

# Test de histamina

Para 60 ensayos

Código 61341

## Manual de usuario para pescado crudo o enlatado

La prueba de histamina es un ensayo enzimático colorimétrico para el análisis cuantitativo de histamina en especies de peces Scombridae frescos, congelados y enlatados como el atún, el bonito y la caballa.

- El kit ha sido validado y aprobado para la certificación AOAC-RI PTM (Número de licencia: 041802).
- La fácil extracción proporciona una ventaja sobre los métodos de HPLC o el método oficial AOAC 977.13.
- La facilidad de uso y el corto tiempo de prueba proporcionan ventajas sobre los métodos de HPLC o EIA.

### Uso previsto

El método está destinado a la determinación de histamina en especies de peces Scombridae crudos frescos o congelados, como el atún, el bonito y la caballa, y estos pescados enlatados en agua o aceite.

### Usuario previsto

El kit de prueba está diseñado para ser utilizado por personal con habilidades básicas de laboratorio en un entorno de laboratorio.

### Principio de medición

La histamina deshidrogenasa cataliza la oxidación de la histamina. Esta reacción en presencia de metilsulfato de metilsulfato de 1-metoxi-5-metilfenil (1-metoxi PMS) y 2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfonil)-2H-tetrazolio, sal monosódica (WST-8) produce una sal de tetrazolio coloreada que se mide a 470 nm.

### Especificaciones del producto

1. No se observa interferencia con la mayoría de las otras aminos. Sin embargo, a altas concentraciones, la agmatina causa una señal positiva fuerte y la putrescina causa una señal positiva débil.
2. Rango cuantitativo: Unidad : mg/kg

	Longitud del recorrido óptico de un espectrofotómetro	
	1 cm	2 cm*
Pescado crudo o enlatado	20– 300	10 – 150
Después de una dilución de 25 veces con tampón de tratamiento de muestras	0.8-12	0.4 – 6

Prueba de

\* Se recomienda el absorbímetro B o el absorbímetro RGB (ref. "Instrumentos recomendados").

3. Tiempo de prueba: 20 minutos una vez que se han preparado las soluciones de muestra y se han dispensado los reactivos a los tubos de ensayo.

### Composición del kit

1. Reactivo enzimático: 6 viales con etiqueta verde Estos contienen histamina deshidrogenasa.
2. Reactivo colorimétrico: 6 viales marcados con magenta Estos contienen 1-metoxi PMS y WST-8.
3. Tampón: 24 mL × 3 viales marcados en rosa Estos contienen tampón Tris-HCl.
4. Solución estándar de histamina: 30 ml × 1 frasco con etiqueta azul  
Contiene 4 mg/kg de histamina.

**Nota:** El kit contiene reactivos para 60 ensayos, incluida la medición del patrón. Para este kit se utiliza un método de curva de calibración estándar de un punto. Por lo tanto, no solo se debe medir la muestra, sino también el patrón en cada análisis. En el caso de una muestra, se requieren los dos conjuntos de mediciones siguientes: (a) una muestra y un blanco de muestra, y (b) una solución patrón y un blanco de reactivo. En el caso de muestras múltiples, sólo se requiere un conjunto de (b).

### Precauciones

1. No utilice un kit caducado. (La fecha de caducidad está impresa en la caja del kit)
2. La cristalería no debe utilizarse con fines de extracción y medición, ya que la histamina puede adherirse al vidrio. El uso de cristalería puede afectar los resultados de las pruebas.
3. No mezcle reactivos de diferentes lotes de kits.
4. El kit debe llevarse a una temperatura de 18 a 30 °C antes de su uso.
5. Evite el almacenamiento prolongado de los kits a temperatura ambiente.
6. Mientras prepara la solución de muestra, hágalo rápidamente para evitar la contaminación por microorganismos. Para evitar la descomposición de la muestra, enfríe la muestra (0-10 °C) después de la homogeneización y durante una serie de operaciones después de la extracción por ebullición.
7. Durante el paso de ebullición de la muestra, tenga cuidado con la ebullición repentina y evite escaldarse.
8. Cambie el papel de filtro si tarda más de 5 minutos en filtrar la muestra. Si la muestra contiene mucha grasa, enfríe la solución de muestra extraída lo suficiente como para separar la materia sólida y la materia líquida antes de la filtración.
9. Congele las muestras si no las analiza inmediatamente. Se recomienda congelar y descongelar solo una vez. Mientras descongela las muestras, manténgalas por debajo de 10 °C. Tenga

cuidado con la contaminación por microorganismos durante la descongelación.

10. Se requiere un tiempo de reacción preciso. De lo contrario, es posible que no obtenga resultados precisos.
11. Cierre inmediatamente el tapón de la solución patrón de histamina para evitar la evaporación.
12. Si las muestras contienen altos niveles de agmatina debido a otras especies de peces o al proceso de fermentación, pueden producirse resultados falsos positivos.

## Instrumentos recomendados

Absorptímetro B (modelo ABS-B470) o Absorción RGB (modelo DPM2-ABS) (Proveedor: Kyoritsu Chemical-Check Lab., Corp.), o un espectrofotómetro capaz de medir a 470 nm.

\*Utilice una cubeta adecuada para  $\leq$  solución de muestra de 1,5 ml. Los espectrofotómetros con una longitud de trayectoria óptica de 1 cm o 2 cm son adecuados.

## Materiales requeridos pero no proporcionados

- (1) Para preparar la solución de histamina: dihidrocloruro de histamina, HCl 0,1N, cilindro graduado de plástico (100 mL) y desecador (sin calor)
- (2) Homogeneizador
- (3) Balanzas (capaces de pesar 0,1 g y 1 mg)
- (4) Tubo cónico de plástico resistente al calor (50 mL) con tapón hermético, para extracción
- (5) Pipeta (capaz de medir 0,5 y 0,1 mL) y puntas
- (6) Espátula
- (7) Agua destilada
- (8) Papel de filtro (Advantec Grado No. 5C, papel de filtro sin cenizas o equivalente) y embudos de plástico (o centrífugas)
- (9) Cilindro graduado (25 mL)
- (10) Pequeños tubos de ensayo de plástico (alrededor de 10 mL, para dilución de solución estándar de histamina y reacción de ensayo colorimétrica) y gradillas de tubos de ensayo
- (11) Incubadora ( $37 \pm 1^\circ\text{C}$ )
- (12) Termómetro
- (13) Temporizador
- (14) Mezclador de vórtice
- (15) Baño de agua hirviendo
- (16) Hielo
- (17) Tampón de tratamiento de la muestra: solución de EDTA·2Na 0,1 M (pH 8,0)
- (18) Para preparar el tampón de tratamiento de la muestra: solución de EDTA·2Na·2H<sub>2</sub>O, NaOH o KOH, un vaso de precipitados (1.000 mL), un cilindro graduado (1.000 mL), un recipiente limpio con tapa y medidor de pH

**Nota:** Preparación del tampón de tratamiento de muestra: Pesar 37,2 g de EDTA·2Na·2H<sub>2</sub>O y disolver en unos 750

mL de agua destilada. Ajuste a pH 8.0 usando una solución de NaOH o KOH. Ajuste a 1,000 mL con agua destilada usando un cilindro graduado de 1,000 mL. Almacenar en un recipiente limpio con tapa a temperatura ambiente hasta 6 meses.

Alternativamente, el tampón de tratamiento de la muestra se puede preparar mediante una dilución quintuple de una solución comercial de EDTA 0,5 M (pH 8,0).

## Instrucciones de uso

### 1. Extracción y preparación de las soluciones de muestra

- (1) Homogeneizar al menos 10 g del tejido de pescado. Pesar con precisión 1,0 g de la muestra homogeneizada y transferirla a un tubo de ensayo resistente al calor con tapón.
- (2) Añada 24,0 mL del tampón de tratamiento de muestras con un cilindro graduado de 25 mL para lograr una dilución de 25 veces. (La muestra se diluye 25 veces mediante estas operaciones).
- (3) Tape herméticamente y agite la muestra durante 10 segundos a máxima velocidad.
- (4) Coloque el tubo de ensayo en un soporte de tubo en agua hirviendo durante 20 minutos.
- (5) Enfriar el tubo colocándolo en un baño de hielo (hasta que esté  $< 20^\circ\text{C}$ , 10 minutos).
- (6) Suspense el pocillo de la muestra con una espátula limpia. Vuelva a colocarlo en el baño de hielo durante 5 minutos para separar la materia sólida y la materia líquida. La materia sólida incluye la grasa.
- (7) Filtre el contenido a través de papel de filtro doblado con un embudo de plástico en un tubo de plástico limpio; o centrifugar a  $10.000 \times g$  durante 5 minutos y transferir el sobrenadante a un tubo limpio teniendo cuidado de no alterar el pellet.
- (8) La solución de muestra ya está lista para analizar.

**Nota:** Asegúrese de realizar la prueba de pico y recuperación escrita en la página 3 para todas las muestras.

### 2. Preparación del reactivo

- (1) Solución colorimétrica:  
El reactivo colorimétrico se encuentra en un vial marcado con magenta. Retire el tapón de goma muy lentamente para no perder nada del polvo reactivo. Agregue exactamente 11 ml de agua destilada al vial. Agite el vial suavemente para no producir espuma hasta que el contenido se disuelva por completo. Dado que el reactivo colorimétrico es extremadamente sensible a la luz solar natural, manipule el reactivo en un lugar protegido de la luz solar natural. Mantener la solución entre  $0^\circ\text{C}$  y  $10^\circ\text{C}$ . Un vial de reactivo colorimétrico se puede utilizar para 10 ensayos en condiciones normales. Se recomienda utilizar la solución de una sola vez, pero si no es posible, puede almacenarla entre  $2^\circ\text{C}$  y  $8^\circ\text{C}$  hasta una semana o mantenerla a  $-10^\circ\text{C}$  o menos hasta un mes. Se recomienda congelar y descongelar hasta tres veces. Al descongelar la solución, use agua

corriente y descongélela lo más rápido posible, y luego manténgala por debajo de 10 ° C.

(2) Solución enzimática:

El reactivo enzimático está en un vial con etiqueta verde. Retire el tapón de goma muy lentamente para no perder el polvo reactivo. Añada exactamente 6 mL del tampón (vial de color rosa) al vial. Agite el vial suavemente para no producir espuma hasta que el contenido se disuelva por completo. Mantener la solución entre 0°C y 10°C. Un vial de reactivo enzimático se puede utilizar para 10 ensayos en condiciones normales.

Se recomienda utilizar la solución de una sola vez, pero si no es posible, puede mantenerla a -10°C o menos hasta un mes. Se recomienda congelar y descongelar hasta tres veces. Al descongelar la solución, use agua corriente y descongélela lo más rápido posible, y luego manténgala por debajo de 10 ° C.

### 3. Procedimiento de ensayo

Consulte la tabla "Combinación de reactivos" a continuación. Incubar todos los tubos de ensayo simultáneamente y evitar la luz solar.

- (1) Para poner a cero la absorbancia del espectrofotómetro, se debe utilizar agua destilada como referencia de acuerdo con su manual de instrucciones.
- (2) Para analizar muestras de N, prepare (2N + 2) tubos de ensayo de plástico.
- (3) Para llevar a cabo el ensayo de la muestra, añada 0,5 ml de la solución de muestra extraída . A continuación, añada 0,5 ml de la solución colorimétrica y de la solución enzimática. Mezclar bien e incubar a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  durante  $15 \pm 2$  minutos. No irradie con luz intensa, especialmente la luz solar durante esta serie de operaciones. Es deseable la protección contra la luz.  
Después de la incubación, mida la absorbancia a unos 470 nm (valor Es). Si el valor Es es superior a 1,0, diluya la solución de muestra extraída con agua destilada y vuelva a realizar el ensayo.
- (4) Para llevar a cabo el ensayo de muestra en blanco, agregue 0,5 ml del tampón en lugar de la solución enzimática. Realice la misma operación que en (3). Mida la absorbancia a unos 470 nm (valor Eb).
- (5) Para llevar a cabo el ensayo estándar de histamina, utilice 0,5 mL de la solución patrón de histamina en lugar de la solución de muestra extraída. Realice la misma operación que en (3). Mida la absorbancia a unos 470 nm (valor estd). El valor Estd debe ser de  $0,85 \pm 0,1$  cuando se utiliza un espectrofotómetro que tiene una longitud de trayectoria óptica de 2 cm o de  $0,5 \pm 0,1$  cuando se utiliza un espectrofotómetro que tiene una longitud de trayectoria óptica de 1 cm en condiciones normales. De lo contrario, verifique el procedimiento de operación y vuelva a realizar el ensayo.
- (6) Para llevar a cabo el ensayo en blanco del reactivo,

añada 0,5 mL de agua destilada en lugar de la solución de muestra extraída y 0,5 mL de tampón en lugar de la solución enzimática. Realice la misma operación que en (3). Mida la absorbancia alrededor de 470 nm (valor Ec). El valor Ec debe ser inferior a 0,10 cuando se utiliza un espectrofotómetro con una longitud de trayectoria óptica de 2 cm, o inferior a 0,05 cuando se utiliza un espectrofotómetro con una longitud de trayectoria óptica de 1 cm en condiciones normales. De lo contrario, compruebe el procedimiento de operación y vuelva a realizar el ensayo.

Mesa. Combinación de reactivos (mL)

	Absorbancia de La muestra	Absorbancia de la muestra en blanco	Absorción de la solución patrón	Absorbancia del blanco de reactivo
Solución de sam- ple extraída	0.5	0.5	—	—
Histamina Solució n estándar	—	—	0.5	—
Agua destilada	—	—	—	0.5
Solución colorimétrica	0.5	0.5	0.5	0.5
Solució n enzimát ica	0.5	—	0.5	—
Búfer	—	0.5	—	0.5
	es	Eb	Estd	EC

### Condiciones de medición de absorbancia

Longitud de onda: 470 nm

Referencia para poner la absorbancia a cero: agua destilada Volumen final: 1,5 mL

### 4. Interpretación de los resultados

Puede determinar la concentración de histamina de la muestra de pescado mediante el siguiente cálculo:

Concentración de histamina (mg/kg)  

$$= (Es - Eb) \div (Estd - Ec) \times 4 \times 25 \times (100 \div \text{Tasa de recuperación} (\%))$$

Es: Absorbancia de la muestra; Eb: Absorbancia de la muestra en blanco; Estd: Absorbancia de la solución patrón; Ec: Absorbancia del reactivo en blanco. La tasa de recuperación se determina mediante la prueba de pico como se muestra a continuación. Los valores "4", "25" y "100" en la fórmula significan que la concentración de histamina de la solución patrón es de 4 mg/kg, que la muestra de atún crudo o enlatado se ha diluido 25 veces mediante el procedimiento de extracción y que la tasa máxima de recuperación es del 100 %.

### Protocolo para pruebas de picos y recuperación

La tasa de recuperación se puede determinar realizando la siguiente prueba de pico y recuperación. Obsérvese que la tasa de recuperación puede ser muy baja cuando se utilizan alimentos procesados o fermentados como

muestras. Por lo tanto, se requiere la siguiente prueba para confirmar la tasa de recuperación.

**Nota:** No todos los reactivos y equipos necesarios en esta sección se describen en las "Instrucciones de uso".

### 1. Preparación de la solución de histamina (1.000 mg/kg) para la prueba de picos

Coloque el diclorhidrato de histamina en desecadores (sin calor) durante al menos 2 horas para que se seque. Luego pese 167 mg del diclorhidrato de histamina seco, disuélvalo en HCl 0.1N y ajuste a 100 mL en un cilindro graduado de plástico de 100 mL.

### 2. Preparación de la solución de muestra

- (1) Homogeneizar al menos 10 g del alimento.
- (2) Prepare dos tubos cónicos resistentes al calor con tapas (tubos A y B). Pesar con precisión 1,0 g de la muestra homogeneizada y transferirla a los tubos A y B respectivamente.
- (3) Añadir 0,1 mL de la solución de histamina (1.000 mg/kg) al tubo A. Añadir 0,1 mL de agua destilada al tubo B.
- (4) Agregue 24.0 mL de tampón de tratamiento de muestras a los tubos A y B. Tape ambos tubos herméticamente y agite la muestra durante 10 segundos a la velocidad máxima. Coloque los tubos en un soporte para tubos. Hervir durante 20 minutos. (Esta es una dilución de 25 veces de la muestra. La concentración de histamina enriquecida después de la dilución es de aproximadamente 4 mg/kg.)
- (5) Enfríe los tubos colocándolos en un baño de hielo (hasta que esté a < 20°C, 10 minutos).
- (6) Suspenda el pocillo de la muestra con una espátula limpia.
- (7) Vuelva a colocarlo en el baño de hielo durante 5 minutos para separar la materia sólida y la materia líquida. Filtre el contenido de (7) a través de papel de filtro doblado en tubos de plástico limpios A y B, respectivamente; o centrífugo (10.000 x g, 5 minutos) y recoger el sobrenadante para limpiar los tubos A y B, respectivamente. Los tubos se denominan solución de muestra A y solución de muestra B, respectivamente.

**Nota:** Esta prueba de recuperación puede evaluarse a otros niveles de espícula preparando la solución de espícula a una concentración más alta o más baja (por ejemplo, 500 mg/kg) y ajustando el cálculo de la tasa de recuperación en consecuencia.

Recoja el sobrenadante homogéneo de inmediato sin alterar el pellet, si la muestra está centrifugada.

### 3. Medición

Mida las concentraciones de histamina en la solución de muestra A y en la solución de muestra B de acuerdo con las "Instrucciones de uso 3. Procedimiento de ensayo y 4. Interpretación de los resultados". Realice mediciones por triplicado y calcule el valor medio.

### 4. Cálculo de la tasa de recuperación

Determine la tasa de recuperación de la muestra mediante el siguiente cálculo:

Tasa de recuperación (%) =  $(\text{Conc. A} - \text{Conc. B}) \div 100 \text{ mg/kg} \times 100\%$

Conc. A: Concentración de histamina (mg/kg) en la solución de espuma A (con 100 mg/kg de histamina en aumento), Conc. B: Concentración de histamina (mg/kg) en la solución de muestra B (sin histamina en aumento), 100 mg/kg: Concentración de histamina en el tubo A. Para la determinación de la tasa de recuperación, calcule la concentración de histamina considerando que la tasa de recuperación es del 100%.

### Métodos de eliminación

Los recipientes del reactivo colorimétrico y el reactivo enzimático están formados por vidrio, caucho y tapa de polipropileno. Los recipientes del tampón y la solución estándar de histamina son de polietileno con una tapa de polipropileno. Sería mejor separar las partes y desechar cada una adecuadamente de acuerdo con las regulaciones locales descritas por los gobiernos locales para la eliminación adecuada de los materiales de desecho.

### Para uso seguro

**Preste atención a los puntos que se enumeran a continuación para un funcionamiento seguro de este kit.**

1. La prueba de histamina no se recomienda ni está destinada para el diagnóstico de enfermedades en humanos o animales.
2. Este kit está diseñado para una prueba voluntaria.
3. Este kit está diseñado para ser utilizado por el personal de control de calidad y otras personas familiarizadas con el análisis de histamina en peces.
4. No trague ni entre en contacto con la piel o los ojos los reactivos suministrados con este kit. En caso de deglución o contacto con la piel o los ojos, enjuagar inmediatamente con abundante agua y consultar a un médico. La histamina puede causar una reacción similar a la alérgica.
5. Use guantes de protección cuando lave el equipo después de su uso. Guarde y deseche este kit con cuidado para no contaminar alimentos u otros productos con los reactivos y materiales suministrados con el kit.
6. No mezcle los reactivos de este kit con otros productos químicos. Es posible que se generen algunos humos tóxicos.
7. Por favor, siga las "Instrucciones de uso". No intente utilizar reactivos en una proporción de dilución diferente o en una proporción de combinación diferente a la de las instrucciones.
8. Mantenga este kit fuera del alcance de los niños y bebés.

### Almacenamiento del kit

Guarde el kit a una temperatura de 2 a 8 °C en el frigorífico. No congelar. La fecha de caducidad está

impresa en el lateral de la caja.

## **Garantía**

Kikkoman Biochemifa Company no ofrece ninguna garantía de ningún tipo, ya sea expresa o implícita, excepto que los materiales con los que se fabrican sus productos son de calidad estándar. Si algún material es defectuoso, Kikkoman Bio-chemifa Company proporcionará un producto de reemplazo. El comprador asume todos los riesgos y responsabilidades que resulten del uso de este producto. No hay garantía de comerciabilidad para este producto, ni para la idoneidad del producto para ningún propósito. La empresa Kikkoman Biochemifa no será responsable de ningún daño, incluidos los daños especiales o consecuentes, ni de los gastos que surjan directa o indirectamente del uso de este producto.