



**Inspection
Branch**

**Direction de
l'inspection**

**Chemical
Methods**

**Méthodes
d'analyse
chimique**



TO
À

Détenteurs du manuel des Méthodes d'analyse chimique

FROM
DE

Directeur
Programmes Scientifiques et techniques
Direction générale d'inspection

SECURITY - CLASSIFICATION - DE SÉCURITÉ
OUR FILE/NOTRE RÉFÉRENCE
YOUR FILE/VOTRE RÉFÉRENCE
DATE 30 juin 1989

SUBJECT
OBJET

Modification no. 1 au manuel des Méthodes d'analyse chimique

Vous trouverez ci-jointe la modification no. 1 au manuel des Méthodes d'analyse chimique qui comprend deux nouvelles sections et revise une section.

Les nouvelles sections sont la méthodologie pour la détermination de putrescine et cadavérine (Chapitre 3, Section 3) et la méthodologie pour la détermination de phosphore total (Chapitre 4, Section 2). La section qui concerne la détermination des sulfites (Chapitre 4, Section 1) a une modification mineure.

Veuillez retourner la formule "Récépissé et modification d'adresse" à l'adresse fournie.

A. Gervais

Pièce jointe



MEMORANDUM

NOTE DE SERVICE

TO
À

Détenteurs du manuel
Méthodes d'analyse chimique

FROM
DE

Directeur,
Programmes scientifiques et techniques
Direction générale des services d'inspection

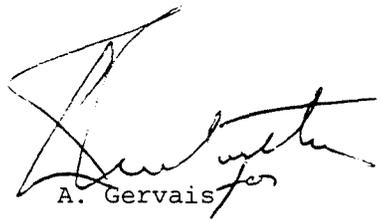
SECURITY - CLASSIFICATION - DE SÉCURITÉ
OUR FILE/NOTRE RÉFÉRENCE
YOUR FILE/VOTRE RÉFÉRENCE
DATE 10 novembre 1989

SUBJECT
OBJET

MÉTHODES D'ANALYSE CHIMIQUE - MODIFICATION NO. 2

Vous trouverez ci-jointe la modification numéro 2 au manuel des Méthodes d'analyse chimique, qui comprend deux nouvelles sections, Chapitre 1, Section 5 - Dosage du plomb des produits du poisson par spectrophotométrie d'absorption atomique et, Chapitre 2, Section 6 - Sucres réducteurs totaux.

Veillez retourner la formule, "Récépissé et modification d'adresse".



A. Gervais

Pièce jointe



TO
À

Détenteurs du manuel des Méthodes
d'analyse chimique

FROM
DE

Directeur général
Direction générale de l'inspection

SUBJECT
OBJET

MÉTHODES D'ANALYSE CHIMIQUES - MODIFICATION N° 3

Vous trouverez ci-jointe la modification n° 3 au manuel des Méthodes d'analyse chimique, qui comprend une table de matières révisée et ajoute Chapitre 5, Section 4 - Méthode d'extraction et d'analyse de l'acide domoïque.

B.J. Emberley

Pièce jointe





chapter chapitre	section	page 1
status état	date 31/01/1986	
new/nouveau		

PRÉFACE

Le Manuel des méthodes d'analyse chimique est un document de référence regroupant les procédures et méthodes utilisées pour l'analyse chimique du poisson et des produits de la pêche dans les laboratoires d'inspection du poisson du ministère des Pêches et des Océans. Les méthodes choisies pour ce manuel proviennent de plusieurs sources et les références appropriées sont données. Nous n'affirmons pas que ces méthodes sont meilleures que d'autres.

Ce manuel est publié sous forme de feuilles volantes pour permettre une certaine souplesse en cas de révision des méthodes et d'insertion de nouvelles méthodes au fur et à mesure qu'elles sont publiées. Les nouvelles méthodes seront d'ailleurs automatiquement envoyées aux détenteurs de ce manuel. Les commentaires et suggestions permettant d'améliorer ce manuel sont les bienvenus.

Pour obtenir des exemplaires, prière de s'adresser à:

Chef, Services techniques
Direction de l'inspection
Commercialisation et Pêches internationales
Pêches et Océans
Ottawa (Ontario)
K1A 0E6



CHEMICAL METHODS MANUAL

Distribution List

Senior Assistant Deputy Minister, (E&F)
Director General, Inspection Services
(E&F)
Director, Field Operations, Inspection
Services (E&F)
Director, Scientific and Technical
Programs, Inspection Services (E&F)

Chief, Facilities and Process
Inspection, Inspection Services
(E&F)
Chief, Fish and Fish Products
Inspection, Inspection Services
(E&F)
Senior Advisor, Shellfish and Scientific
Coordination, Inspection Services
(E)

Standards Officer, Field Operations,
Inspection Services (E)

Coordinator, Directives Management,
Administrative Operations (E&F)
Policy Development Officer,
Administrative Operations (E&F)
Head, Manuals Production and
Distribution, Administrative
Operations, (E&F)

Library Services (E&F)

Newfoundland Region

Director, Inspection Services (E)
Head, Regional Inspection Laboratory (E)

Regional Chemist (E)
Senior Chemistry Technician (E)
Laboratory Technicians (2) (E)
Head, Seafood Quality Services (E)

Regional Library (E&F)

Laboratory Supervisor, Grand Bank (E)

Note: (E) English
(F) French

MANUEL DES MÉTHODES D'ANALYSE CHIMIQUE

Liste de distribution

Sous-ministre adjoint principal, (F&A)
Directeur général, Services de
l'inspection (F&A)
Directeur, Opérations sur le terrain,
Services de l'inspection (F&A)
Directeur, Programmes scientifiques et
techniques, Services de
l'inspection (F&A)
Chef, Inspection des installations et
des processus, Services de
l'inspection (F&A)
Chef, Inspection du poisson et des
produits du poisson, Services de
l'inspection (F&A)
Conseiller principal, Coordination,
activités scientifiques et
mollusques, Services de
l'inspection (A)
Agent des normes, Opérations sur le
terrain, Services de l'inspection
(A)
Coordinateur, Gestion des directives,
Opérations administratives (F&A)

Agent, Élaboration des politiques,
Opérations administratives (F&A)
Chef, Production et Distribution des
manuels, Opérations administratives
(F&A)
Services de bibliothèque (F&A)

Région de Terre-Neuve

Directeur, Services de l'inspection (A)
Chef, Laboratoire régional de
l'inspection (A)
Chimiste régional (A)
Technicien principal en chimie (A)
Techniciens en laboratoire (2) (A)
Chef, Services de qualité des fruits de
mer (A)
Bibliothèque régionale (F&E)

Surveillant du laboratoire, Grand Bank
(A)

Remarque: (A) Anglais
(F) Français

Scotia-Fundy Region
(Halifax)

Head, Regional Inspection Laboratory (E)
Head, Chemistry Section (E&F)
Head, Operations Section (E)
Chemist II (E)
Laboratory Technician (E)
Regional Library (E&F)
Area Inspection Chief, Black's Harbour,
N.B. (E)
Officer in Charge, Black's Harbour,
N.B. (E)
Area Inspection Chief, Sydney, N.S. (E)
Officer in Charge, Sydney, N.S. (E)
Area Inspection Chief, Yarmouth, N.S.
(E)
Officer in Charge, Yarmouth, N.S. (E&F)

Gulf Region

Regional Chemist, Inspection Branch
(E&F)
Regional Library (E&F)
Officer in Charge, Charlottetown,
P.E.I. (E)
Senior Technician, Charlottetown,
P.E.I. (E)
Officer-in-Charge, Inspection Lab,
Corner Brook, N.F.L.D. (E)
Senior Technician, Corner Brook,
N.F.L.D. (E)
Officer in Charge, Shediac, N.B. (E&F)
Senior Lab Technician, Shediac, N.B.
(E&F)
Officer in Charge, Shippagan, N.B. (E&F)
Lab Technician, Shippagan, N.B. (E&F)

Quebec Region

Director, Inspection Services (E&F)
Oceanographer Chemist, Physical and
Chemical Sciences (E&F)

Région Scotia-Fundy
(Halifax)

Chef, Laboratoire régional de
l'inspection (A)
Chef, Section de la chimie (F&A)
Chef, Section des opérations (A)
Chimiste II (A)
Technicien en laboratoire (A)
Bibliothèque régionale (F&A)
Chef de l'inspection de secteur, Black's
Harbour, N.-B. (A)
Officier responsable, Black's Harbour,
N.-B. (A)
Chef de l'inspection de secteur, Sydney,
N.-E. (A)
Officier responsable, Sydney, N.-E. (A)
Chef de l'inspection de secteur,
Yarmouth, N.-E. (A)
Officier responsable, Yarmouth, N.-E.
(F&A)

Région du Golfe

Chimiste régional, Direction de
l'inspection (F&A)
Bibliothèque régionale (F&A)
Officier responsable, Charlottetown,
I.-P.-E. (A)
Technicien principal, Charlottetown,
I.-P.-E. (A)
Agent responsable, Laboratoire
d'inspection, Corner Brook, T.-N.
(A)
Technicien principal, Corner Brook,
T.-N. (A)
Agent responsable, Shediac, N.-B.
(F&A)
Technicien principal en laboratoire,
Shediac, N.-B. (F&A)
Officier responsable, Shippagan, N.-B.
(F&A)
Technicien en laboratoire, Shippagan,
N.-B. (F&A)

Région du Québec

Directeur, Services de l'inspection
(F&A)
Océanographe Chimiste, Sciences
physiques et chimiques (F&A)

Library (E&F)
Bacteriologist, Gaspé (F)
Regional Chemist, Inspection Lab,
Longueuil (E&F)
Senior Technician, Chemistry Section,
Longueuil (E&F)
Senior Technician, Heavy Metals Lab.,
Longueuil (E&F)
Microbiologist, Sept-Iles (F)

Bibliothèque (F&A)
Bactériologiste, Gaspé (F)
Chimiste régional, Laboratoire
d'inspection, Longueuil (F&A)
Technicien principal, Section chimique,
Longueuil (F&A)
Technicien principal, Laboratoire des
métaux lourds, Longueuil (F&A)
Microbiologiste, Sept-Iles (F)

Central and Arctic Region
(Winnipeg)

Regional Inspection Chemist, Inspection
Branch (E)
Inspection Laboratory, Inspection Branch
(E)
Regional Library (E&F)
Library, C.C.I.W. (E&F)

Région du Centre et de l'Arctique
(Winnipeg)

Chimiste régional de l'inspection,
Direction de l'inspection (A)
Laboratoire de l'inspection, Direction
de l'inspection (A)
Bibliothèque régionale (F&A)
Bibliothèque, C.C.E.I. (F&A)

(Toronto)

District Manager, Eastern District, (E)
Senior Technician, Heavy Metals Lab, (E)
Senior Technician, Pesticide Lab, (E)
Chemist, Eastern District, Inspection
Services, (E)

(Toronto)

Gestionnaire de district, District de
l'Est, (A)
Technicien principal, Laboratoire des
métaux lourds, (A)
Technicien principal, Laboratoire des
pesticides, (A)
Chimiste, District de l'Est, Services de
l'inspection, (A)

(Ottawa)

Senior Chemist, National Fish Inspection
Laboratory (E)

(Ottawa)

Chimiste principal, Laboratoire National
de l'inspection du poisson (A)

Pacific Region

Library, West Vancouver Lab (E&F)
Senior Inspection Chemist (E)
Senior Chemistry Technician (E)

Région du Pacifique

Bibliothèque, Laboratoire de Vancouver
Ouest (F&A)
Chimiste principal de l'inspection (A)
Technicien principal de chimie (A)

Library, Pacific Biological Station,
Nanaimo (E)
Microbiologist, Fish Inspection Lab,
Prince Rupert (E)

Bibliothèque, Station biologique du
Pacifique, Nanaimo, (A)
Microbiologiste, Laboratoire
d'inspection du poisson, Prince
Rupert (A)

Microbiologist, Fish Inspection Lab,
Victoria (E)

Inspection Officers, Victoria (2E)

Other

Quality Control Manager, Comeau Sea
Foods, Saulnierville, N.S. (E)

Professor of Chemistry, Moncton
University, Moncton, N.B. (E)

Microbiologiste, Laboratoire
d'inspection du poisson, Victoria
(A)

Agents d'inspection, Victoria (2A)

Autres

Gestionnaire du contrôle de la qualité,
Comeau Sea Food, Saulnierville,
N.-É. (A)

Professeur de chimie, Université de
Moncton, Moncton (N.-B.) (A)



Table of Contents Table des matières

CHAPITRE 1: CONTAMINANTS

- Section 1: Mercure total
- Section 2: Mercure total, inorganique et organique
- Section 3: Pesticides organochlorés et BPC (méthode d'extraction par l'acétone)
- Section 4: Sélénium
- Section 5: Dosage du plomb des produits du poisson par spectrophotométrie d'absorption atomique

CHAPITRE 2: ANALYSE IMMÉDIATE

- Section 1: Cendres
- Section 2: Humidité et matières volatiles
- Section 3: Dosage des protéines (Kjeldhal)
- Section 4: Sel
- Section 5: Sodium et potassium
- Section 6: Sucres réducteurs totaux

CHAPITRE 3: INDICES DE QUALITÉ

- Section 1: Substances ressemblant à l'histamine
- Section 2: Azote à l'état de triméthylamine
- Section 3: Putrescine et cadavérine

CHAPITRE 4: ADDITIFS ALIMENTAIRES

- Section 1: Sulfite
- Section 2: Phosphore total

CHAPITRE 5: DIVERS

- Section 1: Thon en conserve, mesure de la couleur
- Section 2: Intoxication paralysante par les mollusques, méthode d'extraction
- Section 3: Identification des espèces par électrophorèse
- Section 4: Méthode d'extraction et d'analyse de l'acide domoïque



chapter chapitre	section	page
1	1	1
status état		date
new/nouveau		31/01/1986

**CHAPITRE 1 - CONTAMINANTS
SECTION 1: MERCURE TOTAL**

1. PORTÉE ET APPLICATION

- 1.1 Cette méthode peut servir à l'analyse du poisson, des produits halieutiques et des tissus biologiques. La limite de détection de cette méthode est de 0,01 ppm.

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

- 2.1 Le tissu de l'échantillon est digéré à 60°C à l'aide d'un mélange d'acides nitrique et sulfurique, et oxydé par une solution de permanganate de potassium. L'excès de permanganate de potassium est titré par du peroxyde d'hydrogène à 30 % et le mercure oxydé est converti à l'état élémentaire par une solution réductrice contenant du chlorure stanneux, du sulfate d'hydroxylamine et du chlorure de sodium. Le mercure est évaporé dans l'air et dosé par absorption atomique sans flamme à 253,7 nm.

3. INTERFÉRENCES

- 3.1 Il n'existe aucune interférence significative connue.

4. MÉTHODE D'ÉCHANTILLONNAGE ET ENTREPOSAGE

- 4.1 Lot commercial. Prélever un échantillon représentatif du lot du produit, et l'entreposer afin de conserver son intégrité.
- 4.2 Échantillons d'étude. Les poissons peuvent être mélangés ou analysés individuellement. Dans le cas d'espèces dont la longueur est habituellement supérieure à 30 cm, un seul poisson peut servir d'échantillon. Dans le cas d'espèces dont la longueur est inférieure à 30 cm, un échantillon constitué de plusieurs spécimens est nécessaire. Entreposer de façon à conserver l'intégrité de l'échantillon.

5. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

- 5.1 Lot commercial. Il faut tenir compte du type de produit et de la façon dont il est utilisé et préparé par le consommateur.



**CHEMICAL
METHODS
MANUAL**

**MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
1	1	2
status état		date
new/nouveau		31/01/1986

- 5.1.1 Dans le cas des poissons ou des produits halieutiques qui ne contiennent pas de liquide libre, broyer l'échantillon jusqu'à ce qu'il soit homogène.
- 5.1.2 Dans le cas des produits conservés dans de l'eau, de la saumure ou un milieu semblable qui est habituellement jeté par le consommateur, ouvrir le paquet et égoutter le produit sur un tamis de taille appropriée pendant 1 à 1½ minute. Broyer la partie de l'échantillon retenue par le tamis jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.
- 5.1.3 Dans le cas de produits conservés dans un milieu que le consommateur peut utiliser ou emploie normalement, par ex. du poisson en conserve dans son jus ou dans l'huile, placer tout le contenu du paquet dans un homogénéisateur et mélanger pendant une minute ou jusqu'à ce qu'un mélange homogène soit obtenu.
- 5.2 Échantillons d'étude.
- 5.2.1 Dans le cas des poissons, peser et mesurer la longueur du bout du museau à l'extrémité du rayon central de la nageoire caudale pour fins de comparaisons de taille.
- 5.2.2 Dans le cas d'un échantillon constitué de plusieurs spécimens, déterminer les valeurs moyennes de longueur et de poids du poisson.
- 5.2.3 Passer les filets dépiautés dans un broyeur à viande commercial un nombre de fois suffisant pour obtenir un mélange homogène (par ex. trois fois).
- 5.3 Recueillir l'échantillon homogénéisé dans une tasse de plastique ou une bouteille de verre lavées à fond et possédant un couvercle. Entreposer l'échantillon dans un réfrigérateur ou congélateur jusqu'au moment de l'utilisation. S'assurer que la substance préparée est encore homogène avant la pesée. Si du liquide se sépare de l'échantillon, mélanger de nouveau le produit avant de l'utiliser.
- 6. APPAREILLAGE**
- 6.1 Spectrophotomètre d'absorption atomique, équipé d'une lampe à cathode creuse à mercure, d'un auto-échantillonneur, d'une pompe distributrice, d'une canalisation à réactifs et de serpentins à mélange (voir fig. 3).



chapter chapitre	section	page
1	1	3
status état		date
new/nouveau		31/01/1986

- 6.2 Bain-marie thermostaté avec agitateur.
- 6.3 Homogénéisateur de tissus, mélangeur ou broyeur d'aliments.
- 6.4 Cellule d'absorption, 150 mm x 6 mm D.I., avec fenêtres de quartz (voir fig. 2).
- 6.5 Tube en verre pour l'élimination des bulles servant à la séparation des phases liquide et gazeuse avant les mesures d'absorption atomique (voir fig. 1).
- 6.6 Agitateur-mélangeur à tourbillon.
- 6.7 Enregistreur à graphique.
- 6.8 Récipients de digestion; ballons Kjeldahl de 30 mL ou éprouvettes graduées de Taylor de 50 mL.

7. RÉACTIFS

- 7.1 Acide nitrique (HNO_3)
- 7.2 Acide sulfurique (H_2SO_4)
- 7.3 Chlorure de sodium (NaCl)
- 7.3.1 Solution de chlorure de sodium (20 %)
- 7.4 Chlorure stanneux (SnCl_2) ou sulfate stanneux (SnSO_4).
- 7.5 Sulfate d'hydroxylamine.
- 7.6 Solution réductrice. Ajouter environ 2 400 mL d'eau distillée, 400 mL de H_2SO_4 , 120 mL de NaCl à 20 %, 40 g de sulfate d'hydroxylamine et 84 g de SnCl_2 (96 g de SnSO_4). Préparer dans l'ordre indiqué, refroidir, diluer jusqu'à 4 000 mL, mélanger et filtrer au besoin.
- 7.7 Permanganate de potassium (KMnO_4).
- 7.7.1 Solution de permanganate de potassium (à 6 %).



chapter chapitre	section	page
1	1	4
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

- 7.8 Acide de digestion. Préparer un mélange 1 + 4 de HNO₃ concentré et de H₂SO₄ concentré. (Les acides peuvent être ajoutés séparément, au choix.)
- 7.9 Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ à 30 %).
- 7.10 Solution de lavage. Préparer un mélange 1 + 3 d'acide de digestion et d'eau distillée.
- 7.11 Chlorure mercurique (HgCl₂).
- 7.11.1 Étalon primaire de mercure (1 000 ug/mL). Dissoudre 0,1345 g de HgCl₂ dans environ 75 mL d'eau distillée, ajouter 5 gouttes de H₂SO₄ concentré, et diluer jusqu'à 100 mL. La solution demeure stable pendant environ un mois à la température ambiante. Un étalon primaire commercial peut également être utilisé. Entreposé dans un contenant en polyéthylène et placé au réfrigérateur, l'étalon primaire demeure stable pendant une période allant jusqu'à un an.
- 8. MÉTHODE**
- 8.1.1 Peser avec précision de 0,1 à 0,5 g d'échantillon dans un ballon Kjeldahl de 30 mL ou une éprouvette graduée Taylor de 50 mL. (Décongeler partiellement l'échantillon avant la pesée.) Le poids des échantillons dépend du degré de difficulté de la digestion; par ex., les farines de poisson, les concentrés de protéines de poisson et les huiles de poisson nécessitent des poids inférieurs d'échantillon.
- 8.1.2 Préparer pour chaque jour des solutions étalons contenant 100 à 400 ng de Hg et soumettre les étalons et le blanc à tout le protocole.
- 8.2 Ajouter 5 mL d'acide de digestion au récipient de digestion contenant l'échantillon pesé. S'assurer que l'acide recouvre complètement l'échantillon. (Dans le cas des échantillons à teneur élevée en gras comme le foie de poisson, ajouter 2 ou 3 mL d'acide nitrique fumant afin d'assurer la destruction complète de l'échantillon.)
- 8.3 Couvrir sans boucher le récipient de digestion et laisser reposer dans un bain-marie à agitation dont la température a été réglée à 60 °C pendant deux heures ou jusqu'à ce que la digestion soit complète (voir annexe). Le couvercle doit être mis de façon à permettre l'échappement des oxydes d'azote.



**CHEMICAL
METHODS
MANUAL**

**MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
1	1	5
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

- 8.4 Lorsque la digestion est terminée, retirer l'échantillon du bain-marie et laisser refroidir à la température ambiante. (Le refroidissement peut être accéléré en plaçant le récipient dans un bain de glace fondante.)
- 8.5 Ajouter lentement 15 mL de solution de $KMnO_4$ à 6 % dans un bain de glace en mélangeant sans arrêt. Laisser reposer pendant au moins deux heures et, de préférence, toute une nuit.
- 8.6 Titrer la solution échantillon par du H_2O_2 à 30 %; ajouter le H_2O_2 à la goutte dans un agitateur-mélangeur à tourbillon en mélangeant sans arrêt jusqu'à ce que la solution devienne limpide. Éviter l'ajout d'un excès de H_2O_2 . Au besoin, titrer tout excès de H_2O_2 par une solution diluée de $KMnO_4$ jusqu'à l'apparition d'une coloration rose très pâle.
- 8.7 Refroidir la solution échantillon et diluer à 25 mL.
- 8.8 Installer le spectrophotomètre d'absorption atomique selon les indications du fabricant avec la lampe au mercure et la cellule d'absorption à la place du brûleur. Régler les paramètres opérationnels pour une énergie maximale et une absorption minimale due à l'utilisation de la cellule (par ex. longueur d'onde de 253,7 nm).
- 8.9 Mettre l'équipement en marche 30 minutes avant l'analyse.
- 8.10 Régler le "zéro" du spectrophotomètre et de l'enregistreur en passant la solution réductrice dans le système.
- 8.11 Placer l'échantillon, les étalons et le blanc, vérifier les échantillons sur le plateau tournant de l'auto-échantillonneur, et mettre ce dernier en marche.
- 8.11.1 La solution échantillon est combinée à un écoulement constant de solution réductrice et d'air dans une proportion 1: 1: 6. Cette solution est passée dans deux serpentins de mélange et dans le dispositif d'élimination des bulles où l'air et la vapeur de mercure sont séparés de la phase liquide (qui est jetée). La phase gazeuse séparée traverse la cellule d'absorption où l'absorbance due au mercure est mesurée. L'absorption est enregistrée sous forme de pics.
- 8.12 Mesurer la hauteur des pics produits par le blanc, les étalons et l'échantillon.



**CHEMICAL
METHODS
MANUAL**

**MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
1	1	6
status état		date
new/nouveau		31/01/1986

9. CALCULS

- 9.1 Préparer une courbe d'étalonnage de la hauteur de pic en fonction de la teneur en Hg (ng) des étalons.
- 9.2 Doser le mercure dans l'échantillon en comparant la hauteur du pic de l'échantillon à la courbe d'étalonnage tout en tenant compte du poids de l'échantillon et du facteur de dilution. Exprimer les résultats en mercure total/poids humide (ppm).

10. PRÉCISION ET EXACTITUDE

- 10.1 Il a été montré que l'écart-type des analyses en triple était 0,04 à 0,10 ppm et 0,05 à 0,5 ppm de Hg, ou mieux. La récupération du mercure dans des échantillons enrichis atteint 95 % ou mieux.

11. REMARQUES

- 11.1 Les oxydes d'azote absorbent à 253,7 nm. C'est pour cette raison que du sulfate d'hydroxylamine est ajouté à la solution réductrice.
- 11.2 Une solution aqueuse de sulfate d'hydroxylamine ou de chlorhydrate peut remplacer le peroxyde d'hydrogène à 30 % (étape 8.6). Une étude à laquelle ont collaboré des laboratoires régionaux, a montré qu'une solution à 25 % pds/vol, ajoutée goutte à goutte, donnait des résultats semblables à ceux obtenus lorsque du peroxyde d'hydrogène à 30 % était utilisé. Des volumes spécifiques de solutions plus diluées ont aussi été employés.
- 11.3 La méthode Hendzel-Jamieson constitue un protocole acceptable de rechange pour le dosage du mercure total dans les poissons et les produits halieutiques lorsqu'il est nécessaire d'analyser un nombre considérable d'échantillons.

12. RÉFÉRENCES

- 12.1 Uthe, F.J., F.A.J. Armstrong and M.P. Stainton, "Mercury Determination in Fish Samples by Wet Digestion and Flameless Atomic Absorption Spectrophotometry", J. Fish. Res. Bd. Can., 27, 805 (1970).
- 12.2 Armstrong, F.A.J., and F.J. Uthe, "Semi-automated Determination of Mercury in Animal Tissue", Atomic Absorption Newsletter, 10, 101 (1971).
- 12.3 Hendzel, M.R., and D.M. Jamieson, "Determination of Mercury in Fish", Analytical Chemistry, 48, 926 (1976).



chapter chapitre	section	page
1	1	7
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

ANNEXE

Méthodes pour vérifier si la digestion de l'échantillon est complète

Il est essentiel que la digestion soit complète, particulièrement dans le cas des échantillons gras comme l'anguille, le hareng et les huiles de poisson, si l'on veut obtenir des résultats exacts et uniformes. On décrit ci-dessous trois techniques visant à vérifier si la digestion est complète.

- 1) Effectuer des analyses en triple pour trois poids différents d'échantillon (par ex. 0,1 0,2 et 0,4 g). Laisser la digestion s'effectuer pendant la même période pour les trois échantillons. Les neuf résultats devraient être comparables si les échantillons dont le poids est le plus élevé sont complètement digérés. Lorsque les résultats sont différents, la période de digestion doit être prolongée ou la taille des échantillons, réduite. Si la digestion semble être complète, la taille de l'échantillon utilisée lors d'analyses ultérieures de substances semblables doit se situer au milieu de la gamme à l'essai (par ex., entre 0,2 et 0,3 g).
- 2) À la fin d'une période normale de digestion, ajouter quelques gouttes d'acide nitrique fumant le long de la paroi intérieure du récipient de digestion. La digestion est incomplète s'il y a carbonisation au contact des deux liquides.
- 3) Examiner à la lumière le produit de la digestion à la fin d'une période normale de digestion. Faire passer un étroit faisceau de lumière blanche à travers le produit de digestion, à angle droit par rapport à l'axe du récipient.
 - a) Si le faisceau lumineux est dispersé (point d'observation au-dessus du récipient), la digestion est probablement incomplète.
 - b) Si le faisceau lumineux traverse la solution sans trop se disperser, la digestion est probablement complète.

Remarque concernant la sécurité :

Porter des lunettes de protection et sécher les récipients de digestion avant l'essai de la méthode n° 3 telle que décrite ci-dessus. Les ampoules électriques chaudes atteintes par des gouttes d'eau peuvent s'éclater.



chapter chapitre	section	page
1	1	8
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

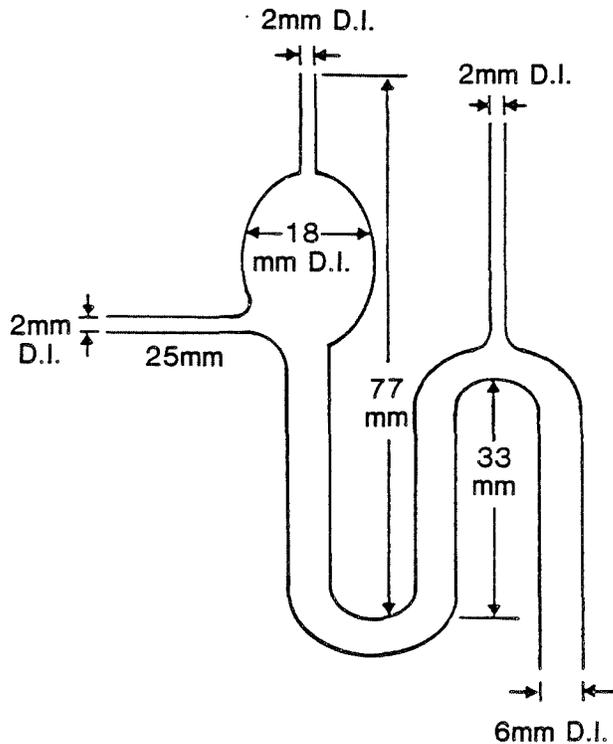


FIGURE 1. Dispositif d'élimination des bulles

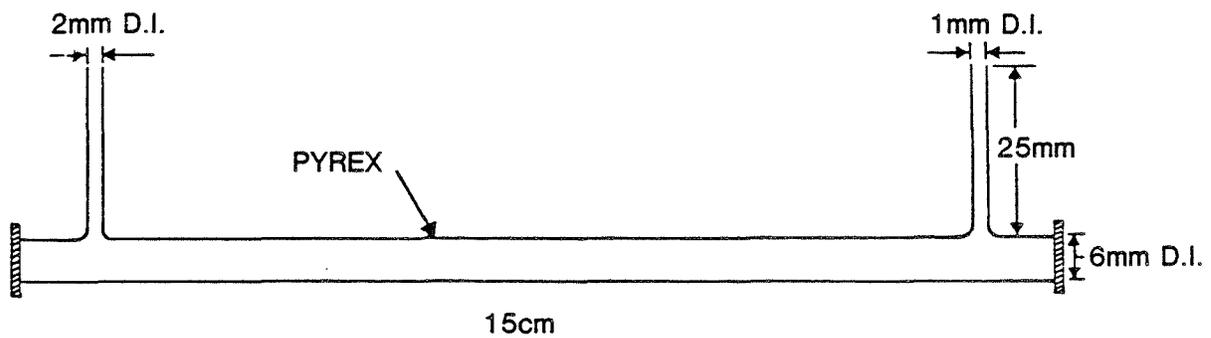


FIGURE 2. Cellule d'absorption

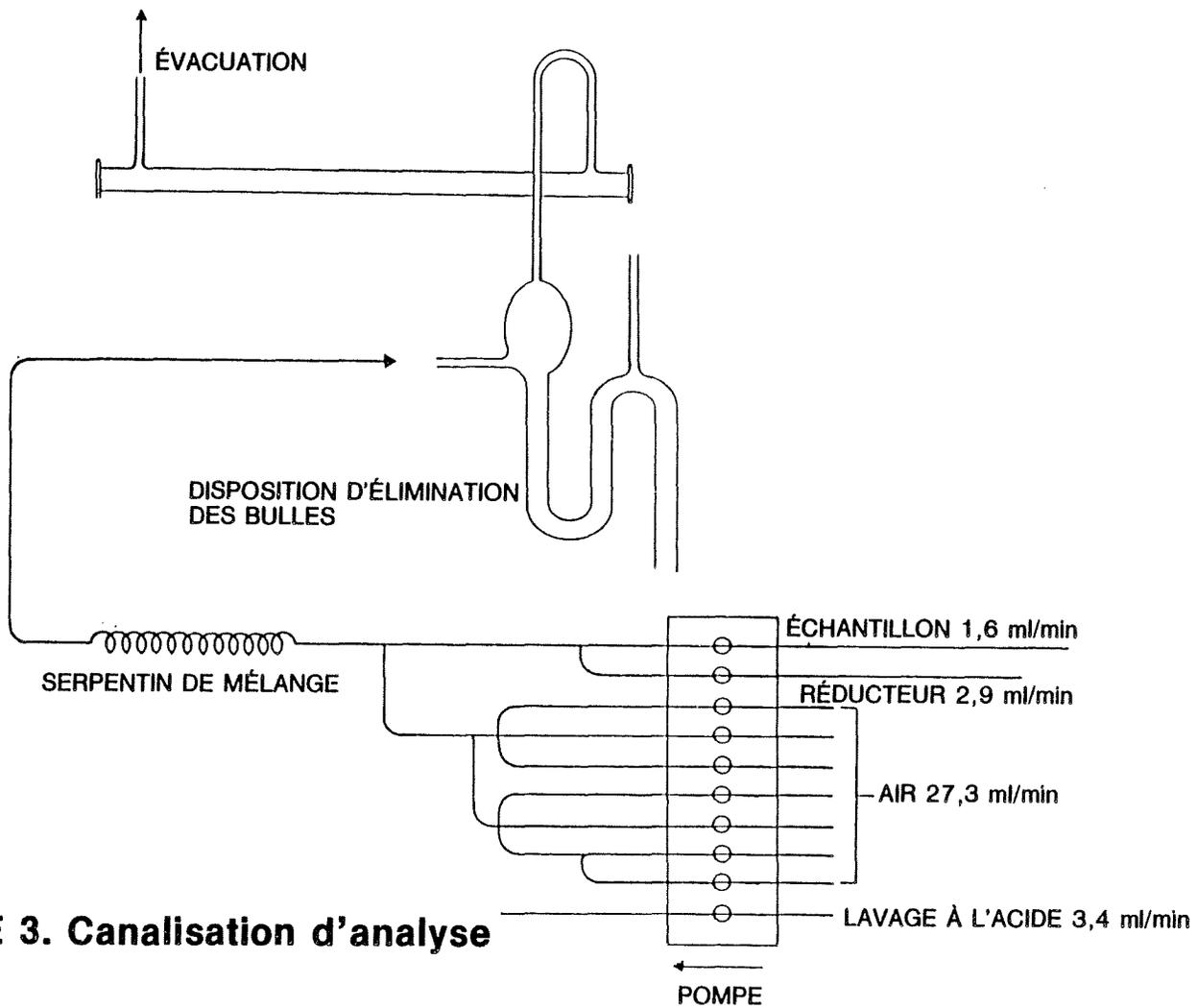


FIGURE 3. Canalisation d'analyse

chapter chapitre	section	page
1	1	9
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	



chapter chapitre	section	page
1	2	1
status état		date
new/nouveau		31/01/1986

**CHAPITRE 1 - CONTAMINANTS
SECTION 2: MERCURE TOTAL, INORGANIQUE ET ORGANIQUE**

1. PORTÉE ET APPLICATION

1.1 Cette méthode peut servir au dosage du mercure total, inorganique et organique, dans le poisson et les produits halieutiques, ainsi que dans d'autres tissus biologiques. La limite de détection de cette méthode est 0,002 ppm.

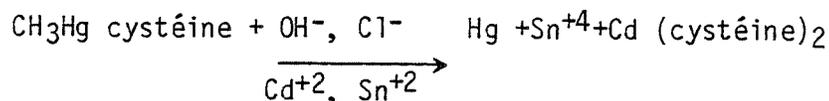
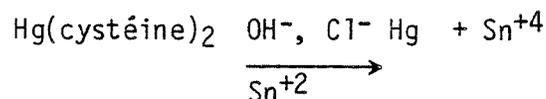
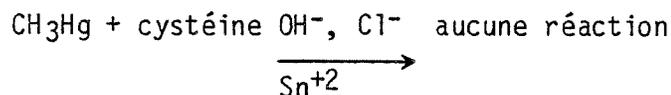
2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

2.1 L'échantillon de tissu est digéré à 100 °C en utilisant une solution de NaOH à 45 % contenant de la cystéine comme complexant du mercure.

2.2 Analyse du mercure inorganique : après avoir été complexé par la cystéine en solution, le mercure inorganique (Hg^{+2}) est réduit au mercure élémentaire par des ions stanneux dans une solution basique forte. Les complexes de mercure organique - cystéine ne sont pas réduits par ce processus.

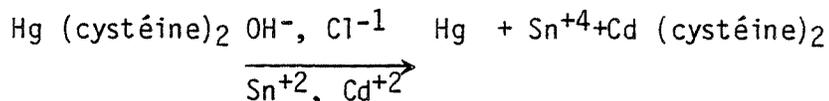
2.3 Analyse du mercure total : dans un autre sous-échantillon, on ajoute un excès important d'ions de cadmium (Cd^{+2}) avec les ions stanneux (Sn^{+2}) dans une solution basique forte afin de déplacer la cystéine de toutes les formes de mercure. Ces dernières sont réduites en mercure élémentaire par les ions stanneux, ce qui permet le dosage du mercure total. Le résultat ainsi obtenu est soustrait de la teneur en mercure inorganique, établie à l'étape 2.2, et la différence constitue la teneur en mercure organique.

2.4 Équations:





chapter chapitre	section	page
1	2	2
status état		date
new/nouveau		31/01/1986



2.5 Le mercure élémentaire est vaporisé dans de l'air et dosé par absorption atomique sans flamme à 253,7 nm ou par un détecteur de mercure.

3. INTERFÉRENCES

3.1 Il n'existe aucune interférence significative connue.

4. ÉCHANTILLONNAGE ET ENTREPOSAGE

4.1 Lot commercial. Prélever un échantillon représentatif du lot du produit et l'entreposer afin de conserver son intégrité.

4.2 Échantillons d'étude. Les poissons peuvent être mélangés ou analysés individuellement. Dans le cas d'espèces dont la longueur est habituellement supérieure à 30 cm, un seul poisson peut servir d'échantillon. Dans le cas d'espèces dont la longueur est inférieure à 30 cm, un échantillon constitué de plusieurs spécimens est nécessaire. Entreposer de façon à conserver l'intégrité de l'échantillon.

5. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

5.1 Lot commercial. Il faut tenir compte du type de produit et de la façon dont il est utilisé et préparé par le consommateur.

5.1.1 Dans le cas des poissons ou des produits halieutiques qui ne contiennent pas de liquide libre, pulvériser l'échantillon jusqu'à ce qu'il soit homogène.

5.1.2 Dans le cas des produits conservés dans de l'eau, de la saumure ou un milieu semblable qui est habituellement jeté par le consommateur, ouvrir le paquet et égoutter le produit sur un tamis de taille appropriée pendant 1 à 1½ minute. Pulvériser la partie de l'échantillon retenue par le tamis jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.

5.1.3 Dans le cas de produits conservés dans un milieu que le consommateur peut utiliser ou emploie normalement, par ex. du poisson mis en conserve dans son jus ou dans l'huile, placer tout le contenu du paquet dans un homogénéisateur et mélanger pendant une minute ou jusqu'à ce qu'un mélange homogène soit obtenu.



**CHEMICAL
METHODS
MANUAL**

**MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
1	2	3
status état		date
new/nouveau		31/01/1986

5.2 Échantillons d'étude.

5.2.1 Dans le cas des poissons, peser et mesurer la longueur du bout du museau à l'extrémité du rayon central de la nageoire caudale pour fins de comparaisons de taille.

5.2.2 Dans le cas d'un échantillon constitué de plusieurs spécimens, déterminer les valeurs moyennes de longueur et de poids du poisson.

5.2.3 Passer les filets dépiautés dans un broyeur à viande commercial un nombre de fois suffisant pour obtenir un mélange homogène (par ex. trois fois).

5.3 Recueillir l'échantillon homogénéisé dans une tasse de plastique ou une bouteille de verre lavées à fond et possédant un à couvercle. Entreposer l'échantillon dans un réfrigérateur ou congélateur jusqu'au moment de l'utilisation. S'assurer que la substance préparée est encore homogène avant la pesée. Si du liquide se sépare de l'échantillon, mélanger de nouveau le produit avant de l'utiliser.

6. APPAREILLAGE

6.1 Spectrophotomètre d'absorption atomique, équipé d'une lampe à cathode creuse à mercure ou d'un détecteur de mercure.

6.2 Multimètre réglé sur l'échelle mv.

6.3 Enregistreur graphique (optionnel).

6.4 Plaque chauffante agitatrice.

6.5 Éprouvette à digestion Taylor graduée.

6.6 Bloc d'aluminium à trous pour éprouvettes à digestion.

6.7 Pipettes automatiques de 1 000 uL.

6.8 Pompe à vide.

6.9 Manomètre gaz-air.

6.10 Tube Tygon de $\frac{1}{2}$ " de diamètre (D.I.).



**CHEMICAL
METHODS
MANUAL**

**MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
1	2	4
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

- 6.11 Thermomètre de plaque chauffante.
- 6.12 Distributeur universel de couvercles à bouteilles
2 de 1-10 mL
1 de 1-50 mL
- 6.13 Contenants à réactifs de 1 ou 2 L en plastique ou en verre.
- 6.14 Ballons de réaction (voir fig. 1) avec tête Dreschsel dont le goulet forme un entonnoir de verre. On peut, comme solution de rechange, employer un bouchon de caoutchouc.
- 6.15 Barboteur, miniature.
- 6.16 Filtre à charbon.
- 7. RÉACTIFS**
- 7.1 Chlorure de sodium (NaCl).
- 7.1.1 Solution de chlorure de sodium (1 %).
- 7.2 Acide sulfurique (H₂SO₄).
- 7.3 H₂SO₄ 4,5N - NaCl à 1 %. À 35 g de NaCl, ajouter 3 000 mL de H₂O et 441 mL de H₂SO₄. Diluer à 3 500 mL.
- 7.4 L-cystéine.
- 7.4.1 Solution de L-cystéine (1 %)
- 7.5 Chlorure stanneux (SnCl₂).
- 7.6 Solution de chlorure stanneux : Ajouter 10 g de SnCl₂ et 1 g de L-cystéine. Diluer à 500 mL avec H₂SO₄ 4,5N - NaCl à 1 %.
- 7.7 Chlorure de cadmium (CdCl₂).
- 7.8 Solution de chlorure stanneux et de chlorure de cadmium. Chauffer jusqu'à ébullition une solution comportant 10 g de SnCl₂, 2,5 g de CdCl₂ et 1 g de L-cystéine. Refroidir et diluer à 500 mL avec une solution de H₂SO₄ 4,5N, - NaCl à 1 % d'hydroxyde.

**CHEMICAL
METHODS
MANUAL****MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
1	2	5
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

7.9 Hydroxyde de sodium (NaOH).

7.9.1 Solution d'hydroxyde de sodium (35 % et 45 %).

7.10 n-octanol.

7.11 Éthanol (95 %).

7.12 Solution antimousse. Ajouter 1 mL de n-octanol à 9 mL d'éthanol (95 %).

7.13 Chlorure de mercure (HgCl₂).

7.13.1 Étalon primaire de mercure (1 000 ug/mL). Dissoudre 0,1345 g de HgCl₂ dans environ 75 mL d'eau distillée, ajouter 5 gouttes de H₂SO₄ concentré et diluer à 100 mL. La solution est stable pendant environ un mois à la température ambiante. On peut la remplacer par un étalon primaire commercial. Entreposé dans un contenant en polyéthylène dans un réfrigérateur, l'étalon primaire est stable pendant un mois.

7.13.2 Solution étalon de mercure (10 ug/mL). Diluer 1 mL d'étalon primaire de mercure dans 100 mL de H₂O.

7.14 Chlorure de méthylmercure (CH₃HgCl).

7.14.1 Étalon primaire de méthylmercure (500 ug/mL). Dissoudre 62,58 mg de CH₃HgCl dans 100 mL d'eau.

7.14.2 Étalon de travail de méthylmercure (5 ug/mL). Diluer 1 mL d'étalon primaire dans 100 mL de H₂O.

8. MÉTHODE

8.1 Peser avec précision de 0,1 à 0,5 g d'échantillon homogénéisé dans une éprouvette à digestion Taylor graduée de 50 mL. (Décongeler partiellement l'échantillon avant la pesée). Le poids de l'échantillon dépend du degré de difficulté de la digestion; par ex. les farines, les protéines concentrées et les huiles de poisson nécessitent des échantillons de poids plus petit.

8.2 Préparer, le jour des essais, des étalons contenant de 0,1 à 0,4 ug Hg (10, 20, 30 et 40 uL de solution de travail de chlorure de mercure) ou 0,2 ug de Hg (40 uL de solution étalon de travail de méthylmercure), les déposer dans une éprouvette à digestion Taylor graduée, et les soumettre, ainsi que le blanc, au protocole en entier.



**CHEMICAL
METHODS
MANUAL**

**MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
1	2	6
status état		date
new/nouveau		31/01/1986

8.3 Installer le spectrophotomètre d'absorption atomique sans flamme ou le détecteur de mercure selon les indications du fabricant, contenant la lampe à mercure. Fixer la cuve d'absorption en place au besoin. Mettre la pompe à vide en marche. Régler le vide à 1 litre/min. Régler le "zéro" du spectrophotomètre ou du détecteur de mercure, et celui de l'enregistreur.

8.4 Dosage de mercure total

8.4.1 Aux éprouvettes à digestion Taylor graduées contenant les échantillons, les étalons (0,1 à 0,4 ug Hg) et les blancs, ajouter 1,0 mL de solution de cystéine à 1 %, 5,0 mL de NaCl à 1 %, et 3,0 mL de NaOH à 45 %.

8.4.2 Laisser digérer pendant une heure à 100 °C en agitant les éprouvettes continuellement.

8.4.3 Refroidir et diluer à 50 mL.

8.4.4 Transférer 1,0 mL au ballon à réaction et ajouter trois gouttes de solution antimousse, 5,0 mL de solution de SnCl₂ - CdCl₂ et 5,0 mL de NaOH à 35 %. Enregistrer immédiatement la déviation de l'aiguille. (Voir fig. 2C).

8.5 Dosage du mercure inorganique

8.5.1 Répéter l'étape 8.4 mais en utilisant du méthylmercure comme étalon (0,2 ug Hg). Remplacer la solution de SnCl₂ - CdCl₂ par une solution de SnCl₂ à l'étape 8.4.4. Enregistrer la déviation de l'aiguille. (Voir fig. 2D).

9. CALCULS

9.1 Préparer une courbe d'étalonnage de la hauteur du pic en fonction de la teneur (ug) en Hg dans les étalons.

9.2 Doser le mercure dans l'échantillon de contrôle intralaboratoire (au besoin) et dans l'échantillon en comparant la hauteur du pic produit par ce dernier et la courbe d'étalonnage, compte tenu du poids de l'échantillon et du facteur de dilution. Exprimer les résultats en mercure ou en mercure inorganique en fonction du poids humide (ppm). Soustraire le mercure inorganique du mercure total pour obtenir la teneur en mercure organique des échantillons.

$$\text{ppm (ug/g)} = \frac{h. \text{ du pic de l'éch. (cm)}}{h. \text{ de la courbe d'étal. (cm)}} \times \frac{\text{(fact. de dil. (au besoin))}}{\text{pds de l'ech. (g)}} \text{ug}$$



chapter chapitre	section	page
1	2	7
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

10. PRÉCISION ET EXACTITUDE

- 10.1 On peut se procurer auprès de l'Office of Standard Reference Materials du National Bureau of Standards, Washington, D.C. 20234, un échantillon de poisson lyophilisé (thon albacore, matière de référence n° 50), et un échantillon de foie de bovin (matière de référence n° 1577). Ces échantillons ou d'autres échantillons de thon intralaboratoires de contrôle sont analysés régulièrement lors de chaque essai. La précision calculée est 11,0 %.
- 10.2 Le dosage du mercure total et inorganique nécessite des analyses en triple.
- 10.3 La limite de détection de cette méthode se situe à environ 0,002 ppm pour le mercure total et inorganique.
- 10.4 La récupération du mercure dans des échantillons enrichis atteint 99,8 % pour le mercure total et 107,2 % pour le mercure inorganique. Un maximum de 7 % de mercure organique a été observé par dosage du mercure inorganique d'échantillons enrichis contenant jusqu'à 100 ppm de méthylmercure.

11. RÉFÉRENCES

- 11.1 Clarkson, T.W., "Determination of total and Inorganic Mercury in Hair by Flameless Atomic Absorption and of Methyl Mercury by Gas Chromatography", Clinical Chem. 20, 222-229, (1974).
- 11.2 Magos, L., Clarkson, T.W., "Atomic Absorption Determination of Total, Inorganic and Organic Mercury in blood", Journ. AOAC, 55, 966-971, (1972).
- 11.3 Clarkson, T.W., "Epidemiological Experience with Magos 1 Reagents in the Determination of Different Forms of Mercury in Biological Samples by Flameless Atomic Absorption", Jour. Anal. Tox., 1, 265-269, (1977),
- 11.4 Magos, L., "Selective Atomic Absorption Determination of Inorganic mercury and Methyl Mercury in Undigested Biological Samples", Analyst, 96, 847 (1971).



chapter chapitre	1	section	2	page	8
status état	new/nouveau			date	31/01/1986

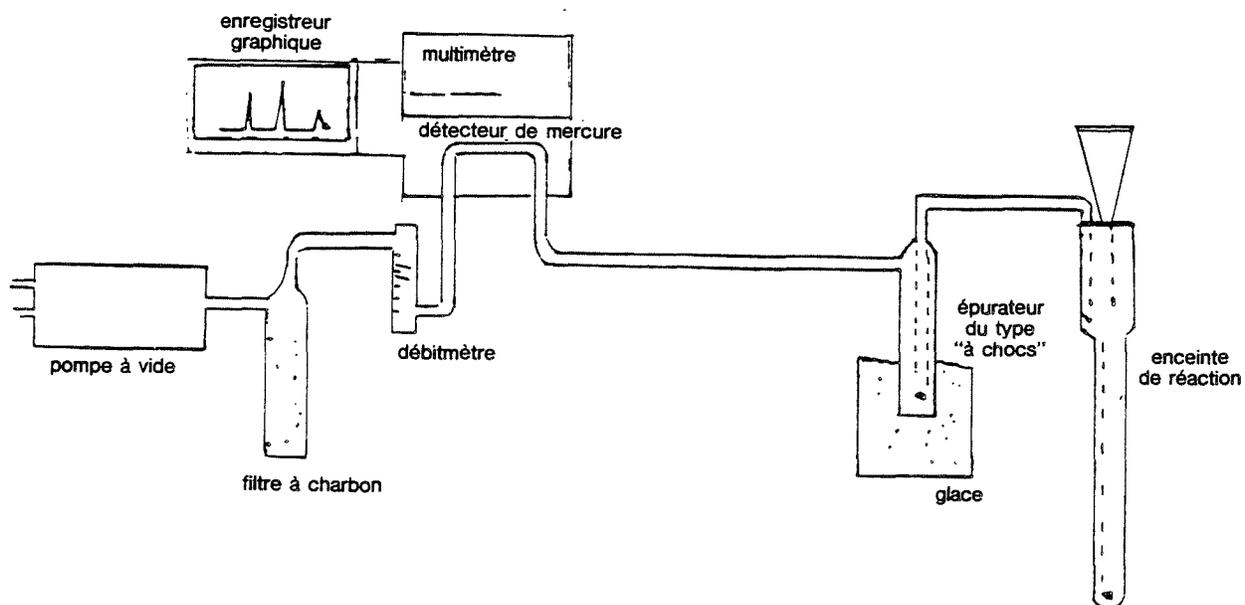
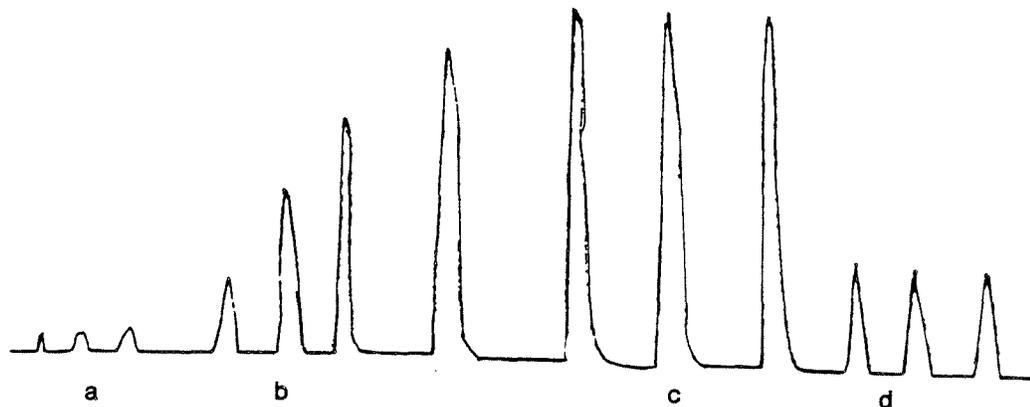


Schéma de l'appareil assemblé

Figure 1



Représentation graphique: a) blanc, b) courbe d'étalonnage, c) mercure total, d) mercure inorganique

Figure 2



chapter chapitre	section	page
1	3	1
status état		date
new/nouveau		31/01/1986

CHAPITRE 1 - CONTAMINANTS

SECTION 3: PESTICIDES ORGANOCHLORÉS et BPC (Méthode d'extraction par l'acétone)

1. PORTÉE ET APPLICATION

- 1.1 Cette méthode peut être utilisée pour le dosage de HCB, BHC, aldrine, heptachlore, époxyde d'heptachlore, pp-DDE, dieldrin, endrine, pp-DDD, pp-DDT, BPC et mirex, dans le poisson, les produits halieutiques et la farine de poisson.

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

- 2.1 Les composés sont extraits de l'échantillon au moyen d'hexane/acétone à 1/1. Les composés sont séparés des lipides co-extraits par chromatographie d'adsorption sur du florisil désactivé. Le nettoyage final et la séparation des BPC, pp-DDE, HCB, aldrine heptachlore et mirex des autres pesticides organochlorés sont réalisés par la chromatographie d'adsorption sur du florisil. Les résidus sont séparés et quantifiés par chromatographie gaz-liquide (CGL) à l'aide d'un détecteur à capture d'électrons (DCE).

3. INTERFÉRENCES

- 3.1 Photomirex coïncide avec un pic de BPC situé à environ $TRR_{DDE}177$.
- 3.2 On a déjà observé des composés non identifiés qui créaient des pics négatifs à temps de rétention varié jusqu'au pp-DDE. Un pic négatif à élution tardive peut prolonger le temps de CGL nécessaire pour éluer la fraction de pesticide.

4. MÉTHODE D'ÉCHANTILLONNAGE ET ENTREPOSAGE

- 4.1 Lot commercial. Prélever un échantillon mélangé, représentatif du lot du produit.
- 4.1.2 Échantillons d'étude. Les poissons peuvent être mélangés ou analysés individuellement. Dans le cas d'espèces dont la longueur est habituellement supérieure à 30 cm, un seul poisson peut servir d'échantillon. Dans le cas d'espèces dont la longueur est inférieure à 30 cm, un échantillon constitué de plusieurs spécimens est nécessaire.



**CHEMICAL
METHODS
MANUAL**

**MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
1	3	2
status état		date
new/nouveau		31/01/1986

4.2 L'échantillon peut être expédié dans un sac de plastique.
(Remarque : On doit s'assurer que tous les matériaux plastiques en contact avec l'échantillon à l'une ou l'autre étape du protocole sont libres de substances à l'origine d'interférences.)

4.3 Entreposer l'échantillon de façon à conserver son intégrité.

5. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

5.1 Lot commercial. Il faut tenir compte du type de produit et de la façon dont il est utilisé et préparé par le consommateur.

5.1.1 Dans le cas des poissons ou des produits halieutiques qui ne contiennent pas de liquide libre, pulvériser l'échantillon jusqu'à ce qu'il soit homogène.

5.1.2 Dans le cas des produits conservés dans de l'eau, de la saumure ou un milieu semblable qui est habituellement jeté par le consommateur, ouvrir le paquet et égoutter le produit sur un tamis de taille appropriée pendant 1 à 1½ minute. Pulvériser la partie de l'échantillon retenue par le tamis jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.

5.1.3 Dans le cas des produits conservés dans un milieu que le consommateur peut utiliser ou emploie normalement, par ex. du poisson mis en conserve dans son jus ou dans l'huile, placer tout le contenu du paquet dans un homogénéisateur et mélanger pendant une minute ou jusqu'à ce qu'un mélange homogène soit obtenu.

5.2 Échantillons d'étude.

5.2.1 Dans le cas des poissons, peser et mesurer la longueur du bout du museau à l'extrémité du rayon central de la nageoire caudale, pour fins de comparaison de taille.

5.2.2 Dans le cas d'un échantillon constitué de plusieurs spécimens, déterminer les valeurs moyennes de longueur et de poids du poisson.

5.2.3 Passer les filets dépiautés dans un broyeur à viande commercial un nombre de fois suffisant pour obtenir un mélange homogène (par ex. trois fois).

**CHEMICAL
METHODS
MANUAL****MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
1	3	3
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

- 5.3 Recueillir l'échantillon homogénéisé dans un pot de plastique ou une bouteille de verre lavés à fond et possédant un couvercle. (Les couvercles des bouteilles de verre doivent être garnis d'une feuille d'aluminium, lavée au préalable avec de l'hexane.) Entreposer l'échantillon dans un réfrigérateur jusqu'au moment de l'utilisation. S'assurer que la substance préparée est encore homogène avant la pesée. Si du liquide se sépare de l'échantillon, mélanger de nouveau le produit avant de l'utiliser.

6. APPAREILLAGE

- 6.1 Chromatographe à gaz avec détecteur à capture d'électrons.
- 6.2 Colonnes de verre pour chromatographe à gaz, 6' x 1/8" D.I.
- 6.3 Homogénéisateur Polytron (PT-10), Sorval Omni-Mixer, ou l'équivalent.
- 6.4 Éprouvettes de 25 x 150 mm (pour l'homogénéisateur Polytron), ou des ensembles à mélange en acier inoxydable de 50 mL (pour Omni-Mixer).
- 6.5 Colonne de chromatographie en verre, 20 x 400 mm, avec un disque de verre fritté et un robinet en teflon.
- 6.6 Colonne de chromatographie en verre, 10 x 450 mm, avec un disque en verre fritté, un réservoir supérieur d'une capacité de 60-100 mL et un robinet en teflon (voir figure 1).
- 6.7 Colonne filtrante en verre (voir figure 2).
- 6.8 Évaporateur rotatif.
- 6.9 Ballons à fond rond (BFR), 250 mL et 500 mL, avec des joints 24/40.
- 6.10 Seringue, 10 uL.

7. RÉACTIFS

- 7.1 Solvants distillés sous verre, pour dosage des résidus de pesticides, exempts de substances pouvant nuire au détecteur à capture d'électrons. Mettre les solvants à l'essai par concentration et injection dans le système de CGL-DCE.



chapter chapitre	section	page
1	3	4
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

- 7.1.1 Hexane.
- 7.1.2 Acétone.
- 7.1.3 Chlorure de méthylène (dichlorométhane).
- 7.1.4 Acétonitrile.
- 7.2 Solvant d'élution, nettoyage, chlorure de méthylène/hexane 1:4 (vol/vol).
- 7.3 Solvant d'élution, fraction séparée 2, chlorure de méthylène à 10 % dans l'hexane (vol/vol).
- 7.4 Solvant d'élution, fraction séparée 3, hexane 50 %/acétonitrile 0,35 %/chlorure de méthylène 49,65 % (vol/vol/vol).
- 7.5 Sulfate de sodium, anhydre, granulaire. Purifier en chauffant à 600°C pendant une nuit.
- 7.6 Florisil, catégorie PR, 60/100 mesh. Retirer du contenant d'expédition et entreposer dans des bouteilles teintées et fermées d'une capsule ou d'un bouchon. (Les bouteilles d'hexane de qualité pesticide séchées, sont idéales.) Transférer dans des bouteilles non bouchées et entreposer à 130°C pendant au moins 24 heures avant la désactivation.
- 7.7 Florisil 5 %, désactivé (nettoyage). Ajouter 5 % d'eau en poids au florisil de qualité PR et bien mélanger. Préparer la veille de l'utilisation et entreposer dans une bouteille très bien bouchée. (S'assurer que l'eau distillée ne contient pas d'impuretés avant de l'utiliser pour désactiver le florisil.)
- 7.8 Florisil désactivé (séparation du BPC). L'importance de la désactivation requise peut varier d'un lot à l'autre, soit de 0,5 % à 2 % en poids d'eau. Déterminer l'importance de la désactivation requise en éluant les étalons de BPC et des pesticides à travers des colonnes d'essai afin d'obtenir les meilleures conditions pour la séparation BPC/pesticide. Au départ, utiliser une gamme de volumes d'éluant à divers niveaux de désactivation (accroissements de désactivation de 0,5 %, accroissements de volume de 5 mL) pour optimiser la séparation. (Voir les sections 8.12, 8.13, 8.14.) Lorsque le lot a été étalonné, les vérifications subséquentes ne requièrent pas autant d'accroissements.

**CHEMICAL
METHODS
MANUAL****MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
1	3	5
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

- 7.8.1 Pas plus de 5 % du pp-DDE et aucun pic de PCB ne doit apparaître dans la fraction II, et pas de pp-DDT ne doit apparaître dans la fraction I. La séparation des composés entre les fractions II et III est normalement réalisée sans difficultés. Vérifier l'étalonnage à des intervalles raisonnables ou après une longue période d'inactivité (plus de 2 mois). De fortes variations de l'humidité ambiante peuvent modifier le rendement de la colonne.
- 7.8.2 Préparer la veille de l'utilisation et entreposer à la température ambiante dans une bouteille bien bouchée.
- 7.9 Phases liquides de CG : 0V-1, 0V-210, 0V-17 (voir 11.3 concernant les substitutions).
- 7.10 Support solide de CG, traité au silane (Chromosorb W-HP, 80/100 mesh, Anakrom Q, 90/100 mesh, ou l'équivalent).
- 7.11 Étalons. Préparer les étalons à partir de produits de qualité analytique.
- 8. MÉTHODE**
- 8.1 Peser avec précision environ 5 g d'échantillon dans une éprouvette de 25 x 150 mm (ou un contenant Omni-Mixer de 50 mL). Ajouter 10 mL d'hexane, 10 mL d'acétone et 5 g de sulfate de sodium anhydre.
- 8.2 Homogénéiser pendant 1 minute dans un homogénéisateur Polytron (ou pendant 5 minutes dans un appareil Sorval Omni-Mixer).
- 8.3 Préparer une colonne filtrante (figure 2) en ajoutant environ 50 mm de sulfate de sodium anhydre.
- 8.4 Verser l'extrait d'échantillon de l'étape 8.2 sur la colonne, et filtrer sous vide dans un BFR de 250 mL.
- 8.5 Rincer le tube avec 3 portions de 10 mL d'hexane, qui sont versées sur le filtre (voir 11.1).
- 8.6 Évaporer jusqu'à environ 1 mL et ajouter 10 mL d'hexane.
- 8.7 Mettre dans la fiole 25 g de florisol désactivé à 5 % et faire tourner le contenu jusqu'à l'obtention d'une poudre qui se répand facilement.



**CHEMICAL
METHODS
MANUAL**

**MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
1	3	6
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

- 8.8 Préparer une colonne chromatographique de 20 x 400 mm : ajouter environ 10 mm de sulfate de sodium anhydre, puis 25 g de florisil désactivé à 5 %. Frapper légèrement la colonne pour bien tasser l'adsorbant.
- 8.9 Verser le contenu de la fiole sur la colonne, puis environ 10 mm de sulfate de sodium anhydre. Frapper légèrement la colonne pour bien tasser l'adsorbant.
- 8.10 Rincer la fiole avec 2 portions de 10 mL de chlorure de méthylène dans de l'hexane (1/4), qui sont versées sur la colonne. Éluer avec le même solvant et recueillir 250 mL dans un BFR de 500 mL (voir 11.2).
- 8.11 Évaporer le solvant jusqu'à ce qu'il ne reste environ que 0,5 mL et diluer jusqu'à 5 mL avec de l'hexane.
- 8.12 Préparer une colonne chromatographique de 10 x 450 mm (figure 1) : ajouter environ 300 mm de florisil désactivé (voir 7.8) et déposer dessus environ 20 mm de sulfate de sodium anhydre. Frapper légèrement la colonne pour bien tasser l'adsorbant.
- 8.13 Placer l'échantillon sur la colonne. Rincer la fiole avec 5 mL d'hexane et verser immédiatement sur la colonne. Ne pas laisser le niveau du liquide descendre sous le sommet de la couche de sulfate de sodium. Éluer la colonne avec 50 à 60 mL d'hexane. (Le volume précis est déterminé de la façon indiquée à l'étape 7.8. Inclure les 10 mL de l'échantillon et les portions de rinçage dans le volume de l'éluant.) Recueillir l'éluat dans un BFR de 250 mL.
- 8.14 Éluer la fraction II avec 40 à 50 mL de chlorure de méthylène 10 % dans l'hexane (le volume précis est déterminé de la façon indiquée à l'étape 7.8). Recueillir l'éluat dans un BFR de 250 mL.
- 8.15 Éluer la fraction III avec 50 à 60 mL du solvant hexane/acétonitrile/chlorure de méthylène (voir 7.4).
- 8.16 Évaporer chaque fraction jusqu'à 0,5 mL et préparer un volume approprié avec de l'hexane. Les extraits d'échantillon sont alors prêts pour l'injection :
- La fraction I contient les BCP, le pp-DDE, le HCB, le mirex, l'aldrine et de l'heptachlore.
La fraction II contient le lindane (-BHC), α -BHC, le pp-DDD et le pp-DDT.
La fraction III contient de l'époxyde d'heptachlore, le dieldrin et l'endrine.



chapter chapitre	section	page
1	3	7
status état		date
new/nouveau		31/01/1986

8.17 Chromatographie en phase gazeuse. Les valeurs suivantes sont celles de conditions d'exploitation types et des garnitures de colonnes recommandées :

Température du détecteur : 300°C (Ni⁶³); 200°C (H³)
Dimensions de la colonne : 6 pi x 1/8 po D.I. (verre)
Gaz vecteur : 25-35 mL/min, He à 5 %/Ar ou N₂

Température d'injection : 220°-250°C
Garniture de la colonne (1) : OV-1 à 2 % + OV-210 à 4 % sur Chromosorb W-HP, 80/100 mesh
Garniture de la colonne (2) : OV-17 à 2 % + OV-210 à 2,6 % sur Chromosorb W-HP, 80/100 mesh

Température de la colonne 1 : 180-190°C
Température de la colonne 2 : 200-210°C

8.17.1 Utiliser la colonne (1) pour les fractions I, II et III.

8.17.2 Utiliser la colonne (2) pour les fractions II et III seulement (voir 11.3.1).

9. CALCULS

9.1 Les calculs manuels sont basés sur les hauteurs relatives des pics des composés (étalons et échantillons).

9.2 Les BPC sont dosés en fonction des pics 7, 8 et 10 de la façon suggérée par Reynolds : évaluer approximativement RRT_{DDE} 127, 147, 177 sur OV-1 + OV-210. Tracer une ligne de base droite et continue pour les pics de PCB, calculer chacun des trois et faire la moyenne des résultats, en utilisant l'Aroclor 1254 comme étalon.

9.3 Le DDT est indiqué en DDT total, soit la somme des DDT, de ses isomères et de ses métabolites (DDE + DDD + DDT).

10. PRÉCISION ET EXACTITUDE

10.1 Précision. Les données qui suivent illustrent la précision qui peut être obtenue lors d'analyses répétées de poisson cru :



chapter chapitre	section	page
1	3	8
status état		date
new/nouveau		31/01/1986

Échantillon n° 1 - Carpe crue, homogénéisée, N=10

Substance analysée :	<u>BPC</u>	<u>HCB</u>	<u>DDE</u>	<u>MIREX</u>	<u>α-BHC</u>	<u>DIEL.</u>	<u>DDD</u>
Moyenne :	1.05	0.023	0.381	0.024	0.011	0.023	0.068
É.-T. Relative:	7.57%	7.03%	5.80%	10.4%	6.73%	11.1%	6.66%

Échantillon n° 2 - Doré cru, homogénéisé, N=10

Substance analysée :	<u>BPC</u>	<u>HCB</u>	<u>DDE</u>	<u>MIREX</u>	<u>α-BHC</u>	<u>DIEL.</u>	<u>DDD</u>
Moyenne :	0.859	0.005	0.267	-	0.012	0.031	0.033
É.-T. Relative:	9.13%	10.0%	9.38%	-	11.9%	12.9%	11.7%

Échantillon n° 3 - Carpe crue, homogénéisée, N=5

Substance analysée :	<u>BPC</u>	<u>HCB</u>	<u>DDE</u>	<u>MIREX</u>	<u>α-BHC</u>	<u>DIEL.</u>	<u>DDD</u>
Moyenne :	2.70	0.107	0.917	0.076	0.018	-	0.158
É.-T. Relative:	1.92%	2.83%	2.36%	2.73%	3.93%	-	2.56%

- 10.2 Exactitude: Deux échantillons de poisson en conserve ont été distribués dans le cadre du programme des échantillons d'essai du Comité fédéral interministériel sur les pesticides (C.F.I.P.). Cinq boîtes de conserve de chaque échantillon ont été utilisées pour le dosage en double du HCB et des PCB par cette méthode. Les résultats ont été comparés à ceux du programme du C.F.I.P. Les participants ont prélevé l'échantillon dans des injections simples et doubles de l'extrait. Les données suivantes proviennent des résultats publiés en mai 1978.

FT1 (carpe)

Par la présente méthode : BPC, 987 p.p. milliard + 8,53 % (É.-T. R.)
 HCB, 17,7 p.p. milliard + 5,19 % (É.-T. R.)

C.F.I.P. : BPC (calcul des pics 7, 8, 10)
 950 p.p. milliard + 26,1 % (É.-T. R.), N=15
 HCB 13,9 p.p. milliard + 29,8 % (É.-T. R.),
 N=14



chapter chapitre	section	page
1	3	9
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

FT2 (doré)

Par la présente méthode : BPC, 817 p.p. milliard + 6,69 % (É.-T. R.)
HCB, 5,88 p.p. milliard + 8,10 % (É.-T. R.)

C.F.I.P. : BPC (calcul des pics 7, 8, 10)
726 p.p. milliard + 22,3 % (É.-T. R.), N=15
HCB, 5,43 p.p. milliard + 36,2 % (É.-T. R.),
N=14

10.3 Récupération. Les pourcentages suivants sont typiques de la récupération d'étalons dans une solution :

HCB	94.8%
α-BHC	98.8%
γ-BHC (lindane)	94.8%
époxyde d'heptachlore	99.4%
pp-DDE	100.7%
dieldrin	97.8%
pp-DDD	99.1%
pp-DDT	99.6%
mirex	99.6%
Aroclor 1254	104.2%

11. REMARQUES

11.1 Dans le cas de certaines farines de poisson, l'extrait peut boucher le filtre s'il est rincé avec de l'hexane. Avec un tel produit, il est recommandé que l'acétone soit utilisé comme solvant de rinçage. Cet emploi peut entraîner la dissolution d'une quantité excessive d'eau, comme on s'en apercevra au cours de l'évaporation qui suit. À ce moment, la meilleure méthode consiste à terminer l'évaporation, ajouter 20 mL d'hexane, répéter l'étape 8.5 en rinçant avec de l'hexane cette fois, et reprendre les étapes restantes dans l'ordre indiqué.

11.2 La plupart des produits halieutiques produisent une bande colorée distinctive lorsqu'ils sont combinés au florasil désactivé à l'étape 8.7. Si cette bande colorée commence à se déplacer ou à faire une tache au début de l'élution (c.-à-d. lorsque seulement 50-100 mL ont été recueillis), la colonne est surchargée de lipides. Terminer la collecte du volume de 250 mL, évaporer et recommencer au début à l'étape 8.6. Un total de deux passages à travers la colonne devraient constituer un nettoyage suffisant.



**CHEMICAL
METHODS
MANUAL**

**MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
1	3	10
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

11.3 Un certain nombre de fabricants produisent des phases liquides de silicone, qui présentent des caractéristiques très semblables. On peut utiliser librement ces phases à condition de s'assurer de leur équivalence. OV-1 + OV-210 est recommandé pour la colonne 1 (voir 8.17) parce que cette phase produit un profil de PCB comparable à celui des colonnes les plus utilisées (SE-30+QF-1, etc.), facilitant les comparaisons interlaboratoires, et assurant une séparation relativement nette entre le mirex et les PCB. SE-30+QF-1 ou OV-101 + OV-210 ne séparent pas le mirex. Le mirex est inclus dans la PORTÉE de cette méthode basée sur l'utilisation de cette colonne ou d'une autre colonne équivalente.

11.3.1 La colonne 2 (voir 8.17) est efficace pour les deuxième et troisième fractions, mais produit un profil inhabituel pour le PCB et ne sépare pas le mirex des PCB.

11.3.2 Si le temps et l'équipement dont on dispose le permettent, d'autres colonnes peuvent être employées. Une phase liquide de silicone non polaire, comme OV-101, SP-2100 ou l'équivalent, et une phase liquide polaire, comme OV-225 ou du carbowax lié, offrent une excellente gamme de polarité pour la confirmation.

12. RÉFÉRENCES

12.1 Langlois, B.C., Stemp, A. and Liska, B.; J. Milk Food Technol., 27, 202-204 (1964).

12.2 Reynolds, L.M.; Residue Reviews, 34, 27-57 (1971).



chapter chapitre	section	page
1	3	11
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

ANNEXE A

Les noms complets des composés sont les suivants :

<u>Abréviation</u>	<u>Nom complet</u>
HCB	Héxachlorobenzène
α -BHC	alpha-héxachlorocyclohexane (HCH)
γ -BHC	gamma-héxachlorocyclohexane (lindane)
Aldrin	aldrine
Heptachlor	heptachlore
Heptachlor époxyde	époxyde d'heptachlore
pp-DDE	1,1'-(dichloroéthénylidiène) bis [4-chlorobenzène]
Dieldrin	dieldrin
Endrin	endrine
pp ¹ -DDD	1,1'-(2,2-dichloroéthylidiène) bis [4-chlorobenzène] (TDE)
pp ¹ -DDT	1,1'-(2,2,2-trichloroéthylidiène) bis [4-chlorobenzène]
BPC	Biphenylepolychlorinés (Aroclor 1254)
Mirex	mirex

chapter / chapitre	1	section	3	page	12
status / état	new/nouveau		date		31/01/1986

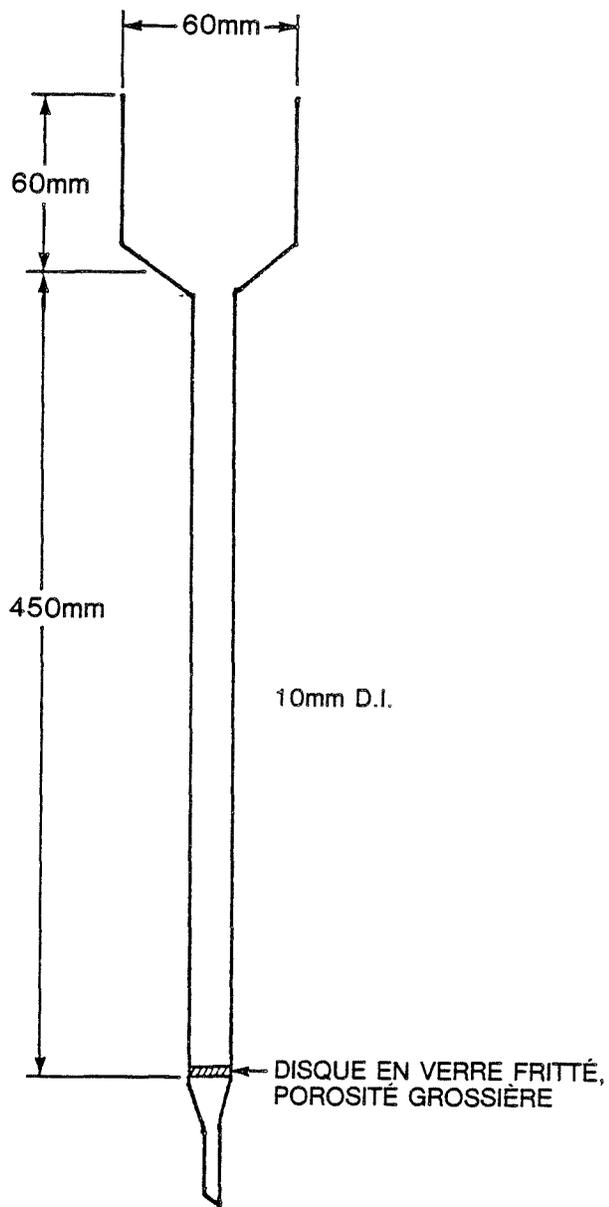


FIGURE 1: Colonne de Chromatographie



chapter chapitre	section	page
1	3	13
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

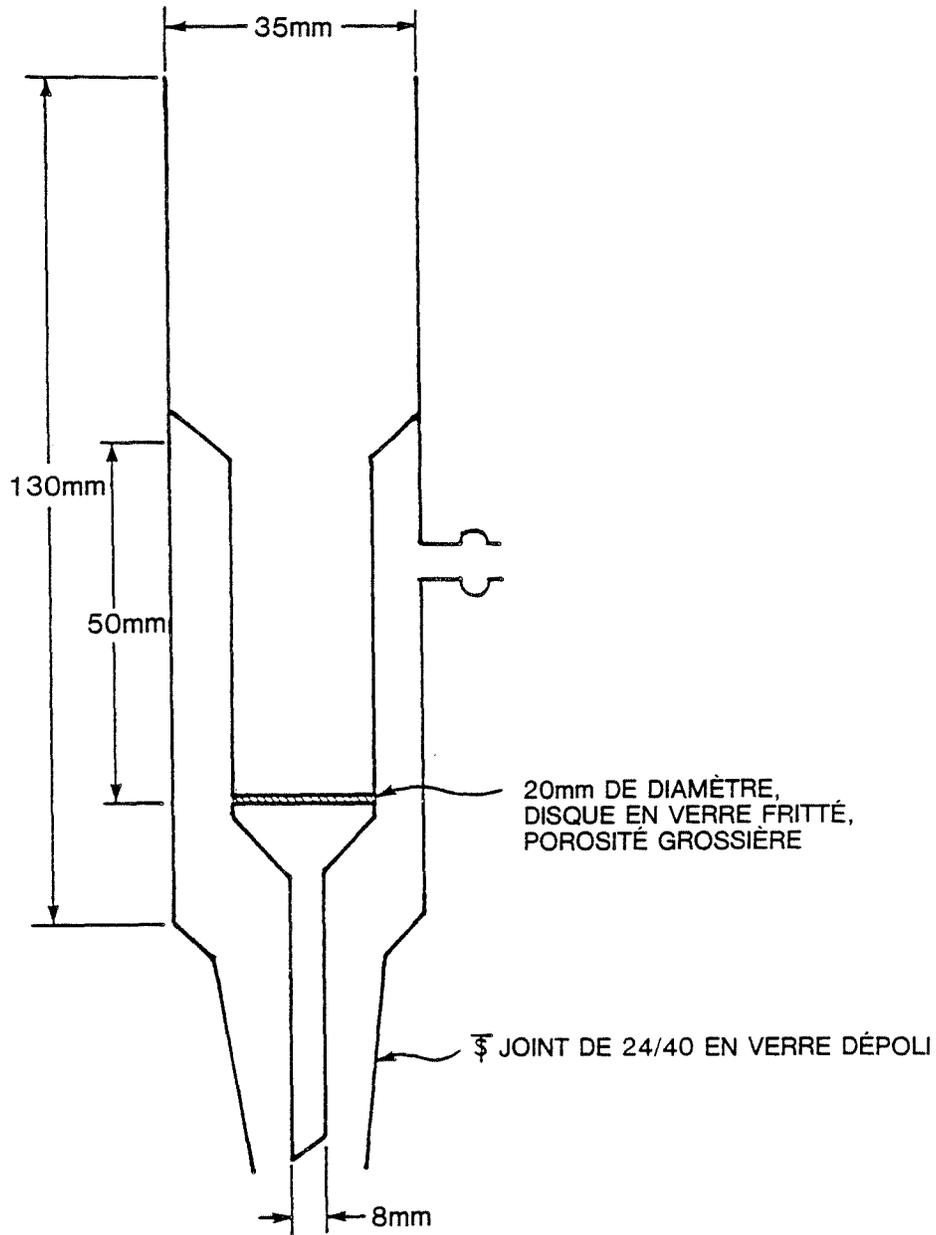


FIGURE 2: Colonne de filtration



chapter chapitre	section	page
1	4	1
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

CHAPITRE 1 - CONTAMINANTS

SECTION 4: SÉLÉNIUM

1. PORTÉE ET APPLICATION

- 1.1 Cette méthode peut être utilisée pour l'analyse de tissus de poisson et de divers produits halieutiques. Des concentrations variant entre 0,05 et 800 ng peuvent être dosées. Des concentrations plus élevées de sélénium peuvent être mesurées en diluant l'échantillon de façon appropriée.

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

- 2.1 L'échantillon est digéré à l'aide des acides nitrique, perchlorique et sulfurique. Les facteurs d'interférence sont masqués par de l'EDTA disodique. Le sélénium est complexé par du 2,3-diaminonaphtalène, extrait par du cyclohexane et dosé par fluorométrie.

3. INTERFÉRENCES

- 3.1 Des éléments comme le fer, le cuivre et le vanadium causent des interférences. On peut les éliminer avec de l'EDTA disodique.

4. MÉTHODE D'ÉCHANTILLONNAGE ET ENTREPOSAGE

- 4.1 Lot commercial. Prélever un échantillon représentatif du lot du produit, et l'entreposer afin de conserver son intégrité.
- 4.2 Échantillons d'étude. Les poissons peuvent être mélangés ou analysés individuellement. Dans le cas d'espèces dont la longueur est habituellement supérieure à 30 cm, un seul poisson peut servir d'échantillon. Dans le cas d'espèces dont la longueur est inférieure à 30 cm, un échantillon constitué de plusieurs spécimens est nécessaire. Entreposer de façon à conserver l'intégrité de l'échantillon.

5. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

- 5.1 Lot commercial. Il faut tenir compte du type de produit et de la façon dont il est utilisé et préparé par le consommateur.



**CHEMICAL
METHODS
MANUAL**

**MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
1	4	2
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

5.1.1 Dans le cas des poissons ou des produits halieutiques qui ne contiennent pas de liquide libre, pulvériser l'échantillon jusqu'à ce qu'il soit homogène.

5.1.2 Dans le cas des produits conservés dans de l'eau, de la saumure ou un milieu semblable qui est habituellement jeté par le consommateur, ouvrir le paquet et égoutter le produit sur un tamis de taille appropriée pendant 1 à 1½ minute. Pulvériser la partie de l'échantillon retenue par le tamis jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.

5.1.3 Dans le cas des produits conservés dans un milieu que le consommateur peut utiliser ou emploie normalement, par ex. du poisson mis en conserve dans son jus ou dans l'huile, placer tout le contenu du paquet dans un homogénéisateur et mélanger pendant une minute ou jusqu'à ce qu'un mélange homogène soit obtenu.

5.2 Échantillons d'étude.

5.2.1 Dans le cas des poissons, peser et mesurer la longueur du bout du museau à l'extrémité du rayon central de la nageoire caudale, à des fins de comparaison de taille.

5.2.2 Dans le cas d'un échantillon constitué de plusieurs spécimens, déterminer les valeurs moyennes de longueur et de poids du poisson.

5.2.3 Passer les filets dépiautés dans un broyeur à viande commercial un nombre de fois suffisant pour obtenir un mélange homogène (par ex. trois fois).

5.3 Recueillir l'échantillon homogénéisé dans une tasse de plastique ou une bouteille de verre lavées à fond et possédant un couvercle. Entreposer l'échantillon dans un réfrigérateur ou congélateur jusqu'au moment de l'utilisation. S'assurer que la substance préparée est encore homogène avant la pesée. Si du liquide se sépare de l'échantillon, mélanger de nouveau le produit avant de l'utiliser.

6. APPAREILLAGE

6.1 Fluorimètre. Fluorimètre à filtre ou spectrofluorimètre capable d'exciter à 366 nm et de détecter la fluorescence à 525 nm.

6.2 Cuves ou tubes de culture en Pyrex, 12 x 75 mm, compatibles.



chapter chapitre	section	page
1	4	3
status état		date
new/nouveau		31/01/1986

6.3 Agitateur oscillant.

7. RÉACTIFS

7.1 Acide nitrique (HNO_3).

7.2 Acide sulfurique (H_2SO_4).

7.2.1 Solution d'acide sulfurique (5N). Diluer 140 mL de H_2SO_4 à 1 L avec de l'eau distillée.

7.3 Acide perchlorique (HClO_4) 70 %.

7.4 Hydroxyde d'ammonium (NH_4OH).

7.4.1 Solution d'hydroxyde d'ammonium (environ 6N). Diluer 400 mL de NH_4OH à 1 L avec de l'eau distillée.

7.5 Cyclohexane.

7.6 Éthylènedinitrilotétracétate (EDTA) disodique.

7.6.1 Solution d'EDTA (0,02 M). Dissoudre 7,445 g de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans de l'eau distillée et diluer jusqu'à 1 L.

7.7 2,3-diaminonaphthalène (DAN).

7.7.1 Solution de 2,3-diaminonaphthalène (1 mg/mL). Pulvériser du DAN dans un mortier de façon à ce qu'il passe à travers un tamis de 80 mesh. Insérer un tampon de laine de verre dans la tige d'une ampoule à décantation de 250 mL et ajouter 100 mL de H_2SO_4 à 5N. Déposer 0,10 g de DAN dans l'ampoule à décantation et dissoudre dans l'acide. Ajouter 30 mL de cyclohexane et agiter pendant 5 minutes. Laisser les phases se séparer pendant 5 minutes, recueillir la phase inférieure dans une autre ampoule et jeter la phase de cyclohexane (supérieure). Répéter l'extraction au cyclohexane encore deux fois et, après une troisième extraction, recueillir la phase inférieure dans une bouteille de verre faiblement actinique et fermée par un bouchon de verre, ajouter 1 cm d'hexane et entreposer au froid.

**CHEMICAL
METHODS
MANUAL****MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
1	4	4
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

7.8 Acide sélénieux (H_2SeO_3).

7.8.1 Solution étalon de sélénium (0,1 mg/mL). Dissoudre 0,1634 g de H_2SeO_3 dans de l'eau distillée et diluer à 1 L avec du H_2SO_4 à 0,1N. Effectuer des dilutions additionnelles avec H_2SO_4 à 0,1N au besoin.

8. MÉTHODE

- 8.1 Placer un échantillon pesé avec précision et contenant $\leq 1,0$ g ou moins de matière sèche et 800 ng de Se avec 3 billes de verre dans un contenant approprié (fiolle de Kjeldahl de 100 mL ou erlenmeyer de 125 mL). Préparer des étalons internes appropriés (par ex. 0, 0,2, 0,4, 0,6 et 0,8 ug de Se) et soumettre l'échantillon et le blanc au protocole entier.
- 8.2 Ajouter 6,0 mL de HNO_3 concentré et chauffer avec précaution jusqu'à ce que la matière organique soit dissoute dans la solution. Prendre soin d'éviter la formation de mousse ou les bouillonnements soudains excessifs. Refroidir.
- 8.3 Ajouter 2,0 mL de $HClO_4$ à 70 % et 5,0 mL de H_2SO_4 concentré et remettre sur la plaque chauffante. Chauffer jusqu'à ce que la solution devienne jaune-verdâtre, puis incolore. (S'il y a carbonisation, répéter l'analyse avec un nouvel échantillon en utilisant un rapport pondéral plus élevé de $HNO_3/HClO_4$ /échantillon. En cas d'insuccès, ajouter de petites quantités de HNO_3 dès les premiers signes de noircissement.)
- 8.4 Retirer la fiolle de la chaleur, faire tourner avec précaution le contenu jusqu'au col, replacer la fiolle sur la plaque et continuer à chauffer jusqu'à ce que la solution soit incolore et que des vapeurs blanches s'en échappent.
- 8.5 Retirer la fiolle de la plaque, refroidir, ajouter 1,0 mL de H_2O_2 à 30 % en rinçant les parois de la fiolle, et faire tourner le contenu jusqu'à ce que les vapeurs disparaissent. Continuer à chauffer jusqu'à forte ébullition du contenu et réapparition des vapeurs blanches. Répéter l'addition de H_2O_2 et le chauffage deux fois encore et prolonger le dernier chauffage pendant 10 minutes après l'apparition des vapeurs blanches. Refroidir.
- 8.6 Ajouter 25 mL de H_2O en rinçant les parois et en agitant très bien. Transférer quantitativement dans un erlenmeyer à bouchon de 250 mL à l'aide de 3 portions de 10 mL de H_2O .



chapter chapitre	section	page
1	4	5
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

- 8.7 Ajouter successivement en brassant 10 mL de solution d'EDTA, 25 mL de NH_4OH à 6N, et 5 mL de solution de DAN.
- 8.8 Sur un bec bunsen, amener rapidement le contenu à forte ébullition, transférer sur une plaque chauffante et laisser bouillir pendant encore deux minutes.
- 8.9 Laisser reposer le mélange à la température ambiante pendant une période fixe, soit entre $1\frac{1}{2}$ et 2 heures. Utiliser la même période pour l'échantillon, les étalons et le blanc.
- 8.10 Ajouter avec précision une quantité appropriée de cyclohexane (6-10 mL), boucher la fiole et la placer sur un agitateur pendant 5 minutes.
- 8.11 Laisser les couches se séparer. Extraire la couche supérieure de cyclohexane et la déposer dans une cuve du fluorimètre à l'aide d'une pipette de Pasteur. Au besoin, centrifuger la solution pour enlever les gouttelettes d'eau en suspension.
- 8.12 Avec le blanc, ramener à zéro le fluorimètre et lire la fluorescence de l'échantillon et des étalons.

9. CALCULS

- 9.1 Préparer une courbe d'étalonnage de la fluorescence en fonction des nanogrammes de Se dans les étalons.
- 9.2 Doser la quantité de Se en comparant la lecture de l'échantillon avec la courbe de calibration. Tenir compte du poids de l'échantillon et du facteur de dilution. Exprimer le résultat en sélénium total sur une base de poids humide (ppm).

10. PRÉCISION ET EXACTITUDE

- 10.1 Du foie de bovin NBS (SRM 1577) doit être analysé avec chaque série d'échantillons. Une valeur de $1,1 \pm 0,1$ ppm a été obtenue pour 21 essais. La valeur certifiée par le NBS pour ce matériel est $1,1 \pm 0,1$ ppm.
- 10.2 La récupération moyenne apparente du sélénium ajouté sous forme de sélénite ou sélénate (100 et 500 ng) à 0,1 g de poisson était de 101,0 %. La récupération réelle des mêmes quantités de sélénium dans les solutions étalons était de 96,6 % (Voir référence 12.2).



**CHEMICAL
METHODS
MANUAL**

**MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
1	4	6
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

10.3 La précision et l'exactitude ont été jugées acceptables après une étude réalisée en collaboration, et la méthode a été subséquemment adoptée comme mesure finale officielle par l'A.O.A.C. (voir références 12.4 et 12.5).

11. REMARQUES

11.1 Nettoyer la verrerie selon la méthode 25.120 des Official Methods of Analysis, A.O.A.C., 12^e édition (1975).

12. RÉFÉRENCES

12.1 Beal, A.R., "Selenium Determination on Fish Tissue", J. Fish Res. Board Can., 32(2), 249-252 (1975).

12.2 Ihnat, M., "Fluorometric Determination of Selenium in Foods", J.A.O.A.C., 57(2), 368-372 (1974).

12.3 Hoffman, I., R. J. Westerby and M. Hidioglou, "Precise Fluorometric Microdetermination of Selenium in Agricultural Materials", J.A.O.A.C., 51(5), 1039-1042 (1968).

12.4 Ihnat, M., "Collaborative Study of a Fluorometric Method for Determining Selenium in Foods", J.A.O.A.C., 57(2), 373-378 (1974).

12.5 Cunningham, H.M. (General Referee), "Report on Metals and Other Elements", J.A.O.A.C., 59(2), 341-342 (1976).



chapter chapitre	section	page
1	5	1
status état		date
new/nouveau		10/11/1989

**CHAPITRE 1 - CONTAMINANTS
SECTION 5: DOSAGE DU PLOMB DES PRODUITS DU POISSON PAR
SPECTROPHOTOMÉTRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE**

1. PORTÉE ET APPLICATION

1.1 Cette procédure s'applique au dosage du plomb présent dans les produits de la pêche à des concentrations se situant entre 0 et 10 ug/mL.

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

2.1 Les échantillons sont réduits en cendres à 500°C et ensuite dissous dans l'HCl 1 N. La teneur en plomb est déterminée par spectrophotométrie d'absorption atomique à 283,3 nm.

3. INTERFÉRENCES

3.1 Des quantités excessives d'autres éléments peuvent modifier le signal émis par le plomb (p. ex.: la présence de Fe à raison de 10 000 mg/L a pour effet d'accroître le signal du plomb).

4. MÉTHODE D'ÉCHANTILLONNAGE ET ENTREPOSAGE

4.1 Prélever un échantillon représentatif du lot de produits et l'entreposer de façon à en maintenir l'intégrité.

5. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

5.1 Broyer l'échantillon jusqu'à homogénéité et placer l'homogénat dans un récipient de plastique ou de verre lavé à l'acide et pouvant être scellé. Entreposer au congélateur jusqu'à utilisation. Veiller à ce que l'échantillon soit homogène au moment de sa pesée. S'il y a présence d'un surnageant, homogénéiser de nouveau avant d'utiliser.

6. APPAREILLAGE

6.1 Spectrophotomètre d'absorption atomique à double faisceau muni d'un dispositif de correction des teneurs de deutérium de fond et pouvant déterminer les absorbances à 283,3 nm et 217 nm, pour une gamme de 0 - 10 ug/mL.

6.2 Lampe à décharge au plomb à cathode creuse ou sans électrode.



chapter chapitre	section	page
1	5	2
status état	date	
new/nouveau	10/11/1989	

6.3 Creuset de porcelaine d'un volume d'environ 50 mL et de 5 cm environ de profondeur ou bécber de 100 mL de forme haute Vycor ou en quartz (Kontes Glass Co., K319000).

6.4 Four à moufle pouvant réduire l'échantillon en cendres à 500°C.

7. RÉACTIFS

7.1 Acide chlorhydrique 1 N. Diluer 82 mL de HCl avec de l'eau pour obtenir un volume de 1 L.

7.2 Acide nitrique - Ajouter 128 mL de HNO₃ redistillé dans de 500 à 800 mL d'eau distillée ou désionisée et porter le volume à 2 L. Du HNO₃ redistillé (G. Frederick Smith Chemical Co., n° 53) peut être dilué et utilisé sans redistillation.

7.3 Solutions normalisées de plomb:

1) Solution mère de 1 000 µg/mL : Dissoudre 1,5985 g de Pb(NO₃)₂ recristallisé dans environ 500 mL de HCl 1 N, dans une fiole jaugée de 1 L et amener au volume avec du HNO₃ 1 N.

2) Solution de travail de 10 µg Pb/mL : Pipetter 10 mL de la solution mère dans une fiole jaugée de 1 L, ajouter 82 mL de HCl et diluer au volume avec de l'eau.

7.4 Solution tampon - Disperser 163 g d'EDTA dans 200 mL d'eau dans une fiole jaugée de 2 L et ajouter suffisamment de NH₄OH pour dissoudre. Diluer 60 mL de HClO₄ à 70,5 % (ATTENTION : VOIR LES REMARQUES) et le versant avec soin dans environ 500 mL d'eau. Refroidir. Dissoudre 50 g de La₂O₃ dans la solution de HClO₄. Ajouter 8 gouttes d'indicateur orange de méthyle à la solution ammoniacale d'EDTA et ajouter le La₂O₃ à la solution d'EDTA en agitant vigoureusement. Au besoin, ajouter du NH₄OH pour maintenir l'alcalinité de la solution ci-dessus à la valeur de l'orange de méthyle. Diluer à 2 L.

8. MÉTHODE

8.1 Vérifier la pureté des réactifs en procédant de la façon suivante : Faire évaporer 4 mL de HNO₃ (ATTENTION : VOIR LES REMARQUES) dans un creuset jusqu'à dessiccation sur une plaque chauffante ou dans un bain de vapeur. Dissoudre le résidu dans du HCl 1 N et transférer dans une fiole jaugée de 25 mL. Chauffer le résidu à deux reprises avec 5 mL de HCl 1 N et verser dans la fiole jaugée. Laisser refroidir, porter au volume avec du HCl 1 N et mélanger. Procéder au dosage. La teneur totale du blanc de réactif devrait être de ≤ 10 µg de Pb (valeur équivalente à une teneur de 0,4 ppm dans un échantillon) pour les dosages de teneurs de ≥ 1 ppm.



chapter chapitre	section	page
1	5	3
status état		date
new/nouveau		10/11/1989

Pour les dosages de teneurs < 1 ppm, utiliser la méthode décrite dans l'appendice A afin d'obtenir un blanc de teneur < 50 % par rapport à la teneur inférieure du dosage.

- 8.2 Peser environ 25 g (à 0,1 g près) de l'échantillon dans un creuset. Assécher pendant 2 heures à 135 - 150 °C. Transférer dans un four froid à température réglable et faire lentement monter la température à 500 °C. Régler et maintenir la température à 500 °C, car il peut y avoir perte de Pb à une température aussi faible que 550 °C. Réduire en cendres au cours de la nuit (16 h).
- 8.3 Retirer l'échantillon et le laisser refroidir à la température ambiante. Ajouter prudemment 2 mL de HNO₃ et mélanger par mouvement rotatoire.
- 8.4 Évaporer avec soin "tout juste" à dessiccation sur une plaque chauffante "tiède" ou sur bain de vapeur. Transférer dans le four refroidi, amener lentement la température à 500 °C et la maintenir pendant 1 heure.
- 8.5 Retirer le creuset et laisser refroidir.
- 8.6 Répéter au besoin la transformation en cendres par HNO₃ jusqu'à l'obtention de cendres pratiquement exemptes de C.
- 8.7 Ajouter 10 mL de HCl 1 N et dissoudre les cendres en chauffant prudemment sur une plaque chauffante. Transférer dans une fiole jaugée de 25 mL.
- 8.8 Chauffer le résidu de cendres à deux reprises avec des volumes de 5 mL de HCl 1 N et verser dans la fiole.
- 8.9 Refroidir, amener au volume avec du HCl 1 N et mélanger.
9. Transférer 0, 1, 3, 5, 15, 25 et 50 mL de la solution de travail au Pb dans des fioles jaugées de 50 mL et amener au volume avec du HCl 1 N (solutions de 0, 0,2, 0,6, 1,0, 3,0, 5,0 et 10,0 ug Pb/mL).
- 9.1 Régler le spectrophotomètre en fonction des conditions optimales déjà déterminées pour un signal maximal à 283,3 nm. Régler les débits air - C₂H₂ conformément aux recommandations du fabricant pour le dosage du Pb.
- 9.2 a) Pour les lectures numériques, étalonner en mode concentration avec les solutions contenant 0,2 et 10,0 ug Pb/mL. Noter la concentration tout de suite après étalonnage de l'instrument.



chapter chapitre	section	page
1	5	4
status état	date	
new/nouveau	10/11/1989	

- b) Pour les lectures sur bande graphique, régler le degré d'amplification de façon à obtenir une lecture d'absorption de ≥ 1 % pour la solution de travail de 0,2 ug/mL et préparer une courbe d'étalonnage de l'absorption en fonction de la concentration en ug de Pb/mL.

9.3 Utiliser l'échantillon préparé comme ci-dessus (8.2 - 8.9) et procéder tel qu'indiqué en a) ou b).

- a) Solutions limpides - Déterminer l'absorption de l'échantillon et de la solution normalisée tel qu'indiqué en 9.2 a) ou b), en appliquant à trois reprises la procédure ci-après:

Effectuer la lecture de la solution normalisée, ensuite celle de la solution échantillon, en alternance, jusqu'à ce que toutes les solutions échantillons et normalisées aient été dosées. Lorsque le nombre d'échantillons est élevé, on peut procéder par séries de trois échantillons pour une solution normalisée.

$$\text{ppm Pb} = [(\text{ug Pb/mL sol. échant.}) \times 25] / \text{g d'échantillon}$$

- b) Solutions troubles - Procéder comme pour les solutions limpides, mais ajouter 1 mL de solution tampon (voir 7.4) aux solutions d'échantillons et aux solutions normalisées avant d'effectuer les lectures.

Si des dilutions supplémentaires sont nécessaires ou une solution du tampon est ajoutée:

$$\text{ppm Pb} = (\text{ug Pb/mL échant. dilué}) \times (\text{mL échant. dilué/mL échant. initial}) \times (25/\text{g d'échant.}).$$

10. PRÉCISION ET EXACTITUDE

- 10.1 La précision et l'exactitude obtenues au cours d'une étude en collaboration ont été jugées acceptables et cette méthode a été adoptée comme méthode définitive officielle par l'AOAC. (Voir les références 12.1 et 12.2).
- 10.2 Le taux de récupération moyen du plomb de six échantillons appariés de teneurs 1-2, 5-6 et 10-11 ppm était de 100,7 % . (Voir référence 12.3).



chapter chapitre	section	page
1	5	5
status état		date
new/nouveau		10/11/1989

11. REMARQUES

11.1 Laver toute la verrerie à l'eau, l'immerger dans de l'acide nitrique (1 + 2) et rincer plusieurs fois à l'eau distillée.

11.2 Acide perchlorique - HClO_4

Le contact de cet acide avec des matières oxydables ou combustibles ou avec des agents déshydratants ou réducteur peut donner lieu à des incendies ou des explosions. Les personnes manipulant cet acide doivent être bien au fait de ces dangers. Les pratiques de sécurité ci-après doivent être appliquées.

- a) Éliminer toute quantité de HClO_4 renversé en procédant immédiatement à un lavage complet avec de grandes quantités d'eau.
- b) Les hottes, conduits et autres structures servant à l'élimination des vapeurs de HClO_4 doivent être faits de matériaux chimiquement inertes et conçus de sorte à pouvoir être complètement lavés à l'eau. Les systèmes de ventilation doivent donner dans des lieux où ils ne présentent pas de danger et l'accès au ventilateur doit en permettre le lavage.
- c) Éviter d'utiliser des produits chimiques organiques dans les hottes et les autres dispositifs de ventilation servant aux digestions par HClO_4 .
- d) Utiliser des lunettes de protection, des écrans de protection ou, au besoin, d'autres dispositifs de protection personnelle. Utiliser des gants en chlorure de polyvinyle, non des gants de caoutchouc.
- e) Sauf indication contraire, dans les cas de combustions humides au HClO_4 , traiter tout d'abord l'échantillon au HNO_3 afin de détruire la matière organique facilement oxydable. Ne pas évaporer jusqu'à dessiccation.
- f) Le contact de la solution de HClO_4 avec de forts agents de déshydratation, comme le P_2O_5 ou le H_2SO_4 concentré, peut donner lieu à la formation de HClO_4 anhydre qui peut réagir de façon explosive avec les matières organiques ou les agents réducteurs. Il faut faire preuve d'une attention particulière au cours des analyses où l'on doit utiliser du HClO_4 avec de tels agents. Le HClO_4 concentré à plus de 72 % est extrêmement sensible aux chocs et à la chaleur.



chapter chapitre	section	page
1	5	6
status état	date	
new/nouveau	10/11/1989	

- g) Les précautions énoncées dans les publications ci-après doivent aussi être prises. 1) "Perchloric Acid Solution", Chemical Safety Data Sheet SD-11 (1965). Manufacturing Chemists Association of the US, 1825 Connecticut Ave., NW, Washington, DC 20009; 2) "Applied Inorganic Analysis", W.F. Hillebrand, G.E.F. Lundell, H.A. Bright and J.I. Hoffman, 2nd ed. (1953), p. 39-40, John Wiley and Sons Inc., New York, NY; 3) "Notes on Perchloric Acid and Its Handling in Analytical Work," Analyst 84, 214-216 (1959); 4) "Perchlorates", ACS Monograph No. 146, J.C. Schumacher, ed., Reinhold (1960).

11.3 Acide nitrique

Cet acide réagit de façon vigoureuse ou explosive avec l'aniline, le H₂S les solvants inflammables, l'hydrazine et les poudres métalliques (notamment le Zn, l'Al et le Mg). Les oxydes d'azote gazeux du HNO₃ peuvent provoquer des dommages importants aux poumons. Le mélange de solutions concentrées de HNO₃ et de HCl donne lieu à d'importants dégagements de vapeurs. Éviter les prémélanges. Utiliser un système de ventilation efficace lorsqu'il y a production de vapeurs. Utiliser des gants de chlorure de polyvinyle, non de caoutchouc.

12. RÉFÉRENCES

- 12.1 Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 14th edition (1984), procedure 25.104.
- 12.2 Gajan, Raymond J. et Damon Larry, "Determination of Lead in Fish by Atomic Absorption Spectrophotometry and by Polarography. I. Development of the Methods", Journ. AOAC 55, 727-732 (1972).
- 12.3 Gajan, Raymond J. et Damon Larry, "Determination of Lead in Fish by Atomic Absorption Spectrophotometry and by Polarography. II. Collaborative Study", Journ. AOAC 55, 733-736 (1972).



chapter chapitre	section	page
1	5	7
status état		date
new/nouveau		10/11/1989

APPENDICE A

L'analyste doit décider si la nature du dosage requiert de faire preuve de soins particuliers relativement à la purification des réactifs ou si le dosage du blanc est suffisant. Moins grande est la quantité de plomb à déceler, plus grand est le soin à apporter à la réduction du blanc.

Pour vérifier le degré d'acceptabilité des réactifs, placer de 10 à 15 g de réactifs solides dissous dans de l' H_2O bidistillée ou dans de 15 à 20 mL d'acides concentrés déjà neutralisés par du NH_4OH bidistillé dans une ampoule de décantation et ajouter suffisamment d'acide citrique exempt de plomb pour prévenir la précipitation par le NH_4OH du Fe, de l'Al, des phosphates alcalins terreux ou d'autres substances. Rendre la solution ammoniacale et ajouter 2-3 mL d'une solution de KCN à 10 %. Agiter la solution avec environ 5 mL de la solution dithizone (5-10 mg/L). Si la couche inférieure est verte, la transférer dans une autre ampoule et extraire la dithizone en excès par du NH_4OH (1 + 99) auquel on aura ajouté une goutte de la solution de KCN. Si la couche de $CHCl_3$ est incolore, considérer le test comme négatif pour les méthodes à la dithizone.

S'il est nécessaire de procéder à une purification plus poussée, redistiller l' H_2O (l'eau distillée conservée dans des cuves recouvertes de Sn contient généralement du Pb et du Sn), le HNO_3 , l' HCl , le HBr, le Br et le $CHCl_3$ dans un alambic tout verre (pyrex) ou de quartz (de préférence). Préparer le NH_4OH en distillant le réactif normal dans de l' H_2O redistillée à température de la glace. Si les alambics sont neufs, les nettoyer par vapeurs chaudes de HCl ou de HNO_3 pour éliminer le Pb de "surface" (les distillats suivants pourront contenir un peu de Pb).

Le $Pb(NO_3)_2$ peut être purifié de la façon suivante : En dissoudre de 20 à 50 g dans une quantité minimale de H_2O chaude et refroidir en agitant. Filtrer les cristaux par aspiration sous petit buchner, redissoudre et recristalliser. Sécher les cristaux à 100-110 °C jusqu'à poids constant. Refroidir au dessiccateur et conserver dans une bouteille fermant hermétiquement (Le produit ne contient pas d'eau de cristallisation et n'est pas très hygroscopique).

Purifier l'acide citrique, le NaOAc ou le NH_4OAc , le $Al(NO_3)_3$, le $Ca(NO_3)_2$ et le Na_2SO_4 en précipitant le Pb de leurs solutions aqueuses par le H_2S en utilisant de 5 à 10 mg de $CuSO_4$ comme coprécipitant (les solutions d'acide citrique et de $Al(NO_3)_3$ doivent être ajustées à pH 3,0-3,5 par du NH_4OH , le bleu de bromophénol servant d'indicateur). Filtrer (le filtre de verre fritté est le plus approprié), faire bouillir le filtrat pendant 20 mn pour éliminer le H_2S en excès. Refiltrer au besoin jusqu'à obtention d'une solution parfaitement limpide. Purifier les autres réactifs par recristallisation.



chapter chapitre	section	page
1	5	8
status état	date	
new/nouveau	10/11/1989	

Conserver les acides redistillés ou les solutions purifiées de réactifs dans des contenants de teflon ou de polyéthylène habituels dont le Pb de surface aura été éliminé avec soin avec du HNO_3 chaud. On peut utiliser des bouteilles revêtues de paraffine pour les réactifs alcalins.

Nettoyer avec soin toute la verrerie neuve (y compris en plastique) et le matériel fait d'autres substances avec une solution de NaOH à 10 % chaude suivie de HNO_3 chaud et ne l'utiliser que pour les dosages du Pb.

Éviter toute contamination par le Pb au cours de la préparation des échantillons pour les analyses. Autant que possible, utiliser un mortier de porcelaine pour les mélanges et broyages. Éviter d'utiliser les broyeurs d'aliments métalliques à moins qu'il n'ait été démontré par expérience que les échantillons ne sont pas contaminés par le Pb ou le Sn. Si les produits à analyser ne peuvent être complètement mélangés dans leur contenant d'origine ou si l'on désire obtenir un échantillon composé à partir de plusieurs récipients, utiliser un grand contenant de verre ou de porcelaine et mélanger complètement à l'aide d'une cuillère de bois ou d'une spatule de porcelaine. Si la partie liquide de l'échantillon ne peut être incorporée aux matières solides afin d'obtenir un mélange homogène, procéder à des analyses distinctes des composantes. Si les aliments sont contenus dans des conserves à serti soudés (sardines et viandes), ouvrir la boîte par le fond afin d'éviter de contaminer l'échantillon avec des particules de soudure. Éviter de tamiser au cours de la préparation des échantillons afin de prévenir toute contamination métallique ou concentration du Pb.



chapter chapitre	section	page
2	1	1
status état		date
new/nouveau		31/01/1986

**CHAPITRE 2 - ANALYSE IMMÉDIATE
SECTION 1: CENDRES**

1. PORTÉE ET APPLICATION

- 1.1 Cette méthode peut être utilisée pour l'analyse du poisson, des produits halieutiques et d'autres matériaux à faible teneur en hydrates de carbone.

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

- 2.1 La méthode consiste à oxyder par incinération toute la matière organique contenue dans un échantillon pesé du produit, et à déterminer le poids de la cendre qui demeure.

3. INTERFÉRENCES

- 3.1 Sans objet.

4. MÉTHODE D'ÉCHANTILLONNAGE ET ENTREPOSAGE

- 4.1 Prélever un échantillon représentatif du lot du produit, et l'entreposer afin de conserver son intégrité.

5. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

- 5.1 Il faut tenir compte du type de produit et de la façon dont il est utilisé et préparé par le consommateur.

- 5.1.1 Dans le cas des poissons ou des produits halieutiques qui ne contiennent pas de liquide libre, pulvériser l'échantillon jusqu'à ce qu'il soit homogène.

- 5.1.2 Dans le cas des produits conservés dans de l'eau, de la saumure ou un milieu semblable qui est habituellement jeté par le consommateur, ouvrir le paquet et égoutter le produit sur un tamis de taille appropriée pendant 1 à 1½ minute. Pulvériser la partie de l'échantillon retenue par le tamis jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.



**CHEMICAL
METHODS
MANUAL**

**MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
2	1	2
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

- 5.1.3 Dans le cas des produits conservés dans un milieu que le consommateur peut utiliser ou emploie normalement, par ex. du poisson en conserve dans son jus ou dans l'huile, placer tout le contenu du paquet dans un homogénéisateur et mélanger pendant une minute ou jusqu'à ce qu'un mélange homogène soit obtenu.
- 5.1.4 Dans le cas de la farine de poisson, broyer l'échantillon dans un moulin ou un autre appareil approprié jusqu'à ce qu'il passe à travers un tamis n° 20.
- 5.2 Recueillir l'échantillon homogénéisé dans une tasse de plastique ou une bouteille de verre lavées à fond et possédant un couvercle. Entreposer l'échantillon dans un réfrigérateur ou congélateur jusqu'au moment de l'usage. S'assurer que la substance préparée est encore homogène avant la pesée. Si le liquide se sépare de l'échantillon, bien mélanger de nouveau le produit avant de l'utiliser.

6. APPAREILLAGE

- 6.1 Creusets, 50 mL, en porcelaine ou en Vycor.
- 6.2 Four à moufle.
- 6.3 Dessiccateur.

7. RÉACTIFS

- 7.1 Aucun réactif n'est nécessaire.

8. MÉTHODE

- 8.1 Peser avec précision environ 5 g d'échantillon dans un creuset calciné et taré. Placer le creuset dans une étuve à 100°C pendant 24 heures. Transférer à un four à moufle froid et augmenter la température par étapes jusqu'à 550°C + 5°C. Maintenir la température pendant huit heures ou jusqu'à l'obtention de cendres blanches. Si des cendres blanches ne sont pas obtenues après huit heures, humidifier avec de l'eau distillée, sécher lentement sur une plaque chauffante et répéter l'opération de chauffage à 550°C, jusqu'à poids constant. Répéter au besoin. Placer le creuset dans un dessiccateur et le peser peu après qu'il soit refroidi.



chapter chapitre	section	page
2	1	3
status état		date
new/nouveau		31/01/1986

9. CALCULS

9.1 Calculer le pourcentage de la teneur en cendres (poids humide) de la façon suivante :

$$\% \text{ CENDRES} = \frac{(\text{poids creuset et cendres} - \text{poids creuset}) \times 100}{(\text{poids creuset et échantillon} - \text{poids creuset})}$$

9.2 Calcul de la teneur en cendres en poids sec (quand la quantité d'humidité est connue) :

$$\% \text{ CENDRES (sèches)} = \frac{\% \text{ de cendres (humides)} \times 100}{(100 - \% \text{ d'humidité})}$$

10. PRÉCISION ET EXACTITUDE

10.1 D'après des études, faites en collaboration en 1979 et 1981, on a obtenu les données suivantes en ce qui a trait à la précision de la méthode. Les résultats moyens sont en fonction du poids sec.

Description de l'échantillon	1 Farine du hareng	2 Farine de déchets	3 Farine du hareng	4 Farine de déchets	5 Farine mixte de poisson
Coefficient moyen de variation	18.47% <u>+0.5%</u>	20.16% <u>+0.2%</u>	15.86% <u>+0.7%</u>	22.83% <u>+1.2%</u>	22.13% <u>+0.6%</u>
	6 Viande séchée de poque	7 Filet de maquereau mariné	8 Filet de morue et maquereau mariné (1 + 1)		
	4.20% <u>+0.3 %</u>	31.32% <u>+1.58%</u>	24.31% <u>+0.8 %</u>		

Le coefficient moyen de variation pour huit échantillons est +0,8%.

11. REMARQUES

11.1 Utiliser 2,5 g d'échantillon dans le cas de produits qui ont tendance à gonfler.



**CHEMICAL
METHODS
MANUAL**

**MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
2	1	4
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

11.2 Une température trop élevée peut causer la volatilisation de certains éléments (particulièrement K, Na, Cl et P) et la fusion de substances minérales.

12. RÉFÉRENCES

12.1 Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 12th Edition (1975), procedure 31.012.

12.2 Hanson, N.W., Society for Analytical Chemistry, London, Official Standardized and Recommended Methods of Analysis (1973), p. 154.

12.3 International Association of Fishmeal Manufacturers, Official and Proposed E.E.C. Methods of Analysis, 70 Wigmore Street, London, W.I., Cables Burfish, London W1H 9DL (1972).

12.4 Triebold, H.O., and Aurand, L.W., Food and Composition and Analysis, Toronto, D. Van Nostrand Co. (1963), pp. 31-33.



chapter chapitre	section	page
2	2	1
status état		date
new/nouveau		31/01/1986

**CHAPITRE 2 - ANALYSE IMMÉDIATE
SECTION 2: HUMIDITÉ ET MATIÈRES VOLATILES**

1. PORTÉE ET APPLICATION

1.1 Cette méthode peut être utilisée pour l'analyse des poissons, ainsi que des produits et sous-produits halieutiques.

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

2.1 L'humidité et les matières faiblement volatiles peuvent être éliminées en chauffant le produit à 95-100°C sous un vide partiel.

3. INTERFÉRENCES

3.1 Il n'existe pas d'interférences significatives connues.

4. MÉTHODE D'ÉCHANTILLONNAGE ET ENTREPOSAGE

4.1 Prélever un échantillon représentatif du lot du produit et l'entreposer de façon à conserver son intégrité.

5. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

5.1 Il faut tenir compte du type de produit et de la façon dont il est utilisé et préparé par le consommateur.

5.1.2 Dans le cas des produits conservés dans de l'eau, de la saumure ou un milieu semblable qui est habituellement jeté par le consommateur, ouvrir le paquet et égoutter le produit sur un tamis de taille appropriée pendant 1 à 1½ minute. Broyer la partie de l'échantillon retenue par le tamis jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.

5.1.3 Dans le cas des produits conservés dans un milieu que le consommateur peut utiliser ou emploie normalement, par ex. du poisson mis en conserve dans son jus ou dans l'huile, placer tout le contenu du paquet dans un homogénéisateur et mélanger pendant une minute ou jusqu'à ce qu'un mélange homogène soit obtenu.



**CHEMICAL
METHODS
MANUAL**

**MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
2	2	2
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

- 5.1.4 Dans le cas du poisson fumé et des produits halieutiques fumés devant être conformes à l'article B.21.025 du Règlement sur les aliments et drogues, retirer l'échantillon du contenant au moyen de pinces ou d'un autre instrument approprié, le placer sur un tamis à mailles grossières et l'égoutter pendant environ 5 minutes. Disposer l'échantillon sur une serviette de papier ou un autre papier absorbant et essuyer le liquide. Répéter l'absorption au moyen d'un deuxième et d'un troisième morceau de papier. Broyer l'échantillon jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène. Si la texture de l'échantillon est trop dure pour que ce dernier puisse être homogénéisé, le passer dans un broyeur un nombre suffisant pour obtenir un mélange uniforme. L'emploi d'un hachoir d'aliments comme étape initiale peut être suffisant si l'échantillon est gros.
- 5.1.5 Dans le cas des poissons conservés dans de la saumure ou salés, enlever, le cas échéant, autant de cristaux de sel libres que possible à l'aide d'une spatule, et éliminer les cristaux restants ou l'humidité avec une serviette de papier. Broyer l'échantillon jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.
- 5.1.6 Dans le cas du poisson cru, frais ou congelé, passer l'échantillon dans un broyeur un nombre de fois suffisant pour obtenir un mélange homogène.
- 5.1.7 Dans le cas des produits qui ne contiennent pas de liquide libre, décongeler dans le paquet (si le produit est congelé) et passer l'échantillon dans un broyeur un nombre de fois suffisant pour obtenir un mélange uniforme.
- 5.1.8 Dans le cas de la farine de poisson, broyer l'échantillon dans un broyeur ou un autre appareil approprié jusqu'à ce qu'il passe à travers un tamis n° 20.
- 5.2 Recueillir l'échantillon homogénéisé dans une tasse de plastique ou une bouteille de verre lavées à fond et possédant un couvercle. Entreposer l'échantillon dans un réfrigérateur ou congélateur jusqu'au moment de l'usage. S'assurer que la substance préparée est encore homogène avant la pesée. Si le liquide se sépare de l'échantillon, mélanger de nouveau le produit avant d'utiliser.

6. APPAREILLAGE

- 6.1 Étuve à vide.



chapter chapitre	section	page
2	2	3
status état		date
new/nouveau		31/01/1986

7. RÉACTIFS

7.1 Aucun réactif n'est nécessaire.

8. MÉTHODE

Peser avec précision un contenant de taille appropriée. Ajouter une quantité d'échantillon équivalente à environ 2 g d'échantillon sec et peser de nouveau. Placer dans une étuve à vide et chauffer à 100°C et sous une pression inférieure à 100 mm de Hg pendant environ 5 heures ou jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Refroidir dans un dessiccateur et peser.

9. CALCULS

9.1 Humidité = $\frac{100(p-a)}{p}$ pourcent

P = poids en g de l'échantillon

a = poids en g de l'échantillon séché

10. PRÉCISION ET EXACTITUDE

10.1 Des études, faites en collaboration en 1979 et 1981, on a obtenu les données suivantes en ce qui a trait à la précision de la méthode.

Description de l'échantillon	1 Farine du hareng	2 Farine de déchets	3 Farine du hareng	4 Farine de déchets	5 Farine mixte de poisson
Coefficient moyen de variation	4.77% +3.6%	5.72% +1.8%	9.24% +1.4%	6.57% +1.1%	4.66% +3.3%
	6 Viande séchée de phoque	7 Filet de maquereau mariné	8 Filet de morue et maquereau mariné (1 + 1)		
	4.10% +8.4%	45.75% +0.3%	62.01% +0.6%		

Le coefficient moyen de variation pour huit échantillons est +2,6%.



Fisheries
and Oceans

Pêches
et Océans

**CHEMICAL
METHODS
MANUAL**

**MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
2	2	4
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

11. REMARQUES

11.1 Étant donné que les échantillons salés ont tendance à mousser, il faut s'assurer que l'assiette n'est pas trop pleine.

12. RÉFÉRENCES

12.1 Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 12^e édition (1975), protocole 7.003.



chapter chapitre	section	page
2	3	1
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

**CHAPITRE 2 - ANALYSE IMMÉDIATE
SECTION 3: DOSAGE DES PROTÉINES (KJELDAHL)**

1. PORTÉE ET APPLICATION

- 1.1 Cette méthode peut servir à l'analyse du poisson ainsi que des produits et sous-produits halieutiques.

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

- 2.1 En présence d'acide sulfurique, de sulfate de sodium et d'un catalyseur, l'azote à l'état d'amine de nombreux composés organiques est converti en sulfate d'ammonium. L'ammoniac est distillé à partir d'un milieu alcalin et absorbé par un acide minéral étalonné. L'ammoniac est dosé par titrage en retour par une solution étalon de base minérale.

3. INTERFÉRENCES

- 3.1 Les composés d'ammonium, la chitine, l'urée, les acides aminés et des produits de dégradation des protéines complexes seront identifiés comme des protéines à moins qu'ils ne soient éliminés avant l'analyse.

4. MÉTHODE D'ANALYSE ET ENTREPOSAGE

- 4.1 Prélever un échantillon représentatif du lot du produit et l'entreposer afin de conserver son intégrité.

5. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

- 5.1 Il faut tenir compte du type de produit et de la façon dont il est utilisé et préparé par le consommateur.
- 5.1.1 Dans le cas des poissons ou des produits halieutiques qui ne contiennent pas de liquide libre, broyer l'échantillon jusqu'à ce qu'il soit homogène.
- 5.1.2 Dans le cas des produits conservés dans de l'eau, de la saumure ou un milieu semblable qui est habituellement jeté par le consommateur, ouvrir le paquet et égoutter le produit sur un tamis de taille appropriée pendant 1 à 1½ minute. Broyer la partie de l'échantillon retenue par le tamis jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.

**CHEMICAL
METHODS
MANUAL****MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
2	3	2
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

- 5.1.3 Dans le cas des produits conservés dans un milieu que le consommateur peut utiliser ou emploie normalement, par ex. du poisson en conserve dans son jus ou dans l'huile, placer tout le contenu du paquet dans un homogénéisateur et mélanger pendant une minute ou jusqu'à ce qu'un mélange homogène soit obtenu.
- 5.1.4 Dans le cas de la farine de poisson, broyer l'échantillon dans un moulin ou un autre appareil approprié jusqu'à ce qu'il passe à travers un tamis n° 20.
- 5.2 Recueillir l'échantillon homogénéisé dans une tasse de plastique ou une bouteille de verre lavées à fond et possédant un couvercle. Entreposer l'échantillon dans un réfrigérateur ou congélateur jusqu'au moment de l'usage. S'assurer que la substance préparée est encore homogène avant la pesée. Si du liquide se sépare de l'échantillon, mélanger de nouveau le produit avant de l'utiliser.
- 6. APPAREILLAGE**
- 6.1 Montage pour la digestion et la distillation Kjeldahl.
- 6.2 Ballons de digestion Kjeldahl, 800 mL.
- 7. RÉACTIFS**
- 7.1 Acide sulfurique (H_2SO_4), libre d'azote.
- 7.2 Sulfate cuivrique ($CuSO_4$), libre d'azote, anhydre.
- 7.3 Sulfate de sodium (Na_2SO_4), libre d'azote, anhydre.
- 7.4 Hydroxyde de sodium (NaOH).
- 7.4.1 Solution de NaOH (50 % p/v).
- 7.4.2 Solution étalon de NaOH (0,1 ou 0,2N). Préparer selon le protocole 50.034 et étalonner par du phtalate acide de potassium selon le protocole 50.035 des Official Methods of Analysis, 12^e édition (1975), de l'A.O.A.C.
- 7.5 Granules d'ébullition, enrobés de sélénium. Les granules Hengar peuvent être utilisés.



**CHEMICAL
METHODS
MANUAL**

**MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
2	3	3
status état		date
new/nouveau		31/01/1986

7.6 Acide chlorhydrique (HCl).

7.6.1 Solution étalon de HCl (0,1N). Titrer par la solution étalon de NaOH 0,1 ou 0,2N.

7.7 Indicateur Conway.

7.7.1 Solution mère. Mélanger 200 mL de solution rouge de méthyle à 0,1 % (dans de l'éthanol à 50 %) avec 50 mL de solution bleu de méthylène à 0,1 % (dans de l'éthanol à 50 %).

7.7.2 Solution de travail. Diluer 1 volume de solution mère avec 1 volume d'éthanol absolu et 2 volumes d'eau distillée. (Vire à pH 5.4 : acide - pourpre, alcalin - vert.)

8. MÉTHODE

8.1 Peser avec précision une quantité appropriée de produit finement granulé (environ 1,2 g pour la farine de poisson, 2,5 g pour les substances solubles ou le poisson homogénéisé) et déposer dans un ballon de digestion.

8.2 Ajouter à la suite dans le ballon 15 g de Na₂SO₄, 1 g de CuSO₄, un ou deux granules enrobés de sélénium et 25 mL de H₂SO₄ concentré.

8.3 Laisser digérer jusqu'à ce que la solution soit presque incolore ou vert pâle (2 heures pour les composés inorganiques) et pendant au moins 30 minutes additionnelles.

8.4 Refroidir (ne pas laisser la substance se solidifier), et ajouter avec précaution 200 mL d'eau. Ajouter des granules additionnels (au besoin) pour éviter la possibilité de bouillonnement brusque.

8.5 Déposer, au moyen d'une pipette 100 mL de HCl 0,1N, dans un erlenmeyer de 500 mL, ajouter 1 mL d'indicateur Conway et placer la fiole sous le condenseur en s'assurant que l'extrémité de ce dernier est immergé dans la solution acide.

8.6 Pencher le ballon Kjeldahl contenant l'échantillon digéré et ajouter 100 mL de la solution de NaOH à 50 % sans l'agiter. Relier immédiatement le ballon à l'allonge de l'appareil de distillation. Tourner le ballon pour bien mélanger son contenu.



chapter chapitre	section	page
2	3	4
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

8.7 Chauffer jusqu'à ce que tout l'ammoniac ait passé dans la solution étalon d'acide. Recueillir environ 150 mL. Prendre garde au bouillonnement brusque dans le ballon. Retirer immédiatement.

8.8 Laver l'extrémité du condenseur et titrer l'excès de solution étalon de HCl dans le distillat par de la solution étalon de NaOH.

9. CALCULS

9.1 Calculer le pourcentage d'azote (en poids humide) de la façon suivante :

$$\% \text{ AZOTE (humide)} = \frac{(A - B) \times 1,4007}{\text{poïds (g) de l'échantillon}}$$

où A = vol. (mL) de la sln étalon de HCl x normalité de la sln étalon de HCl

B = vol. (mL) de la sln étalon de NaOH x normalité de la sln étalon de NaOH

9.2 Calcul de la teneur en azote en poids sec (quand la quantité d'humidité est connue) :

$$\% \text{ AZOTE (sec)} = \frac{\% \text{ Azote (humide)} \times 100}{100 - \% \text{ humidité}}$$

9.3 Calculer le pourcentage de protéines (poids humide ou sec) de la façon suivante :

$$\% \text{ PROTÉINES} = \% \text{ azote} \times 6.25$$

où 6.25 est le facteur de conversion protéine-azote pour le poisson et les produits halieutiques.

10. PRÉCISION ET EXACTITUDE

10.1 Des études en collaboration, effectuées en 1979 et 1981, ont fourni les données suivantes sur la précision de la méthode. Les résultats moyens sont en fonction du poids sec.

**CHEMICAL
METHODS
MANUAL****MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
2	3	5
status état		date
new/nouveau		31/01/1986

Description de l'échantillon	1 Farine du hareng	2 Farine de déchets	3 Farine du hareng	4 Farine de déchets	5 Farine mixte de poisson
Coefficient moyen de variation	68.4% <u>+1.4%</u>	65.4% <u>+0.8%</u>	65.8% <u>+0.6%</u>	68.2% <u>+1.8%</u>	67.3% <u>+0.6%</u>
	6 Viande séchée de phoque	7 Filet de maquereau mariné	8 Filet de morue et maquereau mariné (1 + 1)		
	85.5% <u>+1.2%</u>	30.0% <u>+1.6%</u>	47.7% <u>+1.7%</u>		

Le coefficient moyen de variation est + 1,2 %.

11. REMARQUES

- 11.1 Le volume de solution étalon de HCl utilisé pour la distillation peut varier selon la teneur prévue en azote de l'échantillon.
- 11.2 Verser lentement le long de la paroi du ballon Kjeldahl de la solution d'hydroxyde de sodium à 50 % de façon à former une couche sous le mélange de digestion.
- 11.3 Ne chauffer aucune partie du ballon Kjeldahl au-dessus du niveau du mélange de digestion.
- 11.4 Assurer une ventilation adéquate pour l'évacuation des gaz pendant la digestion.
- 11.5 Certaines espèces de poissons comme l'aiguillat contiennent de l'azote non protéinique; en conséquence, utiliser le protocole 7.024 (12^e édition) de l'A.O.A.C. pour l'azote non protéinique lors de l'analyse de ces espèces afin d'obtenir des résultats corrects.
- 11.6 Une ébullition prolongée et une distillation trop rapide de l'acide pendant la digestion doivent être évitées étant donné la possibilité de perte d'ammoniac.



Fisheries
and Oceans

Pêches
et Océans

**CHEMICAL
METHODS
MANUAL**

**MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
2	3	6
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

12. RÉFÉRENCES

- 12.1 American Public Health Association, Standard Methods for the Examination of Water and Waste-Water, 14th Edition (1975), p. 437.
- 12.2 Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 12th Edition (1975), procedures 2.046 - 2.050.
- 12.3 International Association of Fishmeal Manufacturers, Official and Proposed E.E.C. Methods of Analysis, 70 Wigmore Street, London, W.I., Cables Burfish, London W1H 9DL (1972).
- 12.4 Bradsteet R.B., "A Review of the Kjeldahl Determination of Organic Nitrogen", Chemical Review, 27; p. 331, 1940.



chapter chapitre	section	page
2	4	1
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

CHAPITRE 2 - ANALYSE IMMÉDIATE

SECTION 4: SEL

1. PORTÉE ET APPLICATION

- 1.1 Cette méthode peut servir à mesurer la quantité de sel (NaCl) dans tous les poissons et produits halieutiques, y compris le poisson fumé et les produits halieutiques emballés sous-vide. Légèrement modifiée, cette méthode peut également être employée pour les saumures.

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

- 2.1 Dans le cas du poisson et des produits halieutiques, le chlorure est précipité par l'addition d'un léger excès de solution étalon de nitrate d'argent étalonné. La matière organique est oxydée par chauffage avec de l'acide nitrique, et le nitrate d'argent en excès est dosé par titrage par une solution étalon de thiocyanate avec une solution saturée de sulfate ammoniacal ferrique comme indicateur.
- 2.2 Dans le cas des saumures, le chlorure est titré directement par une solution étalon de nitrate d'argent avec du chromate de potassium comme indicateur.

3. INTERFÉRENCES

- 3.1 Dans le cas des échantillons digérés par de l'acide nitrique et analysés par la méthode de titrage en retour, seuls le bromure, l'iodure et le cyanure, qui apparaissent comme des concentrations équivalentes de chlorure, constituent des interférences.
- 3.2 Dans le cas des échantillons aqueux, les ions de sulfure, de thiosulfate et de sulfite peuvent causer des interférences. Éliminer les interférences en ajoutant 0,5 mL de peroxyde d'hydrogène, à 30 %, et laisser reposer pendant une minute avant de titrer.
- 3.3 Dans le cas des échantillons aqueux, une quantité d'orthophosphate supérieure à 25 mg/L constitue une interférence en formant un précipité de phosphate d'argent.
- 3.4 Dans le cas des échantillons aqueux, une quantité de fer supérieure à 10 mg/L constitue une interférence en masquant le point de virage.



**CHEMICAL
METHODS
MANUAL**

**MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
2	4	2
status état		date
new/nouveau		31/01/1986

4. MÉTHODE D'ÉCHANTILLONNAGE ET ENTREPOSAGE

4.1 Prélever un échantillon représentatif du lot du produit et l'entreposer afin de conserver son intégrité.

5. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

5.1 Il faut tenir compte du type de produit et de la façon dont il est utilisé et préparé par le consommateur.

5.1.1 Dans le cas du poisson fumé et des produits halieutiques fumés, conformément à l'article B.21.025 du Règlement sur les aliments et drogues, retirer l'échantillon du contenant au moyen de pinces ou d'un autre instrument approprié, le placer sur un tamis à mailles grossières et l'égoutter pendant environ 5 minutes. Disposer l'échantillon sur une serviette de papier ou un autre papier absorbant propre et éponger le liquide. Répéter avec un deuxième et un troisième morceau de papier. Pulvériser l'échantillon jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène. Si la texture de l'échantillon est trop dure pour que ce dernier puisse être homogénéisé, le passer dans un broyeur un nombre de fois suffisant pour obtenir un mélange uniforme. L'emploi d'un hachoir d'aliments comme étape initiale peut être suffisant si l'échantillon est de grande taille.

5.1.2 Dans le cas des poissons conservés dans de la saumure ou salés, enlever, le cas échéant, autant de cristaux de sel libres que possible à l'aide d'une spatule, et essuyer les cristaux restants ou l'humidité avec une serviette de papier. Pulvériser l'échantillon jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.

5.1.3 Dans le cas de poisson cru, frais ou congelé, passer l'échantillon dans un broyeur un nombre de fois suffisant pour obtenir un mélange homogène.

5.1.4 Dans le cas des gros poissons, pour chaque poisson prenez trois coupes transversales de 2.5 cm (1 pouce). Une tranche sera prise juste dépassé la nageoire pectorale, l'autre sera prise entre la première coupe et l'anus, alors que la dernière sera prise juste dépassé l'anus. Pulvériser toutes les tranches jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.



chapter chapitre	section	page
2	4	3
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

5.1.5 Dans le cas des produits conservés dans de l'eau, de la saumure ou un milieu semblable qui est habituellement jeté par le consommateur, ouvrir le paquet et égoutter le produit sur un tamis approprié pendant 1 à 1½ minute. Pulvériser la partie de l'échantillon retenue sur le tamis jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.

5.1.6 Dans le cas des produits conservés dans un milieu que le consommateur peut utiliser ou emploie normalement, par ex. du poisson en conserve dans son jus ou dans l'huile, placer tout le contenu du paquet dans un homogénéisateur et mélanger pendant une minute ou jusqu'à ce qu'un mélange homogène soit obtenu.

5.1.7 Dans le cas des produits qui ne contiennent pas de liquide libre, décongeler dans le paquet (si le produit est congelé) et passer l'échantillon dans un broyeur un nombre de fois suffisant pour obtenir un mélange uniforme. Il est très important que le broyage et le mélange soient complets lorsque le produit comporte plusieurs composants comme dans le cas des repas de poisson.

5.1.8 Dans le cas de la farine de poisson, broyer l'échantillon dans un moulin ou un autre appareil approprié jusqu'à ce qu'il passe à travers d'un tamis n° 20.

5.1.9 Dans le cas des saumures, bien agiter avant de prélever un échantillon.

5.1.10 Dans le cas des échantillons difficiles à pulvériser ou à homogénéiser, sécher l'échantillon, déterminer la teneur en humidité et broyer à l'état sec de façon à obtenir une substance homogène.

5.2 Recueillir l'échantillon homogénéisé dans une tasse de plastique ou une bouteille de verre lavées à fond et possédant un couvercle. Entreposer l'échantillon dans un réfrigérateur ou congélateur jusqu'au moment de l'utilisation. S'assurer que la substance préparée est encore homogène avant la pesée. Si du liquide se sépare de l'échantillon, mélanger de nouveau le produit avant de l'utiliser.

6. APPAREILLAGE

6.1 Dessicateur.

6.2 Plaque chauffante avec contrôle de température.



**CHEMICAL
METHODS
MANUAL**

**MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
2	4	4
status état		date
new/nouveau		31/01/1986

- 6.3 Contenant de métal d'environ 50 mm de diamètre et 40 mm de profondeur, muni d'un couvercle renversé qui s'ajuste étroitement à l'intérieur, ou contenant équivalent.
- 6.4 Homogénéisateur ou malaxeur avec contrôle de vitesse.
- 6.5 Étuve à vide avec thermomètre.
- 6.6 Pompe à vide capable de maintenir un vide partiel dans l'étuve équivalent à 100 mm de Hg et équipée d'un barboteur à l'acide sulfurique pour sécher les gaz.

7. RÉACTIFS

- 7.1 Thiocyanate d'ammonium (NH_4SCN) ou thiocyanate de potassium (KSCN).
- 7.1.1 Solution étalon de thiocyanate d'ammonium (0,1N). Dissoudre 7,613 g de NH_4SCN dans de l'eau exempte d'halogènes et diluer à 1 L. Titrer la solution selon le protocole 6.018 des Official Methods of Analysis, 12^e édition (1975) de l'A.O.A.C. Si l'on préfère, une solution de 0,2N ou d'une autre concentration peut être utilisée.
- 7.2 Alun ferrique ($\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$).
- 7.2.1 Indicateur ferrique. Préparer une solution saturée (45 %) de $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ dans de l'eau exempte d'halogènes.
- 7.3 Chromate de potassium (K_2CrO_4).
- 7.3.1 Solution aqueuse saturée de K_2CrO_4 .
- 7.4 Acide nitrique (HNO_3).
- 7.5 Acide sulfurique (H_2SO_4).
- 7.6 Nitrate d'argent (AgNO_3).
- 7.6.1 Solution étalon de nitrate d'argent (0,1N). Dissoudre 16,99 g de AgNO_3 dans de l'eau exempte d'halogènes et diluer à 1 L. Titrer la solution selon le protocole 50.027 des Official Methods of Analysis, 12^e édition (1975) de l'A.O.A.C. Si l'on préfère, une solution de 0,2N ou d'une autre concentration peut être utilisée.



chapter chapitre	section	page
2	4	5
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

8. MÉTHODE

8.1 Détermination du pourcentage d'humidité.

8.1.1 Sécher le contenant métallique de l'échantillon à 98-100 °C, refroidir dans un dessiccateur et peser (W1) peu de temps après le refroidissement à la température ambiante.

8.1.2 Peser avec précision (W2) une quantité de l'échantillon équivalente à environ 2 g en poids sec dans le contenant taré.

8.1.3 Relier la pompe à vide et le barboteur à l'acide sulfurique, à l'étuve à vide. Recouvrir le contenant de façon lâche et sécher l'échantillon dans l'étuve pendant 5 heures à une température de 95-100 °C sous vide partiel (100 mm de Hg).

8.1.4 Faire pénétrer de l'air sec dans l'étuve jusqu'au retour de la pression atmosphérique. Resserrer immédiatement le couvercle de l'assiette et transférer le poisson dans un dessiccateur.

8.1.5 Peser le contenant et son contenu (W3) peu de temps après que l'ensemble a atteint la température ambiante. Sécher l'échantillon jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

8.1.6 Déterminer la perte de poids (WL) de l'échantillon de la façon suivante :

$$WL = W2 - (W3 - W1)$$

8.1.7 Déterminer le pourcentage d'humidité de l'échantillon de la façon suivante :

$$\% \text{ Humidité} = \frac{WL}{W2} \times 100$$

8.2 Détermination de la teneur en sel du poisson et des produits halieutiques.

8.2.1 Peser avec précision 1 - 3 g de l'échantillon préparé (à l'étape 5.2), tout dépendant de la concentration prévue de sel, dans une fiole erlenmeyer de 250 mL.



chapter chapitre	section	page
2	4	6
status état		date
new/nouveau		31/01/1986

8.2.2 Déposer, au moyen d'une pipette, 25-50 mL de AgNO_3 0,1N, dans la fiole, selon la concentration prévue de sel, ajouter 20 mL de HNO_3 concentré et faire bouillir doucement sur une plaque chauffante sous une hotte, jusqu'à ce que tous les solides, à l'exception de AgCl soient dissous. (Dans le cas de produits teints, il pourrait être utile de faire bouillir la solution vigoureusement et de réduire le volume à 20 mL afin d'obtenir un point de virage plus net.)

8.2.3 Ajouter 50 mL d'eau exempte d'halogènes, refroidir jusqu'à la température ambiante, ajouter 3 mL d'indicateur ferrique et titrer par du NH_4SCN 0,1N, jusqu'à ce qu'une première coloration brun pâle persiste pendant environ 15 secondes. Noter le volume de NH_4SCN 0,1N, utilisé pour le titrage.

8.3 Dosage du sel des saumures (%).

8.3.1 Peser avec précision 1-2 g d'échantillon, qui sont déposés dans un erlenmeyer, et ajouter environ 50 mL d'eau exempte de chlorure. Titrer par AgNO_3 0,1N, jusqu'à un virage brun pâle en utilisant quelques gouttes de solution de chromate de potassium comme indicateur.

9. CALCULS

9.1 Calculer la teneur en sel de l'échantillon de la façon suivante :

$$\% \text{ NaCl} = \frac{[(\text{vol. AgNO}_3 \text{ ajouté} \times N.\text{AgNO}_3) - (\text{vol. NH}_4\text{SCN} \times N.\text{NH}_4\text{SCN})] \times 58.44 \times 100}{\text{poids de l'échantillon} \times 1\,000}$$

9.2 Afin de déterminer la teneur en sel du milieu aqueux, multiplier le pourcentage de NaCl (calculé à l'étape 9.1) par 100 et diviser par le pourcentage d'humidité.

9.3 Pour les saumures, calculer le pourcentage du sel de la façon suivante :

$$\% \text{ NaCl} = \frac{(\text{vol. AgNO}_3 \text{ utilisé} \times N.\text{AgNO}_3) \times 58.44 \times 100}{\text{poids de l'échantillon} \times 1\,000}$$

10. PRÉCISION ET EXACTITUDE

10.1 Un écart-type relatif inférieur à 5 % et une erreur relative inférieure à 2 % sont possibles lorsqu'on emploie la méthode argentométrique de dosage du sel.

**CHEMICAL
METHODS
MANUAL****MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
2	4	7
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

11. REMARQUES

11. Il est important que la détermination du point de virage soit constante, et le titrage doit être effectué aussi rapidement que possible pour obtenir des résultats exacts. L'utilisation d'un blanc est essentielle.
- 11.2 Dans le cas d'échantillons présentant une quantité appréciable de pigments qui pourraient rendre la détermination du point de virage plus difficile, on peut effectuer un titrage potentiométrique si l'équipement nécessaire est disponible. Cependant, le changement en mV est peu important et non instantané. En conséquence, cette méthode n'est pas appropriée pour les essais courants et ne doit être employée comme indicateur du point de virage que pour les échantillons dont l'analyse est difficile, et en conjonction avec un indicateur ferrique.

12. RÉFÉRENCES

- 12.1 Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., 12th Edition (1975), procedures 7.003 and 18.030.
- 12.2 American Public Health Association, Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water, 14th Edition (1975), p. 303.
- 12.3 Society for Analytical Chemistry, Official Standardization and Recommended Methods of Analysis, 2nd Edition (1973), p. 155.
- 12.4 "Determination of Percent Salt in Smoked Fish", Official Method FO-14, Health Protection Branch, Health and Welfare Canada.



chapter chapitre	section	page
2	5	1
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

CHAPITRE 2 - ANALYSE IMMÉDIATE

SECTION 5: SODIUM ET POTASSIUM

1. PORTÉE ET APPLICATION

- 1.1 Cette méthode peut servir à analyser tous les poissons et produits halieutiques. Selon la précision requise et l'équipement disponible, on peut employer la spectroscopie d'émission à flamme (E.F.) ou d'absorption atomique (A.A.).

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

- 2.1 L'échantillon est séché à 100 °C et calciné dans un four à moufle à 525 °C jusqu'à l'obtention d'une cendre blanche. La cendre est dissoute dans un acide dilué et la solution de l'échantillon obtenue est aspirée directement dans le brûleur du spectrophotomètre d'émission à flamme (E.F.) ou d'absorption atomique (A.A.), selon la précision requise et l'équipement disponible.

3. INTERFÉRENCES

- 3.1 Les interférences d'ionisation constituent des problèmes avec l'emploi des méthodes d'émission à flamme et d'absorption atomique.
- 3.1.1 Dans le cas de l'E.F., les solutions étalons de Na et de K doivent contenir l'autre élément à la teneur approximative prévue pour les solutions diluées de l'échantillon. L'intensité de l'émission dépend également des conditions de la flamme.
- 3.1.2 Dans le cas de l'A.A., la présence d'un métal ionisable quelconque améliore l'absorption de Na et de K, selon les conditions de la flamme. Les interférences peuvent être minimisées en ajoutant une quantité excessive de "l'autre élément" (par ex., 1 ou 2 mg/mL) aux solutions étalons et d'échantillon. L'emploi d'une flamme air/hydrogène peut également aider à réduire les interférences.

4. MÉTHODE D'ÉCHANTILLONNAGE ET ENTREPOSAGE

- 4.1 Prélever un échantillon représentatif du lot du produit et l'entreposer afin de maintenir son intégrité.



**CHEMICAL
METHODS
MANUAL**

**MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
2	5	2
status état		date
new/nouveau		31/01/1986

5. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

5.1 Il faut tenir compte du type de produit et de la façon dont il est utilisé et préparé par le consommateur. S'assurer que tout l'appareillage est exempt de Na et K.

5.1.1 Dans le cas des produits conservés dans l'eau, la saumure ou un milieu semblable qui est habituellement jeté par le consommateur, ouvrir le paquet et égoutter le produit sur un tamis de taille appropriée de 1 à 1½ minute. Pulvériser la partie de l'échantillon retenue sur le tamis jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène. Si la texture de l'échantillon est trop dure pour que ce dernier puisse être homogénéisé, le passer dans un broyeur un nombre de fois suffisant pour obtenir un mélange uniforme. L'emploi d'un hachoir d'aliments peut être suffisant si l'échantillon est de grande taille.

5.1.2 Dans le cas des produits conservés dans un milieu que le consommateur peut utiliser ou emploie normalement, par ex. du poisson mis en conserve dans son jus ou dans l'huile, placer le contenu en entier du paquet dans un homogénéisateur et mélanger pendant une minute ou jusqu'à ce qu'un mélange homogène soit obtenu.

5.1.3 Dans le cas des produits qui ne contiennent pas de liquide libre, décongeler dans le paquet (si le produit est congelé) et passer l'échantillon dans un broyeur un nombre de fois suffisant pour obtenir un mélange uniforme. Il est très important que le broyage et le mélange soient complets lorsque le produit comporte plusieurs composantes comme dans le cas des repas de poisson.

5.2 Recueillir l'échantillon homogénéisé dans une tasse de plastique ou une bouteille de verre lavées à fond et possédant un couvercle. (Certaines marques de tasses de plastique jetables sont exemptes de Na et de K et peuvent être utilisées sans nettoyage.)

5.3 Entreposer l'échantillon dans un réfrigérateur ou congélateur jusqu'au moment de l'utilisation. S'assurer que la substance préparée est encore homogène avant la pesée. Si du liquide se sépare de l'échantillon, mélanger de nouveau le produit avant de l'utiliser.

6. APPAREILLAGE

6.1 Creusets de silice ou de platine.

6.2 Four à moufle.



chapter chapitre	section	page
2	5	3
status état		date
new/nouveau		31/01/1986

6.3 Photomètre à flamme, spectrophotomètre ou spectrophotomètre d'absorption atomique.

6.4 Enregistreur à bande; il présente des avantages mais son utilisation n'est pas essentielle.

6.5 Un diluteur est très utile pour le dosage d'un grand nombre d'échantillons présentant des concentrations diverses de Na et de K.

7. RÉACTIFS

7.1 Acide nitrique (HNO_3).

7.1.1 Solution d'acide nitrique (1 + 4).

7.2 Chlorure de sodium (NaCl), 99,95 % pur, chauffé à 500 °C jusqu'à obtention d'un poids constant et entreposé dans un dessiccateur.

7.2.1 Solution mère de sodium (1 mg/mL). Dissoudre 2,5422 g de NaCl dans de l'eau distillée et diluer à 1 L.

7.2.2 Solutions étalons de sodium. Préparer une série de 3 à 5 étalons présentant une gamme de concentrations appropriée pour l'appareil utilisé et les échantillons analysés. Les étalons employés pour la spectroscopie d'émission à la flamme (s'il s'agit de la méthode A.A., voir 7.4) sont les suivants : 0,00, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04 et 0,05 mg/mL. Au moyen d'une pipette, déposer 1, 2, 3, 4 et 5 mL de la solution mère de Na dans des fioles jaugées distinctes de 100 mL. À chacune, ajouter 7 mL de la solution mère de K et 2 mL de HNO_3 concentré, et diluer jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée. Un blanc doit également être préparé de la même manière.

7.3 Chlorure de potassium (KCl), recristallisé, chauffé à 500 °C jusqu'à obtention d'un poids constant et entreposé dans un dessiccateur.

7.3.1 Solution mère de potassium (1 mg/mL). Dissoudre 1,9068 g de KCl dans de l'eau distillée et diluer à 1 L.

7.3.2 Solutions étalons de potassium. Préparer une série de 3 à 5 étalons présentant une gamme de concentrations appropriée pour l'appareil utilisé et les échantillons analysés. Les étalons employés pour la spectroscopie d'émission à flamme (s'il s'agit de la méthode A.A.,

**CHEMICAL
METHODS
MANUAL****MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
2	5	4
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

voir 7.4) sont les suivants : 0,00, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,10 mg/mL. Au moyen d'une pipette, déposer 0, 2, 4, 6, 8 et 10 mL de la solution mère de K dans des fioles jaugées distinctes de 100 mL. À chacune, ajouter 3 mL de la solution mère de Na et 2 mL de HNO₃ concentré, et diluer jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée. Un blanc doit également être préparé de la même manière.

- 7.4 Les solutions étalons utilisées dans la méthode A.A. se situent dans une gamme allant de 1 à 5 ug/mL, et la concentration de l'autre élément est d'environ 1 ou 2 mg/mL.

8. MÉTHODE

- 8.1 Si une mesure des cendres de l'échantillon a déjà été effectuée dans un creuset de silice et selon une méthode comme l'A.O.A.C. 31.012, 12^e édition, ces cendres peuvent être utilisées et l'étape 8.2 est omise.
- 8.2 Peser avec précision environ 10,0 g d'échantillon dans un creuset de silice, lavé auparavant avec de l'acide. Placer l'échantillon pesé dans une étuve réglée à 110 °C - 125 °C pendant une période de 8 à 24 heures. Transférer l'échantillon séché dans un four à moufle réglé à 250 °C. Élever graduellement la température jusqu'à 350 °C au cours d'une période de 1 à 2 heures. Maintenir cette température jusqu'à ce que la plus grande partie du gras soit éliminé par l'action de la fumée. Continuer d'élever la température jusqu'à 525 °C et la maintenir pendant une période de 8 à 16 heures. Si à ce moment, la cendre n'est pas blanche, retirer l'échantillon du four à moufle, refroidir et ajouter $\frac{1}{4}$ à 1 mL de HNO₃ concentré à la cendre. Faire évaporer lentement le HNO₃ sur une plaque chauffante (sous une hotte) jusqu'à ce que la cendre soit complètement sèche. Placer de nouveau le creuset dans le four à moufle pendant une demi-heure à une heure. La cendre doit être complètement blanche. Dans le cas contraire, répéter le traitement à l'acide HNO₃.
- 8.3 Dissoudre la cendre refroidie dans 15 mL de HNO₃ dilué (1 + 4) sur une plaque chauffante à température modérée. Filtrer la solution à travers un papier Whatman n° 42 et l'introduire dans une fiole jaugée de 100 mL. Rincer le creuset et le papier avec de 20 à 25 mL d'eau chaude. Ce premier rinçage est suivi de plusieurs autres à l'eau froide afin d'assurer le transfert complet de la cendre soluble dans la fiole. (Omettre l'étape de la filtration si la cendre se dissout complètement). Lorsqu'elle est refroidie, la solution est diluée jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée.



chapter chapitre	section	page
2	5	5
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

8.4 Installer le photomètre ou spectrophotomètre selon les indications du fabricant. Tourner la tête du brûleur de 90° et utiliser une flamme oxydante. (Omettre la rotation de la tête lorsqu'une sensibilité additionnelle est requise.) Analyser la solution de l'échantillon à 589 nm (Na) et 766 nm (K) selon la méthode d'E.F. ou d'A.A. Diluer la solution de l'échantillon pour que la lecture d'émission ou d'absorption se situe dans la gamme des solutions étalons. (Doser les solutions étalons fréquemment pendant la période d'examen des échantillons afin de vérifier la courbe d'étalonnage.) Comme solution de rechange, on peut utiliser les longueurs d'onde secondaires de 330 nm (Na) et de 404 nm (K) afin de réduire le nombre de dilutions nécessaires pour l'analyse des échantillons et des étalons qui présentent des concentrations plus élevées. Les dilutions exigent 2 mL de HNO₃ concentré par 100 mL.

9. CALCULS

9.1 Préparer des courbes d'étalonnage à partir des hauteurs de pics obtenues avec les solutions étalons.

9.2 Déterminer les concentrations de Na et K dans l'échantillon en comparant la hauteur du pic de l'échantillon avec la courbe d'étalonnage. Tenir compte du poids de l'échantillon et des facteurs de dilution.

10. REMARQUES

10.1 Le poisson conservé dans de l'eau de mer réfrigérée (E.M.R.) avant le débarquement et le traitement présente habituellement des concentrations supérieures de Na et inférieures de K.

11. RÉFÉRENCES

11.1 Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 12th Edition (1975), procedures 18.033, 18.034, 18.036, 18.037, 18.038, 31.012, 31.013.

11.2 Analytical Methods for Atomic Absorption Spectrophotometry, Perkin-Elmer, September 1976 Edition.



chapter chapitre	section	page
2	6	1
status état	date	
new/nouveau	10/11/1989	

**CHAPITRE 2 - ANALYSE IMMÉDIATE
SECTION 6: SUCRES RÉDUCTEURS TOTAUX**

1. PORTÉE ET APPLICATION

- 1.1 La présente méthode permet de déterminer la quantité totale de sucres réducteurs, sous forme de dextrose, présents dans les produits préparés du poisson qui contiennent des agents de remplissage, des liants ou d'autres ingrédients. On entend ici par "agents de remplissage" la farine de blé ou d'autres céréales, la farine de pomme de terre, l'amidon et les sucres ajoutés.

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

- 2.1 Tous les sucres simples et la plupart des disaccharides ont la propriété de réduire les solutions alcalines d'un grand nombre de sels métalliques dont ceux du cuivre. Ce phénomène est à la base du test de Fehling pour les sucres réducteurs : une solution échantillon est traitée par un mélange, à parties égales, d'une solution de sulfate de cuivre et d'une solution alcaline de tartrate. La solution de Fehling a une double utilité. Elle contient des ions cuivriques qui sont réduits par le sucre en ions cuivreux et le niveau d'alcalinité est tel que les molécules de sucre sont brisées en fragments réactifs. Ces fragments sont facilement oxydés et réduisent les ions cuivriques en ions cuivreux.
- 2.2 L'échantillon, dont on a déterminé le poids, est hydrolysé afin de briser les hydrates de carbone en mono- et disaccharides simples. La solution échantillon est traitée à l'acide phosphotungstique afin d'en précipiter les substances sources d'interférences. Les solides sont filtrés de la solution et un volume connue de solution est traité par la solution de Fehling afin d'en oxyder les sucres réducteurs. Les ions cuivriques qui demeurent dans la solution sont réduits par l'iodure de potassium en milieu acide et une quantité correspondante d'iode ionique est oxydée en iode moléculaire. L'iode ainsi produit est titré au point de virage de l'amidon par une solution standard de thiosulfate de sodium, la valeur obtenue sert ensuite à calculer la quantité de sucres réducteurs, sous forme de dextrose, présente au départ.

3. INTERFÉRENCES

- 3.1 Toute substance pouvant réduire les ions cuivriques ou oxyder les sucres affectera le dosage.



chapter chapitre	section	page
2	6	2
status état	date	
new/nouveau	10/11/1989	

4. MÉTHODE D'ÉCHANTILLONNAGE ET ENTREPOSAGE

4.1 Prélever un échantillon représentatif du lot de produits et l'entreposer de façon à en maintenir l'intégrité.

5. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

5.1 Broyer l'échantillon jusqu'à homogénéité et transférer l'homogénat dans une bouteille de verre ou de plastique nettoyée à fond et pouvant être scellée. Entreposer l'échantillon au réfrigérateur ou au congélateur jusqu'à utilisation. Veiller à ce que l'échantillon soit toujours homogène au moment de sa pesée. Homogénéiser à nouveau s'il y a présence d'un surnageant.

6. APPAREILLAGE

6.1 Ballons à acide phosphorique de 200 mL.

6.2 Homogénéiseur de tissus, mélangeur ou broyeur d'aliments.

7. RÉACTIFS

7.1 Solution de Fehling. Les solutions ci-après ne sont pas mélangées à l'avance car le mélange ne demeure pas stable pendant très longtemps.

7.1.1 Solution de sulfate de cuivre. Dissoudre 40 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dans de l'eau distillée et porter à 1 L.

7.1.2 Solution de sel de Rochelle. Dissoudre 200 g de cristaux de tartrate de sodium et de potassium dans environ 600 mL d'eau distillée chaude, dissoudre ensuite 150 g de NaOH dans la solution refroidie et porter à 1 L.

7.2 Acide chlorhydrique (HCl).

7.2.1 Solution d'acide chlorhydrique (1,5 N). Diluer 130 mL de HCl concentré avec l'eau distillée. Porter à 1 L.

7.2.2 Solution d'acide chlorhydrique (1 + 2).

7.3 Thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).

7.3.1 Solution de thiosulfate de sodium (0,025 N). Dissoudre 6,5 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dans de l'eau distillée et porter à 1 L.



chapter chapitre	section	page
2	6	3
status état		date
new/nouveau		10/11/1989

7.4 Iodure de potassium (KI).

7.4.1 Solution d'iodure de potassium (10 %).

7.5 Hydroxyde de sodium (NaOH).

7.5.1 Solution d'hydroxyde de sodium (20 %).

7.6 Solution d'acide sulfurique (1 + 3).

7.7 Amidon en poudre.

7.7.1 Solution d'indicateur à l'amidon. Mélanger 1 g d'amidon en poudre avec 20 mL d'eau froide et verser le tout dans 500 mL d'eau bouillante. Faire bouillir pendant 10 minutes. Refroidir et conserver dans une bouteille à bouchon de verre. Recouvrir la solution avec 1 mL de toluène ou de chloroforme, ou ajouter 0,625 g d'acide salicylique comme agent de préservation.

7.8 Acide phosphotungstique ($P_2O_5 \cdot 24WO_3 \cdot xH_2O$, X - 48).

7.8.1 Solution d'acide phosphotungstique (20 %). Filtrer si la solution est trouble.

7.9 Dextrose anhydre.

7.9.1 Solution standard de dextrose. Dissoudre 0.2 g de dextrose dans 100 mL d'eau distillée.

7.10 Thiocyanate d'ammonium.

8. MÉTHODE

8.1 Peser avec exactitude 10,0 g d'échantillon dans un ballon à acide phosphorique de 200 mL. Ajouter 90 mL de HCl, 1,5 N. Chauffer le ballon pendant 90 minutes dans un bain d'eau bouillante et refroidir immédiatement à la température ambiante. Rendre la solution tout juste alcaline ou tournesol (ou à la phénolphtaléine) avec une solution de NaOH à 20 % (27 mL environ), ajouter 10 mL de HCl (1 + 2) et refroidir (au besoin).

8.2 Ajouter 20 mL de la solution d'acide phosphotungstique à 20 %, amener au volume avec de l'eau distillée, boucher et bien agiter. Laisser reposer la solution pendant de 15 à 30 minutes et filtrer sur filtre de papier de 18,5 cm (Whatman n^{os} 41 ou 42, ou l'équivalent).



chapter chapitre	section	page
2	6	4
status état	date	
new/nouveau	10/11/1989	

- 8.3 Pipetter 5 mL du filtrat dans un erlenmeyer de 125 mL. Ajouter, à la pipette, 5 mL de solution de sulfate de cuivre et 5 mL de la solution alcaline de sel de Rochelle. Ajouter de 10 à 15 perles de verre. Amener à ébullition sur plaque chaude. Laisser bouillir pendant une minute environ et refroidir.
- 8.4 Ajouter 20 mL de la solution d'iodure de potassium à 10 % et 4 mL de H₂SO₄ (1 + 3). Titrer avec la solution de thiosulfate de sodium en ajoutant 4 mL d'indicateur à l'amidon et 1 g environ de thiocyanate d'ammonium lorsque la couleur jaune de l'iode est presque disparue. Une goutte de thiosulfate de sodium devrait faire passer la couleur de bleu à blanc ou à lilas pâle.
- 8.5 Procéder à un dosage du blanc en utilisant 5 mL d'eau distillée à la place du filtrat. Débuter à l'étape 8.3. L'écart entre les résultats de titrage du blanc et de l'échantillon donne l'équivalent thiosulfate de la céréale (sucres réducteurs) présente. De façon semblable, procéder à un dosage standard en utilisant 5 mL de la solution standard de dextrose. Procéder au dosage du blanc et de la solution standard le jour du dosage des échantillons. Procéder de la sorte à chaque fois que de nouvelles solutions sont utilisées.

9. CALCULS

- 9.1 Le filtrat de 5 mL utilisé pour le dosage représente 0,25 g de l'échantillon de départ ($10,0 \times \frac{5}{200}$). Le volume de 5 mL de la solution standard de dextrose équivaut à 10 mg de dextrose anhydre ($0,4 \times \frac{5}{200}$). Par conséquent, une valeur de titrage équivalente à celle obtenue avec la solution standard de dextrose correspondrait à une teneur de dextrose de 4 % dans l'échantillon ($\frac{0.010}{0.250} \times 100$).

- 9.2 La concentration de céréale (sucres réducteurs), calculée sous forme de dextrose, peut être déterminée en appliquant la formule:

$$\% \text{ de dextrose: } \frac{A - B}{A - C} \times 4$$

Où: A = titrage du blanc (mL)

B = titrage de l'échantillon (mL)

C = titrage de la solution standard de dextrose (mL)



chapter chapitre	section	page
2	6	5
status état		date
new/nouveau		10/11/1989

10. PRÉCISION ET EXACTITUDE

Une étude faite en 1986 et à laquelle ont collaboré divers laboratoires d'inspection du MPO a permis d'obtenir les données suivantes quant à la précision de la méthode:

	N ^o DU LAB.					MOYENNE (N=5)	É-T	É-T É.
	1	2	3	4	5			
2A*	2.21 2.12	1.70 1.81	1.98 1.77	1.78 2.46	2.44 2.18	2.04	0.28	13.7%
2B	4.13 4.00	3.76 4.20	3.87 3.75	4.36 4.40	4.23 4.27	4.10	0.22	5.5%
2C	0.00 0.12	0.32 0.30	0.22 0.30	0.10 0.10	0.30 0.15	0.19	0.10	54.0%
2D*	2.32 2.31	1.59 2.10	1.90 1.70	2.21 2.14	2.46 2.07	2.08	0.24	11.6%

* Il s'agit du même échantillon.

11. REMARQUES

- 11.1 Les sucres réducteurs, après hydrolyse de tous les ingrédients de l'échantillon, sont jugés analogues au dextrose et sont signalés comme tel.
- 11.2 Si les produits contiennent plus de 8 % de sucres réducteurs, utiliser, à l'étape 8.3, 2 mL de filtrat et 3 mL d'eau distillée. Dans ce cas, la solution de dextrose correspond à une teneur de dextrose de 10 % dans l'échantillon.

12. REFERENCES

- 12.1 Hydrolysis: Schirokow, N.W.; and Milowidows, M.K.; Zeitschrift fur Untersuchung der Lebensmittel, 70, 251 (1935).
- 12.2 Use of Ammonium Thiocyanate: H.W. Foote and J.E. Vance, J. Amer.Chem. Soc., 57, 845 (1935).
- 12.3 Determination: Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 12th Edition (1975), procedure 24.056.



Fisheries
and Oceans

Pêches
et Océans

**CHEMICAL
METHODS
MANUAL**

**MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
2	6	6
status état	date	
new/nouveau	10/11/1989	

- 12.4 Triebold, H.O.; and Aurand, L.W.; "Food Composition and Analysis", D. Van Nostrand Co. Inc. (1963), chapter 5.
- 12.5 Pearson, D.; "The Chemical Analysis of Foods", Chemical Publishing Co., Inc., New York (1976).



chapter chapitre	section	page
3	1	1
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

**CHAPITRE 3 - INDICES DE QUALITÉ
SECTION 1: SUBSTANCES RESSEMBLANT À L'HISTAMINE**

1. PORTÉE ET APPLICATION

- 1.1 Les "substances ressemblant à l'histamine" constituent les principaux composés à l'origine de l'empoisonnement par les scombridés, une condition allergique causée surtout par la consommation de poisson toxique du sous-ordre des scombridés qui inclut le thon, le thazard, la bonite et le maquereau. Cette méthode est utilisée pour l'analyse des "substances ressemblant à l'histamine" des espèces susmentionnées, des produits halieutiques qui contiennent ces espèces, et du mahi mahi (dorade). La concentration de ces substances peut être utilisée comme un indicateur de la décomposition et de la présence de composés dangereux pour la santé publique.

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

- 2.1 Les "substances ressemblant à l'histamine" sont extraites de l'échantillon avec du méthanol, les composés d'interférences sont éliminés par la chromatographie par échange d'anions, et l'histamine purifiée est combinée avec de l'ortho-phthalaldéhyde (OPT) pour former un fluorophore dont l'intensité est mesurée par fluorométrie. Les résultats sont exprimés en concentrations équivalentes d'histamine.

3. INTERFÉRENCES

- 3.1 De fortes quantités d'histidine, un acide aminé, peuvent être présentes dans la chair de poisson, et ce composé nuit au dosage de l'histamine, car il forme également un fluorophore avec l'OPT. Plusieurs homologues de l'histidine et d'autres polyamines peuvent aussi réagir avec l'OPT; cependant, ils sont normalement présents en faibles concentrations et ne constituent pas un problème majeur. La méthode d'échange des anions devrait réduire ces problèmes.

4. MÉTHODE D'ÉCHANTILLONNAGE ET ENTREPOSAGE

- 4.1 Prélever un échantillon représentatif du lot du produit, et l'entreposer de façon à conserver son intégrité.



chapter chapitre	section	page
3	1	2
status état		date
new/nouveau		31/01/1986

5. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

- 5.1 Dès la réception de l'échantillon au laboratoire, les données pertinentes doivent être vérifiées et inscrites dans les dossiers du laboratoire. L'état de l'échantillon doit être contrôlé afin de s'assurer que les échantillons frais ont été réfrigérés de façon appropriée et que les échantillons congelés le sont encore. Il est essentiel qu'un échantillon soit manipulé et entreposé de façon à assurer la préservation de sa qualité originale.
- 5.2 Les échantillons crus frais doivent être préparés dès leur réception. On ne doit cependant tolérer en aucun cas un délai de plus de trois heures avant de traiter le produit réfrigéré. Sinon, il faut le congeler rapidement dès la réception. Entreposer les autres échantillons de façon à préserver leur intégrité en tenant compte du type de produit et de son entreposage commercial.
- 5.3 Il faut tenir compte du type de produit et de la façon dont il est utilisé et préparé par le consommateur. Les échantillons de grande taille ou dont la texture est trop dure pour l'homogénéisation doivent être passés dans un mélangeur ou un broyeur d'aliments un nombre suffisant de fois pour obtenir une substance uniforme.
- 5.3.1 Les échantillons crus frais doivent être analysés immédiatement après le broyage. Si cela n'est pas possible, ils doivent être congelés rapidement pour éviter que la décomposition ne s'amorce.
- 5.3.2 Dans le cas de produits conservés dans un milieu que le consommateur peut utiliser ou emploie normalement, par ex. du poisson mis en conserve dans son jus ou de l'huile, placer tout le contenu du paquet dans un homogénéisateur et mélanger pendant une minute ou jusqu'à ce qu'un mélange homogène soit obtenu.
- 5.3.3 Dans le cas des produits conservés dans de l'eau, de la saumure ou un milieu semblable qui est habituellement jeté par le consommateur, ouvrir le paquet et égoutter le produit sur un tamis de taille appropriée pendant 1 à 1½ minute. Broyer la partie de l'échantillon retenue par le tamis jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.



chapter chapitre	section	page
3	1	3
status état		date
new/nouveau		31/01/1986

5.3.4 Dans le cas des produits qui ne contiennent pas de liquide libre, décongeler dans le paquet (si le produit est congelé) et passer l'échantillon dans un broyeur un nombre suffisant de fois pour obtenir un mélange uniforme. Il est très important que le broyage et le mélange soient complets lorsque le produit comporte plusieurs composantes comme dans le cas des repas de poisson.

5.4 Recueillir l'échantillon homogénéisé dans une tasse de plastique ou une bouteille de verre lavées à fond et possédant un couvercle. Entreposer l'échantillon dans un réfrigérateur ou congélateur jusqu'au moment de l'usage. S'assurer que la substance préparée est encore homogène avant la pesée. Si du liquide se sépare de l'échantillon, mélanger de nouveau le produit avant de l'utiliser.

6. APPAREILLAGE

6.1 Colonnes chromatographiques, 150 x 9 mm D.I. ou 200 x 7 mm D.I., en verre, polypropylène ou l'équivalent.

6.2 Fioles jaugées de 100 mL (les fioles à sucre Bates sont plus faciles à utiliser que les fioles jaugées standard).

6.3 Agitateur-mélangeur à tourbillon.

6.4 Fluorimètre avec capacité d'excitation à 360 nm et d'émission à 450 nm.

6.5 Bain-marie réglé à 60°C.

7. RÉACTIFS

7.1 Méthanol (CH₃OH).

7.2 Résine échangeuse d'anions Bio-Rad AG1-X8, 50-100 mesh; la plupart des substituts n'ont pas donné de résultats satisfaisants.

7.3 Acide chlorhydrique (HCl).

7.3.1 Acide chlorhydrique (1,0N). Diluer 93 mL de HCl à 1 L avec de l'eau distillée.

7.3.2 Acide chlorhydrique (0,1N). Diluer 10 mL de HCl 1,0N à 100 mL avec de l'eau distillée.



**CHEMICAL
METHODS
MANUAL**

**MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
3	1	4
status état		date
new/nouveau		31/01/1986

7.4 Hydroxyde de sodium (NaOH).

7.4.1 Hydroxyde de sodium (1N). Dissoudre 41,2 g de NaOH dans de l'eau distillée et diluer à 1 L.

7.5 Acide phosphorique (H_3PO_4 à 85 %).

7.5.1 Acide phosphorique (10 %). Diluer 10 mL de H_3PO_4 à 85 % à 100 mL avec de l'eau distillée.

7.6 Ortho-phthalaldéhyde ($C_6H_4(CHO)_2$), (OPT).

7.6.1 Solution d'ortho-phthalaldéhyde OPT (sol. à 1 % pds/vol dans le méthanol); entreposer au réfrigérateur dans une bouteille teintée.

7.7 Dichlorhydrate d'histamine ($C_5H_9N_3 \cdot 2HCl$).

7.7.1 Solution étalon primaire d'histamine (1 mg/mL). Sécher $C_5H_9N_3 \cdot 2HCl$ par-dessus de l'acide sulfurique pendant deux heures. Peser avec précision 0,165 g, dissoudre et diluer à 100 mL avec du HCl à 0,1N. Entreposer au réfrigérateur.

7.7.2 Solution étalon d'histamine (10 ug/mL). Diluer 1 mL de solution étalon primaire à 100 mL avec du HCl à 0,1N. Entreposer dans un réfrigérateur et préparer une solution fraîche tous les deux ou trois mois.

7.7.3 Solutions étalons de travail d'histamine (0,1, 0,2, 0,3 ug/mL). Diluer 1, 2 et 3 mL de solution étalon (10 ug/mL) à 100 mL avec du HCl à 0,1N. Préparer une solution fraîche chaque semaine.

8. MÉTHODE

8.1 Convertir la résine échangeuse d'ions à la forme OH en la faisant tourner dans un béccher avec du NaOH 2N, (15 mL par g de résine). Laisser reposer de 20 à 30 minutes, décantier le liquide et répéter le traitement au NaOH. Bien laver la résine avec 2 ou 3 volumes équivalents de H_2O en décantant après chaque rinçage et préparer une suspension aqueuse dans un papier filtre à plis, comme le S&S n° 588 ou le Whatman n° 2, en utilisant un flacon laveur. Répéter le lavage jusqu'à neutralité de l'eau au papier pH, et conserver la résine sous l'eau. Préparer de la résine fraîche chaque semaine.



chapter chapitre	section	page
3	1	5
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

- 8.1.1 Préparer la colonne de chromatographie par échange d'ions en fixant un tampon de laine de verre à la base de la colonne et déposer une quantité suffisante de suspension de résine pour former une couche de 8 cm. Garder la résine recouverte d'eau en tout temps. Ne pas régénérer la résine dans la colonne. Après l'élution d'un échantillon, laver la résine avec 10 mL de H₂O avant l'essai suivant. Environ 50 échantillons peuvent être analysés avec une colonne de résine. Cependant, il faut s'assurer que des composés à l'origine d'interférences ne sont pas élués.
- 8.2 Peser avec précision 10 g d'échantillon et les déposer dans un homogénéiseur, ajouter environ 50 mL de CH₃OH et mélanger pendant environ deux minutes. Transférer le mélange dans une fiole jaugée de 100 mL. Bien rincer l'homogénéisateur et son couvercle avec du CH₃OH et verser les portions de rinçage dans la fiole jaugée. Placer la fiole dans un bain-marie chauffé à 60 °C et laisser reposer à cette température pendant 15 minutes. Refroidir à 25 °C, diluer jusqu'au plein volume avec du CH₃OH, filtrer et entreposer le filtrat au réfrigérateur jusqu'au moment de l'analyse. Dans le cas des produits en conserve, la filtration n'est habituellement pas nécessaire et le surnageant limpide peut être décanté dans un contenant d'entreposage.
- 8.3 Afin d'éliminer les facteurs d'interférence avec l'extrait, passer 4 ou 5 mL d'eau dans la colonne de chromatographie par échange d'ions et jeter cette solution. Recueillir avec une pipette 1 mL d'extrait, le déposer sur la colonne et ajouter 4 à 5 mL d'eau. Amorcer immédiatement l'écoulement dans la colonne et recueillir l'éluat dans une fiole jaugée de 50 mL qui contient 5 mL de HCl 1N. Le débit n'est pas critique et des débits élevés peuvent être utilisés. Lorsque le niveau du liquide est à environ 2 mm au-dessus du sommet de la résine, ajouter une deuxième portion de 5 mL d'eau et ensuite, des volumes croissants d'eau, jusqu'à ce qu'un total d'environ 35 mL ait été recueilli. Arrêter l'écoulement, diluer à 50 mL avec de l'eau et mélanger. Entreposer l'éluat dans un réfrigérateur jusqu'au moment de l'analyse. De tels extraits demeurent stables pendant plusieurs semaines.
- 8.4 Réaction pour préparer le fluorophore. Les volumes peuvent être modifiés pour permettre l'utilisation de la verrerie disponible à condition que les proportions demeurent constantes et que la fluorescence produite se situe dans les limites de détection du fluorimètre.



chapter chapitre	section	page
3	1	6
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

- 8.4.1 Déposer, au moyen d'une pipette, dans un contenant en verre ou en plastique approprié, 5 mL d'éluat de la colonne et 10 mL de HCl à 0,1N. Ajouter 3 mL de NaOH à 1N, bien mélanger et laisser reposer 4 minutes. Ajouter 0,1 mL de la solution d'OPT à 1 %, bien mélanger et laisser reposer 4 minutes. Ajouter 3 mL de la solution de H₃PO₄ à 10 % et bien mélanger. Noter la fluorescence produite comparativement à celle d'un blanc développé. Un échantillon de contrôle dont la teneur en histamine est connue doit être soumis à l'essai avec chaque série d'échantillons.
- 8.4.2 Préparer les solutions d'étalon et de blanc en déposant, au moyen d'une pipette, dans des contenants en verre ou en plastique de même taille (comme ceux utilisés pour la réaction) 5 mL de HCl à 0,1N, et 5 mL des solutions étalons de travail d'histamine (0,1, 0,2 et 0,3 ug/mL). Continuer la préparation selon le protocole ci-dessus en ajoutant à chaque contenant 10 mL de HCl à 0,1N, etc. Noter la fluorescence de chaque solution en utilisant un réglage de sensibilité sur le fluorimètre donnant une lecture d'environ 80 % de l'échelle totale avec l'étalon de 0,3 ug/mL.
- 8.4.3 Deux méthodes peuvent être utilisées pour évaluer la dilution approximative nécessaire si l'on a une lecture de fluorescence à l'extérieur de l'échelle. Si le fluorimètre possède plusieurs gammes de sensibilité, la lecture de l'échantillon peut se faire sur une échelle moins sensible. Dans le cas contraire, la solution d'échantillon développée peut être diluée avec une certaine quantité de solution développée de blanc et la valeur de fluorescence du mélange est notée. Dans tous les cas, afin d'obtenir un résultat exact, l'éluat de l'échantillon doit être dilué avec du HCl à 0,1N et soumis à la réaction.

9. CALCULS

- 9.1 Préparer une courbe d'étalonnage des valeurs de fluorescence en fonction de la concentration d'histamine dans les étalons internes.
- 9.2 Comparer la fluorescence de l'échantillon avec la courbe d'étalonnage et déterminer la concentration d'histamine dans l'extrait d'échantillon. Calculer le nombre de mg d'histamine de base par 100 g d'échantillon de la façon suivante :

Si toutes les dilutions sont équivalentes à celles indiquées dans le présent protocole, 0,2 ug/mL est égal à 10 ug/mL dans l'extrait méthanolique ou à 10 mg % d'histamine dans un échantillon.



chapter chapitre	section	page
3	1	7
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

10. PRÉCISION ET EXACTITUDE (données préliminaires)

- 10.1 Tous les paramètres de la réaction donnant le fluorophore ont été soumis à une épreuve de résistance. Le seul facteur qui doit être contrôlé avec soin et demeurer constant est le contrôle de la durée de la réaction; les temps indiqués + 1/4 de minute donnent les meilleures lectures de fluorescence et la meilleure reproductibilité. Les volumes et les concentrations des solutions de NaOH, d'OPT et de H₃PO₄ peuvent varier considérablement et ces dernières, dans la proportion de $\pm 20\%$, donnent des résultats reproductibles.
- 10.2 Afin de vérifier la reproductibilité de l'élution de l'histamine dans la colonne et la durée possible de la colonne, une solution étalon d'histamine à 5 mg % et un extrait de thon présentant une concentration d'histamine moyenne de 14,4 mg % ont été passés de façon répétée à travers la même colonne fraîchement préparée au cours d'une période d'environ un mois. Dans le cas de la solution étalon d'histamine, l'écart-type était inférieur à 0,2 mg % et les résultats variaient entre 4,2 et 5,2 mg %. Dans le cas de l'extrait de thon, l'écart-type était 0,3 mg % et la gamme de variation, de 13,3 à 15,0. Il a été noté qu'au cours de cette expérience, les 6 à 8 premiers échantillons à passer à travers la nouvelle colonne ont tous donné des résultats inférieurs. Soixante-dix échantillons ont passé à travers chaque colonne, et les résultats sont demeurés uniformes.
- 10.3 Afin de vérifier le pourcentage de récupération de l'histamine ajoutée, des échantillons de thon frais et décomposé ont été enrichis par l'ajout de diverses concentrations d'histamine, bien mélangés et entreposés au réfrigérateur pendant environ une semaine avant d'être analysés. La récupération a atteint environ 95 % dans le cas du thon frais et 101 % dans celui du thon décomposé. Les résultats obtenus avec l'addition d'étalon ont été, dans le cas des échantillons non enrichis, semblables aux résultats analytiques.

11. REMARQUES

- 11.1 L'expérimentation a montré que les échantillons à forte teneur en histamine ont un effet sur les résultats des échantillons suivants. Par exemple, après le passage d'un échantillon contenant 10 mg % d'histamine à travers la colonne, l'échantillon suivant qui passe à travers la même colonne a tendance à présenter une lecture d'environ 0,3 mg % plus élevé que sa valeur réelle.



chapter chapitre	section	page
3	1	8
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

Afin de déterminer si une colonne permet d'obtenir des résultats encore acceptables, il est recommandé d'analyser avec chaque passage un échantillon dont la teneur en histamine est connue. Il est également préférable d'analyser de temps à autre un échantillon qui ne contient aucune histamine.

- 11.2 Bien que la méthode de l'AOAC n'exige pas que des solutions étalons soient passées à travers la colonne, cette opération constitue un autre moyen de vérifier l'acceptabilité de la colonne. L'opération est effectuée en remplaçant l'extrait de 1 mL indiqué à l'étape 8.3 par 1 mL de solution étalon de travail méthanolique et en soumettant la solution étalon au protocole décrit aux étapes 8.3 à 8.4.2. Les solutions étalons méthanoliques sont préparés de la façon suivante :

a) Solution étalon méthanolique d'histamine (100 ug/mL)

Diluer 10 mL de solution étalon primaire d'histamine à 100 mL avec du méthanol. Entreposer au réfrigérateur.

b) Solutions étalons de travail méthanoliques d'histamine (5, 10, 15 ug/mL)

Dans une série de fioles jaugées de 100 mL, déposer, au moyen d'une pipette, 5, 10 et 15 mL de solution étalon méthanolique d'histamine et diluer à 100 mL avec du méthanol. Ces solutions demeurent stables pendant au moins 2 semaines lorsqu'elles sont entreposées au réfrigérateur.

La fluorescence obtenue avec trois solutions étalons méthanoliques doit être la même que celle obtenue avec trois solutions étalons de travail dans HCl. Lorsque la récupération de l'histamine n'atteint pas au moins 95 %, une deuxième série de solutions étalons doit être passée à travers les colonnes. Si aucune amélioration n'est alors observée, la résine doit faire l'objet d'une nouvelle préparation et les colonnes doivent être refaites. Normalement, le pourcentage de récupération doit atteindre 97-99 %.

12. RÉFÉRENCES

- 12.1 Official methods of the Association of Analytical Chemists 13th Ed. Procedures 18.066 to 18.071.



**CHEMICAL
METHODS
MANUAL**

**MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
3	1	9
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

- 12.2 Staruszkiewicz, W.F.; Waldron, E.M.; and Bond, J.F.; "Fluorimetric Determination of Histamine in Tuna: Development of Method", J.A.O.A.C., 60(5), 1125 - 1130 (1977).
- 12.3 Staruszkiewicz, W.F.; "Fluorimetric Determination of Histamine in Tuna: Collaborative Study", J.A.O.A.C., 60(5), 1131 - 1136 (1977).



chapter chapitre	section	page
3	2	1
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

CHAPITRE 3 - INDICES DE QUALITÉ

SECTION 2: AZOTE À L'ÉTAT DE TRIMÉTHYLAMINE

1. PORTÉE ET APPLICATION

- 1.1 La quantité d'azote à l'état de triméthylamine (TMA) sert, pour certaines espèces marines, d'indicateur de la perte de fraîcheur par décomposition aérobie lente, par exemple à la température de fonte de la glace d'eau douce.

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

- 2.1 L'échantillon de tissu de poisson est extrait à l'aide d'une solution aqueuse d'acide trichloroacétique. De la formaline est ajoutée à une partie aliquote de la substance prélevée afin d'éliminer l'ammoniac présent sous forme d'hexaméthylènetétramine. On ajoute également un alcali et la TMA basique est extraite au toluène. De l'acide picrique est ajouté à la solution de toluène pour complexer la TMA et l'absorbance de la solution est mesurée au spectrophotomètre à 410 nm.
- 2.2 La décomposition du poisson entreposé sur glace est causée par l'action de bactéries et d'enzymes, et produit divers composés volatiles, en particulier la triméthylamine, la diméthylamine, l'ammoniac et des acides volatiles. L'oxyde de triméthylamine, un constituant de poissons marins, est réduit en TMA lors de la décomposition, et l'ammoniac formé est surtout un produit de dégradation des protéines.

3. INTERFÉRENCES

- 3.1 Des traces d'eau dans le toluène nuisent à la réaction TMA/acide picrique.
- 3.2 La diméthylamine, qui est surtout produite lors de l'entreposage de poisson congelé, nuit à l'essai de la TMA.

4. MÉTHODE D'ÉCHANTILLONNAGE ET ENTREPOSAGE

- 4.1 Prélever un échantillon représentatif du lot du produit et l'entreposer afin de conserver son intégrité.



chapter chapitre	section	page
3	2	2
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

5. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

- 5.1 L'état de l'échantillon doit être contrôlé afin de s'assurer que les échantillons frais ont été réfrigérés de façon appropriée et que les échantillons congelés le sont encore. Il est essentiel qu'un échantillon soit manipulé et entreposé de façon à assurer la préservation de sa qualité originale.
- 5.2 Les échantillons crus frais doivent être préparés dès leur réception. On ne doit cependant tolérer en aucun cas un délai de plus de 3 heures avant de traiter le produit réfrigéré. Sinon, il faut le congeler rapidement dès sa réception.
- 5.3 Les échantillons de grande taille ou dont la texture est trop dure pour l'homogénéisation doivent être traités dans un mélangeur ou un broyeur d'aliments un nombre de fois suffisant pour obtenir une substance uniforme.
- 5.3.1 Les échantillons crus frais doivent être analysés immédiatement après le broyage. Si ce n'est pas possible, ils doivent être congelés rapidement pour éviter que la décomposition ne s'amorce.
- 5.4 Recueillir l'échantillon homogénéisé dans une tasse de plastique ou une bouteille de verre lavées à fond et possédant un couvercle. Entreposer l'échantillon dans un réfrigérateur ou congélateur jusqu'au moment de l'utilisation. S'assurer que la substance préparée est encore homogène avant la pesée. Si du liquide se sépare de l'échantillon, mélanger de nouveau le produit avant de l'utiliser.

6. APPAREILLAGE

- 6.1 Centrifugeuse.
- 6.2 Tubes à centrifuger, 50 mL.
- 6.3 Minuterie.
- 6.4 Spectrophotomètre.

7. RÉACTIFS

- 7.1 Carbonate de magnésium ($MgCO_3$)



**CHEMICAL
METHODS
MANUAL**

**MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
3	2	3
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

- 7.2 Carbonate de potassium (K_2CO_3).
- 7.2.1 Solution de carbonate de potassium. Dissoudre 100 g de K_2CO_3 dans 100 mL d'eau distillée.
- 7.3 Sulfate de sodium (Na_2SO_4), anhydre.
- 7.4 Acide sulfurique (H_2SO_4).
- 7.4.1 Solution d'acide sulfurique (1N). Diluer à 1 L 28,35 mL de H_2SO_4 concentré avec de l'eau distillée.
- 7.5 Toluène, séché sur Na_2SO_4 anhydre.
- 7.5.1 Afin d'éliminer les interférences, agiter 500 mL de toluène avec 100 mL de H_2SO_4 1N, distiller et sécher sur Na_2SO_4 anhydre.
- 7.6 Acide trichloroacétique (TCA).
- 7.6.1 Solution de TCA (7.5 %, aqueuse).
- 7.7 Formaline ($HCHO$); on peut se procurer une solution commerciale à 40 %.
- 7.7.1 Solution de formaline (à 20 %). Agiter 1 L de formaline à 40 % avec 100 g de $MgCO_3$ jusqu'à la disparition presque complète de la coloration et filtrer. Diluer 100 mL de filtrat à 200 mL avec de l'eau distillée.
- 7.8 Acide picrique.
- 7.8.1 Solution mère d'acide picrique. Dissoudre 2 g d'acide picrique dans 100 mL de toluène exempt d'eau.
- 7.8.2 Solution de travail d'acide picrique. Diluer 1 mL de solution mère à 100 mL avec du toluène exempt d'eau.
- 7.9 Chlorhydrate de triméthylamine ($TMA.HCl$).
- 7.9.1 Solution étalon mère de TMA. Ajouter 0,682 g $TMA.HCl$ à 1 mL de HCl (1 + 3) et diluer à 100 mL avec de l'eau distillée. Le produit contient environ 1 mg de TMA-N/mL et doit être vérifié par microanalyse Kjeldahl.



chapter chapitre	section	page
3	2	4
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

7.9.2 Solution étalon de travail de TMA (0,01 mg TMA-N/mL). Ajouter 1 mL de solution étalon mère à 1 mL de HCl (1 + 3) et diluer à 100 mL avec de l'eau distillée.

8. MÉTHODE

8.1 Peser avec précision 100 g d'échantillon, placer dans un mélangeur, ajouter 200 mL de TCA à 7,5 % et homogénéiser pendant 2 minutes. Centrifuger une partie aliquote de cet extrait à 2 000 - 3 000 tr/min jusqu'à ce que le surnageant soit presque limpide.

8.2 Prélever au moyen d'une pipette une partie aliquote de l'extrait de TCA contenant 0,01 - 0,03 mg de TMA-N et verser dans une éprouvette en pyrex de 20 x 150 mm à bouchon vissant. Diluer à 4,0 mL avec de l'eau distillée.

8.3 Préparer un blanc de réactif et des solutions d'étalonnage en prélevant au moyen d'une pipette 0, 1,0, 2,0 et 3,0 mL de solution étalon mère de TMA, qui sont déposés dans des éprouvettes à bouchon vissant, et diluer à 4,0 mL avec de l'eau distillée.

8.4 À l'échantillon, au blanc et aux étalons, ajouter tour à tour 1 mL de solution de formaline à 20 %, 10 mL de toluène et 3 mL de solution de K_2CO_3 . Boucher les éprouvettes et les placer dans un agitateur rotatif à tubes pendant 12 minutes ou agiter manuellement avec vigueur environ 40 fois.

8.5 Transférer 7-9 mL de la couche de toluène dans un petit tube de séchage contenant environ 0,1 g de Na_2SO_4 anhydre. Éviter de transférer des gouttelettes de la phase aqueuse. Boucher le tube et bien agiter pour sécher l'extrait toluénique.

8.6 Prélever au moyen d'une pipette 5 mL d'extrait toluénique (dans le tube de séchage), le verser dans une cuvette sèche, ajouter 5 mL de solution d'acide picrique et agiter en tournoyant doucement.

8.7 Installer le spectrophotomètre de la manière indiquée par le fabricant et mesurer l'absorbance de l'échantillon et des étalons comparativement au blanc de réactif à 410 nm. (Le complexe TMA/acide picrique est stable.)



chapter chapitre	section	page
3	2	5
status état		date
new/nouveau		31/01/1986

9. CALCULS

- 9.1 Calculer le nombre de mg de TMA-N/100 g d'échantillon (obtenu à partir d'une partie aliquote de 1 mL utilisée à l'étape 8.2) de la façon suivante :

$$\text{mg de TMA-N/100 g} = \frac{A}{A'} \times C' \times V' \times 300$$

où A = absorbance de la solution d'échantillon

A' = absorbance de la solution étalon la plus voisine de celle de l'échantillon

C' = concentration de la solution étalon ci-dessus (en mg de TMA-N/mL)

V' = volume (mL) de la solution étalon ci-dessus

10. PRÉCISION ET EXACTITUDE

- 10.1 Les analyses en double donnent des résultats qui concordent généralement à moins de 5 %.

11. REMARQUES

- 11.1 Ne pas utiliser de la graisse à robinet. Un mélange de sucre et de glycérol peut être employé au besoin.
- 11.2 Ne pas laver les tubes avec du savon ou du détergent. Rincer avec de l'eau distillée et nettoyer occasionnellement avec du HNO₃ concentré.
- 11.3 Les teneurs en azote à l'état de triméthylamine obtenues pour les trois catégories d'aiglefin, de morue et de plie canadienne sont les suivantes :

	<u>Catégorie 1</u> mg %	<u>Catégorie 2</u> mg %	<u>Catégorie 3</u> mg %
Aiglefin et morue	0,00 à 1,19	1,20 à 5,29	plus de 5,29
Plie canadienne	0,00 à 1,09	1,10 à 4,59	plus de 4,59

Catégorie 1 = Premier choix

Catégorie 2 = Deuxième choix

Catégorie 3 = Rejet



chapter chapitre	section	page
3	2	6
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

12. RÉFÉRENCES

- 12.1 Dyer, W.J.; "Report on Trimethylamine in Fish", J.A.O.A.C., 42, 292-294 (1959).
- 12.2 Hillig, F.; Shelton, L.R., Jr.; Loughrey, J.H.; and Eisner, J.; "Chemical Indices of Decomposition in Cod," J.A.O.A.C., 41, 763-776 (1958).
- 12.3 Hillig, F., Shelton, L.R., Jr.; and Loughrey, J.H.; "Chemical Indices of Decomposition in Haddock," J.A.O.A.C., 42, 702-708 (1959).
- 12.4 Bethea, S.; and Hillig, F.; "Determination of Trimethylamine Nitrogen in Extracts and in Volatile Fractions of Fish," J.A.O.A.C., 48, 731-735 (1965).
- 12.5 Boland, F.E.; and Paige, D.D.; "Collaborative Study of a Method for the Determination of Trimethylamine Nitrogen in Fish", J.A.O.A.C., 54(3), 725-727 (1971).
- 12.6 Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 12th Edition (1975), procedure 18.027.



chapter chapitre	section	page
3	3	1
status état	date	
new/nouveau	30/06/1989	

**CHAPITRE 3 - INDICES DE QUALITÉ
SECTION 3: PUTRESCINE ET CADAVÉRINE**

1. ÉTENDUE ET APPLICATION

- 1.1 La décomposition bactérienne des tissus de poisson produit deux diamines, la putrescine et la cadavérine, par décarboxylation respective de deux acides aminés, l'ornithine et la lysine. Le dosage de ces diamines peut fournir un indice de la décomposition des poissons et des coquillages.

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

- 2.1 La putrescine et la cadavérine sont extraites au méthanol. Un étalon interne au diamino-1,6 hexane est ajouté et l'on prépare un résidu sec composé de leurs chlorhydrates. Les dérivés des sels sont obtenus à l'anhydride pentafluoropropionique et isolés du réactif en excès par passage sur colonne d'alumine. Ils sont ensuite injectés dans un chromatographe en phase gazeuse muni d'un détecteur à capture d'électrons afin de doser la putrescine et la cadavérine.

3. PERTURBATIONS

- 3.1 Il est possible que des pics étrangers apparaissent et nuisent à l'intégration.

4. MÉTHODE D'ÉCHANTILLONNAGE ET ENTREPOSAGE

- 4.1 Prélever un échantillon représentatif du lot reçu et le stocker de façon qu'il ne s'altère pas.

5. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

- 5.1 Au moment de la réception de l'échantillon au laboratoire, vérifier les renseignements fournis avec l'échantillon et les inscrire dans le registre de laboratoire. Vérifier si les échantillons frais ont été réfrigérés adéquatement et si les échantillons congelés le sont demeurés. Il est essentiel que la manutention et le stockage d'un échantillon assurent qu'il conserve sa qualité originale.



chapter chapitre	section	page
3	3	2
status état		date
new/nouveau		30/06/1989

- 5.2 Préparer les échantillons frais non cuits dès leur réception, sans les laisser au réfrigérateur plus de trois heures à moins de les surgeler immédiatement. Stocker d'autres échantillons de façon qu'ils ne s'altèrent pas, tout en tenant compte du type de produit et de la façon de le stocker dans le commerce.
- 5.3 La préparation de l'échantillon doit tenir compte du type de produit ainsi que de la façon dont il est utilisé et préparé par le consommateur. Les échantillons trop difficiles à homogénéiser parce qu'ils sont trop gros ou trop durs doivent être passés au robot culinaire ou au broyeur d'aliments jusqu'à ce qu'ils deviennent homogènes.
- 5.3.1 Les échantillons frais non cuits doivent être analysés immédiatement après leur broyage. Si cela est impossible, il faut alors les surgeler pour en stopper la décomposition.
- 5.3.2 Dans le cas de produits conservés dans un milieu qui peut être ou qui est normalement utilisé par le consommateur (p. ex., poisson en boîte dans son jus ou son huile), transvaser tout le contenu de l'emballage dans un homogénéisateur et mélanger pendant une minute ou jusqu'à ce que le mélange soit homogène.
- 5.3.3 Dans le cas de produits conservés dans l'eau, la saumure ou un milieu semblable normalement jeté par les consommateurs, ouvrir l'emballage, disposer le produit sur un tamis de la bonne dimension et le laisser s'égoutter pendant 1 à 1½ minute. Broyer la portion demeurant dans le tamis jusqu'à ce que le mélange soit homogène.
- 5.3.4 Dans le cas des aliments préparés ne contenant aucun liquide séparable, décongeler (au besoin) et passer l'échantillon au broyeur d'aliments aussi souvent qu'il le faut pour obtenir un mélange uniforme. Lorsque le produit est constitué de plusieurs aliments, comme c'est le cas des mets de poisson préparés, seul le poisson est analysé.
- 5.4 Recueillir l'échantillon homogénéisé dans un bocal de plastique ou une bouteille de verre lavée à fond et fermant hermétiquement. Conserver l'échantillon au réfrigérateur ou au congélateur jusqu'à utilisation. S'assurer que l'échantillon est demeuré homogène avant sa pesée, si le liquide s'est séparé du reste, homogénéiser complètement avant analyse.



chapter chapitre	section	page
3	3	3
status état	date	
new/nouveau	30/06/1989	

6. APPAREILLAGE

- 6.1 Fioles jaugées de 100 mL (il est plus facile de se servir de fioles de Bates que de fioles normales).
- 6.2 Colonnes chromatographiques en verre de 150 x 9 mm (diam. int.) avec réservoir.
- 6.3 Ballons à fond rond de 100 mL et bouchons (des ballons de 250 mL peuvent être utilisés) ou ballons à fond plat de 100 ou 125 mL à bouchons vissés de 24/40.
- 6.4 Tubes à essai de 150 x 25 mm avec couvercle vissable ou bouteilles de 60 mL avec couvercle vissable, (ou l'équivalent).
- 6.5 Chromatographe en phase gazeuse muni d'un détecteur à capture d'électron.
- 6.6 Colonne de chromatographie en phase gazeuse : colonne de verre de 1,8 m x 4 mm garnie d'OV-225 à 3 % sur Supelcoport de maille 100-120 ou l'équivalent.
- 6.7 Mélangeur Polytron.
- 6.8 Bêchers de 200 mL de type étroit; ou un type erlenmeyer de 125 mL.
- 6.9 Papiers filtres, ordinaires à filtration rapide.

7. RÉACTIFS

- 7.1 Méthanol (CH₃OH) de qualité ACS.
- 7.2 Acide chlorhydrique (HCl).
 - 7.2.1 Acide chlorhydrique 1,0 N : avec de l'eau distillée, diluer 82,4 mL de HCl à 1 L.
 - 7.2.2 Acide chlorhydrique 0,1 N : avec de l'eau distillée, diluer 8,24 mL de HCl à 1 L.
- 7.3 Diamino-1,6 hexane.



chapter chapitre	section	page
3	3	4
status état	date	
new/nouveau	30/06/1989	

- 7.3.1 Solution mère (1mg/mL) de diamino-1,6 hexane : dans une fiole jaugée de 100 mL dissoudre 100 mg de diamino-1,6 hexane dans du HCl 0,1 N et remplir au trait.
- 7.3.2 Solution diluée (10 ug/mL) de diamino-1,6 hexane : dans une fiole jaugée de 100 mL, diluer 1 mL de la solution mère avec du HCl 0,1 N. Cette solution sert d'étalon interne.
- 7.4 Putrescine (diamino-1,4 butane).
- 7.5 Cadavérine (diamino-1,5 pentane).
- 7.6 Solution mère standard de diamines (1 mg/mL de cadavérine et de putrescine) : dans une fiole jaugée de 100 mL, dissoudre 100 mg de putrescine et 100 mg de cadavérine dans du HCl 0,1 N et remplir au trait.
- 7.6.1 Solution diluée standard A de diamines (10 ug/mL) : dans une fiole jaugée de 100 mL, diluer 1 mL de la solution mère avec du HCl 0,1 N et remplir au trait.
- 7.6.2 Solution diluée standard B de diamines (1 ug/mL) : dans une fiole jaugée de 100 mL, diluer 10 mL de la solution de travail A avec du HCl 0,1 N et remplir jusqu'au trait.
- 7.7 Anhydride pentafluoropropionique (PFPA).
- 7.8 Acétate d'éthyle (distillé dans le verre).
- 7.9 Hexane (distillé dans le verre).
- 7.10 Toluène (distillé dans le verre).
- 7.11 Alumine (activée neutre de maille 150).
- 7.11.1 Alumine (3 % d'humidité)
Chauffer l'alumine à l'étuve pendant 2 heures à 125° C. Refroidir dans un dessiccateur. Ajouter 3,0 mL d'eau distillée à 97,0 d'alumine; boucher et agiter jusqu'à disparition des masses; laisser reposer pendant 5 heures.



chapter chapitre	section	page
3	3	5
status état	date	
new/nouveau	30/06/1989	

7.12 Sulfate de sodium anhydre en grain.

8. MÉTHODE

- 8.1 Dans un bécher de 200 mL de type étroit ou un erlenmeyer de 125 mL, peser avec précision 10,0 g d'échantillon. Ajouter environ 60 mL d'éthanol et mélanger au Polytron jusqu'à obtention d'un mélange homogène (environ 1 minute). Transvaser, en rinçant au méthanol, dans une fiole jaugée de 100 mL. Remplir au trait avec du méthanol et bien mélanger.
- 8.2 Laisser l'échantillon reposer jusqu'à obtention d'une solution limpide ou filtrer ou centrifuger pour obtenir une solution limpide. Entreposer l'extrait au réfrigérateur jusqu'à son analyse.
- 8.3 **Étalons:**
Dans des ballons à fond rond ou plat de 100 mL, pipetter les quantités suivantes des solutions diluées de diamines:

Solutions diluées	Volume (mL)	Équivalents de diamines dans l'échantillon (ug/g)
B	1	1
B	5	5
A	1	10
A	2	20

Si un intégrateur ne permettant d'utiliser qu'un seul étalon est utilisé, choisir l'étalon à 1 ug/g.

Échantillons:

Pipetter 10 mL d'extrait limpide dans des ballons de 100 mL à fond rond ou plat.

- 8.4 Pipetter 1 mL de la solution diluée de diamino-1,6 hexane (étalon interne) et 0,5 mL de HCl 1 N dans un ballon à fond rond ou plat contenant l'échantillon ou l'extrait d'échantillon. Évaporer jusqu'à siccité sur évaporateur rotatif, à 50° C.



chapter chapitre	section	page
3	3	6
status état	date	
new/nouveau	30/06/1989	

La présence d'eau dans l'échantillon empêchera la formation des dérivés. La dessiccation de l'échantillon doit être complète avant d'amorcer l'étape 8.5.

- 8.5 Pour faire réagir le résidu, ajouter 1 mL d'acétate d'éthyle et 500 uL d'anhydride pentafluoropropionique; boucher, mélanger et chauffer au bain-marie à 50 °C pendant 30 minutes. Agiter la solution par roation au moins une fois pendant la réaction. Veiller à ce que le bouchon ne ferme pas hermétiquement au moment où le ballon est placé au bain-marie et à quelques reprises par la suite.

Si la solution n'est pas limpide après 15 minutes, ajouter un autre 300 uL de réactif. L'impossibilité d'obtenir une solution limpide (généralement jaune) signifie que la réaction ne s'est pas déroulée adéquatement. (Une solution laiteuse ou trouble indique l'absence de réaction).

- 8.6 Après la réaction, évaporer le solvant et le surplus de réactif sous un courant d'azote, à 50 °C. Dissoudre le résidu dans 2 mL d'un mélange à 30 % d'acétate d'éthyle dans du toluène. (Au besoin, on peut laisser reposer jusqu'au lendemain à 4 °C.
- 8.7 Préparation d'une colonne de chromatographie sur alumine: disposer à la base de la colonne un bouchon de laine de verre et la remplir d'alumine sur une hauteur de 8 cm. Recouvrir l'alumine d'une couche (1 cm) de sulfate de sodium anhydre.
- 8.8 Verser 10 mL d'hexane sur la colonne d'alumine. Recueillir l'effluent dans un tube à essai ou une bouteille à bouchon vissant. Ajouter l'extrait lorsque le niveau de l'hexane atteint la surface de la colonne. Rincer le ballon avec 3 mL d'une solution à 30 % d'acétate d'éthyle dans du toluène et verser le tout sur la colonne en procédant comme ci-dessus. Répéter l'opération avec 18 mL de la solution à 30 % d'acétate d'éthyle dans du toluène. Recueillir tout l'effluent, placer le bouchon et mélanger. L'effluent est passablement stable à la température ambiante et peut être ainsi conservé pendant plusieurs jours.



chapter chapitre	section	page
3	3	7
status état		date
new/nouveau		30/06/1989

8.9 Paramètres de fonctionnement du chromatographe en phase gazeuse:

Four	180 °C
Injecteur	200 °C
Détecteur	320 °C
Débit d'azote	60 mL/min

8.10 Injecter 1 ou 2 µL de l'effluent dans le chromatographe. Les temps de rétention approximatifs sont, respectivement, de 6,4 min pour la putrescine, 8,6 min pour la cadavérine et 10,6 min pour le diamino-1,6 hexane.

9. CALCULS

9.1 En l'absence d'un dispositif d'intégration des données, calculer le rapport entre la hauteur du pic étalon (putrescine ou cadavérine) et celui du diamino-1,6 hexane. Tracer une courbe d'étalonnage à partir des rapports observés. (La courbe devrait être linéaire de 1 µg/g à 20 µg/g). Calculer ensuite les concentrations de putrescine et de cadavérine.

Exemple:

$$C_{pi} = C_{pe} \times \frac{D_{eie}}{D_{pe}} \times \frac{D_{pi}}{D_{eii}}$$

pi = putrescine de l'inconnu

pe = putrescine de l'étalon

eie = étalon interne de l'étalon

eii = étalon interne de l'inconnu

10. PRÉCISION ET JUSTESSE

10.1 Des données préliminaires (vérification, par le MPO, des échantillons) indiquent que la reproductibilité est de $\pm 0,1$ µg/g à une teneur de 1,0 µg/g et de $\pm 0,3$ µg/g à une teneur de 10,0 µg/g.



chapter chapitre	section	page
3	3	8
status état	date	
new/nouveau	30/06/1989	

11. REMARQUES

- 11.1 Les données expérimentales montrent que les taux de récupération sont d'au moins 95 % pour la cadavérine et de 80-90 % pour la putrescine.
- 11.2 Dans le cas de certains produits (le plus souvent des échantillons non cuits qui se sont gâtés), il peut parfois apparaître des pics étrangers qui nuisent à l'intégration des pics de la putrescine et de la cadavérine.
- 11.3 Il peut arriver que l'effluent obtenu de la colonne soit de teinte jaune. De façon générale, l'échantillon peut être utilisé, mais ces produits peuvent fausser le dosage de la putrescine et de la cadavérine; il faut alors procéder à une nouvelle extraction.

12. RÉFÉRENCES

- 12.1 Staruszkiewicz, W.F. et Bond, J.F., Gas chromatographic determination of cadaverine, putrescine and histamine in foods. J.A.O.A.C., 64(3), 584-591 (1981).
- 12.2 Farn, G. et Sims, G., Chemical Indices of Decomposition in Tuna, Proceedings of an International Symposium on Seafood Quality Determination. Elsevier Science Publishers, B.V. Amsterdam. 175-183 (1986).



chapter chapitre	section	page
4	1	1
status état	date	
new/nouveau	16/05/1989	

**CHAPITRE 4 - ADDITIFS ALIMENTAIRES
SECTION 1: SULFITE**

1. PORTÉE ET APPLICATION

1.1 Cette méthode peut servir à l'analyse des coquillages frais et congelés et du poisson ne présentant pas des concentrations élevées de composés qui peuvent causer des interférences.

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

2.1 Du dioxyde de soufre est libéré lorsqu'on acidifie l'échantillon avec HCl et qu'on le fait bouillir sous reflux dans une atmosphère d'azote (N₂). Le SO₂ est libéré à la vapeur et absorbé dans une solution de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 3 %, qui oxyde le SO₂ en H₂SO₄, lequel est titré par une solution étalon de NaOH.

2.2 La présence de SO₂ est confirmée par analyse gravimétrique de la solution finale obtenue à l'étape 2.1. Le sulfate est précipité par une solution de BaCl₂. Le précipité de BaSO₄ est recueilli par filtration et pesé, et la quantité de SO₂ présente est calculée.

3. INTERFÉRENCES

3.1 À l'étape 2.1, d'autres acides libres et des acides qui sont libérés par HCl peuvent être distillés et titrés en tant que SO₂. Les solutions de peroxyde d'hydrogène peuvent également contenir des traces de H₂SO₄ et, en conséquence, il est nécessaire de doser des blancs.

3.2 La méthode gravimétrique est précise, mais très vulnérable aux erreurs de manipulation. Il faut s'assurer que chaque creuset Gooch est séché et préparé de façon appropriée, et que le précipité est lavé et séché complètement.

4. MÉTHODE D'ÉCHANTILLONNAGE ET ENTREPOSAGE

4.1 Prélever un échantillon représentatif du lot du produit et l'entreposer afin de maintenir son intégrité.

4.2 Les échantillons doivent être congelés dans des contenants hermétiques avant leur préparation et leur analyse.



chapter chapitre	section	page
4	1	2
status état	date	
modif. #1	30/06/1989	

5. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

5.1 Il faut tenir compte du type de produit et de la façon dont il est utilisé et préparé par le consommateur.

5.1.1 Dans le cas des produits conservés dans l'eau, la saumure ou un milieu semblable qui est habituellement jeté par le consommateur, ouvrir le paquet et égoutter le produit sur un tamis de taille appropriée de 1 à 1½ minute. Pulvériser la partie de l'échantillon retenue sur le tamis jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène. Si la texture de l'échantillon est trop dure pour que ce dernier puisse être homogénéisé, le passer dans un broyeur un nombre de fois suffisant pour obtenir un mélange uniforme. L'emploi d'un hachoir d'aliments peut être suffisant si l'échantillon est de grande taille.

5.1.2 Dans le cas des produits qui ne contiennent pas de liquide libre, décongeler dans le paquet (si le produit est congelé) et passer l'échantillon dans un broyeur un nombre de fois suffisant pour obtenir un mélange uniforme.

5.1.3 Pour la chair congelée givrée: dégivrez et rejetez l'eau de fonte puis préparer l'échantillon de la façon décrite en 5.1.2.

5.1.4 Pour les produits congelés avec coquille ou carapace: enlevez la tête, la coquille ou la carapace etc., puis préparez l'échantillon de la façon décrite en 5.1.2.

5.1.5 Pour les produits séchés: reconstituez le produit dans l'eau puis préparez l'échantillon de la façon décrite en 5.1.2.

5.2 Recueillir l'échantillon homogénéisé dans une tasse de plastique ou une bouteille de verre lavées à fond et possédant un couvercle.

5.3 Entreposer l'échantillon dans un réfrigérateur ou congélateur jusqu'au moment de l'utilisation. S'assurer que la substance préparée est encore homogène avant la pesée. Si du liquide se sépare de l'échantillon, mélanger de nouveau le produit avant de l'utiliser.

6. APPAREILLAGE

6.1 Appareil Monier-Williams modifié (voir figure 1).

6.2 Manchon chauffant (pour fiole de 1L) avec rhéostat.

6.3 Bouteille d'azote (type L) avec régulateur d'azote à détendeur.



chapter chapitre	section	page
4	1	3
status état	date	
new/nouveau	16/05/1989	

7. RÉACTIFS

7.1 Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ à 30 %).

7.1.1 Solution de peroxyde d'hydrogène (3 %). Diluer H₂O₂ à 30 % de 1 à 10, et vérifier l'absence d'impuretés de sulfate.

7.2 Pyrogallol.

7.3 Hydroxyde de potassium (KOH).

7.4 Acide chlorhydrique (HCl).

7.4.1 Solution de HCl (1 + 2).

7.4.2 Solution de HCl (6N). Diluer 534 mL de HCl concentré à 1 L avec de l'eau distillée.

7.5 Solution étalon d'hydroxyde de sodium (0,1000N). On peut utiliser une solution commerciale ou en préparer une selon le protocole 50.034 et l'étalonner selon le protocole 50.035 de l'Official Methods of Analysis, 12^e édition (1975), de l'A.O.A.C.

7.6 Chlorure de baryum (BaCl₂).

7.6.1 Solution de chlorure de baryum (10 %). Filtrer avant l'utilisation.

7.7 Indicateur neutre de rouge de méthyle (0,25 % dans l'alcool).

7.8 Alcool éthylique (95 %).

7.9 Diéthyléther.

8. MÉTHODE

8.1 Solution de purification pour l'azote (pour enlever les traces d'oxygène). Broyer 4,5 g de pyrogallol dans 5 mL d'eau et placer la bouillie dans le barboteur à gaz de l'appareil Monier-Williams. Répéter le broyage et transférer le produit avec deux portions additionnelles de 5 mL d'eau. Relier une bouteille d'azote équipée d'un régulateur à détenteur au tube d'entrée du gaz et chasser l'air contenu dans le barboteur. Verser dans le barboteur, au moyen d'un entonnoir à longue tige, une solution de 65 g de KOH dissous dans environ 85 mL d'eau. Fermer le robinet de l'azote et relier le barboteur au ballon à distiller au moyen d'un court tube en caoutchouc de silicone, lavé à



chapter chapitre	section	page
4	1	4
status état	date	
new/nouveau	16/05/1989	

l'acide. Fermer avec des pinces les deux extrémités du barboteur. La solution de lavage doit être préparée le jour même de l'utilisation. Comme solution de rechange, on peut employer l'azote de catégorie L sans purification additionnelle.

8.2 Monter le reste de l'appareil Monier-Williams (en utilisant comme raccords des bouts de tubes en caoutchouc de silicone lavés à l'acide au besoin) et placer le manchon chauffant sous le ballon à distiller. Ajouter, à la sortie de chaque tube en U, deux tiges de verre pleines de 25 mm de diamètre et d'environ 2 cm de long, 10 mL de billes de verre de 3 mm, et 10 mL d'une solution de H₂O₂ à 3 % contenant une goutte d'indicateur rouge de méthyle. Le fond du tube en U doit être complètement rempli de billes de verre et de liquide. Fixer une longueur du tube en caoutchouc à l'éprouvette à décantation, ouvrir le robinet de l'éprouvette, souffler légèrement dans le tube, fermer le robinet et s'assurer de l'absence de fuites de gaz, qui sont décelées par un changement du niveau du liquide dans les tubes en U après quelques minutes.

8.3 Retirer l'éprouvette à décantation du ballon à distiller et placer dans le ballon un échantillon pesé avec précision, par ex. 50 g ou une quantité qui contient plus de 45 mg de SO₂, en utilisant de l'eau au besoin pour le transfert. Diluer l'échantillon à environ 400 mL avec de l'eau. Replacer l'entonnoir à décantation, fermer le robinet et verser 90 mL de HCl (1 + 2) dans l'entonnoir. Forcer le HCl à pénétrer dans le ballon à distiller par une légère pression douce. Amorcer un léger écoulement de N₂ et chauffer doucement le ballon de façon à ce que la solution commence à refluer après une période de 20 à 25 minutes. Appliquer la pleine tension au manchon chauffant et laisser refluer la solution pendant 1½ heure. Fermer le robinet du condensateur et continuer à chauffer jusqu'à ce que le premier joint du premier tube en U montre des signes de condensation et dégage de la chaleur. Retirer l'entonnoir et arrêter le chauffage ainsi que l'écoulement de N₂. Lorsque le sommet du condensateur est refroidi, enlever le montage qui y est relié et en rincer le contenu dans le second tube en U. Tourner le coude supérieur jusqu'à ce qu'il puisse faire un tour complet par rapport au premier tube en U. Ajouter une goutte d'indicateur rouge de méthyle au premier tube en U et titrer la solution avec du NaOH 0,1N, en balançant légèrement le tube en U pour mélanger la solution. Conserver la solution titrée pour l'analyse de confirmation.

Titrer le second tube en U de la même manière et transférer le liquide des deux tubes en U dans un bécher de 400 mL. Éviter, dans la mesure du possible, de diluer le volume contenu dans le bécher à plus de 250 mL. Il peut être utile de se servir d'un petit tamis de plastique pour recueillir et laver les billes et les tiges de verre.



chapter chapitre	section	page
4	1	5
status état	date	
new/nouveau	16/05/1989	

8.4 Confirmation gravimétrique. Ajouter 5 mL de HCl 6N (pour une solution de 250 mL) à la solution dans le bécher et chauffer jusqu'à ébullition. Ajouter lentement une solution filtrée de BaCl₂ à 10 % (en agitant) jusqu'à ce que la précipitation soit complète, et ajouter 2 mL en excès. Ajouter au moins 10 mL de solution de BaCl₂ lorsque la quantité de précipité est faible. Couvrir le bécher et faire digérer la solution à 80-90 °C pendant au moins deux heures ou, de préférence, pendant une nuit entière. Décanter la solution et le précipité dans un creuset filtrant de Gooch, préparé, séché et pesé. Laver à fond le bécher et le précipité avec de l'eau chaude (5 à 8 lavages), de façon à transférer tout le précipité sur le creuset. Vérifier l'absence de chlorure dans le dernier lavage en ajoutant quelques gouttes de solution de AgNO₃. Si un précipité se forme, continuer à laver jusqu'à ce que la solution de lavage soit libre de chlorure. Laver le précipité avec 20 mL d'alcool éthylique, puis avec 20 mL de diéthyléther. Sécher le creuset jusqu'à poids constant à 105-110 °C, et noter le poids. Doser des blancs des réactifs par la méthode gravimétrique et le protocole de titrage.

8.4.1 En l'absence de creusets filtrants de Gooch, utiliser des papiers filtres sans cendre et des creusets ordinaires en porcelaine. Calciner préalablement les creusets à 800 °C, refroidir et peser avant l'usage. Recueillir le précipité par filtration à travers le papier filtre sans cendre. Placer le papier filtre et le précipité dans le creuset et calciner le papier filtre à environ 800 °C. Garder le creuset recouvert pour éviter que le papier ne s'enflamme subitement.

9. CALCULS

9.1 Protocole de titrage. Calculer le volume de solution étalon de NaOH requis en additionnant les volumes nécessaires pour titrer chaque tube en U et soustraire le titre du blanc de réactif. Calculer la quantité de SO₂ présente de la façon suivante :

$$\text{ppm de SO}_2 = \frac{\text{vol. (mL) de NaOH 0,1N} \times 10^3 \times 3,203}{\text{poids (g) de l'échantillon}}$$

9.2 Méthode gravimétrique. Corriger le poids du précipité de l'échantillon en soustrayant le poids du blanc de réactif. Calculer la quantité de SO₂ présente de la façon suivante :

$$\text{ppm de SO}_2 = \frac{\text{poids (mg) BaSO}_4 \times 274,46}{\text{poids (g) de l'échantillon}}$$



chapter chapitre	section	page
4	1	6
status état	date	
new/nouveau	16/05/1989	

10. PRÉCISION ET EXACTITUDE

10.1 Protocole de titrage. Les quantités de sulfite inférieures à 5 ppm sont considérées nulles (en raison d'interférences possibles) et des essais de confirmation ne sont pas nécessaires. Les quantités de 10 ppm et plus indiquent la présence de SO₂ et doivent être confirmées.

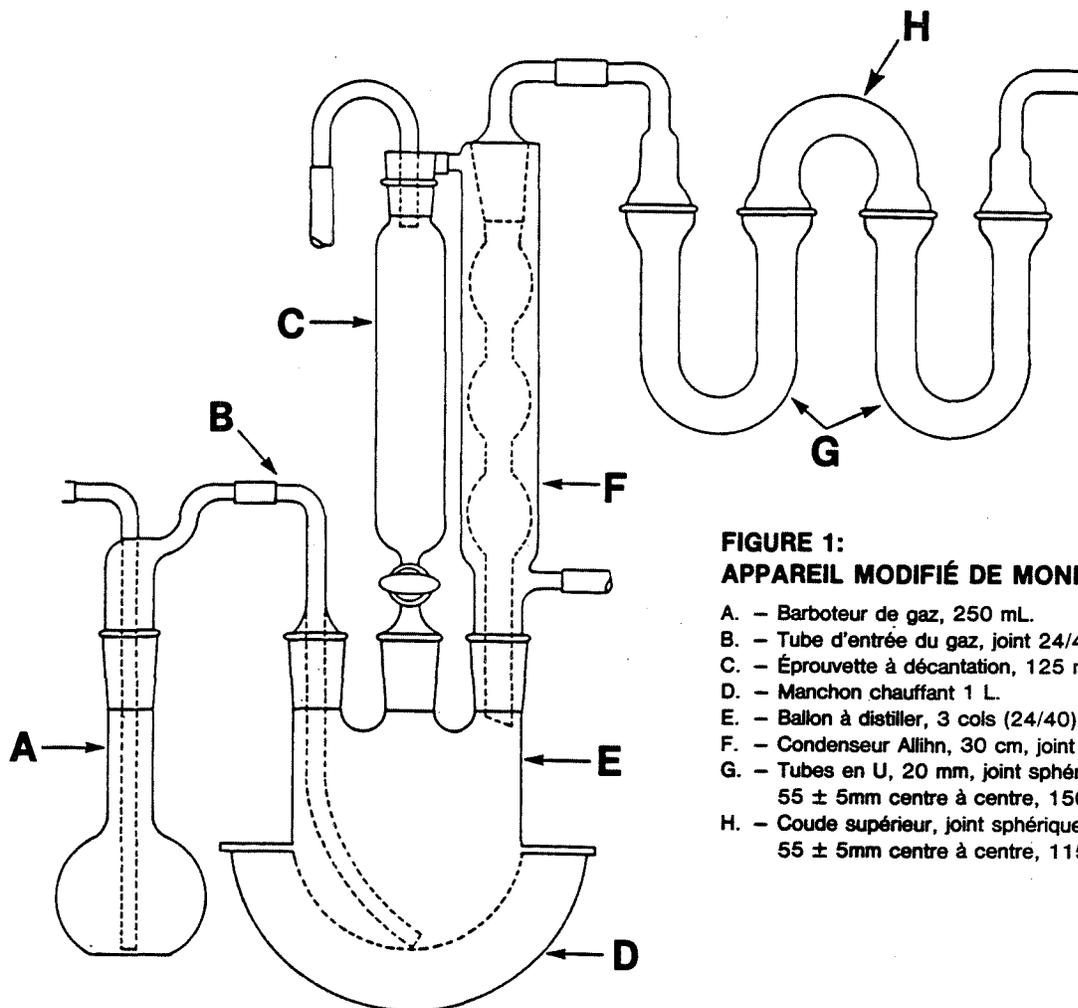
10.2 Méthode gravimétrique. Une précision de ± 1 ppm est possible lorsqu'un échantillon de 50 g est utilisé. Cependant, lorsqu'on analyse des produits halieutiques afin de déceler la présence possible de sulfite utilisé comme agent de préservation, il faut tenir compte du fait que les thio-protéines peuvent se dégrader en substances qui produisent du SO₂ en présence de HCl. En conséquence, si des concentrations de SO₂ de 10 à 20 ppm sont observées, ces résultats ne constituent qu'une preuve présumptive de l'ajout de sulfite au produit.

11. RÉFÉRENCES

11.1 Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 12th Ed. (1975), procedures 20.101 - 20.103.



chapter chapitre	section	page
4	1	7
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	



**FIGURE 1:
APPAREIL MODIFIÉ DE MONIER-WILLIAMS**

- A. - Barboteur de gaz, 250 mL.
- B. - Tube d'entrée du gaz, joint 24/40.
- C. - Éprouvette à décantation, 125 mL joint 24/40.
- D. - Manchon chauffant 1 L.
- E. - Ballon à distiller, 3 cols (24/40), 1 L.
- F. - Condenseur Allihn, 30 cm, joint 24/40.
- G. - Tubes en U, 20 mm, joint sphérique 35/20.
55 ± 5mm centre à centre, 150 ± 5 mm de long.
- H. - Coude supérieur, joint sphérique 35/20,
55 ± 5mm centre à centre, 115 ± mm de long.



chapter chapitre	section	page
4	2	1
status état	date	
new/nouveau	30/06/1989	

**CHAPITRE 4 - ADDITIFS ALIMENTAIRES
SECTION 2: PHOSPHORE TOTAL**

1. PORTÉE ET APPLICATION

1.1 La présente méthode vise les produits alimentaires en général et peut être appliquée à la détermination des teneurs du phosphate ajouté aux produits du poisson, des mollusques et des crustacés traités:

- a) par des solutions de polyphosphate avant la congélation dans le but d'éviter que le givrage des produits surgelés ne s'écoule par décongélation ou ne se fissure;
- b) par de l'acide phosphorique pour ajuster le pH des protéines du poisson; et
- c) par des polyphosphates servant d'agents séquestrants dans les produits en conserve.

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

2.1 Les échantillons sont séchés et ensuite minéralisés dans un four à moufle. Les cendres sont dissoutes dans de l'acide chlorhydrique et le volume est ajusté.

2.2 Un volume connu de la solution est prélevé. On ajoute du molybdovanadate d'ammonium afin d'obtenir la formation d'un complexe de phosphore jaune et stable dont la teneur est déterminée par colorimétrie à 400 nm.

3. INTERFÉRENCES

3.1 Une hydrolyse incomplète de l'échantillon donne lieu à une apparition lente et non contrôlée de la coloration.

4. MÉTHODE D'ÉCHANTILLONNAGE ET ENTREPOSAGE

4.1 Prélever un échantillon représentatif du lot de produits et le conserver de façon à en maintenir l'intégrité.



chapter chapitre	section	page
4	2	2
status état	date	
new/nouveau	30/06/1989	

5. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

5.1 La préparation de l'échantillon doit tenir compte du type de produits ainsi que de la façon dont ces derniers sont préparés et utilisés par les consommateurs.

5.1.1 Dans le cas du poisson congelé, broyer l'échantillon et les produits de décongélation jusqu'à obtention d'un mélange homogène.

5.1.2 Dans le cas de produits non cuits, frais ou décongelés, passer au broyeur un nombre suffisant de fois pour obtenir un mélange homogène.

5.1.3 Dans le cas des produits emballés dans l'eau, la saumure ou un milieu semblable qui est normalement jeté par le consommateur, ouvrir l'emballage et égoutter le produit sur un tamis de mailles appropriées de 1 à 1½ minute. Broyer la partie de l'échantillon retenue sur le tamis jusqu'à obtention d'un mélange homogène.

5.2 Placer l'échantillon homogénéisé dans un récipient de plastique ou une bouteille de verre nettoyé à fond et pouvant être scellé. Entreposer l'échantillon au réfrigérateur ou au congélateur jusqu'à utilisation. Veiller à ce que l'échantillon soit toujours homogène au moment de sa pesée. S'il y a un surnageant, homogénéiser de nouveau avant d'utiliser.

6. APPAREILLAGE

6.1 Spectrophotomètre et cuves appariées prévus pour la détermination de l'absorbance des solutions à 400 nm.

6.2 Four à moufle.

6.3 Homogénéiseur de tissus, mélangeur ou broyeur d'aliments.

7. RÉACTIFS

7.1 Acide chlorhydrique (HCl).

7.1.1 Solution d'acide chlorhydrique (1 + 3).

7.2 Acide nitrique (HNO₃).



chapter chapitre	section	page
4	2	3
status état	date	
new/nouveau	30/06/1989	

- 7.3 Molybdate d'ammonium tétrahydraté ((NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O).
- 7.3.1 Solution de molybdate. Dissoudre 40 g de molybdate d'ammonium dans 400 mL d'eau distillée chaude. Refroidir.
- 7.4 Acide perchlorique (HClO₄, 70 %).
- 7.4.1 Mise en garde: Le contact de matériaux oxydables ou combustibles avec des agent déshydratants ou réducteurs peut donner lieu à une combustion ou à une explosion. Les personnes utilisant l'acide perchlorique doivent très bien en connaître les dangers.
- 7.5 Métavanadate d'ammonium (NH₄ VO₃).
- 7.5.1 Solution de métavanadate. Dissoudre 2 g de métavanadate d'ammonium dans 250 mL d'eau distillée chaude. Refroidir et ajouter 250 mL de HClO₄ à 70 %.
- 7.6 Réactif au molybdovanadate. Verser graduellement la solution de molybdate dans la solution de vanadate en agitant. Amener la solution à 2 L.
- 7.7 Orthophosphate de potassium monobasique (KH₂PO₄).
- 7.7.1 Solution de réserve standard (2 mg P/mL). Dissoudre 8,788 g de KH₂PO₄ et amener à 1 L.
- 7.7.2 Solution de travail standard (0,1 mg P/mL). Diluer 50 mL de la solution de réserve et amener à 1 L.
8. MÉTHODE
- 8.1 Peser avec précision 2 g d'échantillon et sécher pendant la nuit à 100 °C. Placer l'échantillon dans le four à moufle et atteindre le stade de pré-cendres à 250 °C. Porter lentement la température à 350 °C et la maintenir jusqu'à ce que toutes les fumées des graisses soient disparues. Porter la température à 600 °C et la maintenir pendant 4 heures.
- 8.2 Refroidir, ajouter 40 mL de HCl (1 + 3) et plusieurs gouttes de HNO₃. Amener à ébullition.
- 8.3 Refroidir, transférer dans une fiole jaugée de 200 mL et amener au volume.



chapter chapitre	section	page
4	2	4
status état	date	
new/nouveau	30/06/1989	

- 8.4 Filtrer et transférer un volume contenant de 0,5 mg à 1,5 mg de P dans une fiole jaugée de 100 mL. Pipetter 0, 5, 8, 10 et 15 mL de la solution de travail standard dans des fioles jaugées de 100 mL.
- 8.5 Ajouter 20 mL de réactif au molybdovanadate, amener au volume et bien mélanger. Laisser reposer 10 minutes.
- 8.6 Mettre en marche le spectrophotomètre conformément aux indications du fabricant, fixer la longueur d'ondes à 400 nm et déterminer l'absorbance des échantillons et des solutions standard.

9. CALCULS

- 9.1 Préparer une courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la teneur en orthophosphate (mg P) de la solution standard.
- 9.2 Comparer l'absorbance de la solution échantillon avec la courbe d'étalonnage (tracée en fonction du nombre de mg de P total dans la fiole jaugée de 100 mL) afin de déterminer la teneur en phosphate (mg P) de l'échantillon.

Calculer le pourcentage de phosphore des tissus musculaires du poisson en procédant de la façon suivante:

$$\% \text{ de P} = \frac{C}{\text{vol. (mL) de l'échantillon}} \times \frac{200 \text{ mL}}{\text{poids (g) du poisson}} \times \frac{1}{10}$$

C = Teneur en phosphore (mg P) de l'échantillon

10 = Facteur pour transformer les mg P/g en % de P

9.3 $\% \text{ de P}_2\text{O}_5 = \% \text{ de P} \times 2,291$

2,291 = Facteur de conversion du P en P₂O₅

9.4 $\% \text{ de Na}_2\text{HPO}_4 = \% \text{ de P} \times 4,583$

4,583 = Facteur de conversion du P en Na₂HPO₄



chapter chapitre	section	page
4	2	5
status état	date	
new/nouveau	30/06/1989	

10. PRÉCISION ET EXACTITUDE

10.1 L'étude faite en collaboration avec les autres laboratoires en 1984 a permis de déterminer un écart-type relatif de 3,9 % pour les teneurs de phosphore total se situant entre 0,4 et 1,0 % de P_2O_5 . Le coefficient de variation des cinq échantillons était de 4,0 %. Le taux de récupération s'élevait à 98,6 %.

11. REMARQUES

11.1 La teneur naturelle en phosphore des produits de la pêche est variable. Il est donc nécessaire de déterminer la moyenne et l'écart-type des teneurs naturelles de phosphore d'une espèce donnée avant d'en déterminer le "phosphate total ajouté".

12. RÉFÉRENCES

12.1 Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 12^e édition (1975), procedure 7.103.



chapter chapitre	section	page
5	1	1
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

CHAPITRE 5 - DIVERS
SECTION 1: THON EN CONSERVE, MESURE DE LA COULEUR

1. PORTÉE ET APPLICATION

- 1.1 Cette méthode peut être utilisée pour mesurer la couleur du thon en conserve à des fins de classement selon la couleur, conformément à l'article 49 du Règlement sur l'inspection du poisson, P.C. 1971-935, de la Loi sur l'inspection du poisson (voir Annexe A).

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

- 2.1 Lors d'inspections régulières, la chair du thon est comparée visuellement, sous une lumière normale, à des surfaces de coloration normalisée.
- 2.2 Dans le cas du thon en conserve dont le classement selon la couleur, selon l'étape 2.1, est difficile, la coloration de la chair est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre mesurant sa réflectance diffuse à une longueur d'onde de 555 nm.

3. INTERFÉRENCES

- 3.1 À l'étape 2.1, des problèmes peuvent surgir lorsque la couleur de la chair est considérablement différente (par ex., coloration rosée) de celle des étalons de couleur.
- 3.2 À l'étape 2.2, des problèmes peuvent surgir lorsque la chair est très humide, la préparation d'une surface de réflexion diffuse lisse pour l'analyse au spectrophotomètre étant difficile.

4. MÉTHODE D'ÉCHANTILLONNAGE ET ENTREPOSAGE

- 4.1 Prélever un échantillon représentatif du lot du produit et l'entreposer afin de maintenir son intégrité. Ce dernier doit avoir atteint la température ambiante avant l'inspection.

5. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

- 5.1 Pour une évaluation visuelle, ouvrir la boîte de conserve et la verser sur un plateau perforé afin de séparer la chair de la liqueur aqueuse et de l'huile libres.



**CHEMICAL
METHODS
MANUAL**

**MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
5	1	2
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

5.2 Lorsqu'une mesure au spectrophotomètre est nécessaire, égoutter le thon et le placer dans la cuvette de la presse hydraulique. Poser la plaque de pression sur le poisson et placer l'unité entière dans la presse. Soumettre le thon à une pression de 500 lb par pouce carré pendant cinq minutes.

5.3 Retirer le thon de la cuvette et le déchiqueter ou le piler jusqu'à obtention de particules suffisamment fines pour passer à travers d'un tamis n° 20.

5.4 Bien mélanger le thon après le tamisage. Placer le poisson tamisé dans la cellule colorimétrique de façon à la remplir jusqu'aux deux tiers. Mettre le couvercle de verre en place et serrer l'anneau de fixation. Visser le bouchon de pression dans la cellule de mesure (en pressant le thon) jusqu'à ce que toutes les poches d'air près du couvercle en verre soient disparues. Relâcher la pression sans toutefois permettre aux poches d'air de réapparaître et bien nettoyer l'extérieur du couvercle afin d'enlever entièrement l'huile et les marques de doigts. L'échantillon est maintenant prêt à être mesuré.

6. APPAREILLAGE

6.1 Unité d'éclairage normalisée (pour l'examen visuel du thon en conserve), qui produit une lumière dont la température de couleur est 6 470 °K, et équivalente à l'illuminant C de C.I.E.

6.2 Étalons de couleur pour thon, l'un étant équivalent à la limite entre le thon blanc et pâle (une réflectance diffuse de 33,7 % de celle de MgO à 555 nm), et l'autre, équivalent à la limite entre le thon pâle et foncé (une réflectance diffuse de 22,6 % de celle de MgO à 555 nm). Des étalons de porcelaine sur acier, semblables à ceux mentionnés à la référence 12.2, ont donné des résultats satisfaisants.

6.3 Placer un support pour les étalons de couleur afin de pouvoir comparer visuellement les échantillons et les étalons sous la lumière normalisée. Fixer les étalons à un angle éliminant les reflets pour l'observateur.

6.3 Presse hydraulique pour extraire l'humidité excessive de la chair du thon. Cette presse doit posséder des cuvettes de différentes tailles afin de loger diverses quantités de thon.



chapter chapitre	section	page
5	1	3
status état		date
new/nouveau		31/01/1986

6.5 Tamis n° 20.

6.6 Colorimètre ou spectrophotomètre équipé d'un dispositif de réflectance diffuse, et capable de mesurer la couleur de substances solides à 555 nm.

6.7 Cellule de mesure de la couleur ou support à échantillon. Les détails d'un dispositif approprié pour le spectrophotomètre B & L 505 sont présentés dans la figure ci-jointe.

7. RÉACTIFS

7.1 Ruban de magnésium pour préparer les surfaces blanches de réflectance qui servent à étalonner le spectrophotomètre pour une réflectance de 100 %. Tout matériel qui donne une réflectance diffuse d'au moins 99 % de celle de MgO à 555 nm peut être utilisé comme étalon de réflectance.

8. MÉTHODE

8.1 Retirer le thon égoutté de la boîte et enlever une couche de chair en travers du filet ou des lamelles afin d'obtenir une surface fraîche pour la mesure de la couleur. Observer la couleur de la chair sous la lumière normalisée et comparer visuellement avec les deux étalons de couleur. Le thon dont la couleur est équivalente ou plus pâle que celle de l'étalon thon à chair blanche est classé dans la catégorie "chair de thon blanc". Le thon dont la couleur est équivalente ou plus pâle que celle de l'étalon thon à chair pâle, mais plus foncée que celle de l'étalon thon à chair blanche, est classé dans la catégorie de "chair pâle de thon". Tous les autres types de thon appartiennent à la catégorie de "chair foncée de thon":

8.1.1 Classement des boîtes de conserve renfermant plus d'un morceau de poisson. Si de 15 à 20 % ou plus de la chair sont visiblement plus foncés que la couleur déclarée, par comparaison avec l'étalon de couleur, l'échantillon est jugé plus foncé que l'étalon. Si moins de 15 % de la chair dans la boîte sont plus foncés que la couleur déclarée, l'échantillon est classé selon la couleur moyenne de la chair.

8.1.2 Si 10 % ou plus des échantillons appartiennent à une catégorie inférieure à celle indiquée sur l'étiquette, le lot est reclassifié dans une catégorie de couleur inférieure.



**CHEMICAL
METHODS
MANUAL**

**MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
5	1	4
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

8.1.3 Si la couleur du lot est encore douteuse après examen par deux inspecteurs, toutes les boîtes de thon dont la couleur est remise en question sont soumises à une mesure colorimétrique par spectrophotométrie.

8.2 Mesure spectrophotométrique. Les indications ci-dessous s'appliquent au spectrophotomètre enregistreur Bausch & Lomb 505. Lorsqu'un appareil équivalent est utilisé, ces directives doivent être modifiées afin que l'appareil puisse être employé efficacement.

8.2.1 Préparation d'un étalon de réflectance blanc. Préparer deux étalons en brûlant un ruban de magnésium et en tenant une lentille optique plane en verre (identique à celle utilisée dans le support à échantillon décrit à l'étape 6.8) dans la fumée au-dessus de la flamme. Le côté de la lentille qui doit être enduit de MgO est celui qui doit être en contact avec la chair de thon si la lentille était utilisée dans le support à échantillon. Enduire la lentille de MgO jusqu'à obtention d'une couche complètement opaque (environ 1 à 2 mm d'épaisseur). Ne pas tenir la lentille trop près de la flamme car la fumée condensée ne sera pas absolument blanche. Placer les deux lentilles enduites de fumée dans le spectrophotomètre au-dessus de l'ouverture de l'étalon et de l'échantillon (côté non enduit vers l'ouverture). S'assurer que la couche de MgO reste intacte.

AVERTISSEMENT : des lunettes de sécurité doivent être portées pour se protéger de la lumière ultra-violette lorsque le ruban de magnésium est brûlé.

8.2.2 Installer le spectrophotomètre selon les indications du fabricant et régler l'amplification pour obtenir une réflectance de 100 % à 555 nm. Noter la courbe spectrale dans la gamme du visible afin de s'assurer que l'appareil est réglé pour produire une réflectance à 100 % à toutes les longueurs d'onde. Interchanger les deux étalons blancs aux deux ouvertures opposées et refaire la courbe de réflectance à 100 %. Les deux courbes relevées ne doivent pas présenter un écart supérieur à 1 % pour tout le spectre visible. Dans le cas contraire, enduire de nouveau l'étalon blanc qui présente la réflectance la plus faible avec une mince couche de MgO et obtenir deux autres courbes spectrophotométriques comme ci-dessus. Continuer à enduire l'un ou les deux étalons blancs jusqu'à ce que les courbes présentent un écart inférieur à 1 %. Les étalons peuvent être utilisés pendant une période allant jusqu'à une semaine



chapter chapitre	section	page
5	1	5
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

selon les conditions atmosphériques et d'entreposage, ainsi que la densité de la surface préparée. Effectuer un contrôle quotidien pour s'assurer que leur variance est inférieure à 1 % pour tout le spectre visible.

- 8.2.3 Remplacer l'étalon blanc de l'ouverture de l'échantillon par le thon préparé de la façon décrite à l'étape 5.4, et noter la courbe de réflectance diffuse de l'échantillon.

9. CALCULS

- 9.1 Faire la lecture du pourcentage de réflectance à 555 nm à partir de la courbe spectrophotométrique obtenue.
- 9.2 La limite entre le thon à chair blanche et à chair pâle est fixée à 33,7 % de la réflectance diffuse du MgO, et la limite entre la chair pâle et foncée, à 22,6 % de la réflectance de MgO à 555 nm. Cependant, en tenant compte des changements de couleur des étalons, et des erreurs attribuables à l'appareil, une tolérance de réflectance de 2 % est permise.

10. PRÉCISION ET EXACTITUDE

- 10.1 Lors de l'examen visuel du thon en conserve, il a été montré que tous les échantillons présentant une différence de coloration de plus de + 2 % de réflectance lumineuse par rapport à la limite de couleur sont classés correctement par un inspecteur.
- 10.2 Méthode spectrophotométrique.
- 10.2.1 Lorsque la courbe de réflectance d'un échantillon est mesurée de nouveau après rotation de 90° du support à échantillon, le deuxième relevé ne doit pas différer du premier par plus de la largeur de la ligne produite par l'aiguille de l'enregistreur.
- 10.2.2 Si l'échantillon pilé, tamisé et mélangé est placé dans deux supports à échantillon distincts, les valeurs spectrophotométriques des deux échantillons préparés diffèrent normalement de moins de $\frac{1}{2}$ de 1 % à 555 nm.



**CHEMICAL
METHODS
MANUAL**

**MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
5	1	6
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

11. REMARQUES

11.1 La préparation de l'étalon blanc est critique et longue lorsqu'on emploie l'oxyde de magnésium (MgO). Lorsqu'une autre substance étalon est employée, la mesure de la couleur de l'échantillon doit être corrigée pour tenir compte de la différence de coloration entre l'échelon utilisé et le MgO.

12. RÉFÉRENCES

12.1 Règlement sur l'inspection du poisson, P.C. 1971-935, de la Loi sur l'inspection du poisson.

12.2 Bolton, R.S., Mann, J.H., Gushue, W.G., "Use of Standardized Colour Surfaces in the Grading of Canned Salmon for Colour", J. Fish. Res. Bd. Can., 24(7), 1613 - 1621 (1967).



chapter chapitre	section	page
5	1	7
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

ANNEXE A

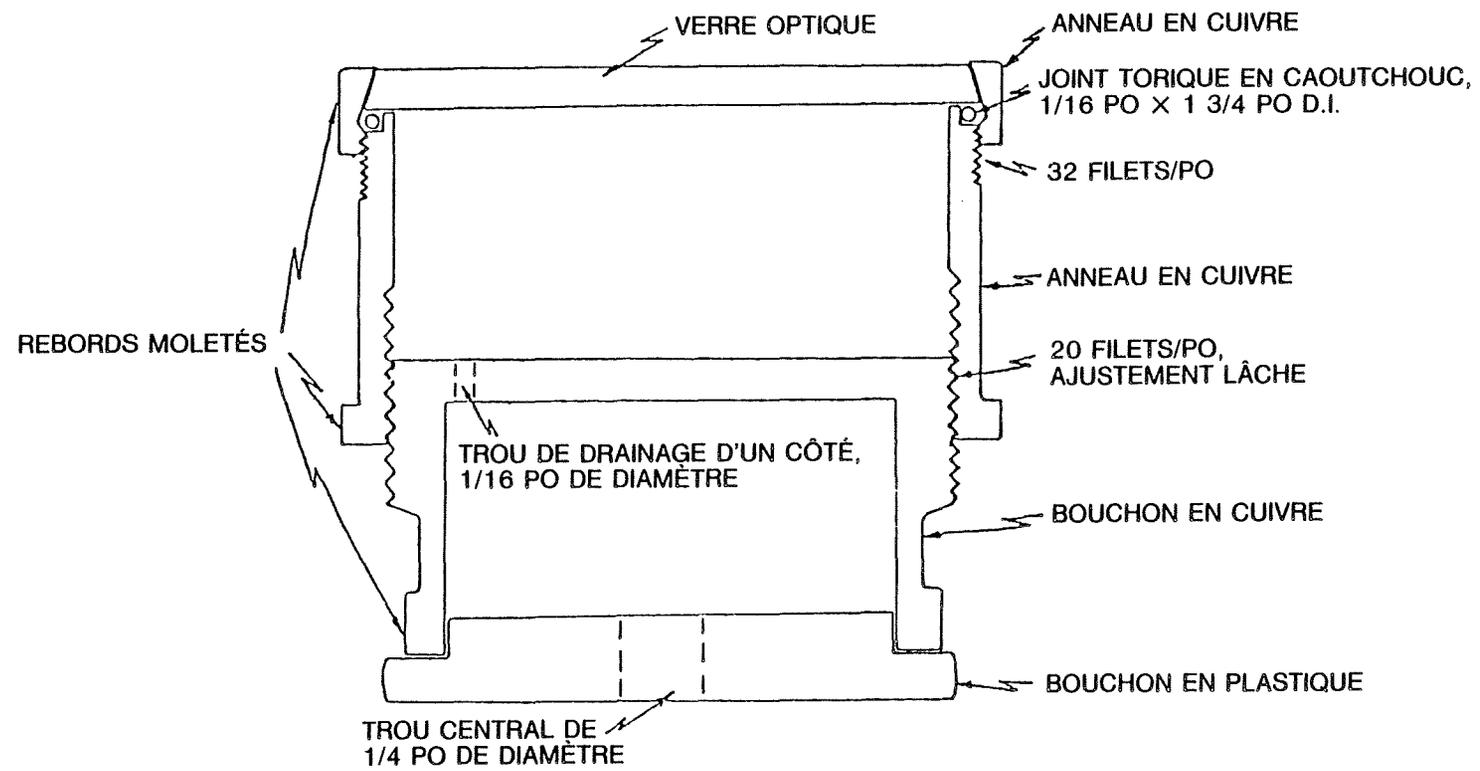
Article 49, Règlement sur l'inspection du poisson

49. Outre les exigences de l'article 25, les étiquettes sur toutes les boîtes de thon doivent indiquer la couleur de la chair, conformément à la classification suivante des couleurs :

- a) le "thon à chair blanche" ou "thon blanc" est une conserve de thon qui a une réflectance diffuse d'au moins 33,7 pour cent de celle de l'oxyde de magnésium, lorsque cette réflectance est mesurée selon une méthode prescrite par le Ministre;
- b) le "thon à chair pâle" ou "thon pâle" est une conserve de thon qui a une réflectance diffuse d'au moins 22,6 pour cent de celle de l'oxyde de magnésium, lorsque cette réflectance est mesurée selon une méthode prescrite par le Ministre; et
- c) le "thon à chair foncée" ou "thon foncé" est une conserve de thon qui ne répond pas aux exigences relatives à la couleur et applicables au "thon à chair pâle".



SUPPORT À ÉCHANTILLON DE POISSON



ÉCHELLE: DEUX FOIS LA GRANDEUR RÉELLE

chapitre chapitre	5	section	1	page	8
status état	new/nouveau		date	31/01/1986	



chapter chapitre	section	page
5	2	1
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

CHAPITRE 5 - DIVERS

SECTION 2: INTOXICATION PARALYSANTE PAR LES MOLLUSQUES, MÉTHODE D'EXTRACTION

1. PORTÉE ET APPLICATION

1.1 Cette méthode est utilisée pour l'analyse des mollusques vivants, congelés ou préparés.

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

2.1 Les mollusques ne produisent pas le poison paralysant, mais l'acquièrent par ingestion de certaines espèces de dinoflagellés marins.

2.2 Afin de déterminer la quantité de toxine présente, on prépare un extrait acide dilué des chairs, qui est injecté dans des souris. La durée de vie de ces souris est notée et l'on calcule la concentration de toxine en fonction d'étalons connus préparés.

3. INTERFÉRENCES

3.1 Des concentrations élevées de sel, comme celles observées dans des mollusques salés ont un effet sur l'influx nerveux des souris.

4. MÉTHODE D'ÉCHANTILLONNAGE ET ENTREPOSAGE

4.1 Échantillons vivants.

4.1.1 Obtenir au minimum six animaux ou un nombre suffisant pour disposer de 200 g de chair.

4.1.2 Placer l'échantillon dans un contenant d'expédition de façon à ce qu'il soit protégé adéquatement contre les dommages physiques et les changements de température. Ne pas emballer avec de la glace en contact direct avec les mollusques.

4.1.3 Inclure dans le paquet une description de l'échantillon, par ex. la date, l'heure et le lieu de la collecte, ainsi que l'espèce et toute autre donnée pertinente.

4.1.4 Expédier au laboratoire sans retard. Les échantillons qui proviennent de lieux éloignés peuvent être congelés.



**CHEMICAL
METHODS
MANUAL**

**MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
5	2	2
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

4.2 Mollusques en conserve, congelés et panés.

4.2.1 Prélever un échantillon représentatif du lot du produit, et l'entreposer afin de conserver son intégrité.

5. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

5.1 Échantillons vivants.

5.1.1 Bien nettoyer l'extérieur du coquillage avec de l'eau fraîche.

5.1.2 Ouvrir en coupant les muscles adducteurs.

5.1.3 Bien rincer la chair avec de l'eau fraîche afin d'enlever toute substance étrangère.

5.1.4 Retirer la chair de la coquille sans couper ni endommager le corps.

5.1.5 Recueillir environ 150 g de chair.

5.1.6 Transférer la chair sur un tamis n° 10 sans l'empiler et égoutter pendant cinq minutes; jeter la phase liquide.

5.1.7 Macérer la chair dans un homogénéisateur à tissus jusqu'à l'obtention d'une bouillie homogène.

5.2 Mollusques en conserve.

5.2.1 Mélanger le contenu entier de la boîte de conserve comme à l'étape 5.1.7.

5.3 Mollusques congelés.

5.3.1 Si le mollusque a été congelé dans sa coquille, décongeler et traiter le produit comme aux étapes 5.1.1 à 5.1.7.

5.3.2 Si le mollusque a été retiré de sa coquille avant d'être congelé, décongeler et traiter le produit comme aux étapes 5.1.5 à 5.1.7.

5.3.3 Si le mollusque a été retiré de sa coquille et égoutté avant d'être congelé, décongeler et traiter le produit comme à l'étape 5.1.7.



chapter chapitre	section	page
5	2	3
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

5.4 Mollusques panés.

5.4.1 Enlever la panure et traiter le produit comme à l'étape 5.1.7.

6. APPAREILLAGE

6.1 Tamis, n° 10.

6.2 Centrifugeuse.

6.3 pH-mètre.

7. RÉACTIFS

7.1 Acide chlorhydrique (HCl).

7.1.1 Solution de HCl (0,18N). Diluer 15 mL de HCl concentré à 1 L avec de l'eau distillée.

7.1.2 Solution de HCl (6N). Diluer du HCl concentré 1 + 1 avec de l'eau distillée.

7.2 Hydroxyde de sodium (NaOH).

7.2.1 Solution de NaOH (0,1N). Dissoudre 4 g de NaOH dans de l'eau distillée et diluer à 1 L. (A.O.A.C., 12^e éd. (1975), méthode 50.034.)

8. MÉTHODE

8.1 Peser avec précision un homogénat de l'échantillon de 100 g dans un bécher taré, gradué jusqu'à 200 mL.

8.2 Ajouter 100 mL de HCl 0,18N et bien mélanger. S'assurer que le pH est $3,5 \pm 0,5$; régler au besoin.

8.3 Chauffer le mélange jusqu'au point d'ébullition aussi rapidement que possible et en brassant continuellement (environ 5-7 min); laisser bouillir doucement pendant cinq minutes et refroidir à la température ambiante.

8.4 Refroidir le produit digéré, ajouter de l'eau distillée pour compléter le poids jusqu'à 200 g et régler le pH à 3,3-3,8 (avec HCl 6N, ou NaOH 0,1N, au besoin) en brassant constamment.



**CHEMICAL
METHODS
MANUAL**

**MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
5	2	4
status état		date
new/nouveau		31/01/1986

- 8.5 Brasser le mélange jusqu'à ce qu'il soit homogène et laisser précipiter jusqu'à ce qu'une partie du surnageant soit translucide et puisse être décantée sans particules solides assez grosses pour boucher une seringue hypodermique de calibre 26. Comme solution de rechange, il est possible de centrifuger le mélange ou le surnageant pendant cinq minutes à 3 000 tr/min, ou filtrer. Seulement la quantité de liquide nécessaire pour effectuer l'essai biologique est requise.
- 8.6 Décanter environ 15 mL du liquide surnageant dans une bouteille à échantillon propre, bien fermer avec un bouchon de liège ciré, poser une étiquette d'identification et numéroter, bien emballer dans un contenant d'expédition approprié et envoyer à :

Projet de l'I.P.M.
Bureau de dangers microbiens,
Direction générale de la protection de la
santé,
Pièce 327, Imm. Sir Frederick Banting,
Parc Tunney
Ottawa (Ontario)
K1A 0L2

9. CALCULS

- 9.1 La Direction générale de la protection de la santé effectue tous les calculs nécessaires et fournit les résultats en microgrammes de PPC par 100 g de chair de coquillage à moins d'indications contraires de l'expéditeur.

10. PRÉCISION ET EXACTITUDE

10. L'exactitude d'un essai avec trois souris est de $\pm 20\%$ tandis que celui d'un essai avec six souris est d'environ $\pm 10\%$.

11. REMARQUES

- 11.1 Sur la côte canadienne de l'Atlantique, le problème est limité aux segments moyen et inférieur de la baie de Fundy et à l'estuaire inférieur du fleuve Saint-Laurent.
- 11.2 Sur la côte canadienne du Pacifique, les secteurs touchés ne peuvent être déterminés à l'avance. Cependant, des manifestations de ce problème sont observées dans des zones protégées.



**CHEMICAL
METHODS
MANUAL**

**MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
5	2	5
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

11.3 Les secteurs touchés par l'I.P.M. présentent de grandes variations annuelles et saisonnières pour ce qui est de la toxicité des coquillages. Typiquement, les espèces littorales comme les myes et les moules ne contiennent aucun poison ou presque pendant l'hiver et le printemps, mais leur toxicité peut s'accroître rapidement pour atteindre un maximum en été et redescendre en automne. (La variation annuelle est peu régulière.) Lorsque les palourdes jaunes (Saxidomus nuttallii) de la côte du Pacifique deviennent toxiques, l'élimination de la toxine peut prendre des années.

12. RÉFÉRENCES

- 12.1 "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists", 12th Edition (1975), procedure 18.070.
- 12.2 Prakash, A., Medcof, J.D., and Tennant, A.D., "Paralytic Shellfish Poisoning in Eastern Canada", Fisheries Research Board of Canada (1971). Bulletin 177.
- 12.3 Quayle, D.B., "Paralytic Shellfish Poisoning in British Columbia", Fisheries Research Board of Canada, Bulletin 168 (1969).



chapter chapitre	section	page
5	3	1
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

CHAPITRE 5 - DIVERS
SECTION 3: IDENTIFICATION DES ESPÈCES PAR ÉLECTROPHORÈSE

1. PORTÉE ET APPLICATION

1.1 Cette méthode qui sert à l'analyse de nombreuses espèces de poisson, s'appuie sur la comparaison visuelle des configurations caractéristiques produites lorsque des extraits protéiques solubles d'espèces connues et inconnues de poisson sont soumis à l'électrophorèse.

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

2.1 Un extrait de protéines hydrosolubles est déposé sur un milieu de polyacétate de cellulose auquel est appliqué un courant direct. Les composants de l'extrait migrent à travers la structure poreuse du milieu qui agit comme un tamis moléculaire, de sorte que les protéines qui ont le même rapport charge/masse se séparent si leurs dimensions moléculaires sont suffisamment différentes.

3. INTERFÉRENCES

3.1 Il n'existe aucune interférence connue.

4. MÉTHODE D'ÉCHANTILLONNAGE ET ENTREPOSAGE

4.1 Prélever un échantillon représentatif du lot du produit, et l'entreposer afin de conserver son intégrité.

4.2 Les échantillons peuvent être frais, congelés, fumés ou salés. Cependant, les échantillons traités à la chaleur ne doivent pas être utilisés.

4.3 Les échantillons peuvent être conservés à l'état congelé pendant plusieurs mois.

4.4 En aucun temps au cours de l'analyse, la température d'un échantillon ou d'un extrait d'échantillon ne doit augmenter jusqu'au point où les protéines se dénaturent.



chapter chapitre	section	page
5	3	2
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

5. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

- 5.1 Frais : congeler l'échantillon et utiliser le liquide non dilué d'une portion décongelée.
- 5.2 Congelé : décongeler l'échantillon et utiliser le liquide non dilué.
- 5.3 Lyophilisé : reconstituer l'échantillon avec de l'eau et traiter comme un échantillon frais.
- 5.4 Les produits halieutiques fumés et salés nécessitent un traitement spécial (voir REMARQUES).

6. APPAREILLAGE

- 6.1 Appareil d'électrophorèse.
- 6.2 Applicateur de sérum.
- 6.3 Bandes de polyacétate de cellulose, 2.5 cm x 15 cm.
- 6.4 Papier absorbant, 20 x 30 cm.
- 6.5 Pincés Magna-Grip.
- 6.6 Micropipettes.
- 6.7 Bac de coloration.
- 6.8 Bac de trempage des bandes.
- 6.9 Bloc d'alimentation en courant direct, 0-500V, 0-25 mA.

7. RÉACTIFS

- 7.1 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol (TRIS)
- 7.2 Acide éthylènediaminetétracétique (EDTA).
- 7.3 Acide borique.
- 7.4 Acide diéthylbarbiturique.

**CHEMICAL
METHODS
MANUAL****MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
5	3	3
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

- 7.5 Diéthylbarbiturate de sodium.
- 7.6 Méthanol.
- 7.7 Acide acétique, glacial.
- 7.8 Noir Amino 10B.
- 7.9 Acide trichloracétique (TCA).
- 7.9.1 Solution de TCA (5 %); utilisée comme solution de lavage.
- 7.10 Alcool éthylique (95 %).
- 7.11 Solution tampon. L'une des trois solutions tampons suivantes peut être utilisée :
- 7.11.1 Dissoudre 60,5 g de TRIS, 6 g de EDTA et 4,6 g d'acide borique dans de l'eau distillée et diluer à 1 L. Diluer 250 g de cette solution stable à 1 L et utiliser comme solution de travail.
- 7.11.2 Solution tampon de l'A.O.A.C. Dissoudre 8,64 g de diéthylbarbiturate de sodium et 1,2 g d'acide diéthylbarbiturique dans de l'eau distillée et diluer à 1 L. (Le tampon a un pH de 8,6 et une force ionique de 0,04M.)
- 7.11.3 Tampon H.R. (Gelman, produit n° 51104). Dissoudre une fiole (18 g) dans 1 800 mL d'eau distillée.
- 7.12 Solution de colorant. L'un des deux colorants suivants peut être utilisé.
- 7.12.1 Mélanger 1 000 mL de méthanol, 1 000 mL d'eau distillée et 200 mL d'acide acétique glacial, et ajouter 25 g de noir Amino 10B.
- 7.12.2 Colorant Ponceau S (Gelman). Dissoudre une capsule (20 mg) de colorant Ponceau S dans 100 mL de solution de TCA 5 %.
- 7.13 Solution de clarification. Mélanger 15 mL d'acide acétique glacial avec 85 mL d'alcool éthylique à 95 %.



chapter chapitre	section	page
5	3	4
status état	date	
new/nouveau	31/01/1986	

8. MÉTHODE

- 8.1.1 Tremper des bandes de polyacétate de cellulose dans une solution tampon pendant au moins 30 minutes.
- 8.1.2 Ajouter du tampon froid (1 °C) dans chaque compartiment de l'appareil jusqu'à un point légèrement en dessous des cloisons séparant les compartiments.
- 8.1.3 Retirer une bande du tampon et enlever l'excès de tampon en le plaçant entre des feuilles de papier absorbant.
- 8.1.4 Remplir une micropipette d'extrait d'échantillon et transférer ce dernier à l'applicateur. Laisser un espace de 3 mm libre d'échantillon pour chaque grandeur de l'applicateur.
- 8.1.5 Presser fermement l'applicateur contre la bande à environ 5 cm de l'extrémité.
- 8.1.6 Placer la bande contenant l'échantillon en travers des cloisons de l'appareil de façon à ce que l'échantillon soit du côté de la cathode et que ses deux extrémités soient immergées dans le tampon dans les deux compartiments extérieurs.
- 8.1.7 Attacher la bande à chaque extrémité avec les pinces Magna-Grip et la garder bien tendue. Répéter les étapes 8.1.3 à 8.1.7 pour chaque bande.
- 8.1.8 Installer l'appareil selon les indications du fabricant. Mettre le couvercle de l'appareil en place, brancher les électrodes et régler le bloc d'alimentation en courant direct à un potentiel d'au moins 300V, avec un courant minimal de 1 mA par bande. Appliquer le courant pendant 45 minutes.
- 8.1.9 Couper le courant, retirer la bande de l'appareil et la placer dans une solution de colorant pendant 2-5 minutes.
- 8.1.10 Immerger la bande dans une série de trois solutions de rinçage d'acide acétique 5 % afin d'enlever l'excès de colorant. Rincer la bande jusqu'à ce que seules les stries de protéines demeurent colorées et que le reste de la bande soit libre de colorant. (Une bande peut être laissée dans une solution d'acide acétique à 5 % pendant une période de 2 à 3 semaines.)



**CHEMICAL
METHODS
MANUAL**

**MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
5	3	5
status état		date
new/nouveau		31/01/1986

8.1.11 Comparer le profil des protéines de l'échantillon avec celui d'espèces connues de poisson. Un étalon doit être analysé simultanément.

8.2 Lorsqu'une lame permanente de la configuration des protéines est désirée :

8.2.1 Placer la bande sur une lame de verre de 2,5 x 11,5 cm et sécher à l'air.

8.2.2 Tremper la lame de verre et la bande dans la solution de clarification pendant 20-30 secondes. Éliminer les bulles d'air emprisonnées.

8.2.3 Laisser la lame sécher. Si la bande ne devient pas complètement limpide, répéter les étapes 8.2.1 et 8.2.2.

9. CALCULS

9.1 Comparer visuellement le profil des protéines de l'échantillon inconnu avec des profils d'espèces connues de poisson.

10. PRÉCISION ET EXACTITUDE

10.1 Cette méthode est fiable pour l'analyse d'espèces marines.

11. REMARQUES

11.1 Afin de limiter l'accumulation de chaleur et de réduire l'évaporation, la solution tampon doit être réfrigérée jusqu'au moment de l'utilisation. Après l'électrophorèse, la solution utilisée dans l'appareil doit être reversée dans la bouteille de solution mère et réfrigérée. Le tampon doit être remplacé après 10 analyses ou au moins une fois par semaine.

11.2 La température doit être réglée de façon à éviter l'accumulation de condensation dans l'appareil d'électrophorèse.

11.3 Lorsqu'on soumet des produits halieutiques fumés ou salés à des analyses d'identification d'espèces au moyen de techniques électrophorétiques, il est possible d'obtenir une plus grande résolution et, en conséquence, un profil électrophorétique très amélioré en exécutant le protocole suivant:

- i) homogénéiser l'échantillon avec un équivalent de 10 mM de dithiothréitol;



**CHEMICAL
METHODS
MANUAL**

**MANUEL
DES MÉTHODES
D'ANALYSE CHIMIQUE**

chapter chapitre	section	page
5	3	6
status état	date	
new/ nouveau	31/01/1986	

- ii) centrifuger pendant 5-10 minutes à 3 000 tr/min; et
- iii) soumettre le surnageant obtenu à l'électrophorèse.

En raison de son faible potentiel d'oxydo-réduction (-0,33 volts à pH 7), le dithiothréitol est capable de maintenir les monothiols complètement à l'état réduit et de réduire quantitativement les disulfures (voir référence 12.2).

12. RÉFÉRENCES

- 12.1 Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 12th Edition (1975), procedure 18.084.
- 12.2 Cleland, W.W.; "Dithiothreitol, A New Protective Reagent For SH Groups", Biochemistry, 3, 480 (1964).



chapter chapitre	section	page
5	4	1
status état	date	
nouveau	12/04/1996	

CHAPITRE 5 - DIVERS

SECTION 4: MÉTHODE D'EXTRACTION ET D'ANALYSE DE L'ACIDE DOMOÏQUE

1. PORTÉE ET APPLICATION

- 1.1 La méthode s'applique aux mollusques, aux crustacés et aux poissons vivants, congelés ou transformés. Elle a permis de mesurer des concentrations d'acide domoïque de 0,5 µg/g à plus de 4 000 µg/g dans les tissus de coquillages.

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

- 2.1 Les coquillages ne produisent pas la toxine; ils l'accumulent par ingestion de certaines espèces de dinoflagellés marins. D'autres organismes aquatiques comme le homard, le crabe et les poissons absorbent la toxine lorsque les proies dont ils se nourrissent sont contaminées par la toxine.
- 2.2 Pour mesurer la quantité de toxine présente, on prépare des extraits acides dilués de chair qu'on soumet à une évaluation chimique par CLHP et on calcule la concentration de toxine à l'aide d'étalons préparés de concentration connue.

3. INTERFÉRENCES

- 3.1 Le tryptophane (acide aminé) interférerait avec l'analyse de l'acide domoïque effectuée par d'autres méthodes. Jusqu'à maintenant, rien ne prouve que ce produit interférerait avec cette méthode.
- 3.2 L'analyse de poissons gras comme le maquereau et le hareng pourrait avoir des effets néfastes sur l'efficacité de fonctionnement de la colonne CLHP, effets qui peuvent être atténués par rinçage au méthanol.



chapter chapitre	section	page
5	4	2
status état		date
nouveau		12/04/1996

4. MÉTHODE D'ÉCHANTILLONNAGE ET ENTREPOSAGE

4.1 Échantillons vivants

- 4.1.1 Prélever un minimum de 5 organismes (10 à 12 organismes dans le cas des mollusques) ou un nombre suffisant pour obtenir 150 g de chair.
- 4.1.2 Placer les échantillons dans un contenant d'expédition à l'abri des dommages mécaniques et d'une variation de température. Les mollusques ne doivent pas être en contact direct avec la glace.
- 4.1.3 Placer dans l'emballage une description de l'échantillon, c'est-à-dire la date de prélèvement, l'heure, l'endroit, l'espèce et toute autre donnée pertinente.
- 4.1.4 Expédier le tout au laboratoire sans délai.

4.2 Mollusques, poissons et crustacés en conserve, congelés et panés

- 4.2.1 Prendre un échantillon représentatif du lot de produit et l'entreposer de manière à préserver l'intégrité de l'échantillon.

5. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

5.1 Échantillons vivants

- 5.1.1 Nettoyer à fond l'extérieur des coquillages avec de l'eau douce.
- 5.1.2 Ouvrir les coquillages en coupant les muscles adducteurs.
- 5.1.3 Rincer la chair à l'eau douce afin d'éliminer les particules étrangères.
- 5.1.4 Enlever la chair de la coquille sans couper ou endommager l'organisme.
- 5.1.5 Prélever environ 150 g de chair.



chapter chapitre	section	page
5	4	3
status état	date	
nouveau	12/04/1996	

- 5.1.6 Placer les chairs en monocouche dans un tamis à mailles n° 10 et laisser égoutter pendant 5 minutes; jeter le liquide d'égouttage.
- 5.1.7 Dans un homogénéisateur tissulaire, réduire les chairs jusqu'à l'obtention d'une bouillie homogène.
- 5.2 Coquillages en conserve
- 5.2.1 Mélanger tout le contenu de la boîte de conserve comme en 5.1.7.
- 5.3 Coquillages congelés
- 5.3.1 Si le produit est congelé dans la coquille, décongeler et traiter selon les étapes 5.1.1 à 5.1.7.
- 5.3.2 Si le produit est congelé décoquillé, décongeler et traiter selon les étapes 5.1.5 à 5.1.7.
- 5.3.3 Si le produit est congelé décoquillé et égoutté, décongeler et traiter comme en 5.1.7.
- 5.4 Coquillages panés
- 5.4.1 Enlever la panure et traiter le produit comme en 5.1.7.
- 5.5. Poissons et crustacés
- 5.5.1 Hacher l'échantillon jusqu'à l'obtention d'une texture homogène.
6. **APPAREILS**
- 6.1 Tamis à mailles n° 10.
- 6.2 Centrifugeuse.
- 6.3 pH-mètre.
- 6.4 Homogénéisateur Polytron ou l'équivalent.
- 6.4.1 Mélangeur de type Vortex.



chapter chapitre	section	page
5	4	4
status état	date	
nouveau	12/04/1996	

- 6.5 Seringues jetables de 3 mL (B-D).
- 6.6 Filtres en nylon pour seringue de 25 mm (maille de 0,2 μ recommandée).
- 6.7 Pipetteurs.
- 6.7.1 Pipetteurs d'une capacité de 1,0, 0,75 et 0,5 mL.
- 6.8 Pompe pour CLHP en régime isocratique pouvant assurer un débit fiable jusqu'à 1,5 mL/min.
- 6.9 Système d'échantillonnage automatique communiquant avec la pompe et le système de données et permettant des volumes d'injection allant jusqu'à 20 μ L.
- 6.10 Colonne (25 cm x 4,6 mm diam. int.) de CLHP en phase inverse Vydac 201 TP54.
- 6.11 Four permettant de maintenir la température de la colonne à 50 °C.
- 6.12 Détecteur UV pour CLHP, longueur d'onde 242 nm.
- 6.13 Système de traitement des données et appareil d'enregistrement.
7. **RÉACTIFS**
- 7.1 Acide chlorhydrique (HCl).
- 7.1.1 Solution d'HCl (0,1N). Diluer 8,3 mL d'HCl concentré avec de l'eau distillée pour porter le volume à 1 L.
- 7.1.2 Solution d'HCl (5N). Diluer 1 partie d'HCl concentré avec 1,4 partie d'eau distillée.
- 7.2 Hydroxyde de sodium (NaOH).
- 7.2.1 Solution de NaOH (0,1N). Dissoudre 4 g de NaOH dans de l'eau distillée et diluer pour porter le volume à 1 L (AOAC 12^e éd., (1975) procédure 50.034).
- 7.3 Méthanol, qualité A.C.S.



chapter chapitre	section	page
5	4	5
status état		date
nouveau		12/04/1996

- 7.4 Acide trifluoroacétique (TFA), qualité A.C.S.
- 7.5 Acétonitrile, qualité CLHP.
- 7.6 Eau distillée sous verre.
- 7.7 Phase mobile.
- 7.7.1 Phase mobile (ordinaire) - Acétonitrile 11 % + TFA 0,1 % dans de l'eau distillée sous verre.
- 7.7.2 Phase mobile (de confirmation) - Acétonitrile 8 % + TFA 0,1 % dans de l'eau distillée sous verre.
- 7.8 DACS - solution-étalon certifiée, CNR, Halifax.
- 7.9 Solution mère (A) - Dissoudre environ 50 mg d'acide domoïque (Diagnostic Chemicals Ltd.) dans 5 mL de méthanol à 10 % (10 mg d'acide domoïque/mL). La solution est étalonnée par rapport à l'étalon DACS afin d'établir la concentration exacte. Cet étalon moins dispendieux sert à préparer les étalons de travail utilisés quotidiennement ainsi que pour préparer les échantillons enrichis.
- 7.9.1 Solution mère diluée (B), (100 µg d'acide domoïque/mL de méthanol à 25 %); porter 5 mL de solution mère d'acide domoïque (A) diluée à 50 mL avec du méthanol à 25 %.
- 7.9.2 Solutions de travail
- 7.9.2.1 Solution à forte concentration (6,0 µg d'acide domoïque/mL); porter 6,0 mL de solution mère diluée (B) à 100 mL avec du méthanol à 25 %.
- 7.9.2.2 Solution à concentration moyenne (1,0 µg d'acide domoïque/mL); porter 1,0 mL de solution mère diluée (B) à 100 mL avec du méthanol à 25 %.



chapter chapitre	section	page
5	4	6
status état	date	
nouveau	12/04/1996	

7.9.2.3 Solution à faible concentration (0,06 µg d'acide domoïque/mL);
porter 1,0 mL de solution à forte concentration à 100 mL
avec du méthanol à 25 %.

Un seul point d'étalonnage a été également utilisé étant donné que les régressions par rapport à la plage proposée de concentrations sont assez linéaires.

8. MÉTHODE

8.1 Méthode d'extraction pour le dosage de l'acide domoïque (méthode de dépistage)

Elle est fondée sur la méthode "Paralytic Shellfish Poison Biological Method Final Action" selon l'Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (AOAC, 16^e éd., 35.1.37).

8.1.1 Peser exactement 100 g d'homogénat d'échantillon dans un bécher taré de 400 mL gradué à 200 mL.

8.1.2 Ajouter 100 mL de HCl 0,1N et bien mélanger. Vérifier le pH (3,5 ± 0,5) et l'ajuster au besoin.

8.1.3 Porter le mélange à ébullition le plus rapidement possible (environ 5 à 7 min), couvrir avec un verre de montre ou l'équivalent et laisser bouillir à 100 °C en agitant constamment. Laisser bouillir cinq minutes et laisser refroidir jusqu'à ce que le mélange soit à la température ambiante.

8.1.4 Faire refroidir le digestat, ajuster le pH entre 3,3 et 3,8 (en utilisant du HCl 5N ou du NaOH 0,1N au besoin) en agitant constamment et ajouter de l'eau distillée pour ramener le poids à 200 g.

8.1.5 Mélanger jusqu'à l'obtention d'une solution homogène et laisser reposer jusqu'à ce qu'une partie du surnageant soit translucide et qu'on puisse le décanter pour retirer toutes les particules solides assez grosses pour obstruer une aiguille hypodermique de calibre 26. Ou bien, centrifuger le mélange ou le surnageant pendant cinq minutes à 3 000 tr/min ou filtrer.



chapter chapitre	section	page
5	4	7
status état	date	
nouveau	12/04/1996	

- 8.1.6 Décanter environ 15 mL de liquide surnageant dans un flacon à scintillation propre, bien fermer, mettre une étiquette d'identification et indiquer le numéro. L'extrait peut servir au bioessai de la toxine paralysante et à la recherche de l'acide domoïque. Les échantillons peuvent être conservés au réfrigérateur (à 4 °C) jusqu'au moment de l'analyse.
- 8.1.7 Retirer les échantillons du réfrigérateur et laisser atteindre la température ambiante.
- 8.1.8 Pipetter 1,0 mL de chaque échantillon, le transférer dans un tube à culture (13 x 100 mm) contenant 1,0 mL de méthanol de qualité ACS et mélanger.
- 8.1.9 Centrifuger à 1 200 tr/min pendant 10 minutes.
- 8.1.10 À l'aide d'une seringue jetable de 3 mL, prélever environ 1,5 mL et transférer dans un tube à culture de 13 x 100 mL après passage dans un filtre à seringue.
- 8.1.11 Pipetter 0,75 mL de chaque échantillon filtré; transférer dans des flacons distincts de l'échantillonneur automatique et diluer avec 0,75 mL d'eau distillée sous verre, boucher et mélanger. Passer à la section 8.3.
- 8.2 Méthode d'extraction pour le dosage de l'acide domoïque au méthanol (analyse critique)
Cette méthode doit être utilisée pour des échantillons soupçonnés de contenir des concentrations importantes d'acide domoïque ou des échantillons pour lesquels la recherche de la toxine paralysante n'est pas nécessaire.
- 8.2.1 Peser 5,0 g de l'homogénat d'échantillon dans un tube à culture à capsule vissante de 50 mL.
- 8.2.2 Ajouter 5,0 mL d'eau distillée et mélanger à l'aide d'un mélangeur de type Vortex.
- 8.2.3 Ajouter 10,0 mL de méthanol (ACS) et mélanger à l'aide d'un mélangeur de type Vortex.
- 8.2.4 Centrifuger l'échantillon à 1 000 tr/min pendant 10 minutes et décanter le surnageant dans un flacon à scintillation.



chapter chapitre	section	page
5	4	8
status état	date	
nouveau	12/04/1996	

8.2.5 À l'aide d'une seringue jetable de 3 mL, prélever environ 1,5 mL et transférer dans un tube à culture de 13 x 100 mm après passage dans un filtre à seringue.

8.2.6 Pipetter 0,75 mL de chaque échantillon filtré; transférer dans des flacons distincts de l'échantillonneur automatique et diluer avec 0,75 mL d'eau distillée sous verre, boucher et mélanger. Passer à la section 8.3.

8.3 Analyse par CLHP

8.3.1 Équilibrer le système de CLHP à la température du four (50 °C) avec la phase mobile fraîche pendant 20 minutes. Ajuster la température de la phase mobile ou de la colonne s'il y a lieu pour obtenir des temps de rétention des étalons de 9 à 11 minutes.

Conditions de la CLHP : phase mobile - Acétonitrile 11 % + TFA 0,1 % dans de l'eau distillée sous verre

Débit - 1,0 mL/min

Longueur d'onde - 242 nm

Durée d'exécution - 12-15 min.

8.3.2 Étalonner l'instrument par injections répétées des solutions de travail.

8.3.3 Injecter des échantillons, des blancs et des solutions de référence certifiées et mesurer les hauteurs de pic obtenus par l'intégrateur.

9. CALCULS

9.1 Mesurer la hauteur des pics des solutions étalons et préparer une courbe d'étalonnage de la quantité d'acide domoïque par injection par rapport à la hauteur des pics.

9.2 À partir de la régression linéaire de la courbe, déterminer la quantité (ng) d'acide domoïque dans chaque dose d'échantillon injectée.



chapter chapitre	section	page
5	4	9
status état		date
nouveau		12/04/1996

- 9.3 Calculer la concentration d'acide domoïque dans l'échantillon en utilisant la formule suivante :

$$\mu\text{g/g} = \frac{\text{ng/injection} \times D}{\mu\text{L injecté}}$$

D= facteur de dilution (le facteur de dilution normal pour cette méthode est de 8).

10. PRÉCISION ET EXACTITUDE

- 10.1 Les données montrent que la reproductibilité est d'environ $\pm 10\%$ pour une concentration de $20 \mu\text{g/g}$ dans le cas d'une extraction au méthanol et de $\pm 13\%$ pour l'extraction de type toxine l'IPM.

- 10.2 La limite de détection est d'environ $0,5 \mu\text{g/g}$.

11. REMARQUES

- 11.1 Des chromatogrammes représentatifs d'un étalon d'acide domoïque et d'acide domoïque extrait d'un homogénat de bivalve sont illustrés respectivement dans les figures 1 et 2 de l'Annexe A. La figure 3 représente une courbe d'étalonnage des solutions de travail, tandis que le chromatogramme de la figure 4 montre la séparation des solutions étalons d'acide domoïque et de tryptophane.
- 11.2 On peut s'attendre à récupérer 95% ou plus d'acide domoïque par la technique de l'extraction au méthanol des homogénats de mye et de palourde, d'huître et de pétoncle.
- 11.3 L'extraction courante de la toxine l'IPM permet des récupérations comparables dans le cas des homogénats de pétoncle et d'huître, mais seulement de 80% des valeurs de l'extraction au méthanol dans le cas des moules et de 45% dans le cas des myes et des palourdes.
- 11.4 L'extraction de type toxine l'IPM, bien qu'elle soit un outil de dépistage pour les échantillons dans lesquels on doit aussi rechercher la présence de toxine l'IPM, ne doit pas être utilisée pour l'acide domoïque lorsqu'on recherche une précision analytique.



chapter chapitre	section	page
5	4	10
status état	date	
nouveau	12/04/1996	

- 11.5 Il est recommandé de conserver les solutions au réfrigérateur (4 °C). Il ne faut pas congeler des extraits acides étant donné que l'augmentation de la concentration d'acide pendant le processus de congélation peut détruire une certaine quantité d'acide domoïque. L'acide domoïque extrait est plus stable dans l'extrait eau-méthanol, cependant les deux extraits semblent présenter une stabilité suffisante pendant une période de conservation d'une semaine à la température ambiante.
- 11.6 Après l'extraction de type toxine l'IPM, on utilise du méthanol pour précipiter une grande partie de la protéine hydrosoluble. Cette étape supplémentaire d'épuration élimine le matériel qui nuirait à l'efficacité et à la longévité de la colonne.
- 11.7 Les échantillons renfermant une quantité importante d'acide domoïque ou provenant de zones ou d'espèces pour lesquelles on relève la présence d'acide domoïque pour la première fois doivent être soumis à confirmation par chromatographie ou par détection à l'aide d'un réseau de diodes. Les conditions de confirmation par un réseau de diodes sont indiquées dans l'Annexe B.
12. **RÉFÉRENCES**
- 12.1 Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 16^e édition (1995), procédure 35.1.37.
- 12.2 Quilliam, M.A., M. Xie et W.R. Hardstaff. 1991. A Rapid Extraction and Clean-up Procedure for the Determination of Domoic Acid in Tissue Samples. Conseil national de recherches Canada, Institut des biosciences marines, Rapport technique n° 64.
- 12.3 Gilgan, M.W., B.G. Burns et G.J. Landry. 1990. Distribution and Magnitude of Domoic Acid Contamination of Shellfish in Atlantic Canada during 1988, in Toxic Marine Phytoplankton, ed. Graneli et al. Elsevier Science Publishing Co. Inc.



chapter chapitre	section	page
5	4	A-1
status état		date
nouveau		12/04/1996

ANNEXE A

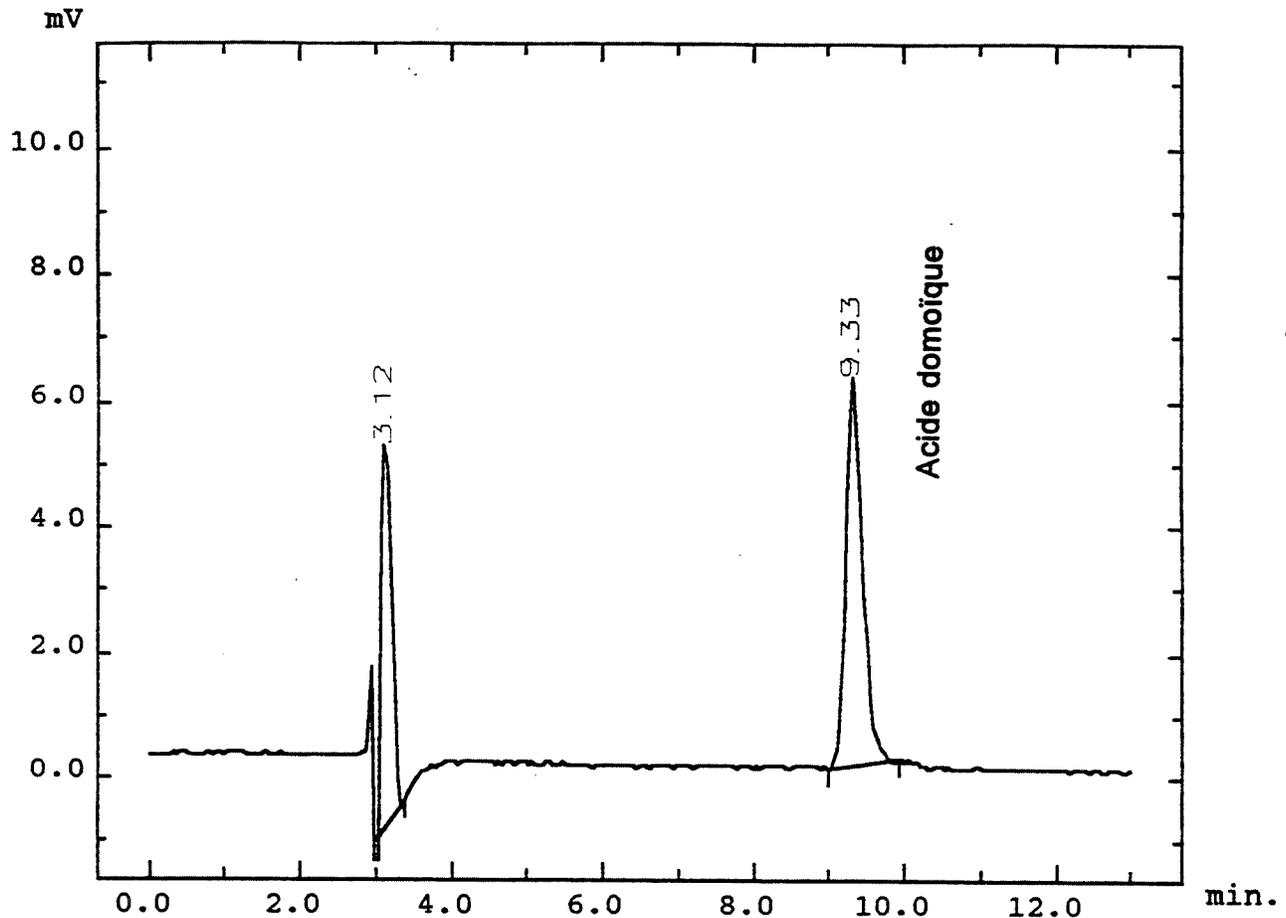


Figure 1. Tracé CLHP dans l'ultraviolet (242 nm) d'une solution étalon d'acide domoïque (21,2 ng) sur une colonne RP-18 Vydac 201 TP54 (25 cm x 4,6 mm diam. int.), 5 μ . Conditions de fonctionnement : température du four 50 °C, débit 1,0 mL/min. Régime isocratique - acétonitrile 11 % dans de l'eau distillée sous verre avec addition d'acide trifluoroacétique à 0,1 % comme agent de modification.



chapter chapitre	section	page
5	4	A-2
status état	date	
nouveau	12/04/1996	

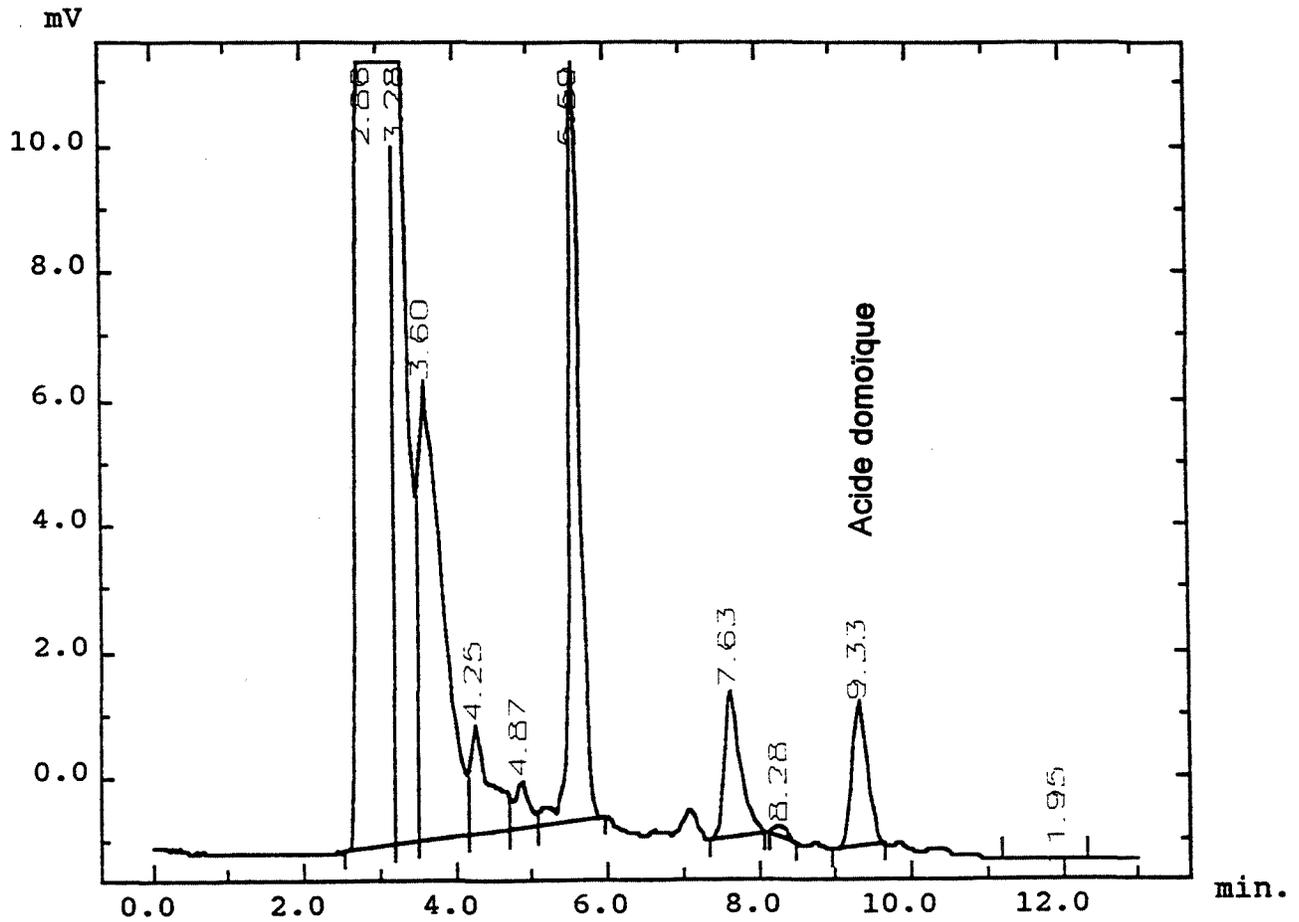


Figure 2. Tracé CLHP dans l'UV (242 nm) d'un extrait au méthanol de tissu de mye (7,3 µg d'acide domoïque/g). Mêmes conditions que pour la figure 1.



chapter chapitre	section	page
5	4	A-3
status état	date	
nouveau	12/04/1996	

COURBE D'ÉTALONNAGE DE L'ACIDE DOMOÏQUE

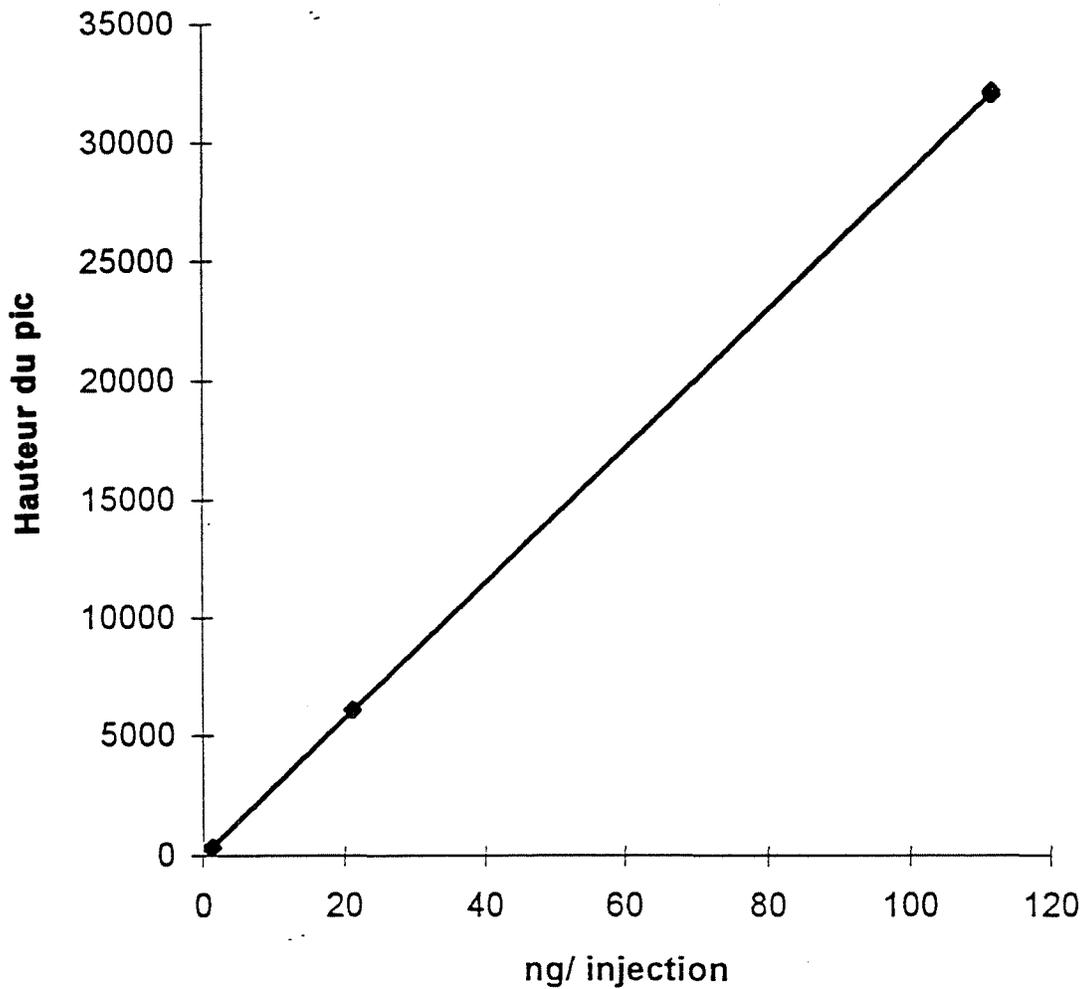


Figure 3. Courbe d'étalonnage pour un passage de l'acide domoïque sur la colonne Vydac. Mêmes conditions que pour la figure 1.



chapter chapitre	section	page
5	4	A-4
status état	date	
nouveau	12/04/1996	

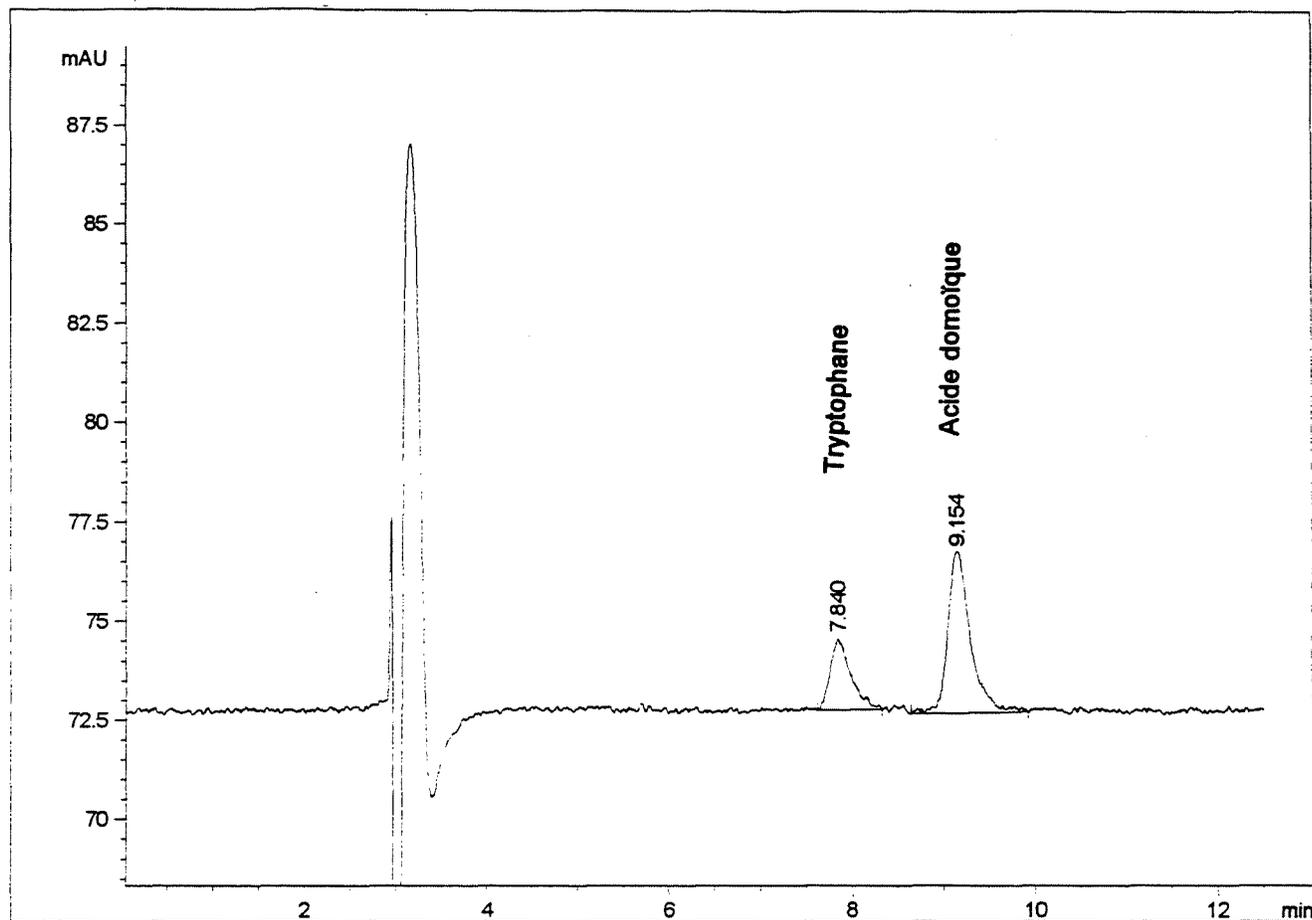


Figure 4. Tracé CLHP dans l'UV (242 nm) d'une solution étalon d'acide domoïque (4,7 ng) et d'une solution étalon de tryptophane (14,6 ng). Mêmes conditions que pour la figure 1.



chapter chapitre	section	page
5	4	B-1
status état	date	
nouveau	12/04/1996	

ANNEXE B

Confirmation par un réseau de diodes

Les conditions d'analyse par CLHP sont les mêmes que celles mentionnées à la section 8.3 à l'exception de la détection par réseau de diodes. Le signal est surveillé à 242 nm avec une largeur de pic de 40. Les spectres sont enregistrés entre 190 et 600 nm à intervalles de 2 nm, à compter de sept minutes après la mise en marche de la colonne jusqu'à la fin de la période d'exécution. On compare les spectres obtenus à partir de la solution étalon d'acide domoïque à ceux provenant des extractions d'échantillon. Les spectres provenant d'un échantillon de myes contenant 6 μg d'acide domoïque/g sont représentés dans la figure 1.

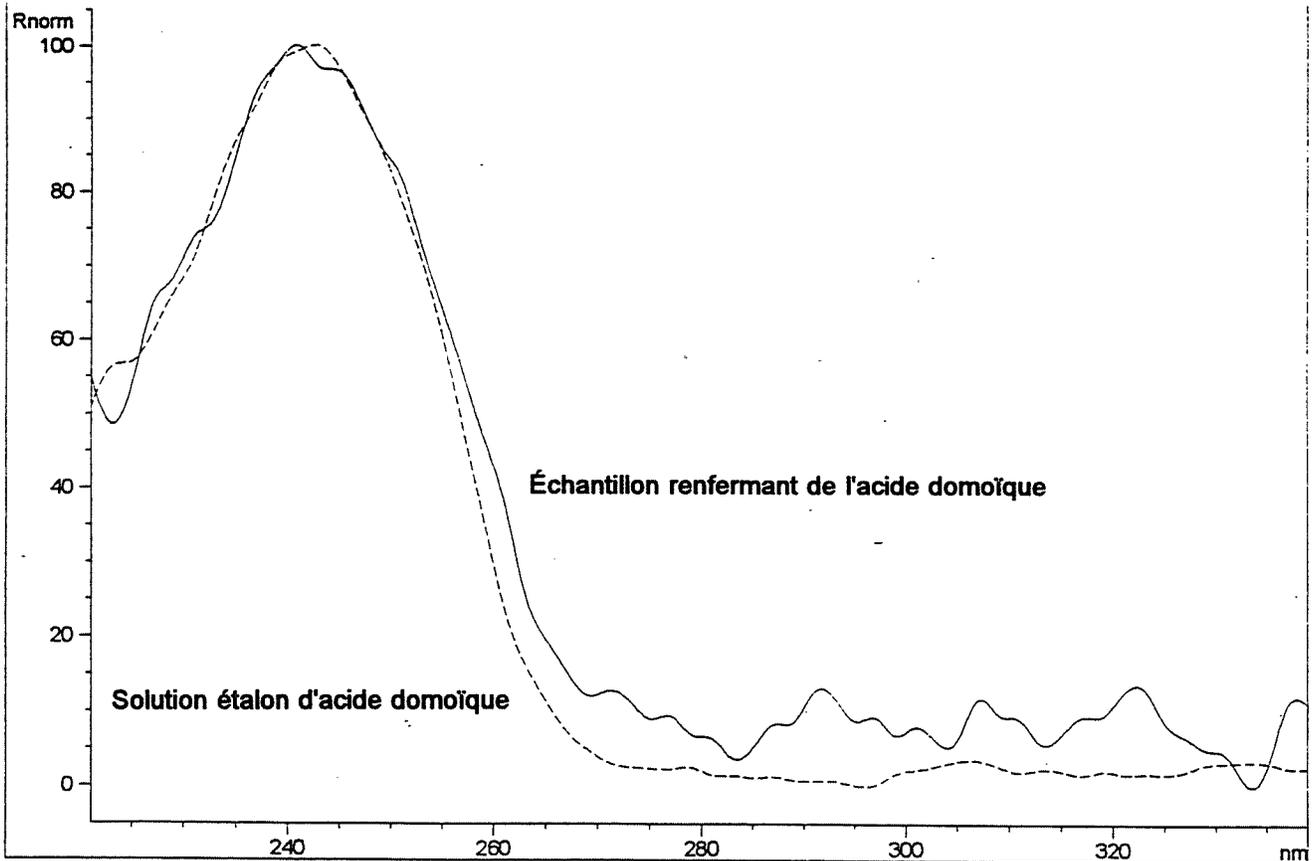


Figure 1. Spectres de détection par réseau de diodes couplés à une CLHP d'un échantillon de myes renfermant 6 μg d'acide domoïque par g. Les conditions de fonctionnement de la CLHP, les mêmes que celles indiquées dans la figure 1 de l'Annexe A. Spectres de détection par réseau de diodes enregistrés entre 190 et 600 nm à intervalles de 2 nm.