

# Les principales méthodes de dosage de l'histamine



## Les méthodes de séparation

### - **Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)** Méthode de référence pour l'Union Européenne

#### **Principe :**

Comme toutes les chromatographies, cette méthode vise à séparer les constituants d'un mélange et repose sur l'utilisation d'une phase mobile et d'une phase stationnaire. La HPLC repose sur la circulation d'un fluide (phase mobile) dans une colonne (phase stationnaire).

Les **amines biogènes\*** sont extraites de l'échantillon à tester puis on pratique une **dérivatisation\*** de ces amines (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. On peut alors déterminer la quantité et le type de constituants dans le fluide (car ils arrivent les uns après les autres dans le récipient) à l'aide de méthodes de mesure précises, en général par fluorimétrie.

Les résultats sont exprimés en mg d'histamine / kg.

#### **Avantages :**

Cette méthode est très précise, sensible et reproductible.

#### **Inconvénients :**

Cette méthode nécessite un équipement sophistiqué (donc cher) et du personnel spécifiquement formé à ce matériel.



### - **Méthode AOAC 977.13**

Méthode de référence pour les Etats-Unis et le *Codex Alimentarius*

#### **Principe :**

L'histamine est extraite de l'échantillon avec une solution de méthanol à 75%. L'extrait méthanolique est passé dans une colonne échangeuse d'ions puis l'histamine éluée est complexée avec de l'orthophthaldialdéhyde (OPT), dérivé fluorescent.

Le résultat est mesuré par fluorimétrie.

#### **Avantages :**

Cette méthode est très précise, sensible et reproductible.

#### **Inconvénients :**

Cette méthode est longue à mettre en œuvre et elle doit être effectuée par des analystes expérimentés.



## - Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

### Principe :

Comme toutes les chromatographies, cette méthode vise à séparer les constituants d'un mélange et repose sur l'utilisation d'une phase mobile et d'une phase stationnaire. Dans ce cas, la phase stationnaire est une colonne et la phase mobile est un gaz porteur.

Les amines biogènes sont extraites du produit à tester (avec du méthanol alcalin), puis le mélange est décomposé par chauffage à l'entrée de la colonne. A la sortie de cette colonne, la détection se fait grâce à un **détecteur à ionisation de flamme\***.

### Avantages :

Cette méthode est très précise, reproductible, sensible et rapide (10 minutes par échantillon).

### Inconvénients :

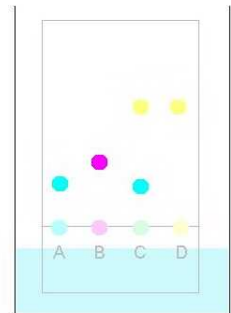
Cette méthode nécessite un équipement sophistiqué (donc cher) et du personnel spécifiquement formé à ce matériel.

## - Chromatographie sur couche mince (CCM ou TLC)

### Principe :

Comme toutes les chromatographies, cette méthode vise à séparer les constituants d'un mélange et repose sur l'utilisation d'une phase mobile et d'une phase stationnaire. Dans ce cas, la phase stationnaire est un adsorbant (gel de silice souvent) et la phase mobile est un solvant.

L'histamine est extraite avec un solvant puis les différents composants du fluide vont migrer plus ou moins en fonction de leur solubilité dans le solvant et de leur affinité pour le gel de silice. Les "tâches" de migration apparaissent grâce à des molécules révélatrices d'acides aminés. La lecture des résultats se fait soit à l'aide d'un densitomètre, soit en comparant les fronts de migration des échantillons au standard.



### Avantages :

Cette méthode permet de tester plusieurs échantillons en même temps, elle est peu onéreuse, ne nécessite pas de matériel très spécifique et permet d'écarter les échantillons négatifs et de garder les autres pour d'éventuelles analyses plus précises.

### Inconvénients :

Le seuil de détection de la présence d'histamine par cette méthode est relativement haut (50 mg/kg) et certains des réactifs employés sont toxiques.

## - Chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC)

### Principe :

Comme toutes les chromatographies, cette méthode vise à séparer les constituants d'un mélange et repose sur l'utilisation d'une phase mobile et d'une phase stationnaire. Dans ce cas, la phase stationnaire est un adsorbant (gel de silice souvent) et la phase mobile est un solvant.

Les amines biogènes sont extraites avec un solvant puis les différents composants du fluide vont migrer plus ou moins en fonction de leur solubilité dans le solvant et de leur affinité pour la gel de silice. La quantification du résultat se fait dans ce cas par densitométrie UV.

### Avantages :

Cette méthode est très précise, sensible, reproductible, rapide (car elle permet d'analyser plusieurs échantillons à la fois), elle ne nécessite pas d'instruments sophistiqués (elle est donc peu onéreuse).

### Inconvénients :

Les résultats de cette méthode n'ont pas encore été évalués par un test inter-laboratoires et certains des réactifs employés sont toxiques.



## Analyse par injection en flux continu (FIA)

### Principe :

De petits échantillons – de l'ordre du  $\mu\text{l}$  – sont injectés dans une solution en mouvement contenant un réactif (coloré, fluorescent, ...) spécifique à l'histamine. En fonction du type de réactif, la quantité d'histamine peut être déterminée par des mesures d'absorbance, ou de fluorescence, ...

### Avantages :

Cette méthode est très rapide (une minute par échantillon pour avoir une évaluation quantitative).

### Inconvénients :

Cette méthode nécessite un équipement sophistiqué (donc cher) et du personnel spécifiquement formé à ce matériel.

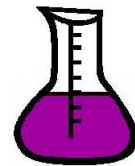


## Les méthodes enzymatiques

### Principe :

Comme leur nom l'indique, ces méthodes font appel à l'action d'enzymes. Une première enzyme - la diamine oxydase (DAO) – va agir sur l'histamine, entraînant une production de peroxyde d'hydrogène. Puis, l'addition d'une 2ème enzyme - une peroxidase - en présence du peroxyde d'hydrogène et d'un leuco-cristal violet (incolore), va faciliter l'oxydation du leuco-cristal en cristal violet (composé coloré).

L'intensité de la coloration violette est donc proportionnelle à la quantité d'histamine contenue dans l'échantillon. La lecture du résultat peut se faire par spectrophotométrie pour obtenir un résultat quantitatif.



### Avantages :

Cette méthode est rapide (variation du temps d'incubation de la réaction enzymatique entre 20 minutes et 2h en fonction de la procédure et possibilité d'analyser simultanément plusieurs échantillons) et les résultats offrent une bonne corrélation avec la méthode AOAC fluorimétrique.

### Inconvénients :

La première enzyme (DAO) réagit avec d'autres amines quand elles sont présentes en grande quantité. Cette méthode tendrait donc à surestimer la quantité d'histamine mais dans des proportions inférieures à 10 mg /kg.

Certains réactifs nécessitent d'être stockés à  $-20^{\circ}\text{C}$  ou entre 0 et  $4^{\circ}\text{C}$ .



## Les méthodes immuno - enzymatiques : les kits de dosage.

### Principe :

Comme leur nom l'indique, ces méthodes font intervenir des enzymes et des anticorps. Des kits de dosage de l'histamine prêts à l'emploi sont commercialisés par des sociétés spécialisées.

Ces méthodes reposent sur la mise en compétition de l'histamine contenue dans l'échantillon à doser et d'une enzyme marquée avec une molécule colorée (chromogène), tous deux susceptibles de se lier avec des anticorps spécifiques fixés sur les parois des puits des kits. Après incubation, les puits sont rincés pour arrêter la réaction.

La coloration obtenue est inversement proportionnelle à la quantité d'histamine contenue dans l'échantillon. Le résultat peut être lu directement en utilisant une courbe standard ou par spectrophotométrie.

Des instructions spécifiques sont fournies avec chaque outil.



**Avantages :**

Cette méthode est rapide (variation du temps d'incubation de la réaction enzymatique entre 15 minutes et 2h15 en fonction de la procédure) et permet d'analyser simultanément plusieurs échantillons.

**Inconvénients :**

Certains réactifs nécessitent d'être stockés à - 20°C ou entre 0 et 4°C.

-----

## Bibliographie

Etienne M. (2006). Traceability - Project 6.3 - valid "Methodology for histamine and biogenic amines analysis". European Project SeaFoodPlus. 20 p.

Etienne M., Léglise M. (2001). Dosage de l'histamine dans les produits de la mer – Méthodes officielles. Document de travail pour la commission V 45 de l'AFNOR – Produits transformés. Ifremer, Département Valorisation des Produits, Nantes. 2 p + annexes.