
**Microbiologie de la chaîne
alimentaire — Détection et
quantification de l’histamine dans le
poisson et les produits de la pêche —
Méthode CLHP**

*Microbiology of the food chain — Detection and quantification of
histamine in fish and fishery products — HPLC method*
iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 19343:2017

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/b5a8e3bb-317a-4fa1-8250-7ec65b6626a1/iso-19343-2017>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 19343:2017

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/b5a8e3bb-317a-4fa1-8250-7ec65b6626a1/iso-19343-2017>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2017, Publié en Suisse

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Ch. de Blandonnet 8 • CP 401
CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland
Tel. +41 22 749 01 11
Fax +41 22 749 09 47
copyright@iso.org
www.iso.org

Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
Introduction.....	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	1
5 Réactifs et matériaux	1
6 Appareillage	2
7 Mode opératoire	3
7.1 Préparation de l'échantillon.....	3
7.2 Extraction.....	3
7.3 Dérivation.....	3
7.4 Purification.....	4
7.5 Conditions de CPL.....	4
7.6 Gamme d'échantillons de référence.....	4
8 Calcul	5
8.1 Droite (courbe) d'étalonnage.....	5
8.2 Quantification de l'histamine.....	5
9 Fidélité	5
9.1 Essai interlaboratoires.....	5
9.2 Limite de répétabilité.....	6
9.3 Limite de reproductibilité.....	6
Annexe A (informative) Recommandations relatives à la séparation par CLHP	7
Annexe B (informative) Caractéristiques de performance de la méthode	9
Bibliographie	14

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

(standards.iteh.ai)

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: www.iso.org/iso/fr/avant-propos.html.

Le présent document a été élaboré par le comité technique CEN/TC 275, *Analyse des produits alimentaires — Méthodes*, du Comité européen de normalisation (CEN) en collaboration avec le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité, sous-comité SC 9, *Microbiologie*, conformément à l'accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

Introduction

L'histamine est un agent causal de la scombroidose ou de la réaction pseudo-allergique dans le poisson. Elle peut être présente principalement chez les scombridés (thon, maquereau) et les clupéidés (hareng, sardine), espèces contenant un taux élevé d'histidine libre. L'histamine est formée par décarboxylation de l'histidine par l'histidine décarboxylase d'origine microbienne.

L'histamine [2-(1H-imidazol-5-yl)éthanamine] est définie comme étant une molécule azotée basique biologiquement active et de faible poids moléculaire. La consommation d'aliments riches en histamine peut provoquer des symptômes similaires à ceux associés aux allergies alimentaires.

Le présent document a été élaboré pour répondre à la nécessité de normaliser une méthode de détection et de quantification de l'histamine dans le poisson et les produits de la pêche, en regard du Règlement européen 2073/2005^[1] concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 19343:2017](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/b5a8e3bb-317a-4fa1-8250-7ec65b6626a1/iso-19343-2017)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/b5a8e3bb-317a-4fa1-8250-7ec65b6626a1/iso-19343-2017>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 19343:2017

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/b5a8e3bb-317a-4fa1-8250-7ec65b6626a1/iso-19343-2017>

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Détection et quantification de l’histamine dans le poisson et les produits de la pêche — Méthode CLHP

AVERTISSEMENT — Il convient que l'utilisateur du présent document connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Le présent document n'a pas pour but de traiter de tous les problèmes de sécurité qui sont, le cas échéant, liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur de la présente norme d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité.

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode de chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) pour analyser l'histamine dans le poisson et les produits de la pêche (sauces au poisson, poissons ayant subi un traitement de maturation enzymatique dans la saumure, etc.) destinés à la consommation humaine.

2 Références normatives

Les documents suivants cités dans le texte constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 3696, *Eau pour laboratoire à usage analytique* — Spécification et méthodes d'essai
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/b5a8e3bb-317a-4fa1-8250-7ec65b6626a1/iso-19343-2017>

3 Termes et définitions

Le présent document ne contient aucun terme ni aucune définition.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online Browsing Platform (OBP): disponible à l'adresse <http://www.iso.org/obp>

4 Principe

Cette méthode permet de séparer l'histamine des amines biogènes du poisson et des produits de la pêche. L'échantillon est extrait en le mélangeant avec de l'acide perchlorique. La dérivation pré-colonne est effectuée à l'aide de chlorure de dansyl. Les amines biogènes et les composants présents dans la solution sont séparés par CLHP avec une colonne appropriée, par détection UV. La concentration massique en histamine est calculée d'après le rapport de surface des pics de l'histamine et de l'étalon interne, avec une courbe d'étalonnage.

5 Réactifs et matériaux

Sauf indication contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue, et de l'eau de qualité 1, conformément à l'ISO 3696. Sauf indication contraire, les solvants doivent être de qualité CLHP.

5.1 Acétone, CH₃COCH₃.

ISO 19343:2017(F)

5.2 Acétonitrile, CH_3CN .

5.3 Toluène, C_7H_8 .

5.4 Eau, de qualité CLHP.

5.5 Eau, distillée ou équivalente.

5.6 Azote, gaz.

5.7 Acide perchlorique, $c(\text{HClO}_4) = 0,2 \text{ mol/l}$ (valeur recommandée).

Diluer 19,5 ml de HClO_4 65 % ou 17,2 ml de HClO_4 70 % dans 1 000 ml d'eau (5.5). La solution est stable pendant six mois si elle est conservée à température ambiante (entre 15 °C et 25 °C).

5.8 Solution saturée de carbonate de sodium, Na_2CO_3 .

Dissoudre 110 g de carbonate de sodium dans environ 150 ml d'eau (5.5). La solution est en excès et est stable pendant trois mois si elle est conservée à 5 °C ± 3°C.

5.9 Solution de chlorure de dansyl, $\rho(\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{ClNO}_2\text{S}) = 7,5 \text{ mg/ml}$.

Dissoudre 0,375 g de chlorure de dansyl dans 50 ml d'acétone (5.1). La solution est stable pendant trois semaines si elle est conservée à l'abri de la lumière et à une température inférieure à -18 °C.

5.10 Solution de L-proline, $\rho(\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2) = 100 \text{ mg/ml}$.

Dissoudre 1 g de L-proline dans 10 ml d'eau (5.5). La solution est stable pendant trois semaines si elle est conservée à 5 °C ± 3 °C.

5.11 Solution mère d'histamine, $\rho(\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_3) = 12,5 \text{ mg/ml}$.

Dissoudre 1,034 g de dichlorhydrate d'histamine dans 50 ml d'eau (5.5). La solution est stable pendant un an si elle est conservée à une température inférieure à -18 °C.

5.12 Solution mère d'étalon interne (IS) 1,7-diaminoheptane, $\rho(\text{C}_7\text{H}_{18}\text{N}_2) = 6,4 \text{ mg/ml}$. (valeur recommandée).

Dissoudre 0,320 g de 1,7-diaminoheptane dans 50 ml d'eau (5.5). La solution est stable pendant trois semaines si elle est conservée à 5 °C ± 3 °C.

6 Appareillage

6.1 Broyeur, par exemple mixeur, mélangeur.

6.2 Balances, précises à 0,1 g et 0,001 g près.

6.3 Homogénéiseur, à tiges métalliques.

6.4 Centrifugeuse, réfrigérée, capable de centrifuger à 8 000g.

6.5 Tubes à centrifuger, en plastique, avec bouchons.

6.6 Pipettes, graduations de 20 µl à 200 µl et de 100 µl à 1 000 µl.

- 6.7 Tubes**, en verre résistant à la chaleur, avec bouchons.
- 6.8 Vortex**.
- 6.9 Bain-marie**, 60 °C ± 1 °C avec couvercle foncé ou équivalent.
- 6.10 Réfrigérateur**, capable de maintenir des températures comprises de 5 °C ± 3 °C.
- 6.11 Congélateur**, capable de maintenir des températures inférieures à -18 °C.
- 6.12 Évaporateur à azote**.
- 6.13 Aiguilles**, 20G, 0,9 mm, à usage unique.
- 6.14 Filtres**, 0,2 µm, à usage unique [polytétrafluoroéthylène (PTFE)/polypropylène (PP)].
- 6.15 Seringues**, 2 ml, à usage unique.
- 6.16 Système CPL**, pompe, passeur d'échantillons automatique réfrigéré, four (25 °C ± 2°C), détecteur UV $\lambda = 254$ nm (UV).
- 6.17 Colonne CPL**, Kromasil®¹⁾ C18 5 µm 100 Å (25 cm × 4,6 mm) ou équivalente.
- 6.18 Flacon en verre pour passeur d'échantillons automatique**, 2 ml, avec insert (200 µl) et bouchon.

7 Mode opératoire

ISO 19343:2017
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/b5a8e3bb-317a-4fa1-8250-7ec65b6626a1/iso-19343-2017>

7.1 Préparation de l'échantillon

Homogénéiser l'échantillon (chair de poisson) en le broyant dans un mélangeur (6.1). Transférer une prise d'essai de 5 g ± 0,1 g d'homogénat de poisson dans un tube à centrifuger (6.5).

7.2 Extraction

Ajouter 10 ml d'acide perchlorique (5.7) et 100 µl de 1,7-diaminoheptane (5.12) à 5 g de poisson dans le tube à centrifuger et mélanger (6.3). Après homogénéisation complète, centrifuger (6.4) à 8 000g pendant 5 min à 4 °C.

7.3 Dérivation

Transférer 100 µl du surnageant dans un tube (6.7) puis ajouter 300 µl de solution de carbonate de sodium (5.8) et 400 µl de chlorure de dansyl (5.9).

Agiter au vortex (6.8) et incuber (6.9) pendant 5 min à l'abri de la lumière et à 60 °C.

Refroidir le tube à l'eau froide du robinet et ajouter 100 µl de solution de L-proline (5.10).

Agiter au vortex (6.8) et placer le tube à l'abri de la lumière pendant 15 min.

NOTE Le surnageant peut être conservé à une température inférieure à -18 °C pendant une semaine.

1) Kromasil® est l'appellation commerciale d'un produit fourni par Sigma-Aldrich Co. LLC. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne saurait constituer un engagement de l'ISO à l'égard de ce produit. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

7.4 Purification

Ajouter 500 µl de toluène (5.3) et agiter au vortex (6.8).

NOTE 1 La manipulation peut être interrompue à ce moment en cas de conservation à une température inférieure à -18 °C pendant une semaine maximum.

Transférer la plus grande quantité possible de phase organique supérieure dans un nouveau tube (6.7) et la sécher sous la hotte avec un flux d'azote (6.12).

NOTE 2 La phase organique toluène contient l'histamine dérivée, contrairement à la phase « non organique » (aqueuse). La phase organique peut être facilement récupérée en congelant la phase aqueuse (< -18 °C pendant 30 min minimum). De plus, la congélation peut améliorer la qualité de la phase organique supérieure.

Remettre en suspension le tube sec avec 200 µl d'acétonitrile (5.2)/eau (5.4) (fraction volumique 60/40) et agiter au vortex (6.8).

Filtrer la solution (6.13, 6.14 et 6.15) dans un flacon pour passeur d'échantillons automatique en verre (6.18) et remplir le passeur d'échantillons automatique (6.16).

7.5 Conditions de CPL

Les systèmes CLHP et CLUHP peuvent être utilisés. Les paramètres indicatifs, variables selon l'instrument et la colonne, sont présentés dans l'Annexe A.

7.6 Gamme d'échantillons de référence

Il convient de préparer des échantillons de référence par supplémentation de volumes de solution mère d'histamine (5.11) pour homogénéiser les échantillons préparés selon 7.1 à partir d'une matrice exempte d'histamine.

Ajouter les volumes tels que spécifiés dans le Tableau 1 à l'échantillon exempt d'histamine et passer à l'étape d'extraction (7.2) et ainsi à la dérivation (7.3), purification (7.4) et CPL (7.5).

Pour éviter l'effet de matrice et le biais, effectuer une droite d'étalonnage sur la même matrice (exempte d'histamine) que l'échantillon analysé.

Tableau 1 — Exemple de préparation d'échantillons de référence

Niveau mg/kg	Volume de la solution mère d'histamine (5.11) µl
0	0
25	10
50	20
100	40
250	100
500	200

8 Calcul

8.1 Droite (courbe) d'étalonnage

Calculer une fonction d'étalonnage par analyse de régression linéaire, à l'aide des échantillons de référence d'histamine (7.6) et de l'étalon interne, d'après la [Formule \(1\)](#):

$$f(C_{HS}) = \frac{A_{HS}}{A_{IS}} \times C_{HS} \quad (1)$$

où

C_{HS} est la concentration massique en histamine dans l'échantillon de référence (mg/kg);

A_{HS} est la surface du pic de l'étalon d'histamine;

A_{IS} est la surface de pic de l'étalon interne.

8.2 Quantification de l'histamine

Calculer la concentration en histamine de l'échantillon à l'aide de la [Formule \(2\)](#) (équation de régression):

$$C_H = \frac{\frac{A_H}{A_{IS}} \times \frac{5}{m}}{a} \quad (2)$$

où

C_H est la concentration massique mesurée en histamine dans l'échantillon (mg/kg);

A_H est la surface du pic de l'histamine;

A_{IS} est la surface de pic de l'étalon interne;

a est la pente de la droite d'étalonnage;

m est la masse de l'échantillon prélevé.

La masse, m , correspond généralement à 5 g, mais si la concentration de l'échantillon se situe en dehors de la gamme des échantillons de référence, effectuer une nouvelle analyse avec une plus petite prise d'essai afin de respecter la gamme linéaire relative à la représentativité de l'échantillon.

NOTE Si la matrice est complexe ou difficile à obtenir à l'état d'histamine libre (par exemple, farine de poisson, sauce au poisson, etc.), la supplémentation peut être directement effectuée à l'aide de la méthode des ajouts dosés.

9 Fidélité

9.1 Essai interlaboratoires

Les résultats de l'essai interlaboratoires visant à déterminer la fidélité de la méthode sont résumés dans l'[Annexe B](#). Les valeurs découlant de l'essai interlaboratoires peuvent ne pas s'appliquer aux gammes de concentration et aux types d'aliments autres que ceux données dans l'[Annexe B](#).