muestran los resultados de la prueba de recuperación en la matriz complementaria huego al nivel de 1 LA.

<b>2) RECUPERACIÓN</b>						
<b>Nivel 1</b>	<b>Conc. Adici</b>	20,00		<b>Unidad:</b>	<b>µg/g</b>	
<b>Ensayo</b>	<b>Fecha</b>	<b>Conc. muestra fortificada µg/g</b>	<b>Conc. muestra sola µg/g</b>	<b>Conc. muestra adicionada µg/g</b>	<b>Recuperación %</b>	
1	19/11/2021	18,54	0,37	20,000	91	
2	19/11/2021	19,13	0,08	20,000	95	
3	19/11/2021	18,43	0,37	20,000	90	
					<b>%R Promedio:</b>	92,1
					<b>Desv. Estándar:</b>	2,716
					<b>n</b>	3
					<b>Ön</b>	1,732
					<b>t<sub>calc</sub></b>	1,68
					<b>t<sub>crit</sub> (α=0,05; n-1)</b>	4,30
					<b>Evaluación</b>	<b>Se acepta</b>
Rango de conc		FALSO				
% R máx		110				
% Rmin		85				
<b>Evaluación</b>		<b>Se acepta</b>				


### Conclusión:

%R promedio: 92,1

$t_{calc} = 1,68 < t_{crit} = 4,30$

El %R promedio obtenido cumple con el criterio de aceptabilidad  $t_{calc} < t_{crit}$  y con las exigencias del codex alimentarius para el ácido domoico (R%: 85-110%).

Por tanto, se concluye que el método de detección de VAM por HPLC-DAD en la matriz complementaria huego posee un %R aceptable que cumple con las exigencias de veracidad.

 <p><b>LBTX</b> LABORATORIO DE BIOTOXINAS UDEC</p>	<b>Laboratorio de Biotoxinas UDEC</b>	Código : P-VAM-01 Revisión : 00 Fecha : 12/2021 Página : 1 de 10
	<b>INSTRUCTIVO PARA DETERMINACIÓN DE TOXINA AMNÉSICA DE MOLUSCO (VAM) Método HPLC/DAD basado en Quilliam <i>et al.</i> (1995)</b>	
<b>Preparado por:</b> Analista Laboratorio	<b>Revisado por:</b> Jefe de I+D+I	<b>Aprobado por:</b> Director Laboratorio

## 1.0 OBJETIVO

Entregar instrucciones para realizar la metodología de extracción, detección y cuantificación de Ácido Domoico (DA) en matrices de moluscos bivalvos.

## 2.0 ALCANCE

Este instructivo es aplicable a moluscos frescos y/o congelados.

## 3.0 FUNDAMENTO

El Ácido Domoico (DA) es extraído de matrices de moluscos bivalvos homogeneizadas con una mezcla de metanol y agua. La mezcla homogenizada es centrifugada para obtener un sobrenadante que constituye el extracto de DA. El extracto es filtrado y analizado por RP-HPLC-DAD. La identificación y cuantificación de DA se realiza según el método del patrón externo.

## 4.0 REFERENCIAS Y/O DOCUMENTOS RELACIONADOS

- 4.1 Rapid extraction and cleanup for liquid chromatographic determination of domoic acid in unsalted seafood. Quilliam *et al.* 1995
- 4.2 Registro de Verificación de Balanzas (RIT-05-02)
- 4.3 Registro de Preparación de Soluciones (R1-E-03)
- 4.4. Instructivo Uso Cromatógrafo Líquido Jasco (I-LC-000)

## 5.0 TERMINOLOGÍA

- 5.1 RP-HPLC-DAD: Cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa con detector de arreglo de diodos.
- 5.2 VAM: Veneno amnésico de molusco
- 5.3 Ácido Domoico (DA): Toxina responsable del síndrome amnésico de molusco.

## 6.1 REACTIVOS

- 6.1.1 Metanol grado análisis
- 6.1.2 Agua ultrapura
- 6.1.3 Ácido trifluoroacético
- 6.1.4 Acetonitrilo grado análisis
- 6.1.5 L-Triptófano para bioquímica.
- 6.1.6 Agua ultrapura

6.1.7 Solución estándar de Ácido Domoico (DA) 103,3 µg/mL; NCR Institute for Marine Bioscience, Halifax, NS, Canadá.

## **6.2 INSUMOS**

- 6.2.1 Guante de malla de acero.
- 6.2.2 Cuchillo.
- 6.2.3 Colador.
- 6.2.4 Tubos de centrífuga de 25 mL con tapa rosca.
- 6.2.5 Tubos de centrífuga de 15 mL con tapa rosca.
- 6.2.6 Viales de microcentrífuga de 1,5 mL.
- 6.2.7 Jeringa plástica desechable de 3 mL con punta metálica.
- 6.2.8. Filtro para jeringa PVDF 12 mm 0,22 µm
- 6.2.9 Viales para HPLC de 2 mL.
- 6.2.10 Inserto para HPLC de 250 µL.
- 6.2.11 Matraces aforados de 1 mL, 50 mL, 100 mL, 1000 mL
- 6.2.12 Probeta de vidrio de 50 mL.
- 6.2.13 Vasos de precipitado de 10 mL.
- 6.2.14 Frascos de vidrio de 250 mL, 500 mL y 1000 mL.
- 6.2.15 Micropipetas de 20-100 µL y 100-1000 µL.
- 6.2.16 Filtro de membrana de nitrocelulosa 0,45 µm.
- 6.2.16 Papel parafilm.
- 6.2.17 Papel aluminio.
- 6.2.18 Columna HPLC.
- 6.2.19 Artículos de librería: etiquetas, lápices y rotuladores.

## **6.3 EQUIPOS**

- 6.3.1 Balanza de carga superior sensibilidad 0,01 g.
- 6.3.2 Balanza analítica sensibilidad 0,0001 g.
- 6.3.3. Batidora de inmersión.
- 6.3.4 Homogenizador analógico capaz de alcanzar 15.000 rpm.
- 6.3.5 Microcentrífuga capaz de alcanzar 10.090 rpm y con temperatura controlada de 4°C.
- 6.3.6 Vortex.
- 6.3.7 Campana extractora de gases.
- 6.3.8 Sistema HPLC: con bomba binaria y detector de arreglo de diodos.
- 6.3.9 Refrigerador con un compartimiento a un rango de temperatura de
- 6.3.10 Sistema de filtración con bomba de vacío.

## **7. DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES**

**A continuación se describe el método analítico. Es crucial, si no se dispone de práctica con el método, leer completamente este procedimiento antes de comenzar a trabajar.**

Es necesario utilizar guantes, delantal, zapatos adecuados para este trabajo analítico como medida de bioseguridad.

### **7.1 MUESTREO/MUESTRA**

7.1.1. Respecto de los antecedentes relativos a los requisitos pre analíticos relacionados a volumen, tipo de muestra, envases, condiciones de conservación y requisitos de la misma, estos están descritos en el Instructivo de aceptación y rechazo de muestras.

7.1.2 Chequear que los antecedentes de la muestra en la guía de ingreso coincidan con los rotulados en la muestra. Registrar la recepción de la muestra en la Planilla Excel Registro Ingreso de Muestras Cromatografía Líquida-LBTx.

7.1.3 Almacenar la muestra a una temperatura de refrigeración para conservar sus características originales. Si la muestra no puede ser procesada de manera inmediata (fin de semana) almacenarla a una temperatura de congelación.

## 7.2 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

7.2.1 Seguir los pasos indicados en el Anexo N°1: GUÍA PARA LA PREPARACIÓN DE REACTIVOS.

## 7.3 PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

7.3.1 Con la solución patrón de ácido domoico 103,3 µg/mL y la solución diluyente acetonitrilo:agua 1:9 se deben preparar 5 soluciones de ácido domoico a distinta concentración. Las concentraciones de las soluciones corresponden a distintos valores del límite de acción (LA) del Ácido Domoico.

7.3.2 El LA del Ácido Domoico es de 20µg/g de carne de molusco. Cada extracción de ácido domoico se realiza con 0,2 g de carne/mL. Por tanto, el valor equivalente del LA del Ácido Domoico en los extractos es de 4µg/mL.

7.3.3 En base a la cantidad anterior, se consideraron distintas cantidades de LA para preparar las soluciones de cada punto de la curva. Las concentraciones y volúmenes de las soluciones, las alícuotas de solución patrón de ácido domoico y de solución diluyente necesarias para su preparación se detallan en la tabla N°1.

7.3.4 Las soluciones deben prepararse dentro de viales de microcentrífuga y luego ser agitadas en vortex a velocidad media durante 5 segundos.

7.3.5 Las soluciones deben almacenarse a una temperatura de refrigeración (4°C) en el REF-01, o bien ser analizadas inmediatamente.

**Tabla N°1**

Punto de la curva	LA	Concentración de ácido domoico en la solución (µg/mL)	Concentración del patrón de ácido domoico (µg/mL)	Alícuota de patrón de ácido domoico (µL)	Alícuota de solución diluyente (µL)	Volumen final de la solución (µL)
1	0,2	0,8	103,3	4	496	500
2	0,5	2	103,3	10	490	500
3	1	4	103,3	19	481	500
4	2	8	103,3	39	461	500
5	2,5	10	103,3	48	452	500

## **7.4 PREPARACIÓN DE CONTROLES**

7.4.1 Preparar un fortificado cercano al límite de cuantificación del método (0,2 LA) y uno a un valor cercano al nivel regulatorio en cada lote de análisis.

## **7.5 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA O ETAPAS PREVIAS PARA REALIZAR LA MEDICIÓN.**

### **7.5.1 Tratamiento previo de la muestra**

7.5.1.1 Lavar el exterior del molusco bajo el chorro de agua la llave.

7.5.1.2 Cortar el músculo aductor y lavar el interior del molusco.

7.5.1.3 Desconchar y escurrir la carne en un colador durante 5 minutos.

7.5.1.4 Pesar 100 g de carne en un vaso de precipitado de 250 mL.

7.5.1.5 Homogeneizar los 100 g de carne con una licuadora de inmersión hasta obtener una masa de consistencia fluida y apariencia homogénea.

7.5.1.6 Transferir la carne homogeneizada a una bolsa hermética.

7.5.1.7 Etiquetar la bolsa con los siguientes datos:

- Nombre de la muestra.
- Fecha de recepción.
- Responsable.
- Fecha de preparación.
- Fecha de vencimiento.

7.5.1.8 Almacenar la bolsa a temperatura de congelación en el REF 02 o proceder de inmediato con la extracción de ácido domoico.

### **7.5.2 Obtención de extractos de Ácido Domoico.**

7.5.2.1 Descongelar las bolsas con carne homogeneizada durante 12 horas a temperatura de refrigeración dentro del REF 01.

7.5.2.2 Encender la balanza 01 20 minutos antes y completar el Registro de Verificación de Balanzas (RIT-05-02).

7.5.2.3 Rotular un tubo de centrifuga de 25 mL con los siguientes datos: nombre o código de la muestra, tipo de análisis (VAM), fecha y analista responsable.

7.5.2.4 Pesar aproximadamente 4 g de carne de molusco triturada en un tubo de centrifuga plástico de 25 mL. Registrar el peso real.

7.5.2.5 Agregar al tubo 16 mL de solución extractante MeOH:H<sub>2</sub>O 50:50 v/v (ver Anexo N°1)

7.5.2.6 Cerrar el tubo y voltearlo de 5 a 10 veces para integrar la carne y la solución.

7.5.2.7 Procesar con él homogenizador analógico JSRH-270 a 15.000 rpm por 5 minutos.

7.5.2.8 Rotular 12 viales de microcentrifuga del n° 1 al 12.

7.5.2.9 Extraer 12 alícuotas de 1500 µL del extracto y transferir a los viales de microcentrifuga.

7.5.2.10 Centrifugar los 12 viales en la microcentrifuga Smart R17 a una temperatura controlada de 4 °C a 10.090 rpm por 10 minutos.

7.5.2.11 Extraer manualmente los sobrenadantes desde los viales y transferirlos juntos a un tubo de microcentrifuga de 15 mL.

7.5.2.12 Rotular el tubo de microcentrifuga con los siguientes datos:

- nombre o código de la muestra
- tipo de extracto (VAM)

- fecha
- analista responsable.

7.5.2.13 Analizar las muestras de inmediato, o bien almacenar a temperatura de congelación hasta el día de su análisis.

### **7.5.3 Filtrado de los extractos.**

7.5.3.1 Descongelar el tubo de extracto a temperatura ambiente por 15 minutos.

7.5.3.2 Depositar un inserto dentro del vial para HPLC.

7.5.3.3 Extraer 0,5 mL de extracto con una jeringa de 3 mL provista de aguja.

7.5.3.4 Quitar y desechar la aguja de la jeringa.

7.5.3.5 Enroscar el filtro PVDF 12 mm 0,22  $\mu\text{m}$  en el extremo de la jeringa.

7.5.3.6 Empujar el extracto a través de la jeringa y depositarlo dentro del inserto hasta completar cerca de  $\frac{3}{4}$  de su capacidad.

**Nota:** El procedimiento de filtrado de los extractos de ácido domoico es el mismo que debe aplicarse para filtrar los blancos de fase móvil, fortificados y soluciones de la curva de calibración.

## **7.6 ANÁLISIS DE LA MUESTRA O REALIZACIÓN DE LA MEDICIÓN. CONDICIONES INSTRUMENTALES**

### **7.6.1 Condiciones cromatográficas**

Columna HPLC: C18 Luna® con un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ , poro de 100 Å y dimensiones de 250 x 4.6 mm.

Flujo: 1 mL/ minuto.

Detector de arreglo de diodos:  $\lambda$  242 nm

Volumen de inyección: 20  $\mu\text{L}$ .

Horno de la columna: 40° C.

Fase móvil A: Ácido trifluoroacético 0,03% : Acetonitrilo 85:15

Elusión: Isocrática.

## **7.7 CÁLCULO DE RESULTADOS**

7.7.1 La identidad del ácido domoico debe ser confirmada respecto a la mezcla ácido domoico 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  + triptófano 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y su análisis espectral.

7.7.2 Debe observarse un espectro con la misma forma y la misma longitud de onda de máxima absorción (242 nm).

7.7.3 Si persisten las dudas de su identidad, para evitar un falso positivo, realizar una adición de estándar de ácido domoico al vial de la muestra en cuestión. Si la señal cromatográfica se deforma y aparece como una doble colina, se puede descartar la presencia de ácido domoico.

**Nota:** Se ha reportado que el ácido domoico en solución gradualmente isomeriza al C5-diastereomero o ácido epi-domoico, por lo tanto, inevitablemente se producirá una mezcla luego del almacenamiento a largo plazo de un estándar. Dado que el ácido epi-domoico presenta un espectro UV idéntico al del ácido domoico, los factores de respuesta en HPLC con detector UV son idénticos. Bajo ciertas condiciones cromatográficas el ácido domoico y el epi-domoico coeluyen; esto no constituye un problema y de hecho hace el análisis más simple. El analista debe basar la calibración de su instrumento y la cuantificación en la suma de las áreas del ácido domoico y el epi-domoico.

El cálculo de la concentración de ácido domoico+epi-domoico en µg/g:

$$\text{Concentración DA } (\mu\text{g/g}) = \frac{\text{Concentración DA } (\mu\text{g/mL})}{P} \times Vt \times D$$

Donde:

D: Factor de dilución.

Vt: Volumen total del extracto (muestra diluida más el solvent): 20 mL.

P: peso de la muestra en gramos (usualmente 4 g).

## **7.8 ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DEL ENSAYO. INDICAR LOS CONTROLES DE CALIDAD PARA ASEGURAR LOS RESULTADOS DE LOS ENSAYOS.**

Se efectuarán controles sistemáticos y periódicos para comprobar la validez de los ensayos realizados con el método de ensayo recogido en este procedimiento. Los controles de calidad quedan agrupados en los siguientes niveles de control:

- a) Nivel I: Ensayos de intercomparación, utilización de materiales de referencia certificados y patrones de referencia certificados, según disponibilidad.
- b) Nivel II: Materiales de referencia sin certificación externa y muestras fortificadas por el analista.

7.8.1 Considerar inyectar un blanco al inicio de la secuencia.

7.8.2 Verificar el equipo inyectando a continuación los estándares para construir la curva de calibración, y verificar el tiempo de retención de las toxinas.

7.8.3 Inyectar a continuación los fortificados y nuevamente una inyección de blanco para evitar un eventual arrastre.

7.8.4 Inyectar a continuación las muestras con un máximo de 5 inyecciones consecutivas, para luego insertar un punto de la curva para corroborar el tiempo de retención y continuar con la inyección de muestras, manteniendo esta secuencia (5 muestras - 1 estándar).

7.8.5 Mantener una carta control para la curva de calibración graficando la pendiente obtenida

7.8.6 Mantener una carta control para la evaluación de la recuperación a partir del análisis del fortificado.



## 7.9 EXPRESIÓN DE RESULTADOS

La forma como se expresan los resultados en el informe de ensayo es la que se expresa en la tabla a continuación

Método de ensayo	Límite de detección	Límite de cuantificación	Resultado	Normativa	Nivel Regulatorio
Quilliam et. al. (1995)  Determinación de Toxina Amnésica de Molusco por HPLC-DAD	X µg/g	X µg/g	X,X µg/g	Reglamento Sanitario de Alimentos	20 µg/g

## 7.10 DISPOSICIÓN FINAL

Los desechos alimentarios son eliminados por basura normal. Los desechos expuestos a alguna contaminación biológica o química y desechos producto del proceso, serán eliminados de acuerdo al procedimiento de Gestión de Residuos (PR-644.00.002) e Instructivo Manejo de Residuos peligrosos, especiales y otros (IT-644.00-001).

## 8. REGISTRO

Identificación	Almacenamiento				Disposición	Nivel de criticidad			Protección
	Tiempo de retención	Recuperación	Medio de soporte	Lugar / Responsable		Confidencialidad (Reservada / Uso Interno / Publica)	Integridad (Alta / Media / Baja)	Disponibilidad (Alta / Media / Baja)	
No Aplica									

## 9. TABLA DE MODIFICACIONES

<b>Versión modificada</b>	
<b>Fecha de modificación</b>	
<b>Numeral modificado</b>	<b>Descripción general de cambios</b>

## 10. CUADRO DE RESPONSABILIDADES

<b>Ejecuta el método (Cargo)</b>	<b>Elabora el informe de resultados (Cargo)</b>	<b>Aprueba el informe de resultados (Cargo)</b>

## 11. ANEXOS

Anexo N° 1: Guía para la preparación de reactivos.

## ANEXO N°1

### GUÍA PARA LA PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Todas las soluciones preparadas deben ser ingresadas en el Registro de Preparación de Soluciones (R1-E-03) y etiquetadas con los siguientes datos.

- Nombre de la solución.
- Número de batch.
- Concentración.
- Solvente.
- Temperatura de almacenamiento.
- Fecha de preparación.
- Fecha de vencimiento.

#### **Solución extractante Metanol:agua 50:50 v/v.**

- Medir 250 mL de metanol para análisis
- Transferir el volumen a un frasco de vidrio Duran Schott de 500 mL.
- Medir 250 mL de agua ultrapura
- Transferir el volumen al mismo frasco y agitar manualmente.
- Etiquetar el frasco y registrar la solución en el formulario R1-E-03.
- Almacenar el frasco en el REF-01 a temperatura de refrigeración.

#### **Solución diluyente Acetonitrilo:agua 1:9 v/v.**

- Bajo campana de extracción, medir 2 mL de Acetonitrilo y transferir a una probeta de 50 mL.
- Con agua ultrapura, completar el volumen de la probeta hasta 20 mL.
- Transferir la solución a un tubo de centrifuga de 25 mL y agitar manualmente.
- Etiquetar el tubo y registrar la solución en el formulario R1-E-03.
- Almacenar el tubo en el REF-01 a temperatura de refrigeración.

#### **Solución Ácido Trifluoroacético 0,03% v/v.**

- Agregar aproximadamente 900 mL de agua ultrapura a un matraz aforado de 1000 mL.
- Bajo campana de extracción, depositar aproximadamente 0,5 mL de Ácido Trifluoroacético en un vaso de precipitado de 10 mL.
- Desde el vaso de precipitado, medir 300 µL de Ácido Trifluoroacético con una micropipeta Gilson 100-1000 µL y transferir al matraz aforado de 1000 mL.
- Enrasar el matraz aforado con una piseta que contenga agua ultrapura.
- Filtrar la solución con un filtro de membrana de nitrocelulosa Merck Millipore modelo HAWPO 4700 (0,45 µm) y la bomba de vacío Rocker 300 de 650 mm hg. Depositar la solución en un frasco.
- Etiquetar el frasco y registrar la solución en el formulario R1-E-03.
- Almacenar el frasco en el REF-01 a temperatura de refrigeración.

Nota: Dejar que el ácido trifluoroacético restante en el vaso de precipitado se evapore dentro de la campana de extracción.

### **Fase Móvil Ácido Trifluoroacético 0,03%: Acetonitrilo 85:15 v/v.**

- Bajo campana de extracción, medir en 2 matraces aforados 100 y 50 mL de Acetonitrilo.
- Agregar los volúmenes de acetonitrilo a un matraz de 1000 mL.
- Enrasar el matraz aforado con solución Ácido Trifluoroacético 0,03% v/v.
- Transferir a un frasco de vidrio de 1 L.
- Etiquetar el frasco y registrar la solución en el formulario R1-E-03.
- Almacenar el frasco en el REF-01 a temperatura de refrigeración.

### **Solución Stock de Ácido Domoico 4,1 µg/mL**

- Rotular un vial eppendorf con los siguientes datos: DA 4,1 µg/mL, fecha y analista responsable.
- Con una micropipeta Gilson (20-100 µL) medir 20 µL de estándar de Ácido Domoico 103,3 µg/mL y transferir al vial eppendorf.
- Con una micropipeta Gilson (100-1000 µL) medir 480 µL de estándar de solución diluyente ACN:agua 1:9 y transferir al vial eppendorf.
- Agitar el vial eppendorf a baja potencia en vortex DLAB MX-S.
- Sellar el vial con papel parafilm.
- Cubrir el vial de la luz con papel aluminio y almacenar en el REF-01 a temperatura de refrigeración (en caso de no usarse inmediatamente).

### **Solución Mezcla de Ácido Domoico 2 µg/mL + Triptófano 20 µg/mL**

- Con una micropipeta Gilson (100-1000 µL) medir 400 µL de solución stock de Ácido Domoico 4,1 µg/mL y transferir a un matraz aforado de 1 mL.
- Con otra micropipeta Gilson (20-100 µL) medir 88 µL de solución stock de Ácido Domoico 4,1 - µg/mL y transferir al mismo matraz aforado de 1 mL.
- Con una micropipeta Gilson (20-100 µL) medir 20 µL de solución stock de Triptófano 1000 µg/mL y transferir al mismo matraz aforado de 1 mL.
- Con una micropipeta Gilson (100-1000 µL) medir 600 µL de solución diluyente ACN:agua 1:9 y aforar suavemente el mismo matraz aforado de 1 mL. Eliminar el resto de solución diluyente remanente en la pipeta.
- Agitar el vial eppendorf a baja potencia en vortex DLAB MX-S.
- Sellar el vial con papel parafilm.
- Cubrir el vial de la luz con papel aluminio y almacenar en el REF 01 a temperatura de refrigeración (en caso de no usarse inmediatamente).