



RIDASCREEN® Гистамин (ферментный)

Арт. No. R1605

Ферментный анализ для количественного определения гистамина



Анализ *in vitro*

Хранить при 2-8°C

Пожалуйста, обращайтесь по вопросам технической поддержки и дополнительной информации к официальным дистрибьюторам на территории Вашей страны:

**Официальный дистрибьютор
в России:**

ООО "НеоТест"

ул. Растопчина, 1Г, г. Владимир

+7 499 649 02 01

info@neo-test.ru

www.neo-test.ru

Техническая поддержка

support@neo-test.ru

+7 499 704 05 50



**Официальный дистрибьютор
в Беларуси:**

ОДО "КомПродСервис"

ул. Филимонова, 25Г, г. Минск

+375 17 336 50 54

info@komprod.com

www.komprod.com

Техническая поддержка

support@komprod.com

+375 17 336 50 54



RIDA® и RIDASCREEN®

являются зарегистрированными торговыми марками R-Biopharm AG.

Производитель: R-Biopharm AG, Дармштадт, Германия

R-Biopharm AG имеет сертификат ISO 9001.

RIDA® and RIDASCREEN®

are registered trademarks of R-Biopharm AG

Manufacturer: R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

RIDASCREEN® Гистамин (ферментный)

Описание

RIDASCREEN® Гистамин (ферментативный) (арт. № 1605) представляет собой ферментный тест в формате микропланшета для количественного определения гистамина в свежей рыбе, рыбных консервах, рыбной муке, вине (используйте RIDA® Sample Decolorant, Art. No. R1699 для пробоподготовки) и сыра.

Все реактивы для проведения анализа, включая градуировочные растворы, содержатся в тест-наборе. Один тест-набор рассчитан на проведение 96 определений (включая градуировочные растворы). Для оценки результатов необходим микропланшетный фотометр.

Тест RIDASCREEN® Гистамин (ферментный):
- сертифицирован в AOAC-ПИ (ПТМ №031901)

Пробоподготовка:	Гомогенизация и экстракция
Время выполнения:	подготовка проб (10 проб) зерновых и кормов – ок. 35 минут выполнение теста (время инкубации) – 15 мин
Стандарт:	Гистамин
Предел обнаружения:	свежая рыба, рыбные консервы – 0,75 мг/кг готовая рыба – 3,75 мг/кг вино – 0,54 мг/кг сыр – 0,75 мг/кг
Предел количественного определения:	свежая рыба, рыбные консервы – 2 мг/кг свежая рыба с аскорбиновой кислотой – 3 мг/кг готовая рыба – 10 мг/кг вино – 1,4 мг/кг сыр – 2 мг/кг
Степень извлечения:	ок. 85-105%
Специфичность:	Фермент специфичен для гистамина. Нет побочных реакций на L-гистидин, L-триптофан, серотонин, L-тирозин, тирамин, L-лизин, триметиламин, путресцин и кадаверин

Специфичность набора оценивалась путем определения побочной активности соответствующих веществ в буферной системе.

Сопутствующие продукты:

RIDA® Sample Decolorant (Art. No. R1699) for wine analysis

RIDASCREEN® Histamine (competitive ELISA, Art. No. R1601)

1. Применение

РИДАСКРИН® Гистамин (ферментативный) используется для количественного определения гистамина в свежей рыбе, рыбных консервах, рыбной муке, вине и сыре. Набор был одобрен AOAC Performance Tested Methods ProgramSM.

2. Общая информация

Гистамин – это продукт разложения гистидина, появляющийся как следствие роста некоторых бактерий в богатой белком пище, такой как рыба, сыр и вино. Количество образующегося гистамина зависит от вида бактерий, температуры и времени воздействия и может превышать в рыбы 1000 мг/кг. В рыбе хорошего качества содержится менее 10 мг/кг гистамина. Предельное значение для рыбы и продуктов из нее составляет от 50 до 200 мг/кг в зависимости от вида рыбы и страны. Высокие концентрации гистамина можно найти в сыре, тогда как содержание гистамина в вине обычно не превышает 15 мг/л.

3. Принцип тестирования

Ферментативное определение основано на действии гистамин-гидрогеназе, которая катализирует окислительное дезамидирование гистамина. В процессе реакции образуется цветной продукт. В итоге, интенсивность окраски раствора прямо пропорциональна концентрации гистамина и измеряется при длине волны 450 нм.

4. Предоставляемые реагенты

Каждый набор содержит достаточно материалов для 96 измерений (включая стандартные анализы). Все реагенты готовы к использованию. Каждый тестовый набор содержит:

Компонент	Цвет крышки	Формат	Объем
Микротитрационный планшет М	-	Готов к использованию	96 лунок
Буфер	Бесцветная	Готов к использованию	15 мл
Стандарт 1	Белый	Готов к использованию	0 мг/л 1,3 мл

Стандарт 2	Белый	Готов к использованию	1 мг/л	1,3 мл
Стандарт 3	Белый	Готов к использованию	5 мг/л	1,3 мл
Стандарт 4	Белый	Готов к использованию	10 мг/л	1,3 мл
Стандарт 5	Белый	Готов к использованию	15 мг/л	1,3 мл
Стандарт 6	Белый	Готов к использованию	20 мг/л	1,3 мл
Раствор фермента	Красный	Готов к использованию		1 мл
Спайк-раствор	Синий	Готов к использованию	500 мг/л	3 мл
Каталаза (для удаления аскорбиновой кислоты)	Черный	Готов к использованию		1 мл

5. Необходимые, но не предоставленные материалы

5.1. Оборудование и реагенты:

- Дистиллированная или деионизированная вода
- Вортекс
- Миксер, блендер (например, Mr. Magic)
- Центрифуга, центрифужные пробирки
- Различные микропипетки на 100–200 мкл
- Многоканальная пипетка объемом 10 мкл, 100 мкл, 150 мкл, 200 мкл (например, Eppendorf combitips)
- Спектрофотометр для микротитровальных планшетов (450 нм)
- Опционально: RIDASOFT® Win.NET (Арт. № Z9996FF); используйте версию 1.104 или более позднюю для расчета

Анализ свежей рыбы

- 50 мл полипропиленовые (ПП) пробирки с завинчивающейся крышкой (например, Greiner; арт. № 227261)
- Гомогенизатор: лабораторная мясорубка/измельчитель, Ultra-Turrax или миксер

- Водяная баня (100 °C / 212 °F)

- Бумажный фильтр (например, Whatman №1 или аналогичного качества)

Анализ свежей рыбы: требуется для разложения аскорбиновой кислоты.

- 1 н. NaOH (например, Roth, арт. № CN 58.1);
- 1 н. HCl (например, Roth, арт. № CN 63.1);
- 30% раствор H₂O₂ в воде (например, Sigma, арт. № 31642);
- Бумажный фильтр (например, Whatman № 1 или аналогичного качества)

Анализ вина

- Полипропиленовые флаконы 1,5 - 2 мл (например, пробирка Эппендорф);
- Обесцвечивающее средство RIDA® Sample Decolorant (R1699) для пробоподготовки.

Анализ сыра

- Полипропиленовые флаконы 1,5 – 2 мл (например, пробирка Эппендорф);
- 1 н Хлорная кислота (например, Bernd Kraft, артикул № 20126.2700);
- 1 н КОН (например, Carl Roth, арт. № K017.1).

6. Меры предосторожности для пользователей

К проведению анализа допускается только специально обученный персонал. Необходимо строго соблюдать инструкцию по использованию набора. Перед началом и во время анализа используйте чистое оборудование и перчатки, чтобы избежать перекрестного загрязнения. При использовании кипящей водяной бани соблюдайте меры предосторожности, чтобы избежать ожогов. В данном наборе могут содержаться опасные вещества. Дополнительные рекомендации по работе с опасными веществами можно найти в соответствующих паспортах безопасности для данной продукции (MSDS), которые доступны на сайте www.r-biopharm.com.

7. Инструкции по хранению

Реагенты хранить при температуре 2 - 8 °С. **Компоненты тест-системы ни в коем случае не замораживать.**

Не требуемые стрипы должны храниться с осушителем в плотно закрытом фольгированном пакете при температуре 2 - 8 °С.

Раствор хромогена светочувствителен, поэтому при работе с ним следует избегать воздействия прямых солнечных лучей.

По истечении срока годности (смотри внешнюю этикетку теста) фирма не несет гарантии по качеству.

Замена отдельных реагентов на реагенты из наборов других партий не допускается.

8. Индикация нестабильности или порчи реагентов

Если разница между абсорбцией A2 - A1 стандарта б (например, $\Delta A < 1,7$) сильно отличается от данных в сертификате анализа, то, вероятно, произошло ухудшение качества реагентов. Наклон стандартной кривой должен находиться в диапазоне 0,0847–0,1025 (в среднем 0,0936).

9. Подготовка образцов

Надевайте перчатки перед началом и во время анализа, чтобы избежать перекрестного загрязнения. Концентрация гистамина может увеличиваться даже в охлажденных пищевых продуктах, поэтому важно проводить лабораторный анализ сразу после отбора проб. Для пробоподготовки используйте только пластиковые флаконы (например, полипропиленовые, полипропиленовые). Гистамин адсорбируется на стеклянных поверхностях, что снижает степень его извлечения.

9.1. Свежая рыба и рыбные консервы

- взвесьте 5 г гомогенизированного образца в 50 мл флаконе из полипропилена с завинчивающейся крышкой;
- добавьте 20 мл дист. воды;
- закройте пробирку и встряхивайте или перемешивайте, пока образец не распределится равномерно по всему объему;
- инкубируйте образец в течение 20 минут на кипящей водяной бане, в ходе кипячения, после 10 минут, достаньте флаконы из водяной бани, надев защитные перчатки, и сразу встряхните образец в течение 3 секунд для создания однородной суспензии; верните образец в водяную баню;
- дайте образцу остыть до комнатной температуры на ледяной бане не менее 2 минут;
- центрифугируйте при не менее 2500 g в течение 10 мин; в качестве альтернативы перенесите 2 мл экстракта во флаконы для центрифуги и центрифугируйте при высокой скорости (> 10 000 g) в течение 2 мин в микроцентрифуге.

Полученный экстракт должен быть максимально прозрачным. Если присутствуют частицы, отфильтруйте экстракт. Если после центрифугирования на поверхности экстракта образовался слой жира, держите флакон под углом и возьмите экстракт сбоку. В качестве альтернативы, осторожно извлеките пипеткой нижний слой и перенесите в новый флакон, снова отфильтруйте/отцентрифугируйте;

- внесите пипеткой по 100 мкл неразбавленного прозрачного экстракта в лунку. Экстрагированные образцы стабильны при комнатной температуре в течение 2 часов или при 2-8 ° C в течение 7 дней.

9.1.1 Деградация аскорбиновой кислоты (> 250 мг/кг) в рыбе

Если свежая рыба обрабатывалась аскорбиновой кислотой (анализ с использованием тест-наборов, артикул E1267 или 10409677035), во время последующего ферментативного анализа в течение нескольких секунд (A1, например, 3,0) может появиться интенсивный желтый цвет.

Аскорбиновая кислота разлагается под действием H_2O_2 /каталазы следующим образом:

- перенесите 1 мл прозрачного супернатанта (см. 9.1) в пробирку из полипропилена с завинчивающейся крышкой на 50 мл;
- добавьте 100 мкл 1 н. NaOH;
- добавьте 100 мкл 30% H_2O_2 ;
- осторожно перемешайте и инкубируйте 10 мин при комнатной температуре;
- добавьте 100 мкл 1 н. HCl;
- осторожно перемешайте;
- добавьте 10 мкл каталазы;
- мягко перемешайте и инкубируйте 10 мин при комнатной температуре;
- поместите смесь на 5 мин в кипящую водяную баню;
- дайте остыть и внесите пипеткой 100 мкл прозрачного экстракта в лунку планшета. Экстрагированные образцы стабильны при комнатной температуре в течение 2 часов или при 2-8 °C в течение 7 дней.

Для проверки используйте загрязненный спайком образец и определите степень извлечения.

9.2 Блюда из рыбы

- взвесьте 1 г гомогенизированного образца в 50 мл флаконе из полипропилена с завинчивающейся крышкой;
- добавьте 25 мл дист. воды;
- закройте пробирку и встряхивайте или перемешивайте, пока образец не распределится **равномерно** по всему объему;
- инкубируйте образец в течение 20 минут на кипящей водяной бане, в ходе кипячения, после 10 минут, достаньте флаконы из водяной бани, надев защитные перчатки, и сразу встряхните образец в течение 3 секунд для создания однородной суспензии; верните образец в водяную баню;
- дайте образцу остыть до комнатной температуры на ледяной бане не менее 2 минут;
- центрифугируйте при не менее 2500 g в течение 10 мин; в качестве альтернативы перенесите 2 мл экстракта во флаконы для центрифуги и центрифугируйте при высокой скорости (> 10 000 g) в течение 2 мин в микроцентрифуге.

Полученный экстракт должен быть максимально прозрачным. Если присутствуют частицы, отфильтруйте экстракт. Если после центрифугирования на поверхности экстракта образовался слой жира, держите флакон под углом и возьмите экстракт сбоку. В качестве альтернативы, осторожно извлеките пипеткой нижний слой и перенесите в новый флакон, снова отфильтруйте/отцентрифугируйте;

- внесите пипеткой по 100 мкл неразбавленного прозрачного экстракта в лунку. Экстрагированные образцы стабильны при комнатной температуре в течение 2 часов, при 2-8 ° C в течение 3 дней, при -20 ° C в течение 3 месяцев.

9.3. Вино

Вино (красное вино, белое вино, розовое вино) содержит антоцианы и полифенолы, которые необходимо удалить перед ферментативным анализом.

- добавьте 200 мкл Реагента 1 из RIDA® Sample Decolorant к 200 мкл вина (промойте наконечник пипетки);

- добавьте 200 мкл реагента 2 RIDA® Sample Decolorant, встряхните и инкубируйте 5 минут при комнатной температуре, затем центрифугируйте 2 минуты при минимум 14000 g (комнатная температура, 20-25 ° C);

- перенесите 500 мкл супернатанта в новый флакон;

- добавьте 100 мкл Реагента 3 Decolorant RIDA® Sample Decolorant, встряхните и инкубируйте 5 минут при комнатной температуре;

- центрифугируйте при 14000 g (комнатная температура) в течение 2 мин;

- используйте 100 мкл **прозрачного экстракта** на лунку.

Экстракты образцов можно хранить при комнатной температуре в течение 2 часов или при 2-8 ° C в течение 1 дня.

9.4. Сыр

Если сырная корка съедобна, она также должна быть частью репрезентативной пробы.

- взвесьте в пластиковой посуде 60 г сыра, добавьте 140 мл воды, перемешивайте в течение 15 с, чтобы получить однородную суспензию, повторите перемешивание еще два раза.

- снимите жировую прослойку шпателем, перелейте 50 мл непрозрачного раствора в пластиковый флакон;

- центрифугируйте при 3500 g в течение 10 мин (при 4 ° C, если возможно, в противном случае охладите образец в ледяной бане);

- снимите жировой слой шпателем и перелейте 0,8 мл прозрачного раствора в пластиковый флакон;

- добавьте 200 мкл 1 н хлорной кислоты, хорошо перемешайте;

- центрифугируйте при 20000 g в течение 2 минут при комнатной температуре;

- перенесите 500 мкл прозрачного супернатанта в новый пластиковый флакон для центрифугирования и добавьте 100 мкл 1 н КОН, перемешайте;

- центрифугируйте 2 мин минимум при 20000 g при комнатной температуре (20-25 ° C);

- используйте 100 мкл **прозрачного экстракта** на лунку.

Экстракты образцов можно хранить при комнатной температуре в течение 2 часов или при 2-8 ° C в течение 18 часов.

10. Проведение теста

10.1. Подготовка набора

Перед использованием тест-системы доведите температуру всех реагентов до комнатной (20 -25°C).

10.2. Проведение анализа

В рамку микротитровального планшета помещают количество стрипов, необходимое для градуировочных растворов и проб в дублях. В протокол вносятся позиции градуировочных растворов и проб.

1. Внесите 150 мкл буфера в лунки и осторожно встряхивайте планшет вручную в течение 3 с.

2. Добавьте 100 мкл стандартов, контролей или подготовленных образцов в отдельные лунки в двух экземплярах. Промойте наконечники пипетки в лунках. После этого осторожно встряхивайте пластину вручную в течение 3 с. Избегайте образования пузырьков в лунках.

3. Через 3 мин* (для образцов вина через 10 мин) измеряется абсорбция A1 при 450 нм без дополнительного фильтра (например, 620 нм).

4. Добавьте 10 мкл раствора фермента, окрашенного в синий цвет, в каждую лунку. После этого осторожно встряхивайте планшет вручную в течение 3 с.

5. Через 10 мин измерьте абсорбцию A2 при 450 нм **без** дополнительного фильтра (например, 620 нм). Для оценки используйте RIDASOFT® Win.NET, выберите A1 и A2 и произведите расчет.

*В образцах **рыбы** может наблюдаться неспецифическое **усиление желтого цвета** (creep reaction).

- Если A1, например, 0,3, время первой инкубации увеличивают до 10 мин.

- Если A1, например, 3,0, то образец рыбы должен быть приготовлен с каталазой (см. 9.1.1).

11. Результаты

Для оценки результатов анализа можно использовать программное обеспечение RIDASOFT Win NET (арт. Z9996), разработанное R-Biopharm специально для тест-систем RIDASCREEN®. Оценка осуществляется с помощью функции линейной регрессии, необходимо учитывать фактор разбавления образцов. Начиная с версии программного обеспечения 1.105, коэффициент по умолчанию равен 5, который при необходимости можно изменить.

Образец	Фактор разбавления	Диапазон измерения
Свежая и консервированная рыба	5	2-100 мг/кг
Рыба с аскорбиновой кислотой	6,55	2,62-131 мг/кг
Блюда из рыбы	25	10-500 мг/кг
Вино	3,6	1,4-72 мг/кг
Сыр	5	2-100 мг/кг

Типичная стандартная кривая приведена в сертификате качества, прилагаемом к набору. Наклон стандартной кривой должен находиться в диапазоне 0,0847–0,1025 (в среднем 0,0936).

Значение ΔA должно находиться в диапазоне от -0,05 до 0,05 (см. график см. на последней странице отчета RIDASOFT® Win). Большое отклонение отдельных лунок почти всегда указывает на недостаточную аккуратность дозирования. Коэффициент вариации не должен превышать 10% для образцов и стандартов (за исключением CV, рассчитанных для стандарта 1 и образцов, близких к стандарту 1). Извлечение контрольных образцов обычно составляет от 75 до 125%.

Более высокие значения оптической плотности (A450 нм) для калибровочной кривой, особенно для нулевого стандарта, могут быть результатом контаминации гистамином. Если значения оптической плотности (A450 нм) > 6 стандарта, разбавьте конечный экстракт водой и проведите еще один анализ.

12. Рекомендации

Для обеспечения высокой аналитической надежности:

- каждый экстракт следует анализировать в дубле, для получения усредненной оценки;
- используйте образцы без гистамина и содержащие гистамин (с добавками) в качестве контрольных образцов (например, эталонные образцы FAPAS);
- чтобы проверить правильность выполнения процедуры испытания, следует использовать спайк-раствор для, содержащийся в наборе.

Спайк-раствор 10 мг/л

- разбавление 1:50 Спайк раствора гистамина (500 мг/л), например 100 мкл + 4,9 мл воды;
- используйте для анализа 100 мкл.

Образцы рыбы с добавлением 50 мг/кг гистамина

- внесите пипеткой 500 мкл раствора гистамина (500 мг/л) в 5 г гомогенизированной рыбы;
- экстрагируют образец 19,5 мл воды (см. 9.2.).

Образец рыбной муки с добавлением 250 мг/кг гистамина

- внесите пипеткой 500 мкл раствора гистамина (500 мг/л) в 1 г гомогенизированной пробы рыбной муки;
- экстрагируют образец 24,5 мл воды (см. 9.3.).

Проба вина с добавлением 10 мг/л гистамина

- внесите пипеткой 200 мкл раствора гистамина (500 мг/л) к 9,8 мл вина;
- извлеките образец с помощью RIDA® Sample Decolorant (см. 9.4).

13. Дополнительные указания

- Вино – более чувствительный анализ с RIDASCREEN® Гистамин (ферментативный).
- Сокращено время подготовки проб для свежей рыбы и рыбных консервов.

Для получения информации о дополнительных применениях (например, молоко, дрожжевой экстракт, корм для домашних животных) и информации о продукте (например, автоматизация, обучающие видеоролики) обращайтесь к местному дистрибьютору.

Обзор версий

Номер версии	Описание
2019-02-26	Первая версия
2022-06-13	Текущая версия Внесены изменения: - Общая лингвистическая ревизия - Добавление сертификата AOAC-RI (сертифицировано с 2019 г.)

Используемые символы

-  Перед использованием ознакомьтесь с инструкцией
-  Номер партии
-  Срок годности (год-месяц)
-  Температура хранения
-  Артикул
-  Количество измерений
-  Дата производства (год-месяц)
-  Производитель + адрес

Данные соответствуют нашему нынешнему состоянию технологий и предоставляют информацию о наших продуктах и их использовании. R-Biopharm не дает никаких гарантий, явных или подразумеваемых, за исключением того, что материалы, из которых изготовлены ее продукты, имеют стандартное качество. Дефектные продукты будут заменены. Нет никаких гарантий товарной пригодности этого продукта или пригодности продукта для каких-либо целей. R-Biopharm не несет ответственности за любой ущерб, в том числе фактический или косвенный ущерб, или расходы, возникшие прямо или косвенно от использования этого продукта.