

**anses**

agence nationale de sécurité sanitaire  
alimentation, environnement, travail



*Connaître, évaluer, protéger*

**Méthode d'analyse en sécurité sanitaire des aliments**

**RÉFÉRENCE : ANSES/LSAliments/LSA-INS-0017- Version 12b**

Mai 2018

# Dosage de l'histamine et des amines biogènes par chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

**Laboratoire de sécurité des aliments – site de Boulogne sur mer**  
**Laboratoire national de référence Histamine dans les produits de la pêche et de l'aquaculture**

Le présent document est, sous sa forme électronique, mis à la disposition des utilisateurs en tant que méthode d'analyse. Ce document est la propriété de l'Anses. Toute reproduction, qu'elle soit totale ou partielle, n'est autorisée qu'à la condition expresse que la source soit citée, par exemple en faisant mention de sa référence (incluant sa version et année) et de son titre.



## Historique de la méthode

Une méthode peut être mise à jour afin de prendre en compte des modifications.

*Une modification est considérée comme majeure* dès lors qu'elle concerne des parties clés ou le fond même de la méthode, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Une modification majeure induit en général des adaptations importantes. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation.

*Une modification est considérée comme mineure* si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Les caractéristiques de performance de la méthode ainsi améliorée ne sont pas modifiées; elle n'a pas fait l'objet d'une nouvelle validation. Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la présente méthode.

Version	Nature des modifications	Date	Principales modifications
V1		01/08/08	Version initiale
V2	Mineure	19/02/09	<ul style="list-style-type: none"><li>Précision sur les précautions sécurité</li><li>Précision du domaine d'application</li></ul>
V3	Mineure	16/03/09	<ul style="list-style-type: none"><li>Ajout de la réalisation en double des analyses</li><li>Précisions sur l'expression des résultats</li><li>Ajout de contrôles sur la droite étalonnage</li></ul>
V4	Mineure	07/04/09	<ul style="list-style-type: none"><li>Précision du domaine application</li></ul>
V5	Mineure	27/01/10	<ul style="list-style-type: none"><li>Précision sur la préparation des solutions</li><li>Ajout écart de répétabilité pour les valeurs &gt;250 mg.kg<sup>-1</sup></li></ul>
V6	Mineure	12/04/10	<ul style="list-style-type: none"><li>Précision de la balance</li></ul>
V7	Mineure	14/09/10	<ul style="list-style-type: none"><li>Ajout de prise essai moindre pour les échantillons fortement contaminés</li></ul>
V8	Mineure	10/10/11	<ul style="list-style-type: none"><li>Ajout de la possibilité d'interruption de la manipulation pendant 1 semaine maximum</li><li>Ajout de précision pour les points de vérification</li><li>Ajout d'un point de gamme étalon (0 mg.kg<sup>-1</sup>)</li><li>Précision sur le mode de conservation des réactifs</li></ul>
V9	Mineure	10/10/12	<ul style="list-style-type: none"><li>Précision sur les différents points de contrôle</li><li>Mise à jour des unités (ppm en mg.kg<sup>-1</sup>)</li><li>Ajout d'unité des balances et des valeurs limites</li><li>Précision sur la nature de la putrescine</li></ul>
V10	Mineure	15/01/13	<ul style="list-style-type: none"><li>Ajout du critère d'acceptabilité du R<sup>2</sup> (R<sup>2</sup>&gt;0,99)</li></ul>
V11	Mineure	15/06/16	<ul style="list-style-type: none"><li>Mise au format Anses</li></ul>
V12	Mineure	03/04/18	<ul style="list-style-type: none"><li>Modifications de forme</li></ul>



## **Avant-propos**

La présente méthode a été développée par :

**Anses - Laboratoire de sécurité des aliments**

**Département des produits de la pêche et de l'aquaculture**

**Site de Boulogne sur mer**

Laboratoire National de Référence Histamine dans les produits de la pêche et de l'aquaculture

Adresse : Boulevard du Bassin Napoléon - 62200 Boulogne sur mer

Contacts : - Duflos Guillaume (responsable LNR)

- Inglebert Gaëlle (suppléante)



## Sommaire

Avant-propos .....	3
Introduction.....	5
Avertissements et précautions de sécurité .....	5
1     Objet et domaine d'application .....	6
2     Documents de référence .....	6
3     Réglementation.....	6
4     Principe de la méthode .....	7
5     Réactifs.....	7
5.1   Solvants et phases mobiles .....	7
5.2   Produits chimiques .....	7
5.3   Solution étalon.....	8
6     Matériels et appareillage.....	9
6.1   Matériels .....	9
6.2   Appareillage .....	9
7     Échantillon .....	10
8     Mode opératoire.....	10
8.1   Préparation des échantillons pour analyse .....	10
8.2   Extraction .....	11
8.3   Dérivation .....	11
8.4   Purification .....	11
9     Résultats .....	12
9.1   Courbe d'étalonnage.....	12
9.2   Injection des échantillons .....	13
9.3   Contrôle de la validité des résultats .....	13
9.4   Calculs et expression des résultats .....	13
10    Caractéristiques de performance de la méthode.....	15
Annexe A .....	16
Annexe B .....	17
Bibliographie.....	19



## Introduction







La détérioration du poisson est due à plusieurs réactions enzymatiques et activités bactériennes. Ces réactions découlent sur la formation d'amines biogènes (amines non volatiles). On les définit comme des molécules biologiquement actives sur le système nerveux central et le système vasculaire. L'histamine provient de la décarboxylation de l'histidine par des décarboxylases microbiennes. Elle est produite plus particulièrement chez les Scombridae (thon, maquereau) et chez certains Clupeidae (hareng, sardine), Engraulidae, Coryfenidae, Pomatomidae et Scombresosidae qui contiennent naturellement un taux d'histidine plus élevé que les autres espèces.

## Avertissements et précautions de sécurité

**Il convient que l'utilisateur de la présente méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité, et de s'assurer de la conformité à la réglementation en vigueur.**

**Il est essentiel que les manipulations conduites conformément à la présente méthode soient exécutés par du personnel ayant reçu une formation appropriée.**

Tableau 1 : Principaux risques des produits chimiques utilisés dans ce protocole.

Produits Chimiques	Mentions de dangers	Risques
Acétone 	H225-H319-H336	- Inflammable - Irritation oculaire - Toxicité spécifique pour certains organes cibles
Acide perchlorique (HClO <sub>4</sub> ) 	H271-H314	- Inflammable - Corrosif - Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires
1,3-diaminopropane dihydrochloride 	H301-H311-H315-H319-H331-H335	- Corrosif - Toxique - Irritations cutanées
Carbonate de sodium (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) 	H319	- Irritations oculaires
Chlorure de Dansyl 	H314	- Corrosif - Brûlures/ Irritations cutanées
Toluène <b>CMR</b> 	H225-H304-H315-H336-H361d-H373	- Inflammable - Toxique - Cancérogène - Peut nuire au fœtus



## 1 Objet et domaine d'application

Ce mode opératoire décrit principalement la méthode de dosage de l'histamine par HPLC dans les poissons et produits à base de poisson. Il peut aussi être appliqué aux dosages des amines biogènes (putrescine, cadavérine, tyramine, spermidine et spermine).

## 2 Documents de référence

RÈGLEMENT (CE) No 2073/2005 DE LA COMMISSION du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires.

RÈGLEMENT (CE) No 1441/2007 DE LA COMMISSION du 5 décembre 2007 modifiant le règlement (CE) No 2073/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires.

RÈGLEMENT (UE) No 1019/2013 DE LA COMMISSION du 23 octobre 2013 modifiant l'annexe I du règlement (CE) No 2073/2005 en ce qui concerne l'histamine dans les produits de la pêche.

## 3 Réglementation

- Concernant les Scombridae, Clupeidae, Engraulidae, Coryfenidae, Pomatomidae et Scombrosidae, la qualité des produits est considérée comme satisfaisante lorsque les exigences suivantes sont remplies pour un lot de 9 échantillons :
  - la valeur moyenne observée doit être inférieure ou égale à  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$ ,
  - un maximum de 2 valeurs peuvent se situer entre  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  et  $200 \text{ mg.kg}^{-1}$ ,
  - aucune valeur observée ne peut dépasser la limite  $200 \text{ mg.kg}^{-1}$ .
- Concernant les produits ayant subi une maturation enzymatique, la qualité des produits est considérée comme satisfaisante lorsque les exigences suivantes sont remplies pour un lot de 9 échantillons :
  - la valeur moyenne observée doit être inférieure ou égale à  $200 \text{ mg.kg}^{-1}$ ,
  - un maximum de 2 valeurs peuvent se situer entre  $200 \text{ mg.kg}^{-1}$  et  $400 \text{ mg.kg}^{-1}$ ,
  - aucune valeur observée ne peut dépasser la limite  $400 \text{ mg.kg}^{-1}$ .
- Des échantillons uniques peuvent être prélevés au niveau de la vente au détail. En pareil cas, la limite à considérer est de  $200 \text{ mg.kg}^{-1}$  pour les produits n'ayant pas subi de maturation enzymatique et  $400 \text{ mg.kg}^{-1}$  pour les produits ayant subi une maturation enzymatique.
- Concernant les sauces de poisson produites par fermentation de produits de la pêche et dans le cas d'un échantillon unique : la qualité est satisfaisante lorsque la valeur observée est inférieure ou égale à  $400 \text{ mg.kg}^{-1}$ .



## 4 Principe de la méthode

Cette méthode permet de séparer et quantifier l'histamine et les autres amines biogènes. L'extraction se fait par l'acide perchlorique. Après complexation avec le chlorure de dansyl et neutralisation par la proline, l'histamine et les autres amines biogènes sont séparées sur une colonne C<sub>18</sub> utilisant un gradient d'élution eau/acétonitrile avec une détection à 254 nm. La quantité d'amine biogène (mg.kg<sup>-1</sup>) est calculée à l'aide du rapport de l'aire de l'amine sur l'aire du standard interne et du coefficient de régression linéaire propre à cette amine.

## 5 Réactifs

**Avertissement : des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.**

### 5.1 Solvants et phases mobiles

- Acétone (pureté 100%)
- Acétonitrile, de qualité HPLC ou supérieure
- Eau, de qualité HPLC ou supérieure
- Toluène, de qualité HPLC

### 5.2 Produits chimiques

- Azote
- Acide perchlorique (HClO<sub>4</sub>) à 0,2 M

Exemple de préparation pour 1 L :

- solution à 65% : 19,5 mL qsp 1L d'eau bidistillée
- solution à 70% : 17,2 mL qsp 1L d'eau bidistillée.

Cette solution se conserve à température ambiante et peut être utilisée pendant 6 mois.

- Standard interne de 1,3-diaminopropane dihydrochloride à 0,8 mg.mL<sup>-1</sup>

Exemple de préparation pour 50 mL :

Peser une quantité de 0,040 g à 0,001 g près de 1,3-diaminopropane dihydrochloride qsp 50 mL avec de l'eau bidistillée.

Cette solution se conserve à 5 ± 3°C et peut être utilisée pendant 3 semaines.

- Carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) saturé

Exemple de préparation pour 150 mL :

Dissoudre jusqu'à complète saturation 110 g à 0,1 g près de carbonate de sodium dans environ 150 ml d'eau bidistillée.



Cette solution se conserve à  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  et peut être utilisée pendant 3 mois

- Chlorure de dansyl à  $7,5 \text{ mg.mL}^{-1}$

Exemple de préparation pour 50 mL :

Peser 0,375 g à 0,001 g près de chlorure de dansyl dans 50 mL d'acétone.

Cette solution se conserve à une température de  $-21 \pm 3^\circ\text{C}$  à l'abri de la lumière et peut être utilisée pendant 3 semaines.

- L-Proline à  $100 \text{ mg.mL}^{-1}$

Exemple de préparation pour 10 mL :

Peser 1 g à 0,001 g près de L-Proline dans 10 mL avec de l'eau bidistillée.

Cette solution se conserve à  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  et peut être utilisée pendant 3 semaines.

### 5.3 Solution étalon

- Solution étalon d'amines biogènes à  $250 \text{ mg.kg}^{-1}$

Le tableau 2 montre un exemple de préparation d'une solution mère-étalon multi-amines biogènes à partir de produits disponibles dans le commerce et tenant compte de la pureté fournie par le fabricant. Peser séparément une quantité à 0,001 g près de chaque amine biogène (putrescine dihydrochloride, cadavérine dihydrochloride, histamine dihydrochloride, tyramine hydrochloride, spermidine trihydrochloride, spermine tetrahydrochloride) puis ajouter l'ensemble de ces pesées dans une fiole jaugée de 50 mL et compléter avec de l'eau bidistillée.

Après avoir aliquoter la solution, elle peut se conserver à une température de  $-21 \pm 3^\circ\text{C}$  et peut être utilisée pendant 1 an.

Tableau 2 : Exemple de préparation de solution étalon d'amines biogènes

Amines	Masse molaire amine complexée sous forme « hydrochloride » ( $\text{g.mol}^{-1}$ )	Masse molaire Amine seule ( $\text{g.mol}^{-1}$ )	Pureté * théorique de l'amine (%)	Masse théorique à peser pour la préparation de la solution mère (g) QSP 50 mL
Putrescine	161,1	88,1	54,69	0,5705
Cadavérine	175,1	102,1	58,31	0,5351
Histamine	184,07	111,07	60,34	0,5170
Tyramine	173,4	137,9	79,53	0,3923
Spermidine	254,6	145,1	56,99	0,5475
Spermine	348,2	202,2	58,07	0,5373

\* : Le calcul ne tient pas compte de la pureté liée à la préparation des produits mentionnée dans le certificat de contrôle du fournisseur.





## 6 Matériels et appareillage

**Avertissement :** des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

### 6.1 Matériels

Utiliser la verrerie et le matériel courant de laboratoire, en particulier, ce qui suit :

- Mixeur (broyeur ménager)
- Balances avec une précision à 0,1 g et 0,001 g
- Tubes à centrifuger avec bouchons
- Pipette jaugée de 10 mL
- Pipettes automatiques de 20-200 µL et 100-1000 µL
- Homogénéisateur (Ultra-Turrax) avec tiges métalliques
- Centrifugeuse réfrigérée (atteignant 7000g et 4°C)
- Tubes pyrex de 10 mL
- Vortex
- Bain marie à  $60 \pm 1^\circ\text{C}$  avec couvercle
- Congélateur
- Evaporateur à flux gazeux
- Seringues 2 mL
- Aiguilles 20 G 0,9 mm
- Filtres de 0,2 µm
- Flacons, vials, inserts, capuchons
- Chromatographe en phase liquide, système capable d'analyse en mode gradient
- Colonne C<sub>18</sub> 5 µm, 100 Å (25 cm x 4.6 mm) colonne phase inverse

### 6.2 Appareillage

Les conditions chromatographiques peuvent être adaptées aux conditions de chaque laboratoire.

Le tableau 3 présente des conditions chromatographiques qui se sont révélées efficaces pour la séparation des 7 amines biogènes.

Tableau 3 : Conditions de LC convenables pour l'analyse des amines biogènes avec une colonne C<sub>18</sub>

<b>Colonne</b>	Kromasil C <sub>18</sub> , 250 mm x 4,6 mm 5 µm 100 Å		
<b>Débit</b>	1 mL.min <sup>-1</sup>		
<b>Volume d'injection</b>	20 µL		
<b>Température four colonne</b>	25°C		
<b>Température passeur échantillon</b>	4°C		
<b>Gradient</b>	<b>Temps (min)</b>	<b>Phase mobile A Eau(%)</b>	<b>Phase mobile B Acétonitrile(%)</b>
	0	40 %	60 %
	11	25 %	75 %
	11,1	5 %	95 %
	20	5 %	95 %
	20,1	40 %	60 %

## 7 Échantillon

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport ou de l'entreposage.

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode décrite dans ce protocole.

## 8 Mode opératoire

### 8.1 Préparation des échantillons pour analyse

Pour un échantillonnage représentatif, au moins 50 g de tissus rassemblés doivent être homogénéisés dans un broyeur. Le tableau 4 propose différentes recommandations de préparation des échantillons.

Peser exactement 5 g à 0,1 g près dans un tube à centrifuger.



Tableau 4 : Recommandations de préparation de différents types d'échantillons avant la pesée

Types d'échantillons	Préparation
Farines	Les amines biogènes sont plus concentrées dans les farines, il peut être conseillé d'utiliser une quantification par la méthode des ajouts dosés ou peser une quantité de 1g.
Conserves de poissons au naturel	Éliminer le jus de la conserve et égoutter, puis procéder à la pesée.
Conserves de poissons à l'huile ou en sauce de type sardines à l'huile de tournesol ou à la tomate	Éliminer le maximum d'huile ou de sauce en épongeant le poisson avec du papier absorbant, puis procéder à la pesée.
Plats cuisinés de type salade de thon	Ne garder que les morceaux de poisson, éliminer le reste des ingrédients et éponger le poisson, puis procéder à la pesée.
Sauces de poisson	Agiter correctement la sauce avant de prélever les 5g nécessaires, puis procéder à la pesée.
Poissons entiers	Eviscérer, lever les filets et enlever la peau, puis procéder à la pesée.

## 8.2 Extraction

Ajouter 10 mL d'acide perchlorique à 0,2 M et 100  $\mu\text{L}$  de 1,3-diaminopropane à 0,8  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . L'ensemble est broyé à l'Ultra Turrax jusqu'à homogénéisation complète. Centrifuger le tube à 7000g à 4°C pendant 5 minutes.

## 8.3 Dérivation

*A partir de cette étape, on conduit l'analyse sur deux répétitions.*

Prélever 100 $\mu\text{L}$  de surnageant (l'excédent du surnageant est conservé à  $-21 \pm 3^\circ\text{C}$ ), ajouter 300  $\mu\text{L}$  de carbonate de sodium saturé et 400  $\mu\text{L}$  de chlorure de dansyl à 7,5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  dans un tube fermé hermétiquement.

Vortexer et incuber au bain-marie pendant 5 minutes à  $60 \pm 1^\circ\text{C}$  à l'obscurité.

Refroidir le tube sous un courant d'eau froide et ajouter 100  $\mu\text{L}$  de proline à 100  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Vortexer et placer le tube à l'obscurité pendant 15 minutes.

## 8.4 Purification

Ajouter 500  $\mu\text{L}$  de toluène sous hotte, vortexer, et laisser au congélateur à  $-21 \pm 3^\circ\text{C}$  pendant au moins 30 minutes.



**Interruption possible de la manipulation à ce stade pendant une semaine maximum si stockage à une température de  $-21 \pm 3^\circ\text{C}$**

Récupérer la phase organique non congelée (contenant l'histamine ou les amines biogènes dérivées) dans un second tube.

Évaporer totalement le liquide sous un flux d'azote, sous hotte.



Ajouter 200  $\mu\text{L}$  d'acétonitrile et vortexer. Filtrer la solution (aiguille + filtre + seringue) dans un insert pour injection. Placer le flacon sur le rack de l'injecteur automatique pour effectuer l'analyse chromatographique.

Les échantillons dans l'attente du calcul des résultats sont stockés à  $-21 \pm 3^\circ\text{C}$ .

Le schéma du protocole est présenté en annexe B.

## 9 Résultats

### 9.1 Courbe d'étalonnage

Utiliser une courbe d'étalonnage à chaque jour d'analyse.

Afin de préparer cette gamme d'étalonnage en 5 points (0, 25, 50, 100 et 250  $\text{mg.kg}^{-1}$ ), il faut prendre une matrice saine (par exemple du thon non contaminé contrôlé au préalable si l'échantillon à analyser est du thon) puis ajouter pendant l'étape d'extraction mais avant la centrifugation un volume, comme décrit dans le tableau 5, de solution de étalon d'amines biogènes.

Tableau 5 : Ajout de solution standard

VOLUME	CONCENTRATIONS
0 $\mu\text{L}$	0 $\text{mg.kg}^{-1}$
20 $\mu\text{L}$	25 $\text{mg.kg}^{-1}$
40 $\mu\text{L}$	50 $\text{mg.kg}^{-1}$
80 $\mu\text{L}$	100 $\text{mg.kg}^{-1}$
200 $\mu\text{L}$	250 $\text{mg.kg}^{-1}$

Tracer la droite de régression linéaire de type  $Y=a*x$  à partir des concentrations et du rapport d'aires (Figure 1).

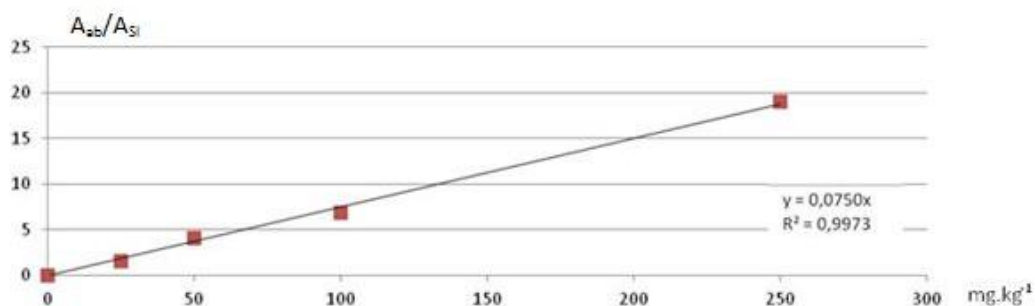


Figure 1 : Exemple de droite de calibration



## 9.2 Injection des échantillons

Pour analyser un échantillon, la séquence d'injection suivante peut être utilisée :

- Une injection de blanc analytique (dans le cas présent l'acétonitrile) ;
- Une première injection de chaque niveau de concentration de la gamme étalon en commençant par la concentration la plus basse pour finir par la concentration la plus élevée ;
- Une injection des échantillons ;
- Une injection d'un point de la gamme étalon que l'on nomme point de vérification ;
- Une injection de blanc analytique (dans le cas présent l'acétonitrile).

## 9.3 Contrôle de la validité des résultats

Vérifier que la droite d'étalonnage suit une régression linéaire. Calculer la droite de calibration. Le coefficient directeur,  $a$ , de la gamme étalon doit être compris entre 0,06 et 0,11 et le coefficient de détermination,  $R^2$ , doit être supérieur ou égal à 0,99. Les deux répétitions ne doivent pas différer de 5  $\text{mg.kg}^{-1}$  pour les valeurs inférieures à 250  $\text{mg.kg}^{-1}$ .

## 9.4 Calculs et expression des résultats

L'identification des pics s'effectue à l'aide du chromatogramme de référence présenté en annexe A. Pour s'affranchir des légères variations de temps de rétention, une vérification systématique est effectuée pour chaque échantillon en utilisant les chromatogrammes de la gamme d'étalonnage associée aux échantillons.

La quantification de chaque amine biogène est déterminée par une méthode d'étalonnage interne. Par conséquent, la concentration de l'histamine et des amines biogènes dans chaque échantillon est calculée à partir de la courbe d'étalonnage, à l'aide de l'équation suivante :

$$Q_{ab} (\text{mg.kg}^{-1}) = (A_{ab} / A_{SI}) / a \times D$$

Où:  $Q_{ab}$  : concentration de l'amine biogène

$A_{ab}$  : aire de l'amine biogène

$A_{SI}$  : aire du standard interne (1,3 diaminopropane dihydrochloride)

$a$  : coefficient de la droite de régression linéaire de l'amine

$D$  : facteur de dilution (si la prise d'essai est inférieure à 5 g Tableau 6)

Les résultats sont rendus sans décimale.

Après une première analyse, si les échantillons ont une concentration supérieure à 250  $\text{mg.kg}^{-1}$ , ils seront à nouveau analysés (à partir du broyat initial) selon le même mode opératoire mais avec une prise d'essai moindre telle que décrit dans le tableau 6.



Tableau 6 : Exemple de dilution d'un échantillon concentré

Concentration à la 1 <sup>ère</sup> analyse	Prise d'essai	Facteur de dilution D
Entre 250 et 500 mg.kg <sup>-1</sup>	2 g	2,5
Entre 500 et 1000 mg.kg <sup>-1</sup>	1 g	5
Supérieure à 1000 mg.kg <sup>-1</sup>	0,5 g	10

Les résultats seront donnés en appliquant le facteur de dilution comme décrit précédemment. Si les résultats sont toujours supérieurs à 250 mg.kg<sup>-1</sup> après une prise d'essai de 0,5 g les résultats seront rendus sous la forme >2500 mg.kg<sup>-1</sup>.

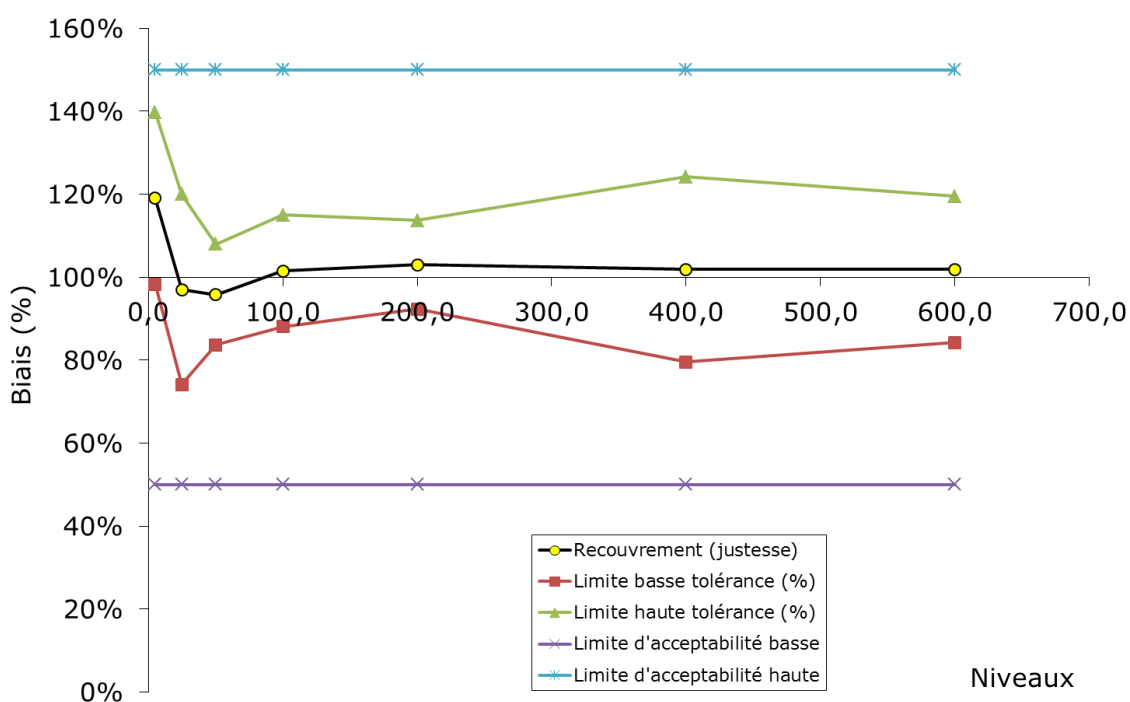
NB : Pour les matrices complexes, la méthode de quantification par ajouts dosés peut être utilisée directement à l'aide des concentrations de la gamme d'étalonnage proposée (Tableau 5).



## 10 Caractéristiques de performance de la méthode

Le profil d'exactitude pour l'histamine a été établi lors d'une étude de validation intra-laboratoire de la méthode, menée selon la Norme AFNOR NF V03-110 [4]. Il est donné à titre indicatif.

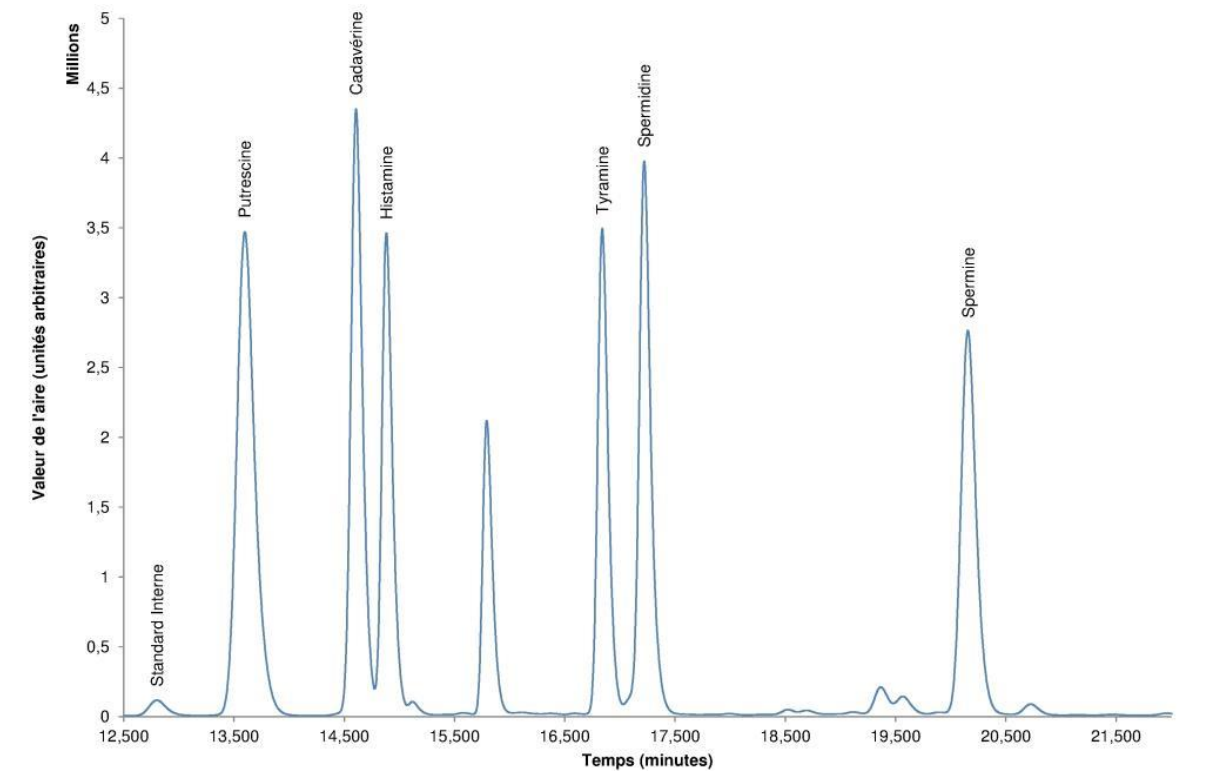
Profil d'exactitude							
Probabilité tolérance (bêta)	80%						
Limite d'acceptabilité	50%						
Niveaux	1	2	3	4	5	6	7
Valeur cible	5,000	25,000	50,000	100,000	200,000	400,000	600,000
Moyenne niveau	5,950	24,250	47,900	101,500	206,000	407,400	611,250
Ecart-type de fidélité (sFI)	0,714	4,210	4,225	8,563	14,605	53,182	65,481
Coefficient intermédiaire	1,060	1,025	1,056	1,085	1,064	1,101	4,951
Nombre de degrés liberté	10,380	18,750	11,197	5,802	9,428	4,153	4,951
Valeur basse tolérance	4,914	18,519	41,822	88,058	184,587	318,154	505,491
Valeur haute tolérance	6,986	29,981	53,978	114,942	227,413	496,646	717,009
Biais absolu	0,950	-0,750	-2,100	1,500	6,000	7,400	11,250
Recouvrement (justesse)	119,00%	97,00%	95,80%	101,50%	103,00%	101,85%	101,88%
Limite basse tolérance (%)	98,29%	74,08%	83,64%	88,06%	92,29%	79,54%	84,25%
Limite haute tolérance (%)	139,71%	119,92%	107,96%	114,94%	113,71%	124,16%	119,50%
Limite d'acceptabilité basse	50,00%	50,00%	50,00%	50,00%	50,00%	50,00%	50,00%
Limite d'acceptabilité haute	150,00%	150,00%	150,00%	150,00%	150,00%	150,00%	150,00%
Incertitude relative	30,27%	34,51%	17,85%	18,58%	15,53%	29,27%	23,84%





## Annexe A

- Chromatogramme de référence

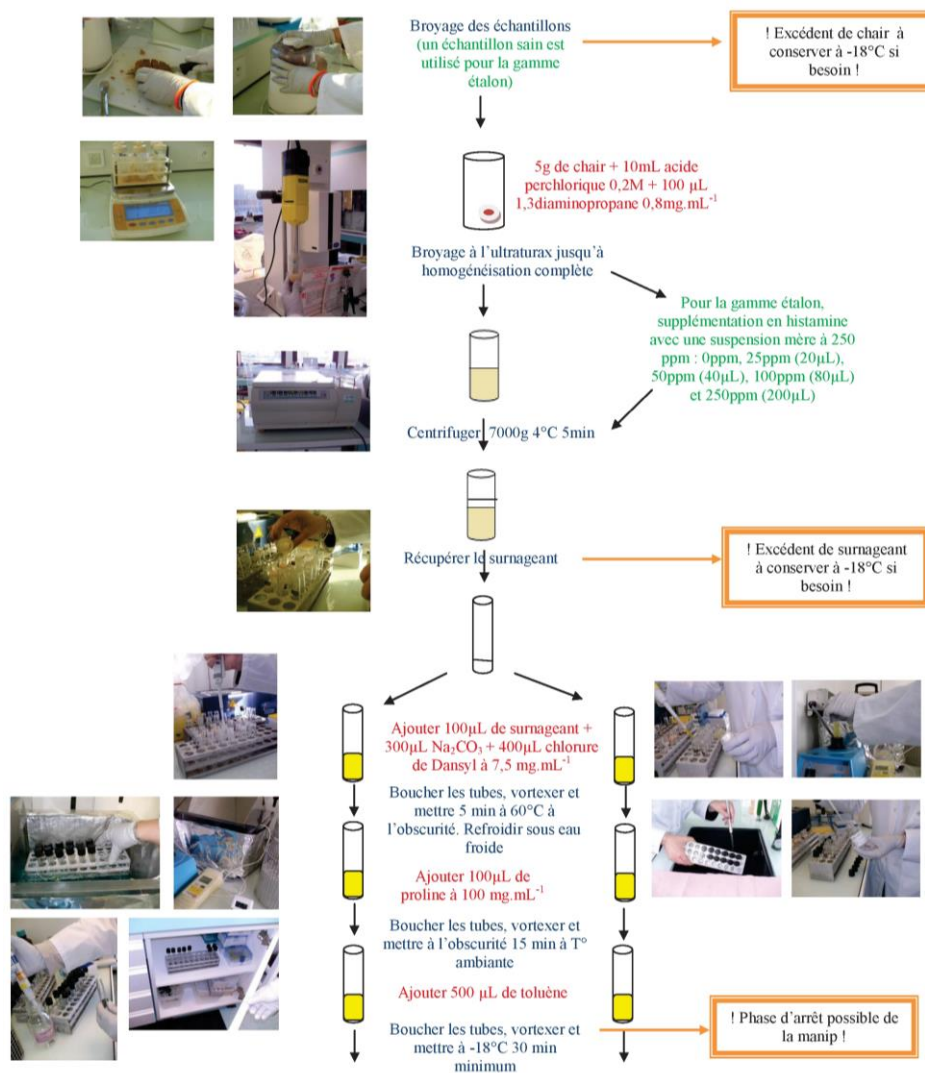


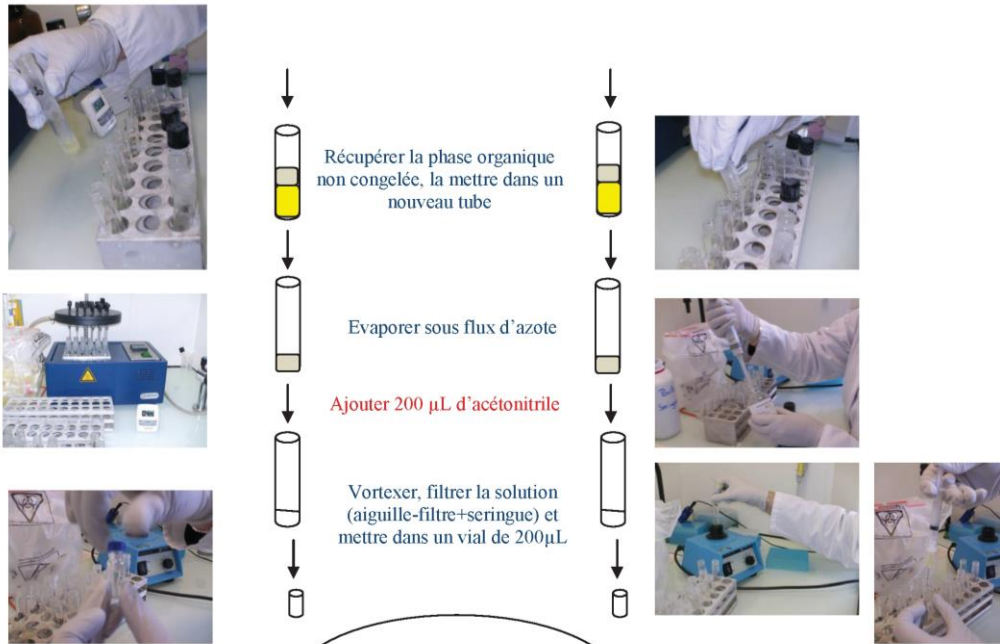




## Annexe B

### Protocole simplifié du dosage de l'histamine par HPLC





**Injection HPLC**





## Bibliographie

- [1] Duflos et al: Use of biogenic amines to evaluate spoilage in plaice (*Pleuronectes*) and whiting (*Merlangus merlangus*). *Journal AOAC international*, vol 82, n°6, 1357-1363, 1999.
- [2] Malle et al: Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. *Journal AOAC international*, vol 79, n°1, 1996.
- [3] Duflos et al: Relevance of matrix effect in determination of biogenic amines in plaice (*Pleuronectes platessa*) and whiting (*Merlangus merlangus*). *Journal AOAC international*, vol 82, n°5, 1097-1101, 1999.
- [4] AFNOR. NF V03-110 Procédure de validation intralaboratoire d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence, 1998. , AFNOR, Saint-Denis, France.