

Optimisation du Milieu Analytique pour le Dosage Spectrofluorimétrique de l'Histamine dans les Produits Halieutiques à l'aide de la Fluorescamine comme Sensibilisateur.

Rabani Adamou^{1,3}, Atanasse Coly², Idrissa Moussa¹, Alphonse Tine², Khalid Ikhiri^{1,3}

¹ *Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université Abdou Moumouni, Niamey/Niger.*

² *Département de Chimie, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop, Dakar/Sénégal.*

³ *Auteur de correspondance : arabani@refer.ne / kikhiri@yahoo.fr*

(Reçu le 11/10/2007 – Accepté après corrections le 23/09/2008)

Résumé

L'histamine est une amine biogène issue de la décomposition des produits halieutiques. Elle est très toxique. L'absorption d'une très basse quantité cause des problèmes sanitaires graves (allergies, troubles respiratoires, vomissements, diarrhées, etc.). Il importe donc de trouver une nouvelle méthode de dosage efficace et compétitive car les méthodes actuelles présentent de nombreuses insuffisances (faible précision, limite de détection et coût élevés).

Dans ce travail, nous proposons une alternative simple, fiable et moins coûteuse basée sur l'optimisation du milieu. L'acétonitrile nous a permis d'augmenter la limite de détection du dosage de l'histamine de 15 fois par rapport au solvant traditionnellement utilisé (eau). L'utilisation de solutions tensioactives dans l'acétonitrile a permis d'améliorer cette limite de plus de 70 fois et la stabilité du signal d'analyse de plus de 20 fois que dans l'eau. Ces performances analytiques ont permis d'atteindre une limite de détection largement plus basse de l'ordre de 0.5 ppb.

L'analyse d'échantillons réels de sardines achetés sur nos marchés a permis de détecter des teneurs (≈ 18 ppm), largement en dessous du seuil international de tolérance (100 ppm) démontrant ainsi la bonne qualité des poissons vendus au plan local. Toutefois, cette teneur interpelle les poissonniers à une amélioration des conditions de stockage.

Mots clefs: histamine, fluorescamine, solvant, spectrofluorimétrie, poissons, analyse, seuil de tolérance.

Summary

Histamine is produced from decomposition caused by the growth of some bacteria in seafood. Absorption of a very low amount causes serious allergies, respiratory disorders, vomiting and diarrhoea. It imports therefore to develop new efficient and competitive dosage method because those currently used present many insufficiencies (weak precision, high LOD and cost).

In this study, we propose a simple, reliable and less expensive alternative compared to traditional gain of sensitivity methods which need sophisticated and very expensive instrumentation.

The optimization of the solvent (acetonitrile) enabled us to increase the sensitivity of our method 15 times compared to solvent traditionally used (water). The use of tensioactive molecules in acetonitrile increased our method sensitivity more than 70 times and the stability of the analysis signal more than 20 times compared to water.

The use of optima obtained conditions (solvents and derivitizer concentration) allowed obtaining linear calibration curves and a limit of detection largely lower (0.5 ppb).

Analyses of local market sardine samples give a content of histamine (≈ 18 ppm) largely under the international tolerance rate (100 ppm) in halieutic and derived products. This result shows the good quality of local market fish. Nevertheless the relatively high histamine content challenges the fishmongers to improve their storage conditions.

Keywords: histamine, fluorescamine, solvent, analyses, fish, spectrofluorimetry, limit of detection (LOD).

1. Introduction

Trouver une nouvelle méthode efficace qui permettra de donner une réponse à toutes les insuffisances observées dans les méthodes actuelles (instabilité, interférences, longue durée et coût très élevé) de dosage de l'histamine dans les produits alimentaires (produits halieutiques et dérivés, fromages, etc.)^[1,4-6] et les liquides physiologiques (sang, plasma, urine, larmes, etc.)^[1-3] présente un enjeu sanitaire et économique très important.

L'histamine à très faible dose joue un rôle de régulation important dans le système immunitaire de l'organisme. A teneur relativement élevée, cette substance est très toxique^[2,7,8]. Elle est à l'origine de certaines allergies (allergies à effets immédiats) qui provoquent chez l'homme des troubles respiratoires, des démangeaisons, une hypersécrétion gastrique de l'acide chlorhydrique, des troubles de la vigilance, des crampes, des vomissements et de la diarrhée^[1,7,8]. Depuis sa découverte, diverses méthodes ont été utilisées pour son dosage dans plusieurs matrices.

Les méthodes chromatographiques (CCM, CPG et CLHP)^[9-12] sont largement utilisées car elles sont bon marché et permettent de nombreuses analyses. Toutefois, elles sont semi-quantitatives et présentent une mauvaise résolution car le temps de rétention de l'histamine et de plusieurs autres amines sont souvent similaires. Ce qui conduit à un déplacement quasi identique pour l'histamine et ces dernières^[12]. Les méthodes enzymatiques et biologiques sont très fatigantes. Dans certains cas, elles exigent deux extractions à l'acide perchlorique et un temps d'incubation trop long (2 heures)^[13]. En plus, elles exigent des enzymes qui ne sont pas disponibles sur le marché^[14]. Ces méthodes sont dans certains cas dites qualitatives car elles lient la teneur d'histamine à un changement de coloration de l'échantillon. En ce qui concerne les méthodes spectroscopiques, l'absorption uv-visible et l'infra rouge sont moins performantes. Elles se caractérisent par des limites de détection de l'ordre du ppm^[15]. En plus de cela, elles posent des questions

d'interférences dues souvent à un recouvrement des bandes spectrales de l'histamine avec celles des autres amines et acides aminés du milieu^[15]. Quant à la voie fluorimétrique, elle est certes la plus efficace car permettant d'atteindre des limites de détection de l'ordre du nanogramme / ml^[11,15-17], mais il y subsiste encore des questions d'interférences et de stabilité pour le signal du fluorophore. Ainsi, malgré les mérites reconnus à ces méthodes, de nombreuses insuffisances sont décriées^[15,16]. La méthode officielle de l'association des chimistes analystes (AOCA, méthode 977.13)^[16], méthode de référence pour l'homologation de toute nouvelle autre dans le monde n'est pas épargnée^[15]. Elle se fonde sur une détection fluorimétrique de l'histamine en formant en milieu alcalin un dérivé fluorescent entre l'histamine de l'échantillon à analyser et l'orthophthalaldéhyde (OPA). Du fait de l'instabilité du dérivé formé en milieux alcalins, 3 à 4 min après la condensation; le milieu est acidifié. Le signal de fluorescence du dérivé histamine-OPA est très sensible à la variation du pH, une infime variation de ce dernier conduira à des résultats très différents. Cela amène dans de nombreux laboratoires à des résultats erronés^[15,16]. D'autre part, après l'acidification, la stabilisation du fluorophore nécessite 25 min avant toute mesure du signal de fluorescence. Cette durée ajoutée aux temps de préparation des solutions étalons et de la réalisation de la courbe de calibration font que cette méthode prend une durée considérable.

Dans ce travail nous avons opté pour la voie fluorimétrique à cause de ses performances analytiques^[15-17] par rapport aux autres. A la différence des nombreuses méthodes fluorimétriques utilisant l'OPA comme sensibilisateur, nous avons choisi la fluoescamine. Cette dernière, à la différence des autres molécules (OPA, chlorure de dansyl et le chlorure de nitrobenzodiazole (NBD), etc.), réagit instantanément avec les amines primaires aliphatiques ($t_{1/2} = 0,5$ s) pour donner un dérivé très fluorescent entre 475–490 nm pour une excitation autour de 385 nm^[18-20]. Cette molécule est spécifique de la fonction amine primaire dans certaines

conditions opératoires (pH 7-10). Cela, élimine les nombreuses sources d'interférences observées avec les autres sensibilisateurs qui forment des dérivés fluorescents avec les molécules interférentes du milieu (alcools, thiols, amines secondaires et dérivés acides) ^[19,20]. D'autre part, comme l'histamine, ni la fluoescamine ni ses produits d'hydrolyse ne sont fluorescents ; éliminant ainsi d'autres sources d'erreurs ^[21].

Cette étude passe par une recherche des meilleures conditions d'exaltation et de stabilité du signal de fluorescence du dérivé fluorophore en utilisant des moyens simples et peu coûteux. En effet, traditionnellement l'amélioration du signal de fluorescence nécessite une instrumentation lourde et onéreuse ^[18]. Pour atteindre cet objectif nous avons simplement cherché à optimiser les effets du solvant sur la fluorescence du dérivé histamine-fluoescamine. En effet, la notion d'exaltation et d'inhibition du signal de fluorescence par le solvant, bien que longtemps abordée par d'autres chercheurs ^[22-24] n'a pas été mise à contribution dans le cas de l'histamine.

Une fois le solvant idéal obtenu, il est possible d'améliorer la fiabilité de la méthode en optimisant le milieu par des solutions tensioactives de cetyltriméthylammonium (CTAC, micelle cationique) de dodécyle sulfate de sodium (SDS, micelle anionique) et de Brij-700 (micelle neutre). En effet, Les molécules tensioactives forment des micelles directes ou inverses selon la polarité du solvant, capables d'encapsuler le fluorophore excité dans sa cavité hydrophobe (micelles directes) ou dans sa cavité hydrophile (micelles inverses). Ce qui met le fluorophore excité à l'abri des autres processus de désactivation non radiative entraînant ainsi, une amélioration des performances analytiques ^[25-27]. Dans des travaux antérieurs nous avons constaté qu'en milieu aqueux les molécules tensioactives anioniques de SDS et cationiques de CTAC ont un effet important d'exaltation et/ou de stabilisation sur le signal du dérivé histamine-fluoescamine ^[28,29]. Par ailleurs, une investigation cinétique de la formation de ce dérivé fluorescent dans le méthanol a montré que la condensation entre l'histamine et la fluoescamine est d'ordre

1 :1 comme énoncé dans le cas des amines primaires en général ^[7,19,29]. Toutefois, du fait de l'hydrolyse rapide de la fluoescamine ($t_{1/2}=5-10s$) il est nécessaire d'utiliser une concentration en fluoescamine au moins dix fois supérieure à celle d'histamine ^[29].

2. Section instrumentale

2.1. Les solvants

2.1.1. Solvants polaires protiques

Dans cette classe nous avons utilisé l'eau distillée (H₂O) préparée au laboratoire ; le méthanol (CH₃OH), CLHP, min 99,8 %, d=0,791, produit de Prolabo ; l'éthanol (CH₃CH₂OH), pour spectrophotométrie, eau 0,1 %, d=0,785, produit de chez Sigma Aldrich. ; le propanol (CH₃(CH₂)₂OH), pour spectrophotométrie, min 99,7 %, d=0,803-0,804, produit de chez E. Merck Darmstadt et le butanol (CH₃(CH₂)₃OH), pour spectrophotométrie, 99,5 %, d=0,81, produit de chez Sigma Aldrich.

2.1.2. Solvants aprotiques

Dans les solvants aprotiques polaires nous avons utilisé l'acétonitrile (CH₃CN), pour spectrophotométrie, 99+ %, d=0,790 (Janssen Chimica) ; le Diméthylsulfoxyde (DMSO) ((CH₃)₂SO), pour spectrophotométrie, 99+ %, d=1,101 (Janssen Chimica) ; le N-méthylacétamide (NMA) ((MeCONCH₃), pour spectrophotométrie, 99,8 %, d=0,957 (Sigma Aldrich) et le N,N-Diméthylformamide (N,N-DMF) (HCON(CH₃)₂), pour spectrophotométrie, 99,8 %, d=0,944 (Sigma Aldrich). Dans la classe des solvants aprotiques apolaires nous avons utilisé le cyclohexane (C₆H₁₂) pour spectrophotométrie, 99+ %, d=0,779 et l'hexane (C₆H₁₄), pour spectrophotométrie, 99+ %, d=0,659, tous deux de chez Sigma Aldrich.

2.1.3. Les surfactants

Le chlorure de cetyltriméthylammonium (CH₃(CH₂)₁₅N(CH₃)₃Cl) (CTAC, 25 %, m/m en solution aqueuse, d=0,968) ; le sulfate dodécyle de sodium (CH₃(CH₂)₁₁OSO₃Na) (SDS, 98%, m/m) et le Brij-700 (C₁₈H₃₇(OCH₂CH₂)_nOH, n=100) (99+ %, m/m) proviennent de Sigma Aldrich.

2.1.4. Les réactifs

L' amino(-2 éthyl)-4-imidazole appelé histamine ($C_5H_9N_3$) (96 %, m/m) ; le 4-phenyl-spiro (furan-2(3H),1'(3'H)-isobenzofuran) appelé fluorescamine ($C_{17}H_{10}O_4$) (98 %, m/m) et l'hydroxyde de sodium (NaOH) (97 %, m/m), sont achetés chez Sigma–Aldrich, l'acide chlorhydrique (HCl) (min 35 %, m/m ; $d=1,170-1,180$) est de VWR international S.A.B, France.

Dans le cadre de l'extraction de l'histamine l'acide trichloroacétique ($C_2HCl_3O_2$, 99–100 %, m/m) (Janssen Chimica) et l'acétate de sodium (CH_3COONa , $3xH_2O$) + l'acide acétique (CH_3COOH) pour analyse cristallisable, 99–100 %, m/m (Labosi France) ont été utilisés.

2.2. Appareillage

La mesure du signal de fluorescence est réalisée à la température ambiante avec un spectrofluorimètre Kontron Modèle SFM-25 (Zurich, Suisse) relié à un microordinateur piloté par le logiciel Lcwin. Une micropipette Pipetman de 5-20 μ l (Gilson, France) et une cuve en quartz (1 cm) (Hellma, Mulheim, Allemagne) sont utilisées pour les prélèvements.

Pour l'extraction de l'histamine de l'échantillon réel, un broyeur (Moulinex, France) et une colonne chromatographique remplie d'une résine Amberlite GC 50 type I (100–200 mesh) (Prolabo, France) sont utilisés.

2.3. Procédure expérimentale

2.3.1. Préparation des solutions

La solution mère d'histamine 10^{-2} M est préparée dans l'eau ou dans un mélange eau – méthanol 75 % (v / v), en vue d'être dans les conditions réelles de l'extrait d'histamine des produits halieutiques [29]. La fluorescamine 10^{-3} M est préparée dans les différents solvants organiques utilisés. Ces solutions sont protégées contre la lumière par du papier aluminium. Le dérivé fluorescent est formé dans une fiole de 5 ml à partir des volumes d'histamine (v_H) et de fluorescamine (v_F) requis et on complète à 5 ml avec le solvant approprié.

2.3.2. Mesures analytiques

Après agitation, on prélève 2,5 ml de la fiole, on l'introduit dans la cuve pour la mesure du signal de fluorescence. Le spectre d'émission de fluorescence est obtenu en se plaçant à la longueur d'onde du maximum d'excitation ($\lambda_{ex\ max}$) du fluorophore histamine-fluorescamine. Toutes les mesures de fluorescence sont corrigées avec le solvant ($I_F = I_{mesuré} - I_{solvant}$). Les différentes mesures analytiques sont réalisées sous les mêmes conditions de voltage (HV = 400), de vitesse 480 et de sensibilité (facteur = 1,5). Les courbes et les interprétations statistiques sont faites avec le logiciel Microcal Origin 6.0.

2.3.3. Extraction de l'histamine de l'échantillon réel de poisson

Dans ce travail nous avons utilisé la voie d'extraction de l'histamine en solution acide trichloroacétique (TCA 10 %) selon la méthode Lerke et Bell [7] que nous avons améliorée et adaptée à la fluorescamine [29].

3. Résultats et discussions

3.1. Etude de l'excitation

Une étude de l'excitation du dérivé histamine-fluorescamine dans les deux classes de solvant (protiques et aprotiques) est réalisée afin de déterminer les longueurs d'onde d'excitation ($\lambda_{ex\ max}$) donnant le maximum d'émission pour l'analyse spectrofluorimétrique. Dans tous les milieux protiques prospectés (eau, méthanol, éthanol, propanol et butanol), le spectre d'excitation présente deux pics. Le moins intense à 276 nm dans les alcools et à 272 nm dans l'eau. Le plus intense à 390 nm dans les alcools et à 380 nm dans l'eau. Les longueurs d'ondes 380 nm et 390 nm respectivement dans l'eau et dans les alcools sont donc choisies pour réaliser les spectres d'émission. Dans les solvants aprotiques polaires, on observe également la formation de deux pics d'excitation. Le moins intense est à 280 nm pour le DMSO, le NMA et le N,N-DMF et à 274 nm pour l'acétonitrile. Le pic le plus intense se trouve à 390 nm pour ces quatre solvants. Les solvants aprotiques apolaires (cyclohexane et hexane) entraînent une inhibition totale de l'excitation, d'où

l'impossibilité de réaliser une étude fluorimétrique dans ces milieux.

3.2. Etude de l'émission

En milieux protiques en fixant l'excitation à 380 nm et à 390 nm respectivement dans l'eau et dans les alcools, on a obtenu les spectres suivants (Fig. 1) dont les intensités de fluorescences I_f relatives à $\lambda_{ex\ max}$ et à $\lambda_{em\ max}$ se trouvent dans le tableau-I (Tab. I). Dans tous les solvants aprotiques étudiés en fixant l'excitation à 390 nm, on trouve les spectres suivants (Fig. 2) dont les intensités de fluorescences I_f relatives à $\lambda_{ex\ max}$ et à $\lambda_{em\ max}$ pour les différents solvants aprotiques utilisés se trouvent dans le tableau -I (Tab. I).

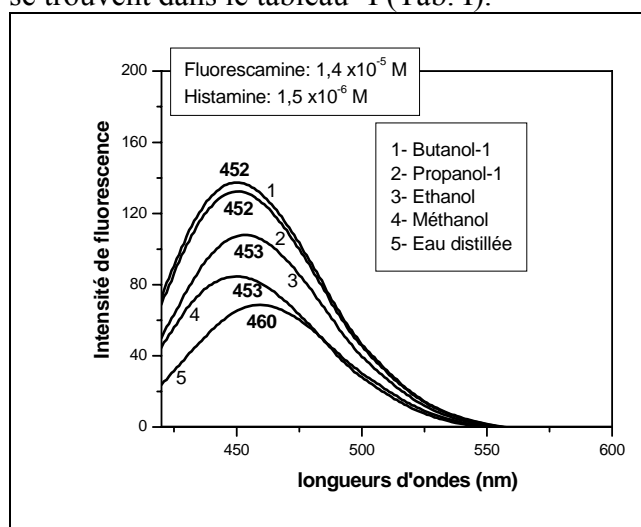


Fig. 1. Spectres d'émission du complexe histamine-fluorescamine dans divers solvants protiques.

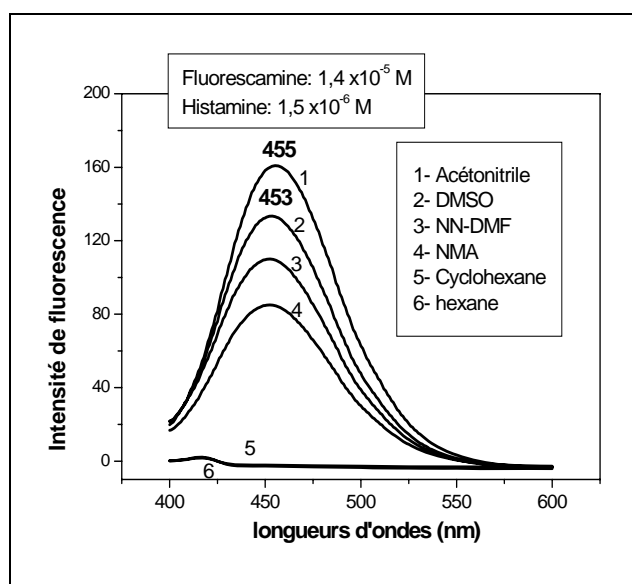


Fig. 2. Spectres d'émission du dérivé histamine-fluorescamine dans divers solvants aprotiques.

Table I. Propriétés spectroscopiques de fluorescence du dérivé histamine-fluorescamine dans divers solvants protiques et aprotiques.

Solvant	$\lambda_{ex\ max}$ (nm)	$\lambda_{em\ max}$ (nm)	I_f
Eau	380	460	68.6
Méthanol	390	453	84.7
Ethanol	390	453	107.9
Propanol-1	390	452	132.3
Butanol-1	390	452	137.3
Acétonitrile	390	455	160.8
DMSO	390	453	133.4
N,N-DMF	390	452	110
NMA	390	452	85
Cyclohexane	390	452	0
Hexane	390	452	0

3.3. Effet du solvant sur la sensibilité du signal de fluorescence

Un solvant est généralement caractérisé par son indice de réfraction n , son extinction molaire ϵ et son moment dipolaire $\mu(\epsilon)$. De ces trois grandeurs, le moment dipolaire renseigne le plus sur le signal de fluorescence. En effet, il a été clairement démontré que dans un solvant polaire, une molécule polaire interagit avec ceux du solvant pour former si possible des liaisons hydrogènes et/ou des complexes [18,22]. Cela aura pour conséquences dans une étude fluorimétrique, en plus du déplacement de stokes, une inhibition du signal de fluorescence en favorisant les autres processus de désactivation non radiative de l'état excité (transfert de charge, conversion interne, conversion intersystème, quenching, etc.) au dépend de l'émission de fluorescence. Une représentation de l'intensité de fluorescence relative I_f en fonction du moment dipolaire du solvant (μ) (Fig. 3) nous montre qu'une augmentation de la polarité (μ) du solvant se traduit aussi bien en milieu polaire protique qu'aprotique par une relative inhibition du signal. De tous les solvants protiques et aprotiques utilisés, l'acétonitrile se trouve être

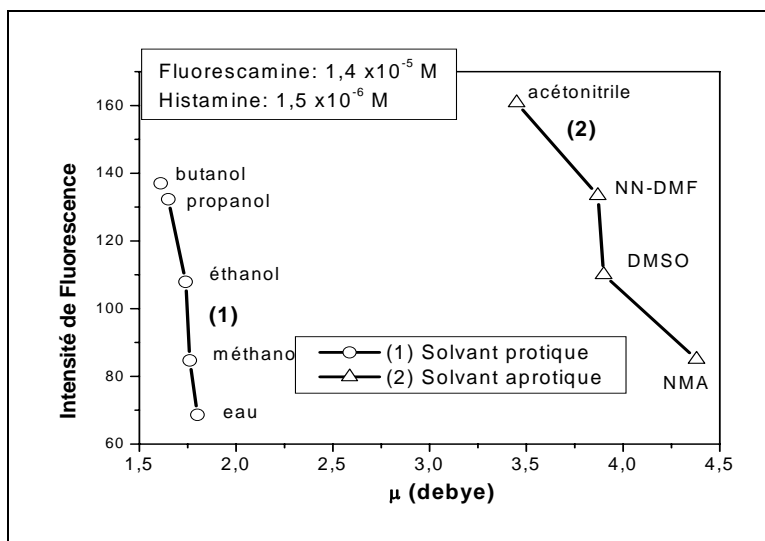


Fig. 3. Effet de la polarité du solvant sur le signal de fluorescence du dérivé histamine-fluorescamine.

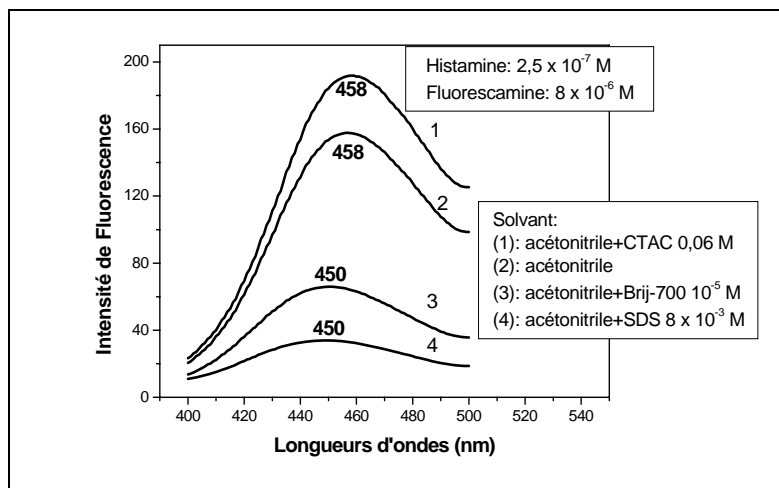


Fig. 4. Emission du dérivé histamine-fluorescamine dans l'acétonitrile et dans divers solutions tensioactives dans l'acétonitrile

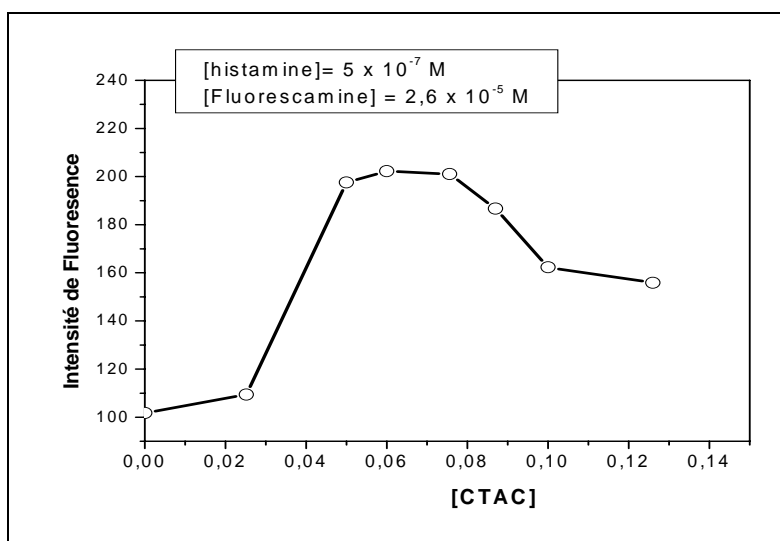


Fig. 5. Effet du CTAC en solution aqueuse sur le signal de fluorescence du dérivé histamine-fluorescamine.

le solvant idéal car offre la meilleure condition de sensibilité. En milieu protique, l'inhibition importante du signal de fluorescence est probablement liée aux liaisons hydrogène entre le fluorophore excité et les molécules du solvant. Ces interactions du fluorophore excité avec les molécules environnantes l'exposent plus aux processus de désactivation non radiative. Ainsi, on constate que plus les liaisons hydrogène sont fortes (butanol, propanol, éthanol, méthanol et l'eau) plus le signal de fluorescence du dérivé se trouve inhibé.

3.4. Etude en solution tensioactive d'acétonitrile

Nous avons opté comme en milieu aqueux [29] de chercher dans l'acétonitrile l'effet des solutions tensioactives de CTAC, SDS et Brij-700 sur le signal de fluorescence du dérivé histamine-fluorescamine (Fig. 4). Alors qu'on assiste à une inhibition du signal dans la solution tensioactive anionique de SDS (courbe 4) et dans la solution tensioactive neutre de Brij-700 (courbe 3); la solution tensioactive cationique de CTAC (courbe 1) exalte le signal de fluorescence par rapport au solvant acétonitrile seul (courbe 2).

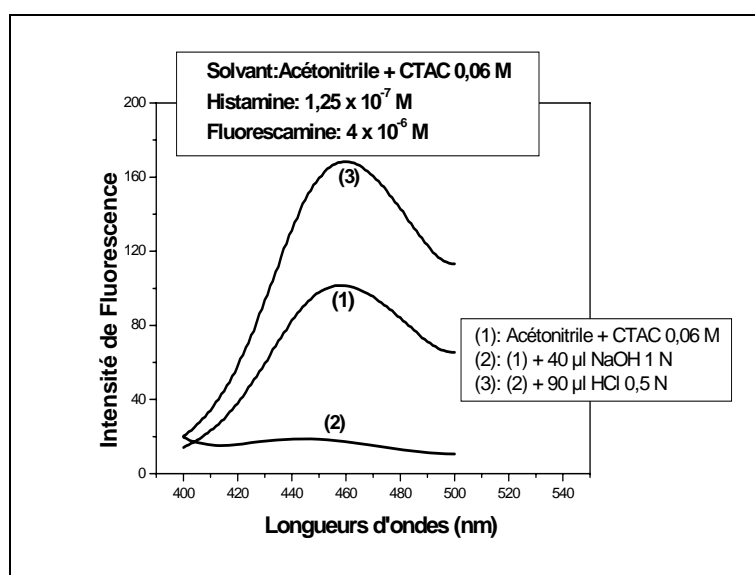


Fig. 6. Effets de NaOH et HCl sur le signal de Fluorescence du dérivé histamine-fluorescamine en solution tensioactive de CTAC dans l'acétonitrile.

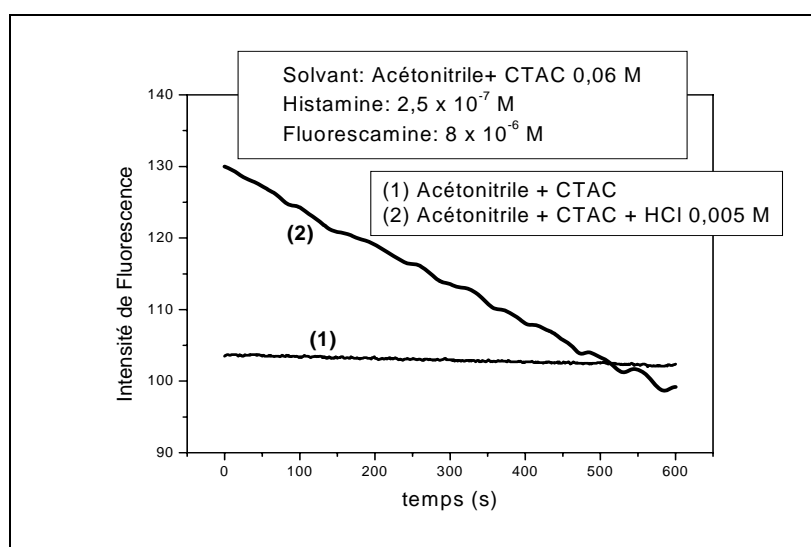


Fig. 7. Etude cinétique du dérivé histamine-fluorescamine dans l'acétonitrile et dans la solution tensioactive de CTAC dans l'acétonitrile.

Ceci nous amène à choisir ce milieu pour le dosage de l'histamine en milieu organique.

3.4.1. Optimisation du milieu acétonitrile + CTAC

- Optimisation de la concentration de CTAC

En gardant constante la concentration en histamine et en fluorecamine dans le milieu réactionnel et en faisant varier la concentration de CTAC, on constate une augmentation du signal de fluorescence jusqu'à 0.06M (Fig. 5). La décroissance du signal au-delà de 0.06M est probablement beaucoup plus liée à l'augmentation des molécules d'eau (réaction d'hydrolyse du sensibilisateur et/ou effet d'inhibition des molécules d'eau) s'y trouvant dans le milieu car la solution commerciale de CTAC est vendue en milieu aqueux 25%.

- Optimisation de l'effet de NaOH et de HCl

En vue de chercher une meilleure condition de sensibilité et de stabilité pour le signal du dérivé histamine-fluorecamine, une étude des effets de NaOH et de HCl a été réalisée. La réaction de condensation entre l'histamine et la fluorecamine a été réalisée dans une fiole de 5 ml à partir d'une solution finale en histamine $1,25 \times 10^{-7}$ M et en fluorecamine 4×10^{-6} M. La solution mère micellaire aqueuse de CTAC 0,76 M a été ajoutée afin d'obtenir une concentration finale 0,06 M quand on complète à 5 ml avec l'acétonitrile. 2,5 ml de cette solution sont placés dans une cuve, la mesure du signal de fluorescence donne le spectre (1) (Fig. 6). Lorsqu'on ajoute 40 μ l d'une solution aqueuse de NaOH 1N on obtient le spectre (2) (Fig. 6), en milieu alcalin on assiste à une inhibition quasi totale du signal de fluorescence. L'ajout de 90 μ l d'une solution de HCl 0,5 N dans la même solution, neutralise le milieu alcalin et le rend faiblement acide. Il en résulte une réhabilitation du signal de fluorescence suivie d'une exaltation importante de ce dernier (spectre (3), (Fig. 6)). Afin de bien cerner l'effet de HCl qui semble être bénéfique, une étude complémentaire dans la solution tensioactive de CTAC a été réalisée. Cette étude révèle une exaltation du signal de

fluorescence pour les faibles concentrations de HCl (0 à 5×10^{-3} M). Au delà de 5×10^{-3} M, on assiste à une inhibition progressive.

3.4.2. Etude Cinétique

En vue de saisir la stabilité du signal de fluorescence (la fiabilité de la mesure) du dérivé histamine-fluorecamine, une étude cinétique en solution tensioactive de CTAC (0.06 M) dans l'acétonitrile a été réalisée pendant 10 min. Dans ce milieu, il en résulte une très grande stabilité du signal (spectre (1), Fig. 7). Après ces 10 min la même solution acidifiée par ajout de HCl (concentration finale 5×10^{-3} M) montre certes une exaltation importante, mais on note une très grande instabilité du signal de fluorescence (spectre (2), Fig. 7). Un dosage en milieu acide nécessitera donc une très grande ponctualité sur les mesures à réaliser afin de réduire les erreurs mais sans pour autant toutefois les exclure totalement. Le milieu acide HCl bien qu'offrant un gain de sensibilité important pour une question de fiabilité ne sera pas utilisé. Une étude complémentaire pendant 4h dans le milieu CTAC + acétonitrile démontre une grande stabilité du signal d'émission du fluorophore. Ainsi, le milieu CTAC + acétonitrile est très approprié pour le dosage de l'histamine par rapport aux milieux traditionnels.

3.5. Etude de Calibration et analyse d'échantillon des marchés locaux

La calibration ($\log I_f = \beta + \alpha \times \log C$) réalisée à partir des conditions optimales de dosage dans les différents milieux prospectés a donné un coefficient de corrélation proche de l'unité (0,998). Cette méthode a permis d'atteindre une limites de détection ($LD = \left(\frac{3 \times \sigma}{10^\beta}\right)^\frac{1}{\alpha} \times M$, avec $\beta=6,76$, $\alpha=0,85$, $M=111$, et σ (écartype de 10 valeurs du solvant fraîchement préparé)=0,1448) de 0,5 ng / ml de solution.

L'analyse d'échantillons des marchés locaux de gueule Tapé et de Soumbédioune (Dakar – Sénégal) a permis de détecter des teneurs en histamine comprises entre 15 - 20 ppm. Ces

Tab. II. Caractéristiques (n , ϵ , μ) des différents solvants protiques et aprotiques utilisés.

Solvant	Protique					aprotique polaire				aprotique apolaire	
	eau	méthanol	éthanol	propanol	butan-1-ol	CH ₃ CN	N-,NDMF	DMSO	NMA	cyclohexane	hexane
n	1.33	1.326	1.361	1.385	1.399	1.344	1.431	1.478	1.433	1.426	1.375
ϵ (Cm ⁻¹ M ⁻¹)	78.4	32.4	24.5	19.9	17.85	37.5	37	46.7	182	2.02	1.88
μ (debye)	1.8	1.76	1.74	1.65	1.61	3.45	3.87	3.90	4.38	0.00	0.00

valeurs sont largement en dessous du seuil de tolérance en histamine dans les produits halieutiques et leurs dérivés (100 à 200 ppm, selon la nature de l'échantillon et selon la législation des Etats).

4. Conclusion

Les résultats obtenus par notre approche d'optimisation du solvant pour l'analyse présente quelques avantages analytiques par rapport aux méthodes décrites dans la littérature.

a)- Nous avons démontré l'avantage évident de certains solvants (acétonitrile, DMSO, butanol, etc.) et les solutions tensioactives (CTAC) par rapport aux solvants habituels à augmenter la sensibilité de la mesure et sa fiabilité en assurant une grande stabilité du signal de fluorescence pour une durée largement supérieure au temps nécessaire pour l'analyse (25 min). La solution tensioactive de CTAC dans l'acétonitrile offre les meilleures conditions de sensibilité et de stabilité pour l'analyse de l'histamine par la fluorescamine.

b)- L'optimisation du solvant (acétonitrile + CTAC) a permis d'atteindre une limite de détection très basse (0,5 ppb).

c)- Au-delà du dosage direct de l'histamine dans les produits halieutiques et leurs dérivés; cette méthode à cause de sa limite de détection basse sera très pratique dans le domaine médical: un prélèvement très infime de liquide physiologique (sang, plasma, larmes, etc.) suffira pour la préparation des échantillons. Cela, rendra l'analyse clinique moins pénible pour les patients.

Remerciements

Nous remercions l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) qui a financé cette étude à travers le projet JER N° 6018. Nos remerciements vont également au Pr. Joseph Lakowicz, Directeur du Center of Fluorescence Spectroscopy (CFS), Baltimore Scholl of Medecine, Maryland University (Baltimore/USA) pour la formation dans son centre et la documentation importante en fluorescence spectroscopie qu'il nous a offerte.

Bibliographie

- [1] Food and Drug Administration (FDA). Decomposition-related Hazards, Chap.8 (In Fish and Fisher Products. Hazards and controls Guidance), FDA 3rd edition 2001, Washington D.C;
- [2] Iarosh O.O., Kanevs'Ka S.A., Lik. Sprava (1992) (1),75-76;
- [3] Imanara. I.,Watanabe., Y. Hase., Y. Sakamoto., Y. Fukuda., H. Yamamoto., T. Tsuruhara., H. Wada., Jour. Biochem (1984) 96(6), 1925-1929;
- [4] Frank H.A., Yoshinaga D.H., Histamine production in Tuna. Seafood toxins.ACS symposium series N°262. American Chem. SOC., Pp. 443-451. E.P. Ragelis edition 1984, Washington, D.C.;
- [5] Baranowsky J.D., Frank A.H., Brust A.P., Chongsiriwatana. M., Premaratne J.R., Jour. Food protec (1990) 53 (3), 217-222;
- [6] Summer S.S., Roche. F., Taylor S.L., Jour. Dairy Sci (1990) 73, 3050-3058.
- [7] Lerke P.A., Werner S.B., Taylor S.L., Guthertz L.S., West Jour. Med (1978)129, 381-386;
- [8] Arnold S.H., Brown W.D., Adv. Food Res (1978) 24, 113-154;
- [9] Schutz D.E., Chang G.W., Bjeldanes L.F., Jour. AOAC (1976) 59 (6), 1224-1225.
- [10] Yen. G., Hsieh. C., Jour. Food (1991) 56(1), 158-160;

- [11] Rogers L.P., Staruskiewicz W.F., *Jour. Aquatic Food Prod. Techn* (2000) 9 (2), 5-17;
- [12] Lieber E.R., Taylor S.L., *Jour. Chromatogr* (1978) 153, 143-152;
- [13] Lopez-Sabater E.I., Rodriguez-Jerez J.J., Roig-Sagues A.X., Mora-Ventura M.T., *Food Addit. Cont* (1993)10, 593-602;
- [14] Ohashi M., Numura F., Suzuki M., Otsuka M., Adachi O., Arakawa N., *Jour. Food Sci.* (1994) 59, 519-522;
- [15] Douabalé. S.E., Dione. M., Coly. A., Tine. A., *Talanta* (2003) 60, 581-590;
- [16] Official Methods of Analysis of AOAC international (AOAC 16th ed.), Method 977.13: Histamine in seafood, Fluorimetric method. Sec.35.1.32. (1995c) 6-17. P.A. Cunniff Edition, AOAC International Gaithersburg, MD;
- [17] Rogers L.P., Staruskiewicz W.F., *Jour. AOAC inter* (1997) 80(3), 459-692;
- [18] Lakowicz J.R., *Principles of fluorescence spectroscopy* (2nd ed.), Kluwer Academic / plenum publishers edition 1999, New York;
- [19] De Bernardo. S., Weigele. M., Toome. V., Manhart K., Leimgruber. W., Bohlen. P., Stein. S., Udenfriend. S., *Arch Biochem. Biophys* (1974) 163, 390-399;
- [20] Udenfriend. S., Stein. S., Bohlen. P., Leimgruber. W., Weigele. M., *jour. Sci* (1972) 178, 871-872;
- [21] Stein. S., Bohlen. P., Udenfriend. S., *Arch Biochem. Biophys* (1974) 163, 400-403;
- [22] Toptigin. D., *Jour. Fluoresc* (2003) 13, 201-219 ;
- [23] Lakowicz J. R., *Anal. Biochem* (2001) 298, 1-24 ;
- [24] Geddes D., Parfenov A.; Roll D.; Gryczynski I.; Malicka J., Lakowicz J.R., *Jour. Fluoresc.* (2003)13(3), 267-276;
- [25] Coly A., Aaron J-J., *Talanta* (1999) 49, 107-117;
- [26] Coly A., Aaron J-J., *Analyst* (1996) 121, 1545-1549;
- [27] Coly A., Aaron J-J., *Talanta* (1998) 46, 843-875;
- [28] Coly A., Adamou. R., Douabalé S.E., Tine. A., *Chemistry at the interfaces*, 39^e IUPAC. Congress and 86^e conference of the Canadian society for chemistry Ottawa-Canada (2003) AE. 1. P036;
- [29] Adamou. R., Coly. A., Douabalé S.E., Saleck L.C., Gaye S.D., Tine. A., *Jour. Fluoresc.* (2005) 15(5), 679-6.

