

Principales méthodes de dosage des amines volatiles

Les amines volatiles sont principalement constituées par l'ammoniac (NH_3), la diméthylamine (DMA) et la triméthylamine (TMA). Ces molécules sont souvent regroupées sous le nom de **bases volatiles totales** ou **ABVT** (Azote Basique Volatil Total).

[Pour en savoir plus, consulter la fiche de synthèse sur « l'ABVT »...](#)

Il existe de multiples méthodes de dosage de ces composés. Elles permettent soit de quantifier les bases volatiles totales sans préciser la proportion de chacune d'elles, soit de doser spécifiquement l'un des composés. Enfin, il existe des méthodes de dosage multiparamètres qui permettent de mesurer la concentration de plusieurs amines volatiles à la fois.



Les méthodes de dosage des bases volatiles totales

Ces méthodes permettent de mesurer l'ABVT (Azote Basique Volatil Total) mais ne donnent pas d'indication sur la proportion de chacune des amines volatiles.

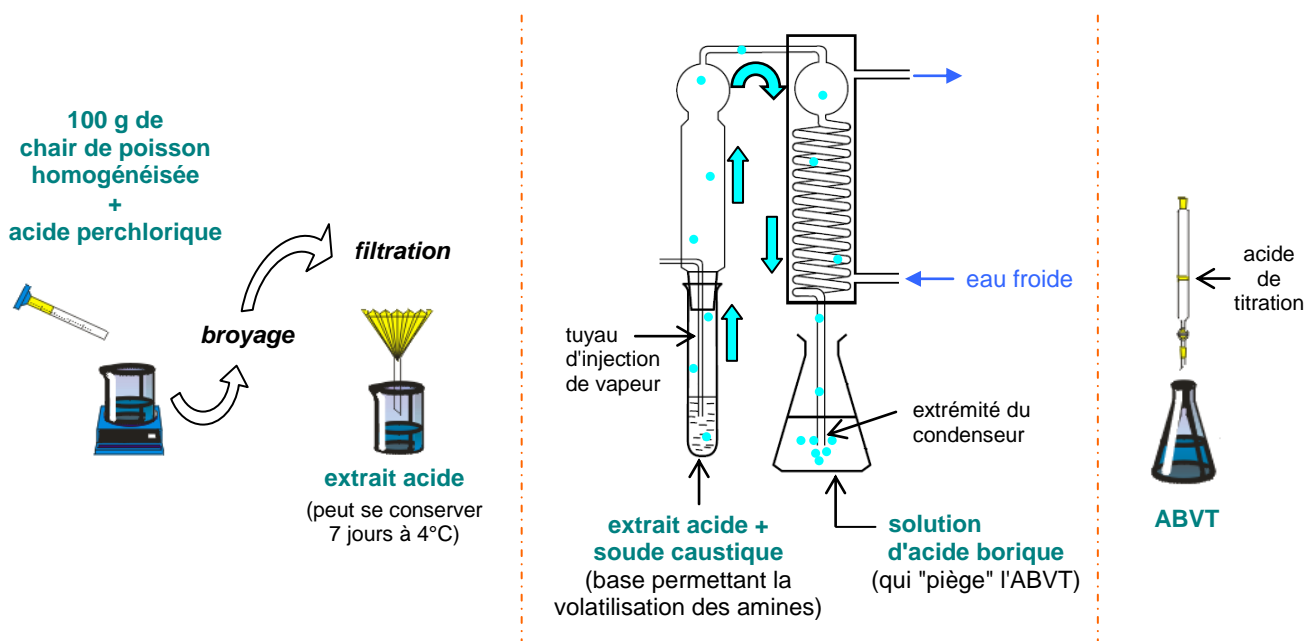
- distillation d'un extrait déprotéinisé par l'acide perchlorique

C'est la **méthode de référence retenue par l'Union Européenne** (règlement CE n°2074/2005).

La première étape est une déprotéinisation de l'échantillon par de l'acide perchlorique, suivie d'une distillation de l'extrait acide à la vapeur d'eau et enfin d'une titration avec un acide (l'ABVT étant formé de composés basiques).

L'échantillon doit consister en 100 g de chair environ, prélevés en trois endroits différents au moins et mélangés par broyage.

Le respect d'un protocole de mesure standardisé est *essentielle* pour la fiabilité des résultats. Ceux-ci sont exprimés en **mg d'azote pour 100 g de chair (mg N / 100 g)**.



1° Extraction des bases volatiles ➡ **2° Entraînement à la vapeur** ➡ **3° Titration**

[Voir le règlement CE n°2074/2005 pour en savoir plus sur la méthode officielle...](#)

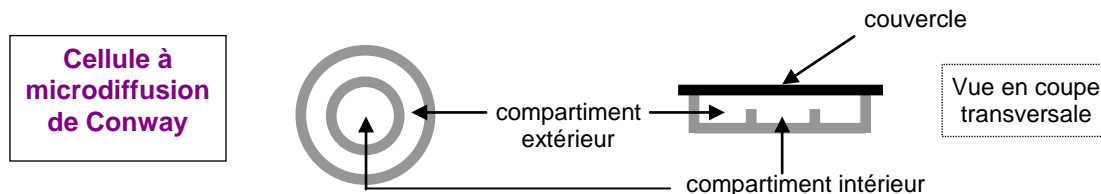
- autres méthodes de dosage de l'ABVT

La réglementation européenne stipule également que trois autres méthodes peuvent être employées pour les contrôles de routine.

• la microdiffusion

Cette méthode, décrite par **Conway et Byrne** en 1933, consiste à doser les bases volatiles par un réactif non volatil et en les "piégeant" avec de l'acide borique. Elle fait intervenir de toutes petites quantités de réactifs et de l'échantillon à tester (de l'ordre du ml), d'où son nom.

La première étape est une déprotéinisation de l'échantillon par de l'acide trichloracétique suivie d'une filtration de l'extrait acide. Puis la microdiffusion est effectuée dans une cellule de Conway.



Le filtrat et de l'eau distillée sont placés dans la couronne extérieure de la cellule et l'acide borique est placé dans le compartiment central. L'ajout d'une solution saturée de CO_3K_2 dans la couronne extérieure entraîne un dégagement de NH_3 qui va être absorbé par l'acide borique. Puis la capsule est tournée doucement pour mélanger les réactifs et incubée pendant 2 heures à 35°C . Ensuite, le mélange est titré avec un acide.

• la distillation directe

Cette méthode, décrite par **Antonacopoulos** en 1968, consiste à distiller directement l'échantillon à analyser et non plus un extrait acide de cet échantillon.

L'azote basique volatil contenu dans l'échantillon homogénéisé est libéré par addition d'un composé basique : l'oxyde de magnésium (MgO). Ce mélange est distillé à la vapeur d'eau puis les bases volatiles sont absorbées par une solution d'acide borique et enfin elles sont titrées par un acide.

• la distillation d'un extrait déprotéinisé par l'acide trichloracétique

Le principe est le même que pour la première méthode (celle retenue par le règlement européen) sauf qu'au lieu de l'acide perchlorique, c'est l'acide trichloracétique qui est employé pour obtenir l'extrait acide.



Les méthodes de dosage spécifiques

- le dosage de l'ammoniac (NH_3)

Une méthode basée sur l'enzyme **glutamate-déshydrogénase** peut être citée. L'addition de cette enzyme à un extrait de poisson provoque la réduction du NH_3 contenu dans l'échantillon. Il s'ensuit une production d'acide glutamique et de NAD, qui peut être suivie par mesure spectrophotométrique (absorbance à 340 nm).

Il existe des kits prêts à l'emploi pour mesurer l'ammoniac. Ils sont basés soit sur la réaction précédente (avec la glutamate-déshydrogénase), soit sur la détection des ions ammonium.

- le dosage de la diméthylamine (DMA)

Les méthodes les plus classiques pour déterminer la teneur en DMA dans des échantillons de poisson sont des **méthodes colorimétriques**. Par exemple la méthode de Dyer et Mounsey (1945) qui utilise le diméthylthiocarbamate peut être citée. Ces méthodes colorimétriques présentent l'inconvénient d'être peu précises quand les mélanges de différentes amines sont présents dans les échantillons.

D'autres méthodes un peu plus spécifiques et moins sujettes aux interférences que les méthodes colorimétriques ont été développées. Il s'agit de la **chromatographie gaz-liquide** (chromatographie en phase gazeuse dont la phase stationnaire est liquide) et de la **chromatographie liquide haute performance (HPLC)**. Ces deux méthodes reposent sur le même principe : la séparation des constituants d'un échantillon impliquant l'utilisation d'une phase mobile et d'une phase stationnaire.



- le dosage de la triméthylamine (TMA)

- **méthode AOAC 971.14**

C'est une méthode de détermination colorimétrique.

La TMA est extraite de l'échantillon à tester à l'aide de benzène ou de toluène. Puis, de l'acide picrique est ajouté à cet extrait d'échantillon. La réaction entre la TMA et l'acide picrique va engendrer la formation d'un complexe coloré.

- **distillation d'un extrait acide**

Cette méthode est assez proche de celle décrite dans le règlement CE n°2074/2005 pour la détermination de l'ABVT.

Cependant il y a une étape supplémentaire entre la déprotéinisation de l'échantillon et sa distillation. Il s'agit de l'ajout de formaldéhyde à un pH basique pour bloquer les amines primaires et secondaires.

- **microdiffusion**

Le principe est le même que pour la microdiffusion décrite pour mesurer l'ABVT.

Seulement cette fois-ci, le compartiment extérieur ne contient pas uniquement le filtrat et de l'eau distillée mais également du formaldéhyde. Ensuite, la capsule est tournée afin que le NH_3 et les amines primaires et secondaires soient bloquées avant l'addition de la solution de CO_3K_2 .

- **méthode enzymatique**

Cette méthode a été développée par Wong et Gill en 1997. Elle utilise l'enzyme TMA déshydrogénase, extraite de *Hyphomicrobium X* (bactérie) et purifiée. Elle donne de très bonnes corrélations avec d'autres méthodes parmi lesquelles la méthode HPLC. Les résultats peuvent être déterminés par spectrophotométrie ou par lecture visuelle (comparaison des couleurs).



Les méthodes de dosage multiparamètres

-chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Cette méthode vise à séparer les constituants d'un mélange grâce à la circulation d'un fluide (phase mobile) dans une colonne (phase stationnaire).

Les amines volatiles sont extraites de l'échantillon à tester puis une **dérivatisation*** de ces amines est pratiquée (avant ou après passage dans la colonne). La solution à tester est ensuite injectée dans la colonne où les constituants vont être retenus inégalement en fonction de leur taille et de leur composition. Ils vont donc mettre plus ou moins de temps à la parcourir.

Le fluide est récupéré à la sortie de la colonne où se trouvent un détecteur couplé à un enregistreur. La quantité et le type d'amines volatiles dans le fluide peuvent alors être déterminés (car elles arrivent les unes après les autres dans le récipient).



-chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Cette méthode vise à séparer les constituants d'un mélange grâce à la circulation d'un gaz porteur (phase mobile) dans une colonne (phase stationnaire). Elle permet de déterminer les quantités de DMA et de TMA.

La première étape est l'extraction des amines volatiles (avec de l'acide perchlorique), suivie d'une alcalinisation (par l'ajout d'hydroxyde de potassium) et enfin d'une extraction au toluène (solvant organique). Le mélange est chauffé puis injecté dans la colonne. A la sortie de cette colonne, la détection des amines volatiles se fait grâce à un **détecteur à ionisation de flamme***.

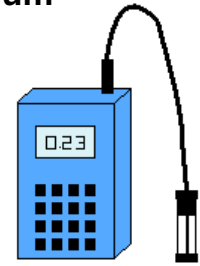


Actuellement, la **chromatographie liquide haute performance** et la **chromatographie en phase gazeuse** sont les méthodes les plus employées pour la détermination des amines volatiles.

-méthode AOAC 999.01 : l'électrode sélective aux ions ammonium

Cette méthode permet de déterminer les quantités de NH_3 et de TMA.

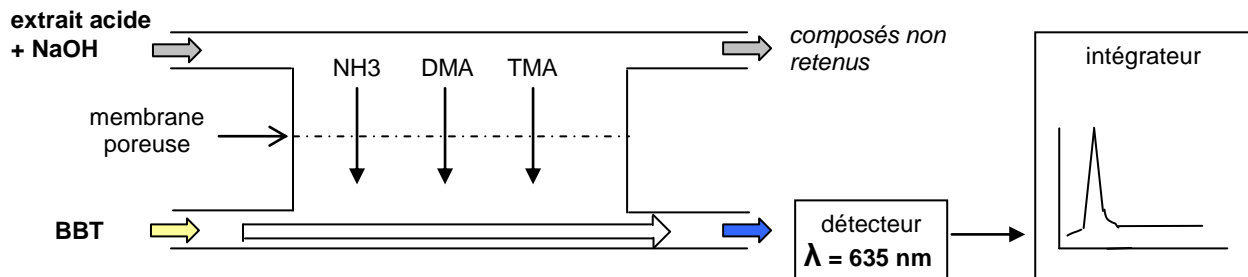
La première étape est la préparation d'un homogénéisat aqueux par broyage puis addition d'eau distillée. Ensuite, l'ajout d'une solution alcaline permet de "libérer" le NH_3 et la TMA. Puis ces bases volatiles passent à travers la membrane hydrophobe des électrodes jusqu'à atteindre un équilibre avec celles-ci. La lecture du résultat se fait sur un ionomètre portable, précalibré avec des solutions ammoniacales de référence et dans lequel a été enregistré le facteur de dilution. Il donne les résultats en $\text{mg NH}_3 / 100 \text{ g}$.



-méthode d'injection à flux continu / diffusion gazeuse (FIGD)

Cette méthode permet de déterminer les quantités d'ABVT et de TMA.

La première étape consiste en une extraction des amines volatiles avec de l'acide perchlorique ou trichloroacétique. Ensuite cet extrait acide est injecté dans l'appareil avec d'autres réactifs : l'hydroxyde de sodium (NaOH) qui permet de "libérer" les amines volatiles et le bleu de bromothymol (BBT) qui va permettre de détecter la présence d'amines volatiles par un changement de couleur (à cause de la hausse du pH). Pour obtenir le résultat, l'absorbance à 635 nm est mesurée.



(d'après Baixas-Nogueras et al., 2001)

Pour déterminer la quantité de TMA présente, il faut ajouter une solution de formaldéhyde à l'extrait acide pour "piéger" le NH_3 et la DMA. Ainsi, suite à l'addition de NaOH, seule la TMA se volatilise et sera dissoute dans le bleu de bromothymol.



Les résultats des analyses dépendent largement de la méthode employée
=> **toujours préciser avec quelle méthode les résultats ont été obtenus.**

Bibliographie

Antonacopoulos N., Vyncke W. (1989). Determination of volatile basic nitrogen in fish : a third collaborative study by West European Fish Technologists' Association (WEFTA). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A* **189** : 309-316.

Baixas-Nogueras S., Bover-Cid S., Vidal-Carou M.C., Veciana-Nogués M.T. and Mariné-Font A. (2001). Trimethylamine and total volatile basic nitrogen determination by flow injection/gas diffusion in Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49** (4) : 1681-1686.

Ellis P.C., Pivarnik L.F., Thiam M. (2000). Determination of volatile bases in seafood using the ammonia ion selective electrode : collaborative study. *Journal of AOAC International* **83** (4) : 933-943.

Etienne M. (2005). Traceability - Project 6.3 - Valid - Methods for chemical quality assessment - Volatile amines as criteria for chemical quality assessment. European Project SeaFoodPlus. 21 p.

Huss H. H. (1999). La qualité et son évolution dans le poisson frais. FAO Documents Techniques sur les Pêches - T 348. Rome : 196 p.

Malle P., Tao S. (1987). Rapid quantitative determination of trimethylamine using steam distillation. *Journal of Food Protection* **50** (9) : 756-760.

Malle P., Vanelle A.M., Petit A. (1989). Teneur en azote basique volatil total du tissu musculaire des poissons marins - Eléments pour une normalisation de la détermination, de l'expression et de l'exploitation de l'ABVT. *Recueil de Médecine Vétérinaire* **165** (4) : 395-402.

Ruiz-Capillas C., Horner W.F.A. (1999). Determination of trimethylamine nitrogen and total volatile basic nitrogen in fresh fish by flow injection analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79** (14) : 1982-1986

Sadok S., Uglow R.F. and Haswell S.J. (1996). Determination of trimethylamine in fish by flow injection analysis. *Analytica Chimica Acta* **321** : 69-74.

Veciana-Nogues M.T., Albala-Hurtado M.S., Izquierdo-Pulido M., Vidal-Carou M.C. (1996). Validation of a gas-chromatographic method for volatile amine determination in fish sample. *Food Chemistry* **57** (4) : 569-573.

Wong K., Gill T.A. (1987). Enzymatic determination of trimethylamine and its relationship to fish quality. *Journal of Food Science* **52** (1) : 1-3.