

# **RIDASCREEN<sup>®</sup> Histamine (enzymatic)**

## **Art. No. R1605**

Enzymatischer Test zur quantitativen Bestimmung  
von Histamin

Enzymatic assay for the quantitative determination of  
histamine

In vitro Assay

Lagerung bei 2 - 8 °C

Storage at 2 - 8 °C

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Please contact for questions and further information:

Zentrale/Switchboard

Tel./Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

Auftragsannahme/Order department

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20

E-Mail: [orders@r-biopharm.de](mailto:orders@r-biopharm.de)

Marketing & Vertrieb/Marketing & Sales

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-40

E-Mail: [info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de)

RIDA® und RIDASCREEN®  
sind eingetragene Marken der R-Biopharm AG  
Hersteller: R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

RIDA® and RIDASCREEN®  
are registered trademarks of R-Biopharm AG  
Manufacturer: R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

## Kurzinformation

RIDASCREEN® Histamine (enzymatic) (Art. Nr. 1605) ist ein enzymatischer Test im Mikrotiterplattenformat zur quantitativen Bestimmung von Histamin in frischem Fisch, Dosenfisch, Fischmehl, Wein (RIDA® Sample Decolorant, Art. Nr. R1699, zur Probenaufarbeitung benutzen) und Käse.

Alle Reagenzien für die Durchführung des enzymatischen Tests, inkl. Standards, sind im Testkit enthalten. Ein Testkit ist ausreichend für 96 Bestimmungen (einschl. Standardbestimmungen). Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung:	homogenisieren und extrahieren
Zeitbedarf:	Probenvorbereitung (für 10 Fischproben) . ca. 35 min Testdurchführung (Inkubationszeit) ..... 15 min
Standard:	Histamin
Nachweisgrenze:	Frischer Fisch, Dosenfisch ..... 0,75 mg/kg Fischmehl ..... 3,75 mg/kg Wein..... 0,54 mg/kg Käse..... 0,75 mg/kg
Bestimmungsgrenze:	Frischer Fisch, Dosenfisch ..... 2 mg/kg Frischer Fisch inkl. Ascorbinsäure ..... 3 mg/kg Fischmehl ..... 10 mg/kg Wein..... 1,4 mg/kg Käse..... 2 mg/kg
Wiederfindung:	ca. 85 - 105 %
Spezifität:	Das Enzym ist spezifisch für Histamin. Es bestehen keine Nebenaktivitäten für L-Histidin, L-Tryptophan, Serotonin, L-Tyrosin, Tyramin, L-Lysin, Trimethylamin, Putrescin und Cadaverine. Weitere Informationen zu Nebenaktivitäten sind im aktualisierten Validierungsbericht enthalten.

Die Spezifität des RIDASCREEN® Histamine (enzymatic) Tests wurde durch die Bestimmung der Nebenaktivität zu den entsprechenden Substanzen im Puffersystem ermittelt (s. Validierungsbericht).

## Produktangebot

RIDA® Sample Decolorant (Art. Nr. R1699) für Weinanalytik

## 1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Histamine (enzymatic) wird zur quantitativen Bestimmung von Histamin in frischem Fisch, Dosenfisch, Fischmehl, Wein und Käse eingesetzt. Der Testkit wird eine *AOAC Performance Tested Method<sup>SM</sup>* werden.

## 2. Allgemeines

Histamin ist ein Produkt der Zersetzung von Histidin, verursacht durch das Wachstum bestimmter Bakterien in proteinreichen Nahrungsmitteln wie Fisch, Wein und Käse.

Die Menge an gebildetem Histamin hängt von der Bakterienart, der Temperatur und der Expositionszeit ab und kann in Fisch 1000 mg/kg überschreiten. Fisch mit hohen Konzentrationen an Histamin wird oft mit der „Scombroid-Fischvergiftung“ in Verbindung gebracht.

Fisch guter Qualität enthält weniger als 10 mg/kg. Der Grenzwert für Histamin in Fisch- und Fischereierzeugnissen liegt zwischen 50 - 200 mg/kg je nach Fischart und Land. Ähnlich hohe Gehalte können in Käse festgestellt werden, während in Wein die Gehalte normalerweise 15 mg/l nicht überschreiten.

## 3. Testprinzip

Die enzymatische Bestimmung basiert auf Histamin-Dehydrogenase, welches die oxidative Deamidierung von Histamin in Anwesenheit eines Elektronenüberträgers katalysiert. Die Farbintensität des sich bildenden Farbstoffs ist direkt proportional zur Histaminkonzentration und wird bei 450 nm gemessen.

Der Elektronenüberträger und der Farbstoff sind auf der Mikrotiterplatte beschichtet.

## 4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können 96 Bestimmungen durchgeführt werden (einschließlich Standardbestimmungen). Alle Reagenzien sind gebrauchsfertig.

Komponente	Deckelfarbe	Zustand	Histamin Konz.	Inhalt
<b>Microtiter plate</b> Mikrotiterplatte	-	gebrauchsfertig		96 Kavitäten
<b>Buffer</b> Puffer	farblos	gebrauchsfertig		15 ml
<b>Standard 1</b> Standard 1	weiß	gebrauchsfertig	0 mg/l	1,3 ml
<b>Standard 2</b> Standard 2	weiß	gebrauchsfertig	1 mg/l	1,3 ml
<b>Standard 3</b> Standard 3	weiß	gebrauchsfertig	5 mg/l	1,3 ml
<b>Standard 4</b> Standard 4	weiß	gebrauchsfertig	10 mg/l	1,3 ml
<b>Standard 5</b> Standard 5	weiß	gebrauchsfertig	15 mg/l	1,3 ml
<b>Standard 6</b> Standard 6	weiß	gebrauchsfertig	20 mg/l	1,3 ml
<b>Enzyme solution</b> Enzymlösung	rot	gebrauchsfertig		1 ml
<b>Spiking solution</b> Dotierlösung	blau	gebrauchsfertig	500 mg/l	3 ml
<b>Catalase</b> Katalase zum Abbau von Ascorbinsäure	schwarz	gebrauchsfertig		1 ml

## 5. Zusätzlich benötigte Reagenzien und Zubehör

**Für die Probenvorbereitung nur Plastik-Gefäße (kein Glas) z.B. Polypropylen verwenden.**

- destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Vortex
- Mixer, Blender (e.g. Mr. Magic)
- Zentrifuge, zentrifugierbare Reagenzröhrchen
- variable 100 - 200 µl Mikropipetten
- Multistepper-Pipette mit 10 µl, 100 µl, 150 µl und 200 µl Pipettivolumen (z.B. Eppendorf combitips)
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- RIDASOFT® Win.NET (Z9996) ab **Version 1.104** zur Auswertung

### Frischfischanalytik

- 50 ml Polypropylen (PP) Schraubverschluss-Röhrchen (z.B. Greiner; Mat. Nr. 227261)
- Homogenisator: Schlagmühle, Ultra-Turrax oder Mixer
- Wasserbad 100 °C
- Papierfilter (z.B. Whatman Nr.1 oder vergleichbare Qualität)

### **Frischfischanalytik: Bei Bedarf zusätzlicher Abbau von Ascorbinsäure**

- 1 N NaOH (z.B. Roth, Art. Nr. CN 58.1)
- 1 N HCl (z.B. Roth, Art. Nr. CN 63.1)
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -Lösung, 30 % in Wasser (z.B. Sigma, Art. Nr. 31642)
- Papierfilter (z.B. Whatman Nr.1 oder vergleichbare Qualität)

### **Weinanalytik**

- 1,5 - 2 ml Polypropylen-Gefäße (z.B. Eppendorf Tube)
- RIDA<sup>®</sup> Sample Decolorant (R1699) zur Probenaufarbeitung

### **Käseanalytik**

- 1,5 - 2 ml Polypropylen-Gefäße (z.B. Eppendorf Tube)
- 1 N Perchlorsäure (z.B. Bernd Kraft, Art. No. 20126.2700)
- 1 N KOH (z.B. Carl Roth, Art. No. K017.1)

## **6. Vorsichtsmaßnahmen**

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten. Saubere Ausrüstung benutzen und Handschuhe vor und während der Durchführung tragen, um Kreuzkontamination zu vermeiden. Vorsichtsmaßnahmen treffen, wenn das kochende Wasserbad benutzt wird, um Verbrennungen und Verbrühungen zu vermeiden.

Die Testdurchführung kann gesundheitsgefährdende Substanzen beinhalten. Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten sind in den Sicherheitsdatenblättern (SDS) zu diesem Produkt auf der Internetseite [www.r-biopharm.de](http://www.r-biopharm.de) zu finden.

## **7. Reagenzien und ihre Lagerung**

Die Reagenzien bei 2 - 8 °C lagern. Den Testkit auf keinen Fall einfrieren.

Nicht benötigte Kavitäten zusammen mit dem Trockenmittel im Folienbeutel gut verschlossen aufbewahren und weiterhin bei 2 - 8 °C lagern.

Nach Ablauf des Verfallsdatums (siehe Testkit-Außenetikett unter Expiration) kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

Ein Austausch von Einzelreagenzien zwischen Kits verschiedener Chargennummern ist nicht zulässig.

## 8. Anzeichen für Reagenzienverfall

Wenn die Differenz der Extinktion  $A_2 - A_1$  bei Standard 6 stark (z.B.  $\Delta A < 1.7$ ) vom Analysenzertifikat abweicht, liegt vermutlich ein Reagenzienverfall vor. Die Steigung der Standardkurve sollte im Bereich von 0,0847 – 0,1025 (Mittelwert 0,0936) liegen.

## 9. Probenvorbereitung

Die Histamingehalte steigen auch in gekühlten Lebensmitteln weiter an, daher ist es wichtig, die Laboruntersuchungen direkt nach der Probenahme durchzuführen.

**Für die Probenvorbereitung nur Plastik-Röhrchen (z.B. Polypropylen, PP) verwenden. Histamin adsorbiert an Glasoberflächen und führt zur verminderten Wiederfindung.**

### 9.1. Frischfisch und Dosenfisch

- 5 g homogenisierte Probe in einem 50 ml PP-Schraubverschluss-Röhrchen einwiegen
- Probe mit 20 ml dest. Wasser übergießen
- Gefäß verschließen, schütteln oder vortexen bis die Probe **gleichmäßig suspendiert** ist
- Proben 20 min in ein kochendes Wasserbad stellen und nach 10 min mit einem Schutzhandschuh die Röhrchen aus dem Wasserbad nehmen und sofort für 3 s schütteln, so dass die Proben gut suspendiert sind
- Die Proben im Eisbad mindestens 2 min auf Raumtemperatur herunterkühlen lassen
- 10 min bei mind. 2500 g zentrifugieren  
Alternativ 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 2 min hochtourig zentrifugieren ( $> 10.000$  g). Der Extrakt sollte möglichst klar sein. Wenn im Extrakt Partikel sind, dann filtrieren.  
(Sollte sich nach dem Zentrifugieren eine Fettschicht auf dem Extrakt gebildet haben, das Röhrchen schräg halten und seitlich die Probe entnehmen. Alternativ vorsichtig mit einer Pipette die untere Schicht abnehmen und in ein neues Gefäß überführen, anschließend den Extrakt filtrieren/zentrifugieren)
- 100  $\mu$ l des **klaren Extraktes** unverdünnt im Test einsetzen (die Probenextrakte sind 2 h bei Raumtemperatur oder 7 Tage bei 2 - 8 °C haltbar)

### 9.1.1 Frischfisch: Bei Bedarf Abbau von Ascorbinsäure (> 250 mg/kg)

Wenn frischer Fisch mit Ascorbinsäure behandelt wird (Nachweis mittels Testkit Art. Nr. E1267 oder 10409677035), kann eine intensive Gelbfärbung (verursacht durch eine Schleichreaktion) in der enzymatischen Analyse auftreten (A1 Messung z.B. 3.0).

Die Ascorbinsäure wird durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  / Catalase wie folgt abgebaut:

- 1 ml des klaren Extrakts (s. 9.1) in ein 50 ml PP-Schraubverschluss-Röhrchen überführen
- 100  $\mu\text{l}$  1 N NaOH hinzufügen
- 100  $\mu\text{l}$  30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  hinzufügen
- Vorsichtig mischen und 10 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 100  $\mu\text{l}$  1 N HCl hinzufügen
- Vorsichtig mischen
- 10  $\mu\text{l}$  Katalase hinzufügen
- Vorsichtig mischen und 10 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Die Mischung 5 min in ein kochendes Wasserbad stellen
- Abkühlen und 100  $\mu\text{l}$  des klaren Extraktes im Test einsetzen

Zur Validierung sollte die Probe dotiert und die Wiederfindung bestimmt werden. (Die Probenextrakte sind 2 h bei Raumtemperatur oder 7 Tage bei 2 - 8 °C haltbar).

### 9.2. Fischmehl

- 1 g homogenisiertes Fischmehl in einem 50 ml PP-Schraubverschluss-Röhrchen einwiegen
- Probe mit 25 ml dest. Wasser übergießen
- Gefäß verschließen, schütteln oder vortexen bis die Probe **gleichmäßig suspendiert** ist
- Proben 20 min in ein kochendes Wasserbad stellen und nach 10 min mit einem Schutzhandschuh die Röhrchen aus dem Wasserbad nehmen und sofort für 3 s schütteln, so dass die Proben gut suspendiert sind
- Die Proben im Eisbad mindestens 2 min auf Raumtemperatur herunterkühlen lassen
- 10 min bei mind. 2500 g zentrifugieren
- Alternativ 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 2 min hochtourig zentrifugieren (> 10.000 g). Der Extrakt sollte möglichst klar sein. Wenn im Extrakt Partikel sind, dann filtrieren. (Sollte sich nach dem Zentrifugieren eine Fettschicht auf dem Extrakt gebildet haben, das Röhrchen schräg halten und seitlich die Probe entnehmen. Alternativ



- vorsichtig mit einer Pipette die untere Schicht abnehmen und in ein neues Gefäß überführen, anschließend den Extrakt filtrieren/zentrifugieren)
- 100 µl des **klaren Extraktes** unverdünnt im Test einsetzen  
(Die Probenextrakte sind 2 h bei Raumtemperatur, 3 Tage bei 2 - 8 °C oder 3 Monate bei -20 °C haltbar)

### 9.3. Wein

Weine (Rotwein, Weißwein, Rosé) enthalten Anthocyane und Polyphenole, welche vor der enzymatischen Analyse entfernt werden müssen.

- 200 µl Reagenz 1 des RIDA® Sample Decolorant zu 200 µl Wein hinzugeben (Pipettenspitzen vorspülen)
- 200 µl Reagenz 2 des RIDA® Sample Decolorant hinzufügen, vortexen und 5 min bei Raumtemperatur inkubieren, anschließend 2 min bei mind. 14000 g zentrifugieren (Raumtemperatur, 20 – 25 °C)
- 500 µl des Überstands in ein neues Gefäß transferieren
- 100 µl Reagenz 3 des RIDA® Sample Decolorant hinzufügen, vortexen und 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 2 min bei 14.000 g zentrifugieren (Raumtemperatur)
- 100 µl des **klaren Extraktes** im Test einsetzen. (Die Probenextrakte sind bei Raumtemperatur 2 h und bei 2 - 8 °C 1 Tag haltbar)

### 9.4. Käse

Wenn die Käserinde essbar ist, sollte sie Teil der repräsentativen Probe sein.

- 60 g Käse in den Plastikaufsatz des Mixers einwiegen, 140 ml Wasser zufügen und für 15 Sekunden mixen; um alle Partikel zu suspendieren zweimal wiederholen
- Anschließend die Fettschicht mit einem Spatel entfernen. 50 ml der milchigen Suspension in ein Plastikgefäß überführen
- 10 min bei mind. 3500 g zentrifugieren (möglichst bei 4 °C oder den Käse vorab im Eisbad kühlen)
- Anschließend die Fettschicht mit einem Spatel entfernen und 0,8 ml der klaren Lösung in ein Plastikgefäß überführen
- 200 µl 1 N Perchlorsäure hinzufügen, gut mischen
- 2 min bei 20000 g zentrifugieren (Raumtemperatur)
- 500 µl des klaren Überstands in ein neues Zentrifugen-Plastikgefäß überführen, 100 µl 1 N KOH hinzufügen und anschließend mischen
- 2 min bei 20.000 g zentrifugieren (Raumtemperatur)
- 100 µl des **klaren Extraktes** im Test einsetzen (die Probenextrakte sind bei Raumtemperatur 2 h und bei 2 - 8 °C 18 h haltbar)

## 10. Testdurchführung

### 10.1. Testvorbereitungen

Alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen und vor Gebrauch vorsichtig mischen.

### 10.2. Testdurchführung

So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und Proben in Doppelbestimmung benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.

1. Je 150 µl Puffer mit einem Multistepper in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und die Platte vorsichtig 3 s manuell schütteln.
2. Je 100 µl der Standardlösungen, der Kontrollen bzw. der vorbereiteten Proben in Doppelbestimmung pipettieren. Die Pipettenspitzen sind vorzuspülen. Anschließend die Platte vorsichtig 3 s manuell schütteln.
3. Nach 3 min\* (bei Weinproben nach 10 min) die Extinktion  $A_1$  bei 450 nm **ohne** Referenzfilter messen (z.B. 620 nm) (Luftbläschen in den Kavitäten vermeiden)
4. Mit einem Multistepper 10 µl der blau eingefärbten Enzymlösung in jede Kavität pipettieren. Anschließend die Platte vorsichtig 3 s manuell schütteln.
5. Nach 10 min die Extinktion  $A_2$  bei 450 nm **ohne** Referenzfilter (z.B. 620 nm) messen. Zur Auswertung die RIDASOFT® Win.NET benutzen, dazu  $A_1$  und  $A_2$  aufrufen und berechnen.

\* Bei **Fisch** kann eine **zunehmende Gelbfärbung** auftreten (Schleichreaktion)

- Wenn  $A_1$  z.B. 0.3 dann die Inkubationszeit auf 10 min erhöhen
- Wenn  $A_1$  z.B. 3.0 dann die Fischprobe mit Catalase aufarbeiten (s. 9.1.1).

## 11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm eine speziell für die RIDASCREEN® Produkte entwickelte Software, die RIDASOFT® Win.NET (Art. Nr. Z9996) erhältlich. Die Auswertung erfolgt mittels linearer Regression, dabei muss der **Verdünnungsfaktor der Proben berücksichtigt werden.** (Ab Software Version 1.105 ist ein Faktor von 5 eingetragen, der ggfs. verändert werden muss).

Probe	Verdünnungs- faktor	Messbereich
Frischer Fisch / Dosenfisch	5	2 - 100 mg/kg
Fisch inkl. Abbau von Ascorbinsäure	6,55	2,62 - 131 mg/kg
Fischmehl	25	10 - 500 mg/kg
Wein	3,6	1,4 - 72 mg/l
Käse	5	2 - 100 mg/kg

Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Analysenzertifikat entnommen werden. Die Steigung der Standardkurve sollte im Bereich von 0.0847 - 0.1025 (Mittel 0.0936) liegen. Die Residuen für  $\Delta A$  sollten zwischen - 0,05 und 0,05 liegen (siehe Residuen Plot auf der letzten Seite des RIDASOFT® Win.NET Berichtes). Größere Abweichungen einzelner Kavitäten weisen (nahezu) immer auf eine unzureichende Präzision des Pipettierens hin, daher sollte die Pipettiertechnik verbessert werden.

Der Variationskoeffizient sollte 10 % für Proben und Standards nicht übersteigen (außer VKs für Standard 1 und Proben im Bereich von Standard 1). Die Wiederfindung von Kontrollproben liegt normalerweise zwischen 75 und 125 %.

Höhere Extinktionswerte ( $E_{450nm}$ ) im Vergleich zu den Daten des Zertifikates, insbesondere für den Null-Standard, können auf eine Histamin-Kontamination hinweisen. Wenn Extinktionswerten ( $E_{450nm}$ ) > Standard 6 mit Wasser entsprechend verdünnen und nochmals bestimmen.

### Empfehlungen:

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten:

- Jeden Probenextrakt als Doppelbestimmung messen, **präzises Pipettieren sicherstellen**
- Histamin-freie und Histamin-haltige (dotierte) Proben als Testkontrollen (z.B. FAPAS® Referenzmaterial) mitführen

Zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung sollte die dem Kit beiliegende Dotierlösung zum Spiken verwendet werden.

### **10 mg/l Spike-Kontrolle**

- 1:50 Verdünnung der Dotierlösung Histamin (500 mg/l), z.B. 100 µl + 4,9 ml Wasser
- 100 µl im Test einsetzen

### **50 mg/kg histamin-haltige dotierte Fischprobe:**

- 500 µl der Dotierlösung Histamin (500 mg/l) zu 5 g homogenisierter Fischprobe pipettieren
- Probe mit 19,5 ml Wasser aufarbeiten (siehe 9.2.)

### **250 mg/kg histamin-haltige dotierte Fischmehlprobe:**

- 500 µl der Dotierlösung Histamin (500 mg/l) zu 1 g homogenisierter Fischmehlprobe pipettieren
- Probe mit 24,5 ml Wasser aufarbeiten (siehe 9.3.)

### **10 mg/l histamin-haltige Weinprobe:**

- 200 µl der Dotierlösung Histamin (500 mg/l) zu 9,8 ml Wein pipettieren
- Anschließend die Probe mit dem RIDA<sup>®</sup> Sample Decolorant aufarbeiten (siehe 9.4.)

### **Weitere Applikationen:**

- Wine – More sensitive analysis with RIDASCREEN<sup>®</sup> Histamine (enzymatic)
- Reduced sample preparation time for fresh fish and canned fish

Für zusätzliche Applikationen (z.B. Milch, Hefeextrakte, Tiernahrungsmittel) und Produktinformationen (z.B. Automatisierung, Training-Videos) kontaktieren Sie bitte [info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de).

Diese Angaben entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten informieren. Sie haben somit nicht die Bedeutung, bestimmte Eigenschaften der Produkte oder deren Eignung für einen konkreten Einsatzzweck zuzusichern. R-Biopharm übernimmt keine Gewährleistung, außer für die standardisierte Qualität der Reagenzien. Defekte Produkte werden ersetzt. Für darüber hinaus gehende direkte, indirekte Schäden oder sonstige Kosten im Zusammenhang mit der Nutzung der Produkte haftet R-Biopharm nicht.

# RIDASCREEN<sup>®</sup> Histamine (enzymatic)

## Brief information

RIDASCREEN<sup>®</sup> Histamine (enzymatic) (Art. No. 1605) is an enzymatic test in microtiter plate format for the quantitative determination of histamine in fresh fish, canned fish, fish meal, wine (use RIDA<sup>®</sup> Sample Decolorant, Art. No. R1699, for sample preparation), and cheese.

All reagents required for the enzyme assay - including standards - are contained in the test kit.

The test kit is sufficient for 96 determinations (including standards).

A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation:	homogenization and extraction
Time requirement:	sample preparation (10 fish samples) approx. 35 min test implementation (incubation time) ..... 15 min
Standard:	histamine
Limit of detection:	fresh fish, canned fish ..... 0.75 mg/kg fish meal ..... 3.75 mg/kg wine..... 0.54 mg/kg cheese.... 0.75 mg/kg
Limit of quantification:	fresh fish, canned fish ..... 2 mg/kg fresh fish incl. ascorbic acid ..... 3 mg/kg fish meal ..... 10 mg/kg wine..... 1.4 mg/kg cheese... 2 mg/kg
Recovery:	approx. 85 - 105 %
Specificity:	The enzyme is specific for histamine. There are no side reactions to L-histidine, L-tryptophan, serotonin, L-tyrosine, tyramine, L-lysine, trimethylamine, putrescine and cadaverine. Further information on side reactions are contained in the updated validation report.

The specificity of RIDASCREEN<sup>®</sup> Histamine (enzymatic) has been evaluated by the determination of the side activities of the respective substances in a buffer system (see validation report).

## Related products

RIDA<sup>®</sup> Sample Decolorant (Art. No. R1699) for wine analysis

## 1. Intended use

RIDASCREEN® Histamine (enzymatic) is used for the quantitative determination of histamine in fresh fish, canned fish, fish meal, wine and cheese. The test kit will be approved by the AOAC *Performance Tested Methods Program*<sup>SM</sup>.

## 2. General

Histamine is a product of the decomposition of histidine caused by the growth of certain bacteria in protein rich food like fish, cheese, and wine.

The amount of histamine formed depends on the bacterial species, the temperature, and the time of exposure and may exceed in fish 1000 mg/kg. Fish of good quality contains less than 10 mg/kg histamine. The limit value for fish and products thereof is between 50 and 200 mg/kg depending on the fish species and the country. Similar high concentrations can be found in cheese, while histamine in wine usually does not exceed 15 mg/l.

## 3. Test principle

The enzymatic determination is based on the histamine dehydrogenase which catalyzes the oxidative deamidation of histamine in the presence of an electron carrier that converts a dye to a color product. The color intensity is directly proportional to histamine concentration and is measured at 450 nm. The electron carrier and dye are coated on the microtiter plate.

## 4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for 96 measurements (including standard analyses). All reagents are ready to use. Each test kit contains:

Component	Cap color	Format	Histamine conc.	Volume
<b>Microtiter plate</b>	-	ready to use		96 wells
<b>Buffer</b>	transparent	ready to use		15 ml
<b>Standard 1</b>	white	ready to use	0 mg/l	1.3 ml
<b>Standard 2</b>	white	ready to use	1 mg/l	1.3 ml
<b>Standard 3</b>	white	ready to use	5 mg/l	1.3 ml
<b>Standard 4</b>	white	ready to use	10 mg/l	1.3 ml
<b>Standard 5</b>	white	ready to use	15 mg/l	1.3 ml
<b>Standard 6</b>	white	ready to use	20 mg/l	1.3 ml
<b>Enzyme solution</b>	red	ready to use		1 ml
<b>Spiking solution</b>	blue	ready to use	500 mg/l	3 ml
<b>Catalase</b> Catalase to remove ascorbic acid	black	ready to use		1 ml

## 5. Reagents and equipment required but not provided

### 5.1. Equipment and reagents

**For the sample preparation only plastic vials (no glass) e.g. polypropylene should be used.**

- distilled or deionized water
- vortex
- mixer, blender (e.g. Mr. Magic)
- centrifuge, centrifuge vials
- variable 100 - 200 µl micropipettes
- multistep-pipette with 10 µl, 100 µl, 150 µl, 200 µl pipetting volume (e.g. Eppendorf combitips)
- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- RIDASOFT® Win.NET (Z9996); use **version 1.104** or later for calculation

### **Fresh fish analysis**

- 50 ml polypropylene (PP) screw-cap vials (e.g. Greiner; Product No. 227261)
- homogenizer: laboratory mincer / grinder, Ultra-Turrax or mixer
- water bath (100 °C / 212 °F)

### **Fresh fish analysis: As required for degradation of ascorbic acid**

- 1 N NaOH (e.g. Roth, Art. No. CN 58.1)
- 1 N HCl (e.g. Roth, Art. No. CN 63.1)
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution, 30 % in water (e.g. Sigma, Art. No. 31642)
- Paper filter (e.g. Whatman no.1 or similar quality)

### **Wine analysis**

- 1.5 - 2 ml polypropylene vials (e.g. Eppendorf tube)
- RIDA® Sample Decolorant (R1699) for sample preparation

### **Cheese analysis**

- 1.5 - 2 ml polypropylene vials (e.g. Eppendorf tube)
- 1 N perchloric acid (e.g. Bernd Kraft, Art. No. 20126.2700)
- 1 N KOH (e.g. Carl Roth, Art. No. K017.1)

## 6. Warnings and precautions for the users

This test should be carried out only by trained laboratory technicians. The instructions for use must be strictly followed. Use clean equipment and wear gloves before starting and during the assay in order to avoid cross-contamination. Take precautions when using the boiling water bath to avoid being burnt or scalded.

The analytical procedure might include the use of hazardous chemicals. Please refer to the appropriate safety data sheets (SDS) available online at [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 7. Storage instructions

Store the kit at 2 - 8 °C (35 - 46 °F). Do not freeze any test kit components.

Return any unused microwells to their original foil bag, reseal them together with the desiccant provided and further store at 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

No quality guarantee is given after the expiration date on the kit label.

Do not interchange individual reagents between kits of different lot numbers.

## 8. Indication of instability or deterioration of reagents

If the difference between absorption of  $A_2 - A_1$  of standard 6 (e.g.  $\Delta A < 1.7$ ) is differing strongly from the certificate of analysis, then a deterioration of reagents has likely occurred. The slope of the standard curve should lie in the range of 0.0847 – 0.1025 (mean 0.0936).

## 9. Preparation of samples

The histamine concentration increases also in refrigerated food, therefore it is important to carry out the laboratory analysis directly after sampling. **Use only plastic vials (e.g. polypropylene, PP) for the sample preparation. Histamine adsorbs on glass surfaces which causes reduced recoveries.**



## 9.1. Fresh fish and canned fish

- weigh 5 g of homogenized sample into a 50 ml PP-screw cap vial
- pour 20 ml of dist. water over the sample
- close the vial and shake or vortex until the sample is **evenly suspended**
- incubate the sample for 20 min in a boiling water bath, take vials out of the water bath while wearing safety gloves after 10 min and shake immediately for 3 s so that samples are well suspended
- allow the sample to cool to room temperature in an ice bath for at least 2 min
- centrifuge at least 2,500 g for 10 min  
Alternatively transfer 2 ml of the extract into centrifuge vials and centrifuge at high speed (> 10,000 g) for 2 min in a micro-centrifuge. The extract should be as clear as possible. If particles are present, then filtrate the extract.  
(If a layer of fat has formed on top of the extract after centrifugation then hold the vial angular and take the extract from the side. Alternatively, carefully withdraw with a pipette the lower layer and deliver to a new vial, filter / centrifuge again)
- pipette 100 µl of the undiluted **clear extract** per well. (The extracted samples are stable at room temperature for 2 h, or at 2 - 8 °C (36 - 46 °F) for 7 days.)

### 9.1.1 Degradation of ascorbic acid (> 250 mg/kg) in fish

If fresh fish has been treated with ascorbic acid (analysis using test kits Art. No. E1267 or 10409677035), an intense yellow color may occur (due to a creep reaction) during the subsequent enzymatic analysis within seconds ( $A_1$  measurement e.g. 3.0).

The ascorbic acid is degraded by  $H_2O_2$  / catalase as follows:

- Transfer 1 ml of the clear supernatant (see 9.1) in a 50 ml PP screw cap vial
- Add 100 µl 1 N NaOH
- Add 100 µl 30 %  $H_2O_2$
- Mix softly and incubate 10 min at room temperature
- Add 100 µl 1 N HCl
- Mix gently
- Add 10 µl Catalase
- Mix softly and incubate 10 min at room temperature
- Put the mixture for 5 min into a boiling water bath
- Let cool down and pipette 100 µl of the **clear extract** per well (The extracted samples are stable at room temperature for 2 h, or at 2 - 8 °C (36 - 46 °F) for 7 days.)

For validation spike the sample and determine the recovery.

## 9.2. Fish meal

- weigh 1 g of homogenized fish meal into a 50 ml PP-screw cap vial
- pour 25 ml of dist. water over the sample
- close the vial and shake or vortex until the sample is evenly suspended
- incubate the sample for 20 min in a boiling water bath, take vials out of the water bath while wearing safety gloves after 10 min and shake immediately for 3 s so that samples are well suspended
- allow the sample to cool to room temperature in an ice bath for at least 2 min
- centrifuge at least 2,500 g for 10 min

Alternatively transfer 2 ml of the extract into centrifugal vials and centrifuge at high speed (> 10,000 g) for 2 min in a micro-centrifuge. The extract should be as clear as possible. If particles are present, then filtrate the extract.

(If a layer of fat has formed on top of the extract after centrifugation then hold the vial angular and take the extract from the side. Alternatively, carefully withdraw with a pipette the lower layer and deliver to a new vial, filter / centrifuge again)

Pipette 100 µl of the undiluted **clear extract** per well. (The sample extracts can be stored at room temperature for 2 h, at 2 - 8 °C (36 - 46 °F) for 3 days or at -20 °C (- 4 °F) for 3 months).

## 9.3. Wine

Wine (red wine, white wine, rosé) contains anthocyanins and polyphenols which have to be removed prior to the enzymatic analysis.

- Add 200 µl Reagent 1 of RIDA<sup>®</sup> Sample Decolorant to 200 µl wine (rinse pipette tip)
- Add 200 µl Reagent 2 of RIDA<sup>®</sup> Sample Decolorant, vortex, and incubate 5 min at room temperature, then centrifuge 2 min at a minimum of 14,000 g (room temperature, 20 - 25 °C, 68 - 77 °F)
- Transfer 500 µl of the supernatant in a new vial
- Add 100 µl Reagent 3 of RIDA<sup>®</sup> Sample Decolorant, vortex and incubate 5 min at room temperature
- centrifuge at 14,000 g (room temperature) for 2 min
- Use 100 µl of the **clear extract** per well (the sample extracts can be stored at room temperature for 2 h or at 2 - 8 °C (36 - 46 °F) for 1 day)

## 9.4. Cheese

If the cheese rind is edible then it should also be part of the representative sample.

- Weigh 60 g of cheese into the plastic cup for blending and add 140 ml of water. Mix for 15 s to suspend all particles. Repeat mixing two more times to suspend all particles
- Remove the fat layer with a spatula. Transfer 50 ml of the unclear solution to a plastic vial
- Centrifuge at 3,500 g for 10 min (at 4 °C if possible otherwise cool sample down in an ice bath)
- Remove the fat layer with a spatula and transfer 0.8 ml of the clear solution to a plastic vial
- Add 200 µl 1 N perchloric acid, mix well
- Centrifuge at 20,000 g for 2 min at room temperature
- Transfer 500 µl of the clear supernatant to a new centrifugal plastic vial and add 100 µl 1 N KOH, mix
- Centrifuge 2 min at of least 20,000 g at room temperature (20-25 °C, 68-77 °F)
- Use 100 µl of **clear extract** per well. (The sample extracts can be stored at room temperature for 2 h. or at 2 - 8 °C (36 - 46 °F) for 18 h)

## 10. Test implementation

### 10.1. Test preparation

Bring all reagents to room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) and mix carefully before use.

### 10.2. Test implementation

Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standard and samples to be run in duplicate. Record standard and sample positions.

1. Using a multi-stepper, add 150 µl of buffer to the wells and carefully shake the plate manually for 3 s
2. Add 100 µl of standards, controls or prepared samples to separate wells in duplicate. Flush the pipette tips. Thereafter, carefully shake the plate manually for 3 s
3. After 3 min\* (for wine samples at 10 min) the absorption A1 is measured at 450 nm **without** a reference filter (e.g. 620 nm) (avoid any bubbles in the wells)
4. Add 10 µl of the blue dyed enzyme solution with a multi-stepper to each well. Thereafter, carefully shake the plate manually for 3 s

5. After 10 min the absorption A2 is measured at 450 nm **without** a reference filter (e.g. 620 nm). For evaluation use the RIDASOFT® Win.NET, select A1 and A2 and calculate.

\*For **fish** an **increase of yellow color** may occur (creep reaction)

- If A1 is e.g. 0.3 then the incubation time is increased to 10 min.

- If A1 is e.g. 3.0 then the fish sample should be prepared with catalase (see 9.1.1)

## 11. Results

At R-Biopharm AG a special software, the RIDASOFT® Win.NET (Art. Nr. Z9996, use version 1.104 or later), is available for evaluation of the RIDASCREEN® assays. The calculation is done by using a linear regression, the dilution factor of the samples has to be taken into account. (From software version 1.105 onwards the default factor is 5 which needs to be modified if required).

Sample	Dilution factor	Measuring range
Fresh/canned fish	5	2 - 100 mg/kg
Fish incl. degradation of ascorbic acid	6.55	2.62 - 131 mg/kg
Fish meal	25	10 - 500 mg/kg
Wine	3.6	1.4 - 72 mg/kg
Cheese	5	2 - 100 mg/kg

The course of the standard curve is shown in the Quality Assurance Certificate enclosed in the test kit. The slope of the standard curve should lie in the range of 0.0847 – 0.1025 (mean 0.0936).

The residuals for  $\Delta A$  should lie between - 0,05 und 0,05 (refer to the residual plot, last page of the RIDASOFT® Win report). Larger deviation of single wells are indicating (almost) always an insufficient precision of pipetting, therefore the pipetting technique needs to be improved.

The coefficient of variation should not exceed 10 % for samples and standards (except for CVs calculated from standard 1 and samples close to standard 1). The recovery of check samples is usually between 75 and 125 %.

Higher values of the absorbance ( $A_{450\text{ nm}}$ ) for the calibration curve, especially for the zero standard, may be a result of histamine contamination. If absorbance values ( $A_{450\text{ nm}}$ ) > standard 6, dilute the final test extract with water and perform another assay.

### **Recommendation:**

In order to ensure a high analytical reliability:

- Each final test extract should be assayed in duplicate, **ensure accurate pipetting**
- Employ also histamine-free and histamine-containing (spiked) samples as test controls (e.g. FAPAS<sup>®</sup> reference samples)

To verify the correct and interference-free implementation of the test procedure the spike solution contained in the kit should be used for spiking.

### **10 mg/l spike control**

- 1:50 dilution of the Spiking Solution Histamine (500 mg/l) e.g. 100  $\mu$ l + 4.9 ml water
- Use 100  $\mu$ l in the assay.

### **50 mg/kg histamine spiked fish sample**

- pipette 500  $\mu$ l of the Spiking Solution Histamine (500 mg/l) to 5 g homogenized fish
- extract the sample with 19.5 ml of water (see 9.2.)

### **250 mg/kg histamine spike fish meal sample**

- pipette 500  $\mu$ l of the Spiking Solution Histamine (500 mg/l) to 1 g homogenized fish meal sample
- extract the sample with 24.5 ml of water (see 9.3.)

### **10 mg/l histamine spiked wine sample**

- pipette 200  $\mu$ l of the Spiking Solution Histamine (500 mg/l) to 9.8 ml wine
- extract the sample with RIDA<sup>®</sup> Sample Decolorant (see 9.4)

**Further application notes:**

- Wine – More sensitive analysis with RIDASCREEN® Histamine (enzymatic)
- Reduced sample preparation time for fresh fish and canned fish.

For additional applications (e.g. milk, yeast extract, pet food) and product information (e.g. automation, training videos) please contact your local distributor or R-Biopharm AG.

The data corresponds to our present state of technology and provides information on our products and their uses. R-Biopharm makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. Defective products will be replaced. There is no warranty of merchantability of this product, or of the fitness of the product for any purpose. R-Biopharm shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.

**R-Biopharm AG**

Postanschrift / Postal Address:

An der neuen Bergstraße 17  
64297 Darmstadt, Germany

Sitz / Corporate Seat: Pfungstadt

Tel.: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-40

E-mail: [info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de)

[www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)