

Validación de una metodología para la determinación de poliaminas en orina por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Validation of a methodology for determination of polyamines in urine by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Mario Noa-Pérez*

Departamento de Salud Pública, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara. Camino Ramón Padilla Sánchez No. 2100 Nextipac, Zapopan, Jalisco C.P.45200. México.

Natalia Serrano-Gutiérrez

Departamento de Calidad y Estabilidad, Laboratorios Pisa S.A. de C.V, Calle 6, Colón Industrial, Guadalajara, C.P. 44930. México.

Ramón Reynoso-Orozco

Departamento de Biología Celular y Molecular, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara. Camino Ramón Padilla Sánchez No. 2100 Nextipac, Zapopan, Jalisco C.P.45200. México.

*Autor para correspondencia: mario.noa@academicos.udg.mx

Resumen

Los niveles de poliaminas (PAs) en orina constituyen un importante biomarcador de fenómenos fisiológicos, y patológicos para el ser humano. Dada su importancia, se eligió como objetivo del presente trabajo la validación del método de PAs (Putrescina (Pu), Cadaverina (Cdv), Espermidina (Spd), Espermina (Spm), Epinefrina (Epf) e Histamina (Hst) en orina por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en fase reversa (RP- HPLC) con derivatización pre- columna con cloruro de dansilo y detección UV a 254 nm. Para ello se determinaron la selectividad; rango de trabajo y linealidad; límite de detección/límite de cuantificación; precisión (repetibilidad y precisión en condiciones intermedias); exactitud (medida como recuperación) y robustez. Se partió del método reportado en la Norma chilena para la detección de histamina y otras aminos biógenas en pescado y mariscos ME-711.O4-070, 2014, por lo que fue necesario implementar ajustes para su aplicación en orina. Los resultados demostraron que los aminoácidos (AAs) no causaban interferencias en el análisis de PAs, y permiten determinar concentraciones en el rango lineal entre 4 y 28 µg/mL. No obstante, no se obtuvo buena recuperación (exactitud) en el experimento, posiblemente debido a que los estándares utilizados no eran acetilados (42.6143% de Pu y 69% de Cdv). La metodología permite determinar los niveles de Pu, Cdv, Spd, Spm Hst y Efd en muestras de orina de humanos y otras especies de mamíferos.

Palabras clave: Poliaminas, orina, HPLC, validación.

Abstract

The levels of polyamines (PAs) in urine are an important biomarker of physiological and pathological phenomena for humans. Due to its importance, the validation of a PAs determination methodology was validated for (Putrescine (Pu), Cadaverine (Cdv), Spermidine (Spd), Spermine (Spm), Epinephrine (Epf) and Histamine (Hst) in urine by Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) with pre- column derivatization using dansyl chloride and UV detection at 254 nm. To this aim, selectivity, working range and linearity, detection /quantification limit were determined. The precision (as repeatability and precision under intermediate conditions), accuracy (measured as recovery) and robustness were established. The methodology was adapted from the Chilean Standard for the detection of histamine and other biogenic amines in fish and shellfish ME-711.O4-070, 2014, so it was necessary to implement adjustments for its application in urine. The results showed that amino acids (AAs) did not cause interference in the analysis of PAs, and allow determination of concentrations in the linear range between 4 and 28 µg/mL. However, good recovery (accuracy) was not obtained in the experiment, possibly because the standards used were not acetylated (42.6% Pu and 69% Cdv). The present methodology allows determining the levels of Pu, Cdv, Spd, Spm Hst and Efd in urine samples from humans and other mammalian species.

Keywords: Polyamines, urine, HPLC, validation.

Introducción

Las PAs son compuestos alifáticos naturales particularmente esenciales para las funciones biológicas importantes (Hussain *et al.*, 2016) La adrenalina o epinefrina es una hormona considerada biomarcador de estrés (Dhama *et al.*, 2019) y la histamina (Hst) regula múltiples funciones fisiológicas (Comas-Basté *et al.*, 2020); siendo todas excretadas en la orina de mamíferos (Xu *et al.*, 2020; Landolt-Marticorena *et al.*, 2016; Scalabrino y Ferioli, 1984).

El interés generado por los niveles de PAs ha propiciado el desarrollo de numerosos métodos analíticos mediante cromatografía (Yu *et al.*, 2015). Se ha aplicado la determinación de las PAs y sus metabolitos acetilados como biomarcadores potenciales en el diagnóstico y evaluación terapéutica en el cáncer hepatocelular en fluidos y orina con resultados que permiten apoyar en el éxito de los tratamientos (DeFelice y Fiehn, 2019).

La orina es una de las matrices más utilizadas en bioanálisis porque es relativamente fácil de recolectar y su muestreo no es invasivo (Naccarato, Elliani, Cavaliere, Sindona, y Tagarelli, 2018). Antes de implementar un método de uso rutinario en un laboratorio de análisis, se deben realizar verificaciones para asegurar las características de rendimiento y demostrar que éste es científicamente sólido bajo las condiciones en que se aplica. Estos controles son conocidos como validación. La validación del método se establece mediante estudios sistemáticos de laboratorio, que indican que dicho método es apto para su propósito, es decir, su rendimiento es capaz de producir los resultados adecuados a las necesidades del usuario. El estudio de un método de validación comienza con descripciones suficientes, detalladas e inequívocas con respecto tanto para el analito, como para el mismo método (Barwick, 2016).

Las características más importantes de rendimiento, incluidas usualmente en los estudios de validación son:

- Especificidad, frente a posibles interferencias de la matriz analizada.
- Rango de trabajo y linealidad;
- Límite de detección/límite de cuantificación;
- Precisión para un único laboratorio (repetibilidad, precisión en condiciones intermedias)

- Exactitud
- Robustez

El presente trabajo partió del método de determinación de PAs reportado en la Norma chilena para la detección de histamina y otras aminas biógenas, principalmente en productos hidrobiológicos frescos o procesados, harina de pescado, quesos y cecinas (ME-711.04-070, 2014), por lo que fue necesario implementar ajustes para su aplicación en orina, lo cual fue el objetivo de la validación del método de PAs, adicionando además dos aminas biógenas: histamina y epinefrina, así como ensayando muestras de diferentes especies.

Materiales y Métodos

La validación se realizó con orina humana, mientras que para la robustez se utilizaron además orina de perro (*Canis lupus familiaris*), borrego, y conejo.

Teniendo en cuenta el escaso volumen de orina disponible en algunas especies, se muestrearon sólo 5 mL de orina recién obtenida, se colocaron en un tubo de ensayo de polipropileno de fondo cónico y tapa de rosca y se adicionó 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5% conteniendo 25 mg/mL de estándar interno (diaminoheptano, DHA).

Se utilizó el equipo (HPLC) VARIAN 9050 con el software GALAXY WORKSTATION y un equipo (HPLC) AGILENT 1200 con el software CHEMSTATION FOR LC®.

La columna cromatográfica fue LiChroCART® 250-4 rellena con LiChrospher® 100 RP-C18 (5µm)), con una lámpara UV/ Vis a una longitud de onda de 254 nm.

El gradiente de fases móviles utilizado fue:

Fase móvil A: Metanol grado HPLC: agua grado HPLC (70:30)

Fase móvil B: Metanol grado HPLC

De 0 % de B a 100 % de B en 20 minutos

Como criterio de selección de la columna cromatográfica se utilizó la resolución (R) de los picos de DHA e Histamina, considerando que fuera > 1.

Para la detección de las PAs presentes en orina se llevó a cabo la derivatización pre-columna con cloruro de dansilo, de la siguiente manera:

Procesamiento de las muestras de orina

1. A 5 mL de las muestras de orina, se le agregó 1 mL de TCA al 5% conteniendo el estándar interno (DHA) a 25 mg/mL
2. Se agitaron los tubos durante 30 min en agitador mecánico
3. Una alícuota de 2 mL se filtró a través de membrana de Nylon de 13 mm d.i. y 0.22 μm hacia un vial previamente rotulado.

La dansilación se efectuó de la siguiente manera:

Se adicionaron, en el siguiente orden: 100 μL del extracto de la muestra filtrado, 400 μL de bicarbonato de sodio acuoso 0.25 M, 200 μL de cloruro de dansilo a 10 mg/mL en acetona, recién preparado, o conservado en refrigeración en envase ámbar bien cerrado, seguido de 300 μL de acetona. Los viales se agitan a mano ligeramente, se colocaron durante 1 hora en baño seco a 60°C y se dejaron enfriar durante 10 min.

De la misma forma antes descrita se midieron 100 μL de cada solución de estándares o en su defecto 100 μL de TCA al 5% (blanco control negativo).

En ambos casos se inyectaron 20 μL al HPLC, iniciando con los controles negativos y estándares, seguidas de los estándares y las muestras.

Para validar el método se midieron los siguientes indicadores de calidad:

Especificidad: teniendo en cuenta las posibles compuestos presentes en las muestras de orina, se derivatizaron nueve aminoácidos (Triptófano, Ornitina, Arginina, Norleucina, Treonina, Norvalina, Cistina, Alanina y Citrulina) para descartar posibles interferencias o solapamiento con las PAs de interés, determinando sus tiempos de retención relativos (trr).

Linealidad y rango de trabajo: Para la linealidad se obtuvieron los valores de r^2 en las correspondientes curvas de calibración mediante el software CHEMSTATION FOR LC®, con los siguientes niveles de concentración de las mezclas de todas las PAs:

Nivel 1 (concentración de 2 $\mu\text{g/mL}$)

Nivel 2 (concentración de 4 $\mu\text{g/mL}$)

Nivel 3 (concentración de 7 $\mu\text{g/mL}$)

Nivel 4 (concentración de 14 $\mu\text{g/mL}$)

Nivel 5 (concentración de 28 $\mu\text{g/mL}$)

Todos los matraces se aforaron con TCA 5% y de cada uno se tomaron 100 μL para la posterior dansilación. Cada concentración se preparó e inyectó por triplicado.

Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ): Se procesaron y dansilaron muestras de orina humana, determinando el FCR (factor de correlación de ruido) con la siguiente ecuación; Parámetro de ruido (medido en μV)/ área de pico. Posteriormente se multiplicaron los valores de ruido x 3 para obtener el LOD, y x 5 para obtener el LOQ (Magnusson y Örnemark, 2014).

Exactitud: La exactitud es una combinación de veracidad y precisión. La veracidad puede ser determinada por sesgo o recuperación (Duffau, *et al.*, 2010), por lo que en nuestro caso se llevó a cabo el experimento de recuperación. Éste se llevó a cabo analizando una misma muestra fortificada y sin fortificar, todas por triplicado, de acuerdo a la fórmula descrita por Duffau, *et al.*, 2010.

La precisión en condiciones intermedias da una estimación de la variación de los resultados cuando las mediciones de una misma muestra se realizan en un solo laboratorio, usando el mismo método durante un período de tiempo extendido, y por lo tanto hay mayor variabilidad que en la repetibilidad. Otros parámetros que pueden ser variados durante el período de estudio pueden ser el analista, los reactivos y el equipo (Barwick, 2016).

Para obtener la precisión se llevaron a cabo dos parámetros de calidad: repetibilidad y precisión en condiciones intermedias, se utilizaron estadígrafos simples: Media (\bar{x}), Desviación estándar (S) y Coeficiente de variación (CV) según Duffau, *et al.* 2010)

Repetibilidad: es un tipo de precisión que se espera que represente la menor variación en los resultados. Es una medida de la variabilidad cuando las mediciones se realizan en el mismo material, por un mismo analista, usando el mismo método y equipamiento, en un periodo corto de tiempo (Barwick, 2016). Los resultados de repetibilidad determinaron en diez repeticiones de la misma muestra, mismo analista, equipo y mismo día de análisis para obtener los resultados de desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV).

Precisión en condiciones intermedias: Se procesó y dansiló una muestra de orina (seis réplicas), que posteriormente fueron inyectadas durante cuatro días consecutivos. Los resultados se procesaron para calcular el CV de cada uno de los días.

Para llevar a cabo la precisión en condiciones intermedias, se consideraron cambios en algunos parámetros, que fueron:

Cambio de equipo cromatográfico y software: equipo Agilent 1200 con Software CHEMSTATION FOR LC® y equipo Varian 9050 con Software Galaxy Workstation e inyecciones diarias de 50 muestras durante 30 días.

Robustez, Se procesaron y analizaron muestras de orina de diversas especies. Se utilizaron muestras de las siguientes especies:

- Homo sapiens (hombre)
- Canis familiaris (perro)
- Ovis aries (oveja)
- Oryctolagus cuniculus (conejo)

Para el análisis estadístico se utilizó el programa RStudio 2018, para obtener los valores de media (\bar{x}), S, FCR, LOD, LOQ, CV, así como los valores de recuperación.

Resultados

Especificidad:

Al obtener los cromatogramas de muestras de orina se observaron picos no identificados por lo que se decidió incluir dos aminos biógenas (histamina y epinefrina) en los estándares y obtener el trr de estas mismas.

En la Cuadro 1 se pueden observar las diferencia de trr entre aminoácidos y PAs, confirmando que éstos últimos no representan interferencias.

Cuadro 1. Resultados del tiempo de retención y tiempo de trr de los AAs y PAs y aminos biógenas analizadas.

Aminoácidos	Tiempo de retención	Tiempo de retención relativo (trr)*	PAs	Tiempo de retención relativo (trr)
Triptófano	6.865	0.6075	Pu	0.8572
Ornitina	5.809	0.514	Cdv	0.894
Arginina	5.634	0.5591	Histamina	1.128
Norleucina	5.301	0.4647	Spd	1.273
Treonina	5.559	0.5446	Spm	1.020
Norvalina	5.814	0.6454	Epinefrina	1.320
Cistina	5.903	0.6491		
Alanina	6.071	0.6709		
Citrulina	7.07	0.644		

*trr: Tiempo de retención relativo al DHA (estándar interno)

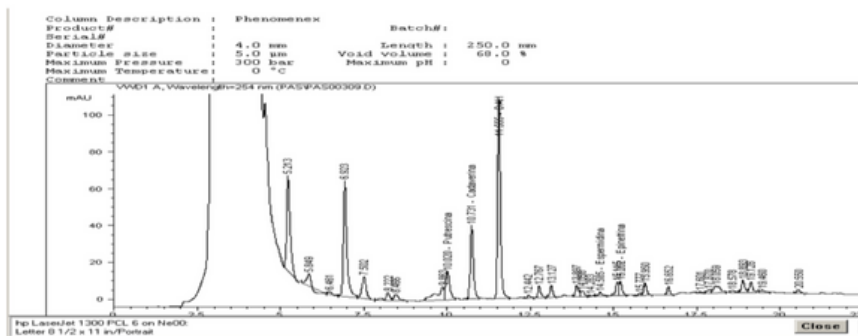


Figura 1. Cromatograma típico de estándar de PAs.

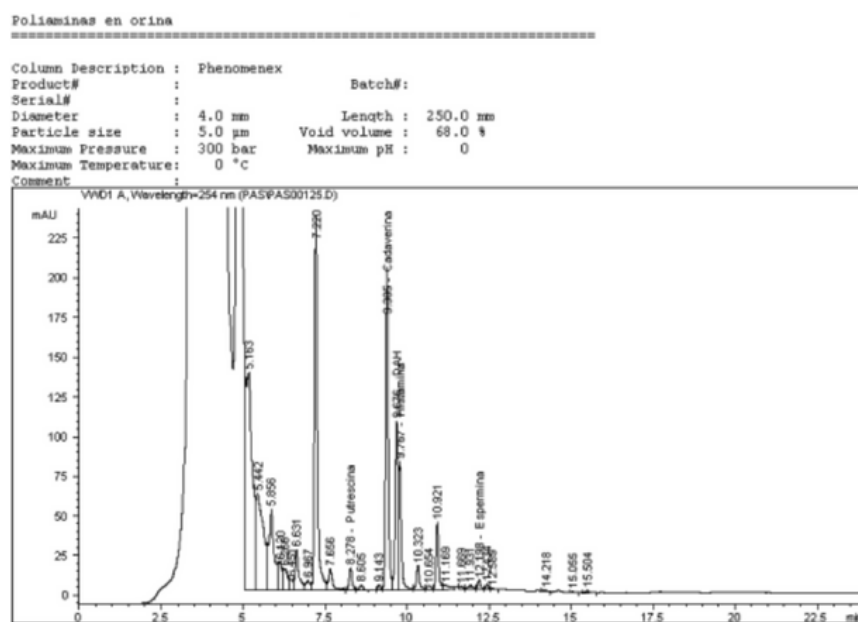


Figura 2. Cromatograma de estándares de PAs en muestras de orina.

Metodología de conservación de las muestras de orina

Se realizaron pruebas de conservación de las muestras de orina, hasta obtener el volumen óptimo de TCA al 5% para la conservación de la muestra y el tiempo de conservación, en congelación (-18°C). Se obtuvieron los niveles de concentración de PAs de una misma muestra, utilizando diferentes volúmenes de TCA en cada una de las réplicas, de la cual se obtuvo que 1 mL de TCA por cada 5 mL de muestra, fuera la mejor opción, proporcionando valores repetibles hasta 48 horas después del muestreo.

Especificidad (Selectividad)

En la Figuras 1 y 2 se muestran cromatogramas típicos obtenidos de PAs

Linealidad y rango de trabajo

La linealidad obtenida mediante el software ChemStation for LC®, mostró valores > 0.98 para todas las Pas analizadas.

Los valores de LOD y LOQ obtenidos se muestran en la Cuadro 2.

Cuadro 2. LOD y LOQ de cada PAs y amina biógena.

PAs	Ecuación obtenida por el software	FCR	LOD	LOQ
Putrescina	ÁreaRadio= 2.83222761* AmtRadio - 0.0204694	0.118	0.354	0.59
Cadaverina	ÁreaRadio= 1.5998796* AmtRadio - 0.0249369	0.219	0.657	1.095
Histamina	ÁreaRadio= 1.5998796* AmtRadio - 0.0198728	0.120	0.36	0.6
Espermidina	ÁreaRadio= 1.4627327* AmtRadio - 0.0132367	0.103	0.309	0.515
Espermina	ÁreaRadio= 1.9580607* AmtRadio - 0.0395547	0.117	0.351	0.585
Epinefrina	ÁreaRadio= 1.22456052* AmtRadio - 0.0044957	0.100	0.3	0.5

Exactitud

El resultado de exactitud no arrojó valores aceptables: sólo se recuperaron 41.6% de Pu y 69.0% de Cdv (Cuadro 3). Esto se pudo deber a que no se utilizaron para el experimento de recuperación PAs acetiladas: las muestras se fortificaron con estándares de PAs no acetiladas.

La importancia de que la muestra sea fortificada con estándares acetilados, se debe a que las PAs son excretadas en la orina acetiladas y diacetiladas, por lo que es posible que la recuperación no sea efectiva con resultados favorables al descomponerse los estándares no acetilados.

Cuadro 3. Resultados del experimento de recuperación.

PAs y aminas biógenas	Muestra 1	Muestra Fortificada 7 µg/mL	Recuperación %	Muestra 2	Muestra Fortificada 7 µg/mL	Recuperación %
Putrescina	4.2963	5.75541	10.21377	4.2963	10.2412	41.6143
Cadaverina	14.01096	20.93268	48.45204	14.01096	23.86975	69.01153
DHA	100	100	100	100	100	100
Histamina	-	4.34668	-	-	4.47581	--
Espermidina	5.85835	6.10878	1.75301	5.85835	6.35202	--
Espermina	3.2965	5.10878	12.68596	3.2965	6.47295	--
Epinefrina	15.38512	7.67582	-53.9651	15.38512	9.3891	--

Repetibilidad

Cuadro 4. Desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV) de cada una de las PAs y aminas biógenas.

Poliaminas	\bar{x}	S	CV
Putrescina	19.771965	2.269818	11.47998
Cadaverina	3.653098	0.5245786	14.35983
Histamina	-	-	-
Espermidina	3.332859	0.3032776	9.099621
Espermina	3.456337	0.1108942	3.208431
Epinefrina	9.685827	2.05082527	22.31879

Precisión en condiciones intermedias

Las variables seleccionadas fueron cambio de equipo de HPLC y de software:

- Equipo Agilent 1200 y con el software CHEMSTATION FOR LC®
- Equipo Varian 9050 con Software Galaxy Workstation

También se inyectaron réplicas de una misma muestra durante diferentes 4 días para determinar los indicadores estadísticos de CV (Cuadro 5).

Cuadro 5. Resultados de PAs durante cuatro días consecutivos.

Poliaminas	Putrescina	Cadaverina	Espermidina	Espermina	Epinefrina
\bar{x}	1.180	21.58	2.425	1.1125	1.4825
Varianza	5.152073	4.46717	1.610286	0.6062786	2.912764
S	0.1400956	2.113568	1.26897	0.7786389	1.706682
CV	11.80996	9.792404	52.3286	22.31879	115.12

Robustez

Los resultados de los análisis de las diferentes especies se muestran en la Cuadro 6.

Cuadro 6. Niveles de concentración de PAs en muestras de diferentes especies.

Muestras de orina	Mujer	Mujer	Hombre	Hombre	Ovino Macho	Ovino Hembra	Conejo T1	Conejo T2	Perro Hembra
Putrescina	8.73964	11.38472	11.2217	11.35378	8.86849	9.80715	25.21841	33.64888	0
Cadaverina	48.51.202	69.3398	54.51372	79.52482	13.3628	5.71568	13.00499	0	61.73003
DHA	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Histamina	-	-	-	-	-	0	-	0	-
Espermidina	9.21147	4.57613	5.46516	8.38865	16.9353	12-3903 7	15.96249	9.93507	0
Espermina	0	0.00E+00	2.57828	8.92611	7.14532	4.26397	4.60342	0	-
Epinefrina	26.93175	11.47179	22.72845	7.55042	19.31668	3.713	41.15336	14.04832	15.79561

Los resultados de la determinación de la Resolución cromatográfica (R) entre DHA e histamina para cada columna de HPLC ensayada se muestran en la Cuadro 7:

Cuadro 7. Resultados de la resolución DHA e histamina para las columnas cromatográficas ensayadas.

Columna	Resultado
Kinetex 5µm C18 100	>1
LiChrospher 100 RP -C18 5 µm	>1
Purospher RP-C18	<1
Supelcosil C18	<1

De acuerdo a lo anterior, las columnas Kinetex y LiChrospher resultados adecuadas para el análisis, al presentar valores de R>1 para los picos cromatográficos DHA- Histamina, por lo que las demás fueron descartadas.

Discusión

En la validación del método de PAs se observó que a mayor volumen de TCA, algunas PAs se pueden degradar, afectando la recuperación.

La linealidad dio resultados > 0.98 con sólo cuatro niveles de concentración de estándares de PAs diferentes (4, 7,14, 28 µg/ml) obteniendo así un rango de 4 -28 µg/mL, lo que es adecuado para los niveles presentes en orina. En otros trabajos de validación se han utilizado seis niveles de concentración para la linealidad, un ejemplo de ello, es el trabajo de validación de (Cui *et al.*, 2014), donde obtuvo un rango de 0.40 a 3.20 µg/ml.

Para el LOD y LOQ en el trabajo de validación del método de PAs, se inyectó un estándar de 4 µg/ml, así, determinando la concentración más baja que se produce mediante la señal-ruido, donde se obtuvo una respuesta 3,3 y 5,5 por encima del nivel del ruido del sistema cromatográfico, en cambio en la validación del método para la determinación de la pureza enantiomérica de (L)-AA con derivatización pre-columna y fase estacionaria quiral (Cui *et al.*, 2014), se determinaron cada uno de los AA como la concentración más baja que produce la señal-ruido en al menos 3:1 y 10:1.

La precisión en el trabajo de Cui *et al.*, 2014, se preparó con una serie de seis inyecciones, las cuales fueron inyectadas el mismo día, para evaluar el parámetro repetibilidad, la serie fue de tres niveles de concentración diferentes, y la precisión intermedia se determinó analizando las muestras durante tres días sucesivos obteniendo un S menor del 10%.

Tomando en cuenta los resultados del parámetro de calidad exactitud, que se llevó a cabo mediante experimento de recuperación, los resultados no fueron los deseados, debido a que se debería de recuperar el 80-110% (Duffau, *et al.*, 2010), y en nuestro caso sólo se logró recuperar 42.6143% de Pu y 69% de Cdv, en la Cuadro 9 se puede observar los resultados de porcentaje de recuperación de Spd, Spm, histamina y epinefrina, las cuales fueron muy bajas, o incluso nulas. Si tomamos en cuenta el trabajo de (Kawakita *et al.*, 2015) se llevó a cabo con poliaminas monoacetilidas y diacetiladas, se dedujo que esa fue la razón por la cual la recuperación no se pudo llevar a cabo, a diferencia de otros trabajos como el de (Santivañez, *et al.*, 2017), en el cual la exactitud se efectuó mediante la evaluación del error de rango obtenido en la prueba de precisión.

Para evaluar la robustez se pueden hacerse varios cambios en el procedimiento analítico, para determinar que tales cambios no afectan los resultados producidos, los cambios dependerán tanto del proceso del método, la matriz de análisis y la técnica a utilizar. Los cambios realizados en la validación del método de PAs en orina, fue procesar de diferentes especies (Cuadro 6).

El procesamiento de las muestras de orina se adaptó del método para alimentos realizando los cambios, que se pueden observar en la Cuadro 8:

Cuadro 8. Comparación de procesamiento de muestras original y el obtenido para orina.

Procesamiento de muestra	(ME-711.04-070, 2014)	Método de PAs
Centrifugación	3,000 rpm durante 15 min	Se omite
Primer paso de filtrado	Papel filtro Whatman N° 1, 4	Se omite
Segundo paso de filtrado	0.22 µm	0.22 µm
Estándar interno	Efedrina	DHA
Concentración de estándar interno	250 µg/mL	25 µg/mL
Niveles de concentración	100, 250 y 500 µg/mL	4, 7, 14, 28 µg/mL.

Fuente: ME-711.04-070, 2014

En el trabajo de Casas, *et al.* (2016), la muestra de orina se pasaba por una etapa de lavado, pasando a través de cartuchos y agua ultra pura con metanol, para evitar posibles fuentes de interferentes, lo cual resulta más costoso, por el uso de cartuchos de extracción en fase sólida (SPE).

Conclusión

Los parámetros de calidad analizados (especificidad, precisión, robustez, rango de trabajo, linealidad, límite de cuantificación y límite de detección), se puede deducir que es posible utilizar el método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (RP-HPLC) aunque de forma limitada por la baja exactitud obtenida en el presente estudio, para determinar los niveles de concentración de PAs: Pu, Cdv, Spd, Spm Hst y Efd en muestras de orina de humanos y otras especies de mamíferos.

Literatura citada

- Barwick V. (2016). Guide to Quality in Analytical Chemistry: An Aid to Accreditation. Eurachem/ CITAC Guide: 3rd ed. ISBN 978-0-948926-32-7.
- Casas-Fererira, A.M., B. Moreno-Cordero, A.P. Crisolino-Pozas y J. L. Pérez-Pavón. (2016). Use of microextraction by packed sorbents and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of polyamines and related compounds in urine. *Journal of chromatography*. 1444: 32-41
- Comas-Basté, O., S. Sánchez-Pérez, M.T. Veciana-Nogués, M. Latorre-Moratalla y MDC Vidal-Carou. (2020) Histamine Intolerance: The Current State of the Art. *Biomolecules*. 10(8):1181-1188.
- Cui Yan., Jiang Zhen., Sun Jiayi, Yu Jia, Li Minghua, Li Mingjie, Liu Mingxia, Guo Xingjie. (2014) Enantiomeric purity determination of (L) amino acids with pre-column derivatization and chiral stationary phase: Development and validation of the method. *Food Chemistry*. 158: 401- 407.
- DeFelice, B.C. y O. Fiehn. (2019) Rapid LC-MS/MS quantification of cancer related acetylated polyamines in human biofluids. *Talanta*. 1(196):415-419. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.12.074.
- Dhama, K., SK. Latheef, M. Dadar, HA.Samad, A.Munjal, R. Khandia, K. Karthik, R. Tiwari R, M.I. Yattoo, P. Bhatt, S. Chakraborty, KP. Singh, HMN Iqbal, W. Chaicumpa y S.K. Joshi. (2019) Biomarkers in Stress Related Diseases/Disorders: Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Values. *Frontiers in Molecular Biosciences*. doi: 10.3389/fmolb.2019.00091.
- Duffau Boris., F. Rojas, I. Guerrero, L. Roa, L. Rodriguez, M. Soto, M. Aguilera y S. Sandoval. (2010) Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “Aspectos generales sobre la validación del método”. *Instituto de Salud Pública*. Disponible en https://www.academia.edu/7849711/Guia_de_validaci%C3%B3n_de_m%C3%A9todos_y_determinaci%C3%B3n_de_la_inc%C3%A9rtidumbre_de_la_medici%C3%B3n
- Hussain, A., Zhang M., Üçpunar HK, Svensson T., Quillery E., Gompel N., Ignell R. y Kadow ICG. Ionotropic Chemosensory Receptors Mediate the Taste and Smell of Polyamines. *PLoS Biol*. 2016 May 4; 14(5):e1002454. Disponible en doi: 10.1371/journal.pbio.1002454. eCollection 2016 May.
- Kawakita Masao., Hiramatsu Kyoko., Moriya Shun-Suke., Samejima Keijiro y Takshashi Kei-ichi (2015) N1 N12-Diacetylspermine in human urine: performance as a tumor marker, quantification, production, and excretion. In: *Kusano Tomonobu y Suzuki Hideyuki. Polyamines A universal molecular nexus for growth, survival, and specialized. Springer*. Pp: 305-311.
- Landolt-Marticorena, C., Prokopec SD., Morrison S., Noamani B., Bonilla D., Reich., Scholey J., Avila-Casado C., Fortin PR., Boutros PC. y Wither J. A discrete cluster of urinary biomarkers discriminates between active systemic lupus erythematosus patients with and without glomerulonephritis. *Arthritis Research & Therapy* (2016) 18:218. Disponible en <https://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13075-016-1120-0>
- Magnusson B and U. Örnemark (eds.) *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0. Disponible en https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf
- ME-711.04-070 (2014) Determinación de aminas biogénicas (Histamina) Método HPLC. Disponible en <https://xdoc.mx/documents/me-71104-070-v3-aminas-biogenas-histamina-5f120e18e1f83>
- Naccarato, A., R. Elliani, B. Cavaliere, G. Sindona, y A. Tagarelli. (2018) Development of a fast and simple gas chromatographic protocol based on the combined use of alkyl chloroformate and solid phase microextraction for the assay of polyamines in human urine. *Journal of chromatography*. 11(1549):1-13.

- Santivañez-Veliz M., V.E. Moreno, S. Pérez-Silanes, S. Varela, H. Cerecetto, M. González y E. Lizarraga. (2017). Development, validation and application of a GC-MS method for the simultaneous detection and quantification of neutral lipid species Trypanosomacruzy. *Journal of chromatography*. 1061-1062: 225-232.
- Scalabrino, G. y M.E Ferioli. (1984) Polyamines in mammalian ageing: an oncological problem, too? A review. *Mechanisms of Ageing and Development*. 26:149-164.
- Xu, G., W. A. J. Lin. McAinch, X. Yan y X. Weng. (2020). Identification of Urinary Biomarkers for Exercise-Induced Immunosuppression by iTRAQ Proteomics. *Biomed Research International*. 23:1-13.
- Yu, C., R. Liu, C. Xie, Q. Zhang, Y. Yin, K. Bi y Li Q. (2015). Quantification of free polyamines and their metabolites in biofluids and liver tissue by UHPLC-MS/MS: application to identify the potential biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 407:6891–6897.