

DIN EN ISO 19343



ICS 07.100.30

Einsprüche bis 2016-06-08

Entwurf

**Mikrobiologie der Nahrungskette –
Nachweis von Histamin in Fisch und Fischereierzeugnissen –
HPLC-Methode (ISO/DIS 19343:2016);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 19343:2016**

Microbiology of the food chain –
Detection and quantification of histamine in fish and fishery products –
HPLC method (ISO/DIS 19343:2016);
German and English version prEN ISO 19343:2016

Microbiologie de la chaîne alimentaire –
Détection et quantification de l’histamine par méthode HPLC (ISO/DIS 19343:2016);
Version allemande et anglaise prEN ISO 19343:2016

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2016-04-08 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfes besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal des DIN unter www.entwuerfe.din.de bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/stellungnahme oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin (Hausanschrift: Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin).

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 33 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 19343:2016) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN (Deutschland) gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung der prEN ISO 19343 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 5725-2 siehe ISO 5725-2

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 5725-2:2002-12, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens (ISO 5725-2:1994 einschließlich Technisches Korrigendum 1:2002)*

**Mikrobiologie der Nahrungskette — Nachweis und Bestimmung von
Histamin in Fisch und Fischereierzeugnissen — HPLC-Methode
(ISO/DIS 19343:2016)**

*Microbiologie de la chaîne alimentaire — Détection et quantification de l'histamine par méthode HPLC
(ISO/DIS 19343:2016)*

*Microbiology of the food chain — Detection and quantification of histamine in fish and fishery products — HPLC
method (ISO/DIS 19343:2016)*

ICS:

Descriptors:

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokumentstufe: parallele Umfrage
Dokumentsprache: D

STD Version 2.7g

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Kurzbeschreibung	6
4 Reagenzien und Hilfsmittel	6
5 Geräte	7
6 Durchführung	8
6.1 Probenvorbereitung	8
6.2 Extraktion	8
6.3 Derivatisierung	8
6.4 Reinigung	8
6.5 LC-Bedingung	8
6.6 Standardproben	8
7 Berechnung	9
7.1 Kalibriergerade (Kurve)	9
7.2 Histamin-Quantifizierung	9
Anhang A (informativ) Empfehlungen für HPLC-Trennung	10
A.1 LC-Bedingungen	10
A.2 Reihenfolge der Probeninjektion	10
A.3 Elutionsbereich	10
A.4 Chromatogramm	11
Anhang B (informativ) Präzision und Richtigkeit	12
B.1 Laborvergleichsuntersuchung für Thunfisch (<i>Thunnus albacares</i>)	12
B.2 Laborvergleichsuntersuchung für Heringe (<i>Clupea harengus</i>)	13
B.3 Laborvergleichsuntersuchung für Makrelen (<i>Scomber scombrus</i>)	13
B.4 Untersuchung der Histaminstabilität in Makrelen (<i>Scomber scombrus</i>)	14
B.5 Vergleich mit Nachsäulenderivatisierung ^[5]	14
Literaturhinweise	15

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 19343:2016) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 19343:2016 wurde vom CEN als prEN ISO 19343:2016 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung von Nationalen Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird normalerweise von ISO Technischen Komitees durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale Organisationen, staatlich und nicht-staatlich, in Liaison mit ISO, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) bei allen elektrotechnischen Themen zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Im Besonderen sollten die für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten notwendigen Annahmekriterien beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der empfangenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname wird als Information zum Nutzen der Anwender angegeben und stellt keine Anerkennung dar.

Eine Erläuterung der Bedeutung ISO-spezifischer Benennungen und Ausdrücke, die sich auf Konformitätsbewertung beziehen, sowie Informationen über die Beachtung der WTO-Grundsätze zu technischen Handelshemmnissen (TBT, en: Technical Barriers to Trade) durch ISO enthält der folgende Link: Foreword - Supplementary information.

ISO 19343 wurde vom Europäischen Komitee für Normung (CEN) in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 9, *Microbiology*, in Übereinstimmung der Wiener Vereinbarung zwischen ISO und CEN erstellt.

Einleitung

Histamin ist ein auslösender Faktor einer Scombroid-Fischvergiftung oder einer Histaminvergiftung. Histamin kann hauptsächlich in Scombridae (Thunfisch, Makrele) und Clupeidae (Hering, Sardine) vorhanden sein, in Arten, die einen hohen Gehalt an freiem Histidin haben. Histamin wird bei der Decarboxylierung von Histidin durch mikrobielle Histidindecarboxylase gebildet.

Histamin wird als ein biologisch aktives, stickstoffhaltiges Grundmolekül mit geringem Molekulargewicht definiert. Der Konsum von Lebensmitteln mit einer erheblichen Histaminkonzentration kann Symptome verursachen, die einer Allergie gegen Fischereierzeugnisse ähneln.

Diese Norm wurde entwickelt, als Antwort auf den Bedarf einer standardisierten Methode zum Nachweis und Bestimmung von Histamin in Fisch und Fischereierzeugnissen, insbesondere für die europäische Verordnung (EG) 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt eine Hochleistungsflüssigkeitschromatografie-Methode (HPLC) fest, um Histamin in Fisch und Fischereierzeugnissen für die menschliche Ernährung zu titrieren.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

EN ISO 3696, *Wasser für analytische Zwecke — Anforderungen und Prüfungen (ISO 3696)*

3 Kurzbeschreibung

Diese Methode ermöglicht eine Abtrennung von Histamin innerhalb der biogenen Amine in Fisch und Fischereierzeugnissen. Die Probe wird durch das Mischen mit Perchlorsäure extrahiert. Die Vorsäulenderivatisierung wird mithilfe von Dansylchlorid durchgeführt. Die biogenen Amine und die Komponenten in der Lösung werden durch HPLC mit einer geeigneten Säule unter Verwendung von UV-Detektion getrennt. Nach der Derivatisierung wird die Massenkonzentration des Histamin über das Peakflächenverhältnis von Histamin und internem Standard mit einer Kalibrierkurve berechnet.

4 Reagenzien und Hilfsmittel

Es sind nur Reagenzien von anerkannten analytischem Reinheitsgrad sowie Wasser entsprechend Grad 1 der EN ISO 3696 zu verwenden, sofern nicht anders bestimmt. Lösungsmittel müssen die HPLC-Qualität für Analysen haben, sofern nicht anderweitig spezifiziert.

4.1 Aceton, CH_3COCH_3 .

4.2 Acetonitril, HPLC-Qualität, CH_3CN .

4.3 Toluol, C_7H_8 .

4.4 Wasser HPLC-Qualität.

4.5 Bidestilliertes Wasser

4.6 Stickstoff.

4.7 Perchlorsäure, Substanzkonzentration $c(\text{HClO}_4) = 0,2 \text{ mol/l}$ (empfohlen).

Es werden 19,5 ml HClO_4 65 % oder 17,2 ml HClO_4 70 % zu 1 000 ml Wasser(3.4) hinzugefügt. Die Lösung ist für sechs Monate stabil, wenn sie bei Raumtemperatur (15°C bis 25°C) aufbewahrt wird.

4.8 Natriumcarbonat, (Na_2CO_3) Lösung.

110 g Natriumcarbonat werden bis zur vollständigen Sättigung in ungefähr 150 ml Wasser(3.4) gelöst. Die Lösung ist für drei Monate stabil, wenn sie bei 5 °C aufbewahrt wird.

4.9 Dansylchloridlösung, Massenkonzentration $\rho = 7,5 \text{ mg/ml}$.

0,375 g Dansylchlorid werden in 50 ml Aceton (3.1) gelöst. Die Lösung ist für drei Wochen stabil, wenn sie im Dunkeln bei einer Temperatur unter $-18^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ aufbewahrt wird.

4.10 L-Prolin-Lösung, $\rho = 100$ mg/ml.

1 g L-Prolin werden in 10 ml Wasser (3.4) gelöst. Die Lösung ist für drei Wochen stabil, wenn sie bei $5\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ aufbewahrt wird.

4.11 Histaminstammlösung, $\rho = 500$ mg/kg.

1,034 g Histamin-Dihydrochlorid werden in 50 ml Wasser (3.4) gelöst. Die Lösung ist für ein Jahr stabil, wenn sie bei $-18\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ aufbewahrt wird.

4.12 Interner Standard (IS) 1,7-Diaminoheptan-Stammlösung, ρ ($\text{C}_7\text{H}_{18}\text{N}_2$) = 6,4 mg/ml. (empfohlen)

0,320 g 1,7-Diaminoheptan werden in 50 ml Wasser (3.5) aufgelöst. Die Lösung ist für drei Wochen stabil, wenn sie bei $5\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ aufbewahrt wird.

5 Geräte

5.1 Zerkleinerungsgerät, z. B. Mixwerkzeug, Mixer.

5.2 Waagen, (Präzision 0,1 g und 0,001 g).

5.3 Dispergierer, (UltraTurrax) mit Zerkleinerungsstäben aus Metall.

5.4 Zentrifuge, gekühlt geeignet für eine Zentrifugalkraft von $8\,000 \times g$ bei 100-ml-Röhrchen.

5.5 Zentrifugenröhrchen, (Plastik) mit Verschlussdeckel, 100 ml.

5.6 Pipetten, Bereiche 10 μl , 20 μl bis 200 μl und 100 μl bis 1000 μl .

5.7 Röhrchen, (temperaturbeständiges Glas) mit Verschlussdeckel, 10 ml.

5.8 Vortex-Mischer.

5.9 Wasserbad, $60\text{ °C} (\pm 1\text{ °C})$ mit dunkler Abdeckung oder Ähnliches.

5.10 Kühlschrank, geeignet für Temperaturen zwischen 0 °C und 10 °C

5.11 Tiefkühlgerät, geeignet für Temperaturen zwischen -20 °C und -30 °C

5.12 Abdampfgerät mit Gasfluss.

5.13 Nadeln, 20G 0,9 mm Einwegprodukt.

5.14 Filter, 0,2 μm Einwegprodukt.

5.15 Spritzen, 2 ml Einwegprodukt.

5.16 LC-System, Pumpe, Probengeber ($5\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$), Säulenofen ($25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$), Detektor (UV oder Ähnliches).

5.17 LC-Säule, Kromasil C18 5 μm 100 Å (25 cm x 4,6 mm), Umkehrphase oder Ähnliches.

5.18 HPLC-Glasfläschchen, 2 ml mit Einsatz (200 μl) und Deckel.

6 Durchführung

6.1 Probenvorbereitung

Die Probe (Fischfleisch) wird homogenisiert, indem es in einem Mixwerkzeug (5.1) zerkleinert wird. Eine Untersuchungsprobe von 5 g ($\pm 0,1$ g) des Fisch-Homogenats wird in das Zentrifugenröhrchen (5.5) gegeben.

6.2 Extraktion

10 ml Perchlorsäure (4.7) werden zusammen mit 100 μ l 1,7-Diaminoheptan (3.12) hinzugefügt und bis zur vollständigen Homogenisierung gemischt (5.3) oder geschüttelt (5.8) und bei 8000 g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert (5.4).

6.3 Derivatisierung

100 μ l des Überstands werden in ein Röhrchen (5.7) gegeben und 300 μ l Natriumcarbonat-Lösung (4.8) und 400 μ l Dansylchlorid (4.9) hinzugefügt.

Dieses wird mit dem Vortex-Mischer (5.8) gemischt und dann für 5 min im Dunkeln bei 60 °C ± 1 °C inkubiert.

Das Röhrchen wird unter kaltem Wasser abgekühlt und 100 μ l Prolin-Lösung (4.10) werden hinzugefügt.

Dies wird mit dem Vortex-Mischer (5.8) gemischt und das Röhrchen wird für 15 min ins Dunkel gestellt.

ANMERKUNG Der Überstand kann bei -18 °C ± 2 °C eine Woche lang aufbewahrt werden.

6.4 Reinigung

500 μ l Toluol (4.3) werden zugefügt und mit dem Vortex-Mischer (5.8) gemischt.

ANMERKUNG Die Aufarbeitung kann in diesem Schritt durch eine Lagerung bei -18 °C höchstens für eine Woche unterbrochen werden.

Die obere organische Phase wird in ein neues Röhrchen (5.7) gegeben und im Abzug mit einen Stickstoffstrom (4.11) zur Trocknung geführt.

ANMERKUNG Die organische Phase Toluol enthält das derivatisierte Histamin und nicht die „anorganische“ (wasserhaltige) Phase. Die organische Phase kann leicht abgetrennt werden, indem die wasserhaltige Phase ausgefroren wird (-18 °C ± 2 °C für mindestens 30 min). Außerdem kann das Einfrieren die Trübung des Überstands verbessern.

Das trockene Röhrchen wird mit 200 μ l Acetronil (4.2) resuspendiert und mit dem Vortex-Mischer (5.8) gemischt.

Die Lösung (5.13, 5.14 und 5.15) wird in ein Fläschchen (5.18) gefiltert und in den Probengeber (5.16) gestellt.

6.5 LC-Bedingung

Es können HPLC- und UHPLC-Systeme genutzt werden. Leitparameter, die vom Instrument und der Säule abhängen, sind in Anhang A aufgeführt.

6.6 Standardproben

Die Standardproben sollten durch Zudotierung nach dem Zerkleinerungsschritt in homogene Proben ohne Histamin hergestellt werden. Das Volumen wird, wie in Tabelle 1 angegeben, zupipettiert und vor dem Zentrifugieren (6.2), der Derivatisierung (6.3), der Reinigung (6.4) und der LC (6.5) gemischt.