

Université de Jijel

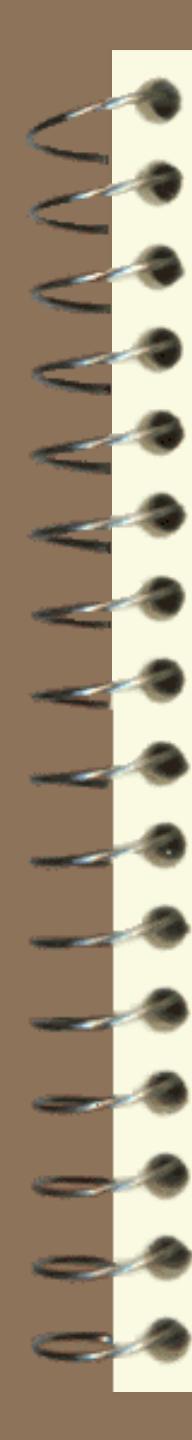
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

**Département de Microbiologie Appliquée et
Sciences Alimentaires**

**Master II: Agroalimentaire et Contrôle de
Qualité**

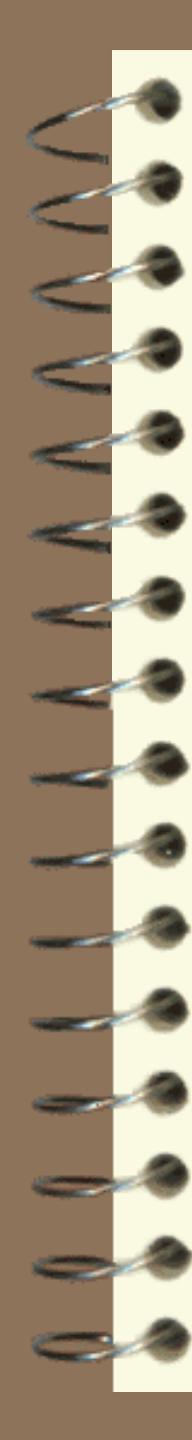
Techniques d'Analyse Toxicologique

**Cours préparés par Dr. BENHAMADA
Ouahiba**



Contenu de la matière

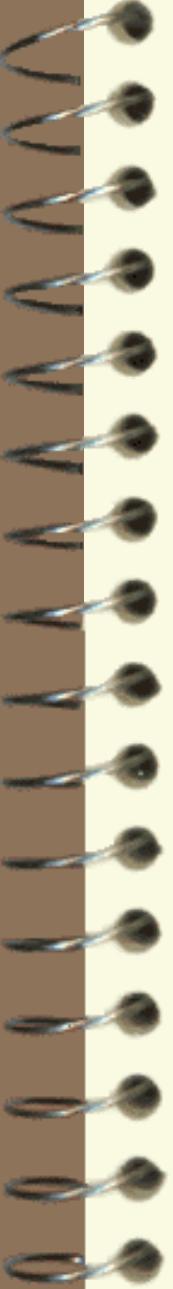
-  **Introduction**
-  **Liste des poisons dans les aliments**
-  **Les principes méthodologies de recherche**
 -  **1. Les métaux lourds**
 -  **2. Les poisons volatiles**
 -  **3. Les substances alcaloïdes**
 -  **4. Les substances non alcaloïdes**
 -  **5. Les halogènes et sels**
 -  **6. Les nitrates et nitrites**
 -  **7. Les hydrocarbures**
 -  **8. Les pesticides**
 -  **9. Les traces d'antibiotiques**



Introduction

 La toxicologie analytique est l'une des branches de la médecine. Elle repose sur la recherche et l'analyse des substances toxiques dans différents produits : médicaments, cosmétiques, aliments, produits chimiques (produits d'entretien, peintures, solvants...).

Ces poisons peuvent être d'origine animale (venin), végétale (plante vénéneuse), bactérienne, chimique... Le but est de détecter ces substances toxiques mais aussi de lutter contre leurs effets néfastes dans l'organisme ou l'environnement et de les éliminer.



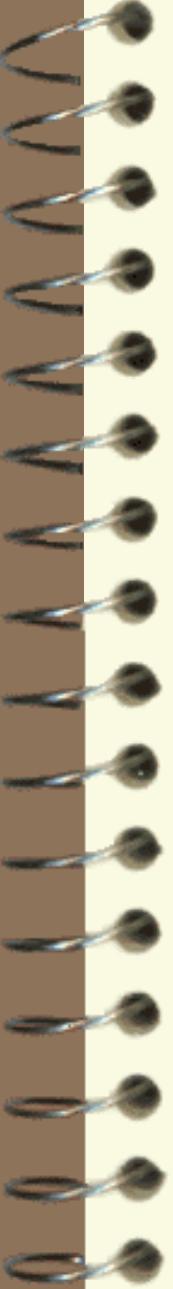


Liste des toxiques des aliments

I – Substances nocives naturelles

 Les substances nocives des aliments peuvent être classées en deux groupes :

- A : **Les antinutriments** dont l 'effet toxique est de rendre moins disponibles les nutriments, ou d 'entraîner des pertes supplémentaires.
- B : **Les substances naturelles toxiques: amines biogènes** dont l 'effet néfaste n 'est pas compensable par un apport supplémentaire de nutriments. Elles existent cependant à l'état naturel en quantités infimes dans certains produits comme l'épinard, la banane, la tomate ou l'orange .



A - SUBSTANCES ANTINUTRITIVES

1. Inhibiteurs enzymatiques

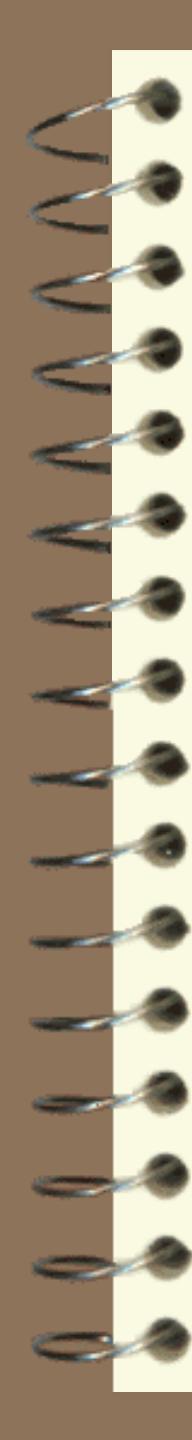
-  **1.1. Anticarbohydrases** Extrêmement répandus dans les pommes de terre, le maïs, le blé, les légumineuses. , interfèrent sur les protéases et les carbohydrateases.
-  **1.2. Antitrypsine**
 -  **1.2.1. Antitrypsines d'origine animal: Ovomucoïde** présent dans le blanc d 'œuf et Colostrum
 -  **1.2.2. Antitrypsines d'origine végétale** très répandues dans soja, haricots, petits pois, les lentilles

2. Substances interférant avec l'assimilation de minéraux indispensables

-  **2.1. Substances antithyroïdiens** Les aliments les plus visés: le chou
-  **2.2. Acide oxalique** les aliments les plus visés sont rhubarbe, épinards, pommes de terre, cacao et le thé.
-  **2.3. Acide phytique** très répandu les céréales, légumineuses et les oléagineuses

3. Substances antivitaminiques

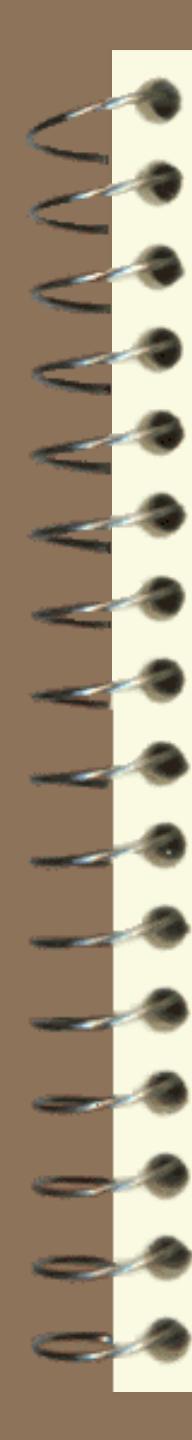
-  **3.1. Antithiamines** présents dans les fougères, les poissons, les crustacées, les mollusques, les bactéries de tube digestif.
-  **3.2. Acide ascorbique oxydase** Présente dans l'apulpe des cucurbitacées, dans le chou, les carottes, les pommes, les tomates, les petits pois (assez peu riches en vitamine C).
-  **3.3. Antibiotine** présent dans le blanc d 'œuf.



II. Contaminants chimiques des aliments



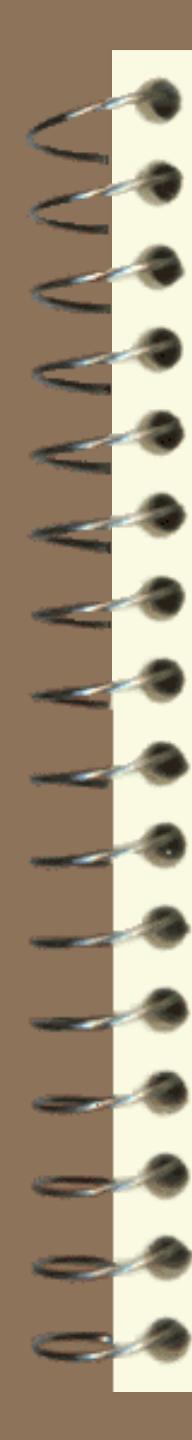
II.1. Additifs alimentaires



A. Les conservateurs

1. Nitrites et nitrates: conserves de poissons

2. Sulfites et dérivés: contre le brunissement enzymatique

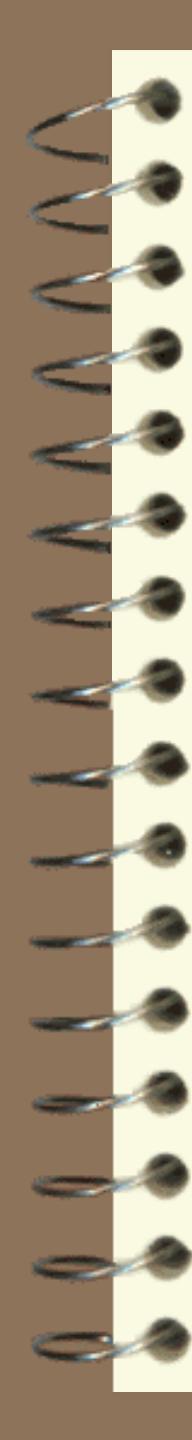


B. Colorants

- Colorant de synthèse
- D'origine naturelle

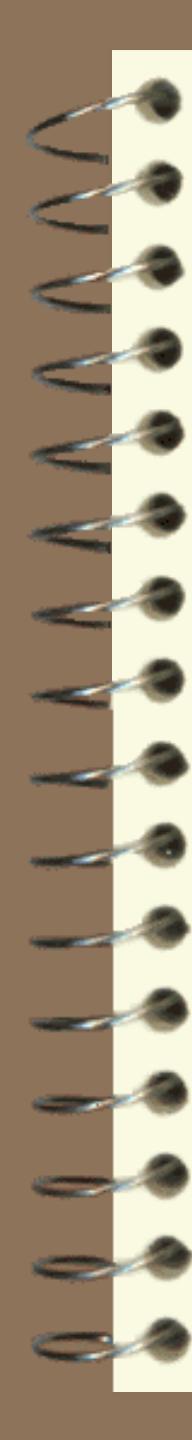
C. Epaississants, gélifiants

- Nature polyglucidique normalement peu génératrice d'inquiétudes particulières sur le plan toxicologique, mais il semblerait que ces composés soient des immunosuppresseurs, capables d'induire des atteintes de la production d'anticorps et de l'immunité antitumorale.



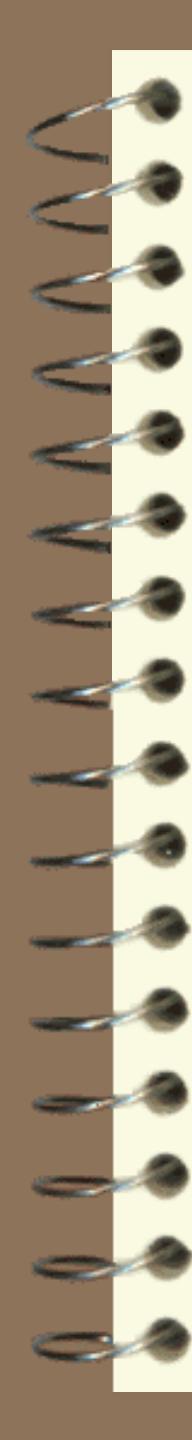
D. Emulsifiants

 Dérivés plus ou moins complexes d'acides gras généralement saturés présentent quelques risques cardio-vasculaires



E. Les antioxygènes

- protéger l'autoxidation d'un grand nombre de produits.
- En alimentation contre le rancissement des graisses.



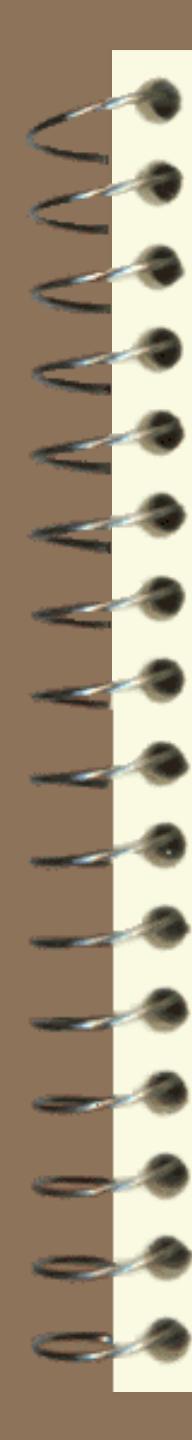
II.2 Résidus des pesticides

- Beaucoup de ces résidus chimiques, en particulier les dérivés de composés chlorés, sont sujets à la bioaccumulation qui peut conduire à des niveaux nocifs dans le corps et dans l'environnement.
- Les produits chimiques persistants peuvent s'accumuler dans la chaîne alimentaire et ont été détectés dans des produits aussi divers que la viande, la volaille et le poisson, les huiles végétales, les noix et divers fruits et légumes.

II.3. Métaux lourds

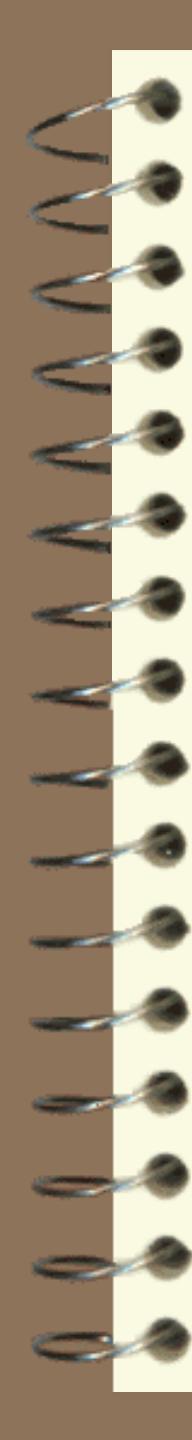
Origine de contamination

- **Environnementales** (traitements agricoles, pollutions accidentelles, fumées et pollution atmosphérique...)
- **Matériaux de contact** (emballages, équipements industriels...)



Les plus toxiques

- Arsenic: c'est un métalloïde assez faible dans certains produits agricoles (vins issus de vieilles vignes)
- Plomb: les eaux de boissons, dans les industries alimentaires par contacte par les soudures.
- Mercure: présent dans l'eau et par conséquent s'accumule à travers la chaîne alimentaire.
- Cadmium: Largement utilisé comme revêtement anticorrosion, pour la fabrication d'accumulateurs



II.4. Résidus d'emballage

- Certains constituants de l'aliment peuvent être absorbés par l'emballage au risque de détériorer ce dernier et de nuire à la qualité de l'aliment. Il peut s'ensuivre un transfert de substances volatiles au travers du matériau à l'origine soit d'une perte d'arôme pour l'aliment, soit d'une contamination de ce dernier par des gaz ou des odeurs provenant de l'extérieur.
- Ces échanges peuvent s'accompagner aussi d'une « migration » de constituants du matériau d'emballage vers l'aliment. Ce phénomène de migration concerne tous les emballages et des milliers de substances.

III. Contaminants d'origine microbienne: Toxines



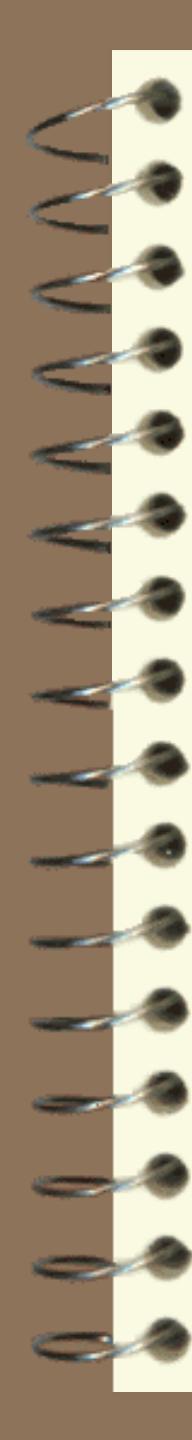
1. Toxines des champignons

- Deux types de manifestation :
 - Soit immédiatement après ingestion - spectaculaire, mais peu grave
 - Soit après une dizaine d 'heures
- Symptômes rapides :
 - gastroentérites,
 - diarrhées passagères
 - Symptômes « lents » : les plus graves
- Symptômes « lents » : les plus graves

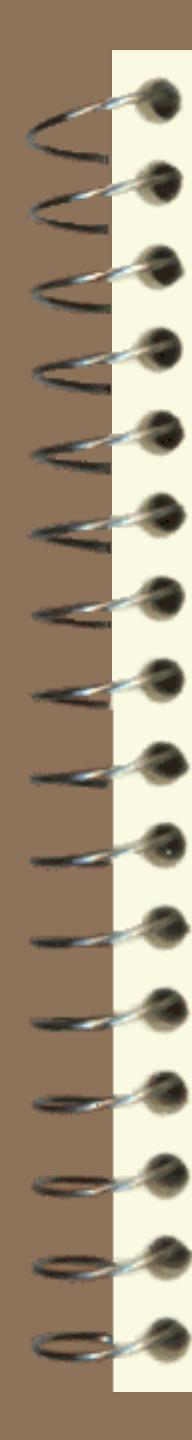
Les espèces les plus impliquées

- *1. Amanites phalloïdes* (la toxine s'appelle amanitine), contamine généralement les conserves des champignons
- Amanite phalloïde l'agaric des jachères



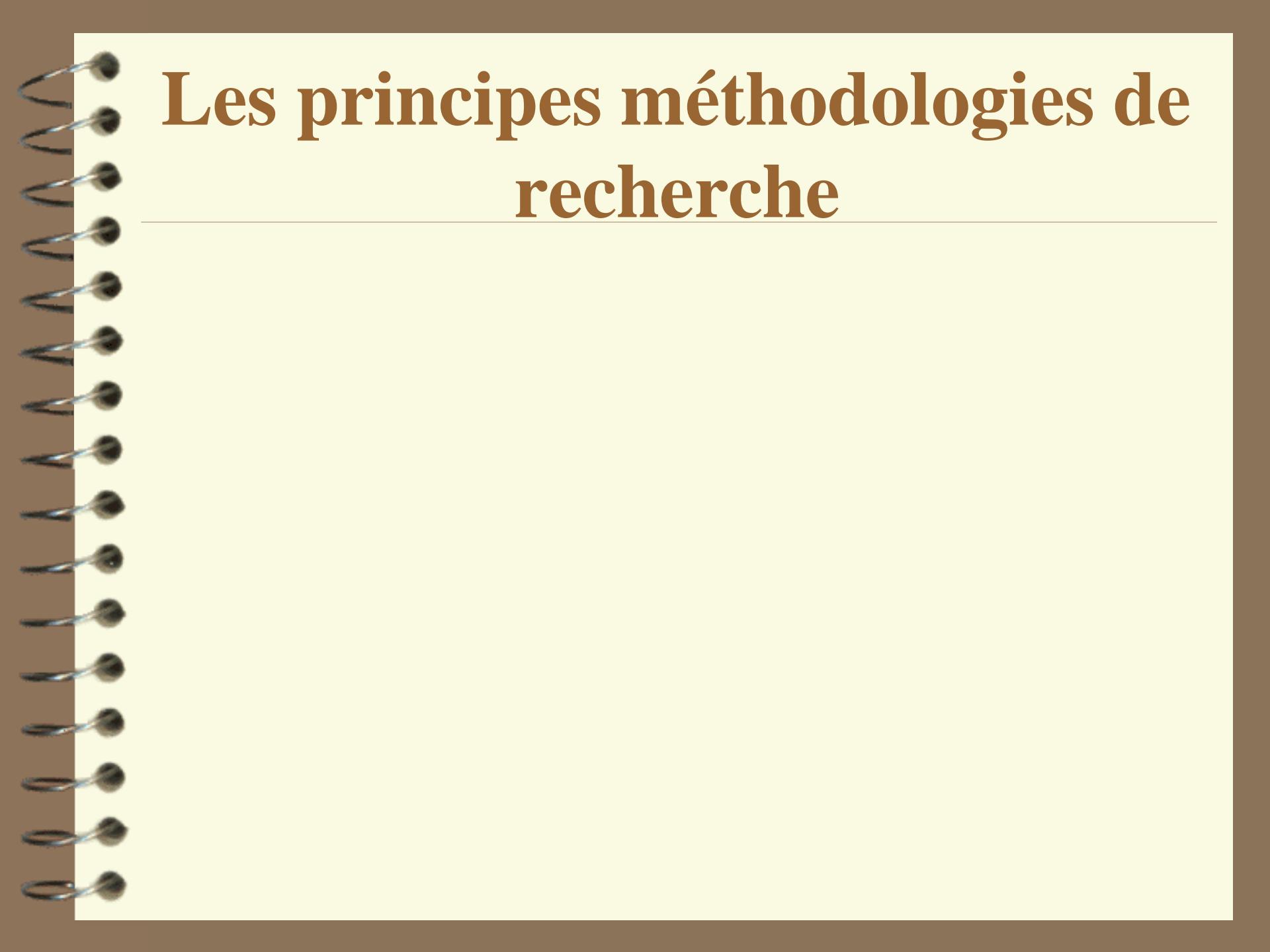


2. *Aspergillus niger* (aflatoxine) présent dans les céréales, dont la consommation continue provoque des cancers du foie.



2. Toxines des animaux

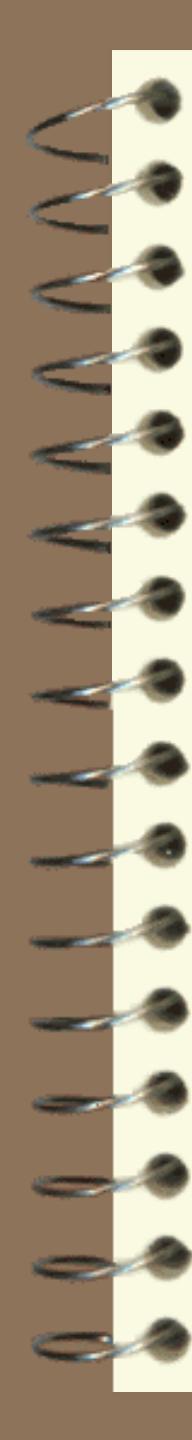
- Majoritairement d 'origine bactérienne
- On a longtemps cru que ces toxicités étaient propres aux espèces (poissons toxiphores)
- **Ichtyosarcotoxisme** provoqué par :
 - tétrodoxine (chair des « poissons-globes ») Intoxication par les tétrodoxines très grave, souvent mortelle
 - Ciguatoxine (provenant des dinoflagellés), très répandue dans les mers chaudes provoque des troubles digestifs et neurologiques, mortels dans 2 % des cas.
- **Cothurnisme** : provoqué par la consommation de cailles, entraîne une myoglobinurie, analogies fortes avec le favisme.



Les principes méthodologies de recherche

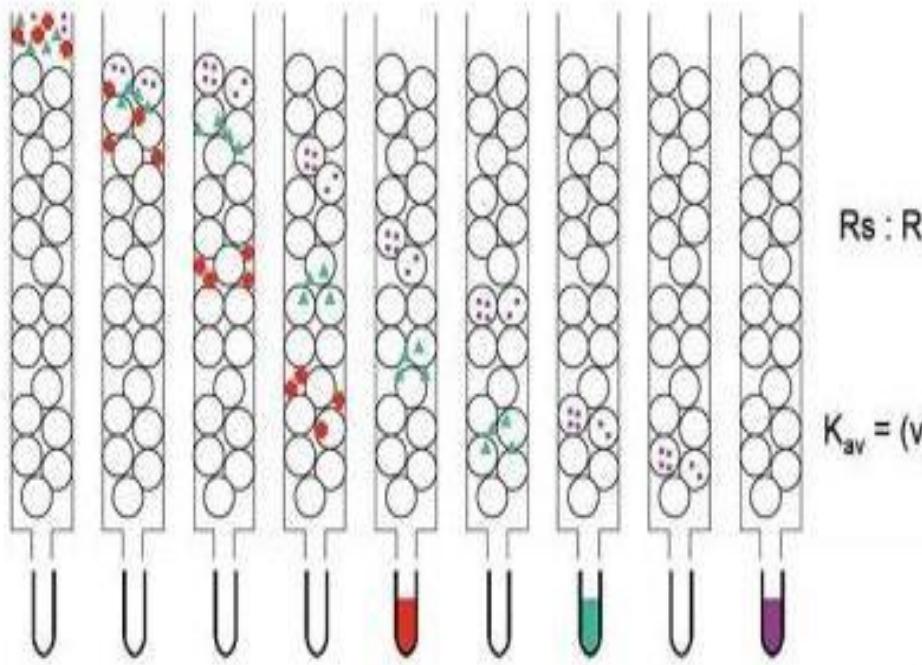
I. Méthodes chromatographiques

-
- La chromatographie est une méthode séparative qui permet l'identification et le dosage des différents composés d'un mélange. Le principe est basé sur les différences des composés d'affinité du mélange avec la phase stationnaire et la phase mobile. La chromatographie traduit la variation du soluté dans l'éluant en fonction du temps.
 - La chromatographie permet également d'effectuer des dosages avec une grande précision. Les principales méthodes de dosage sont la normalisation interne, la méthode des ajouts dosés et l'étalonnage interne. L'étalonnage externe peut également être effectué sous certaines conditions.



I.1. La chromatographie d'exclusion

- Egalement appelé tamisage moléculaire ou gel-filtration, vise à séparer les molécules en fonction de leur masse moléculaire, bien que la forme intervienne également.
- La phase stationnaire est donc solide (les billes) et la phase mobile est liquide (un tampon dont le flux entraîne les molécules). Selon la taille des pores des billes, on peut séparer efficacement des molécules dont la masse moléculaire est comprise dans une fourchette différente.



Rs : Rayon de Stokes

$$K_{av} = (v_e - v_0) / (v_t - v_0)$$

- ◆ : Rs élevé
- ▲ : Rs moyen
- : Rs petit

v_0

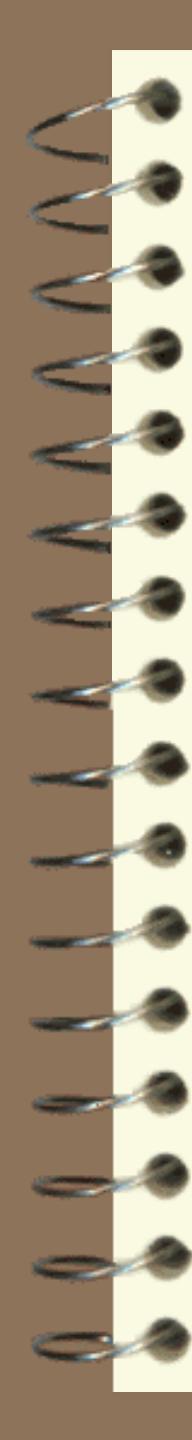
v_0

v_t

$v_t - v_0$

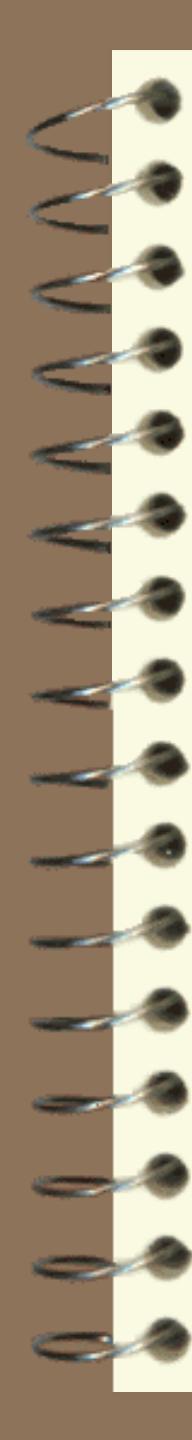


Figure 1 - Schéma du principe de séparation de la chromatographie d'exclusion



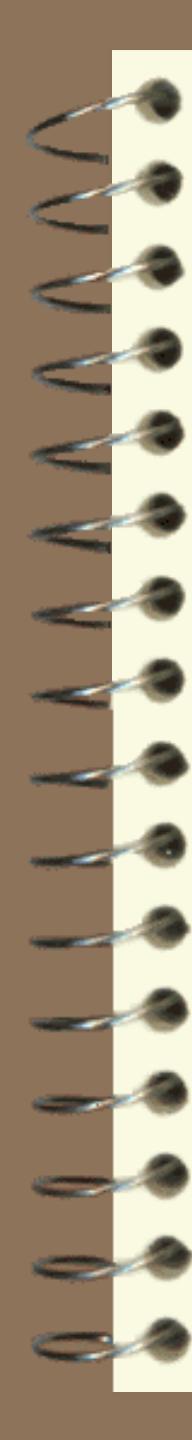
I.2. La chromatographie échangeuse d'ions

 Dans la chromatographie échangeuse d'ions, le paramètre qui va permettre la séparation des différents constituants est la charge nette. Pour cela, on utilise des résines chargées positivement (chromatographie échangeuse d'anions) ou négativement (chromatographie échangeuse de cations).



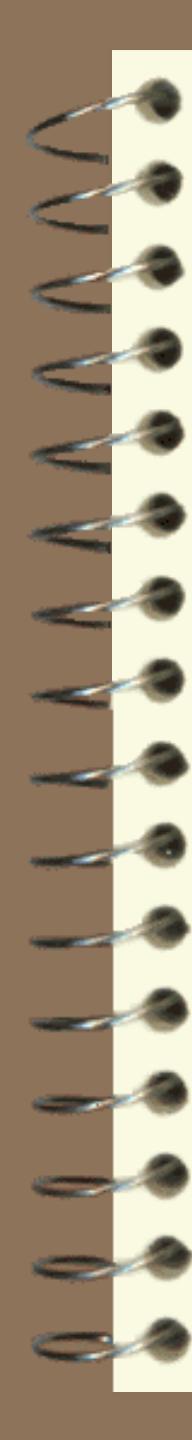
I.3. La chromatographie de partage en phase gazeuse

 La chromatographie de partage en phase gazeuse utilise comme principe de séparation le partage différentiel des molécules à séparer dans les deux phases stationnaires et mobiles. Dans ce type de chromatographie, la phase stationnaire est un film liquide très fin qui recouvre la surface intérieure d'un tube (la colonne), et la phase mobile est un gaz (d'où son nom).



Cette technique nécessite de vaporiser l'échantillon à analyser avant son injection dans la colonne. Pour cela, l'échantillon doit être chauffé.

En général, le gaz utilisé est le plus ~~meilleur~~ possible. Le plus souvent, on utilise de l'hélium ou de l'azote. L'hydrogène possède également des caractéristiques très intéressantes, mais s'agissant d'un gaz dangereux (risque d'explosion), il est beaucoup moins utilisé.



Etapes de la CPG

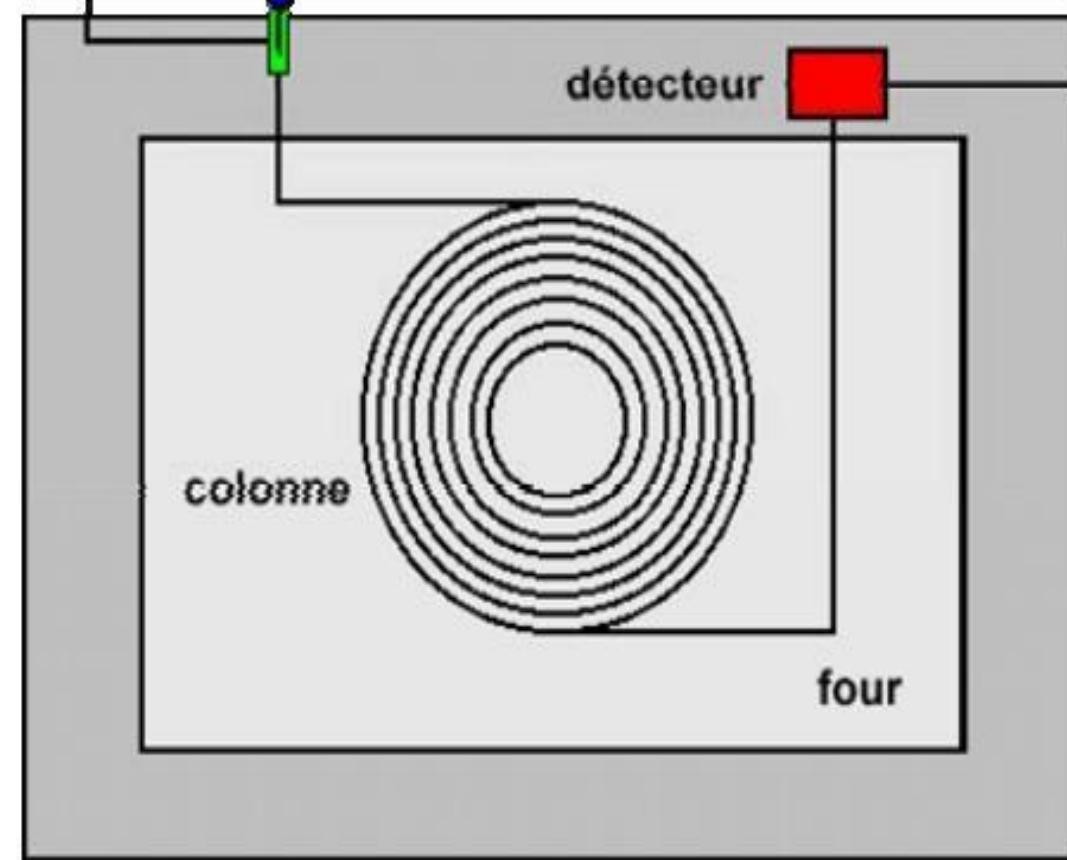
- Injection du mélange à séparer dans l'injecteur
- Vaporisation du mélange à chaud
- Transport de ce nuage à travers une colonne grâce au gaz vecteur
- Séparation à chaud, grâce à la colonne et sa phase stationnaire
- Détection des produits à la sortie de la colonne.

gaz vecteur
injecteur

détecteur

colonne

four



I.4. La HPLC (chromatographie liquide de haute performance)

¶ La HPLC est largement utilisée comme technique analytique et préparative.

¶ La phase mobile est liquide

¶ Il existe deux possibilités : soit la phase stationnaire est polaire (on parle de HPLC en phase normale), soit elle est apolaire (on parle de HPLC en phase inverse).

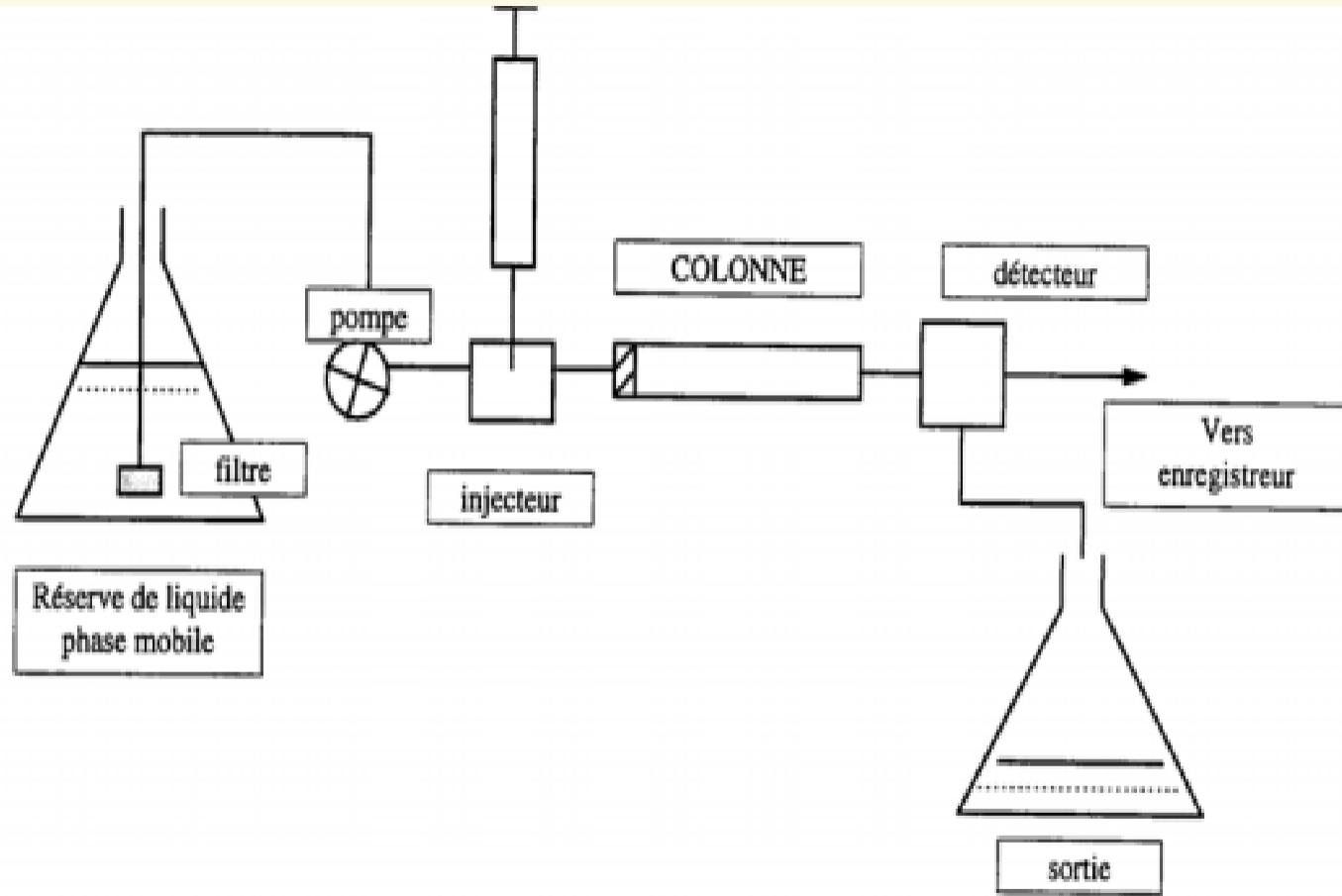


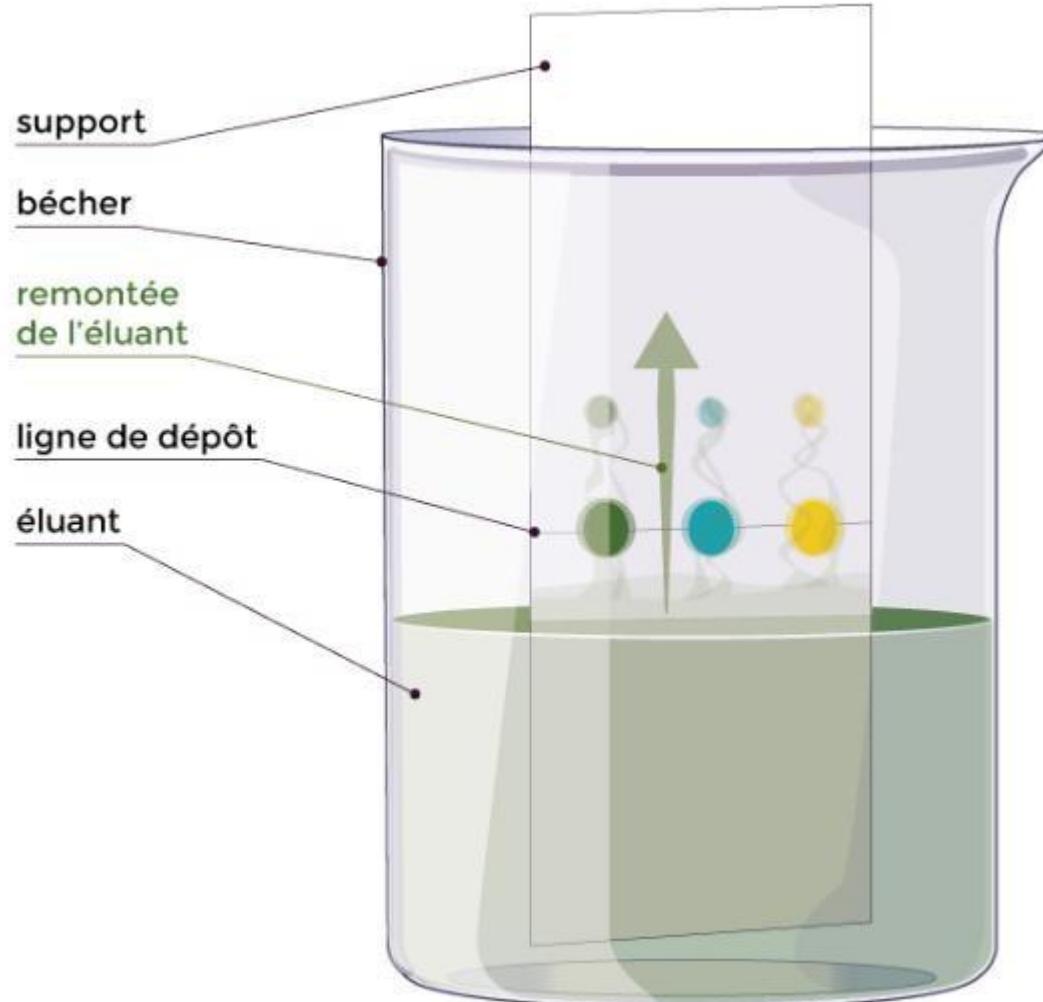
Figure 3 : principe de fonctionnement de l'HPLC

I.5. Chromatographie sur couche mince

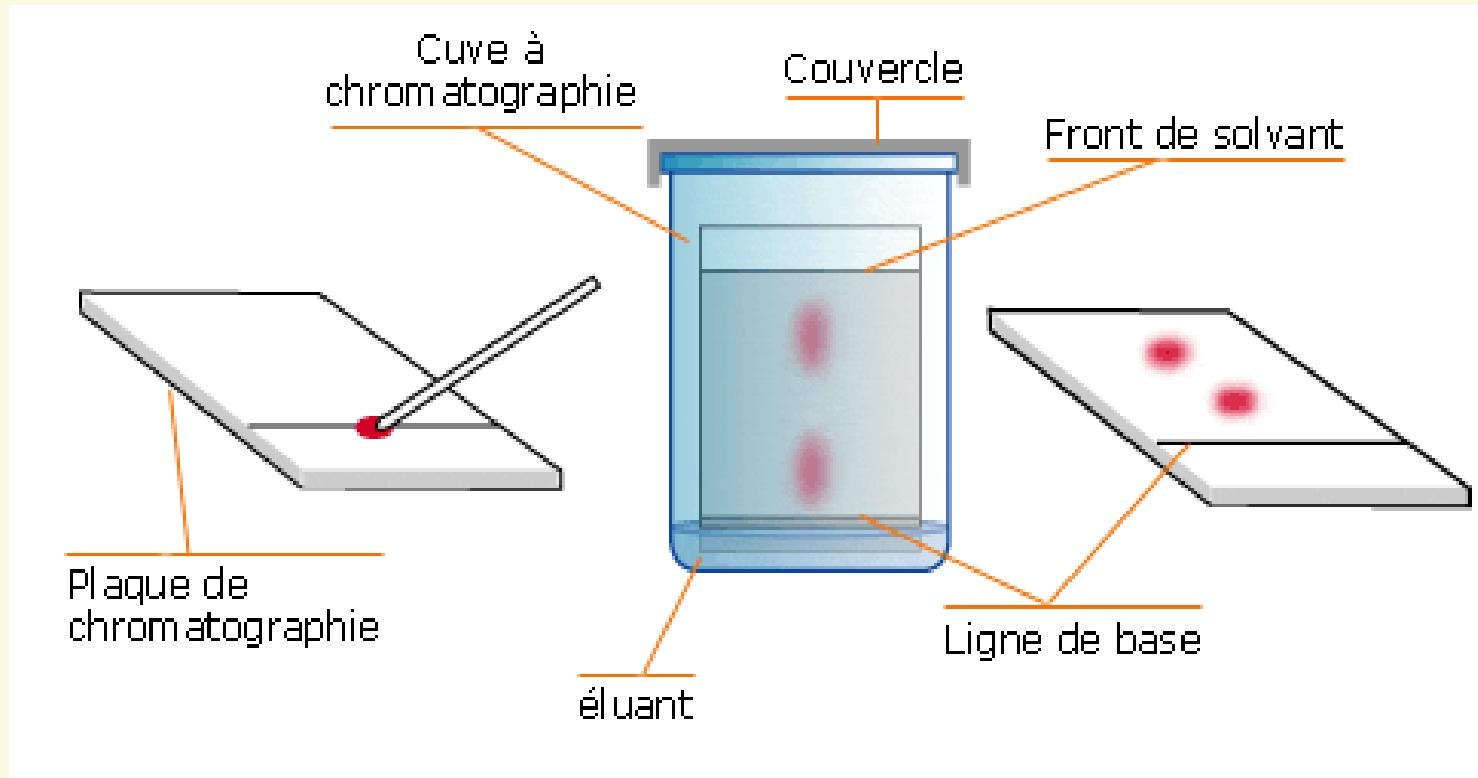
 La Chromatographie sur Couche Mince (C.C.M) est une technique qui permet d'identifier les constituants d'un mélange.

 Les constituants d'un mélange homogène sont séparés par entraînement au moyen d'un solvant (nommé éluant ou phase mobile) sur un support (nommé phase fixe ou stationnaire).

Montage d'une CCM

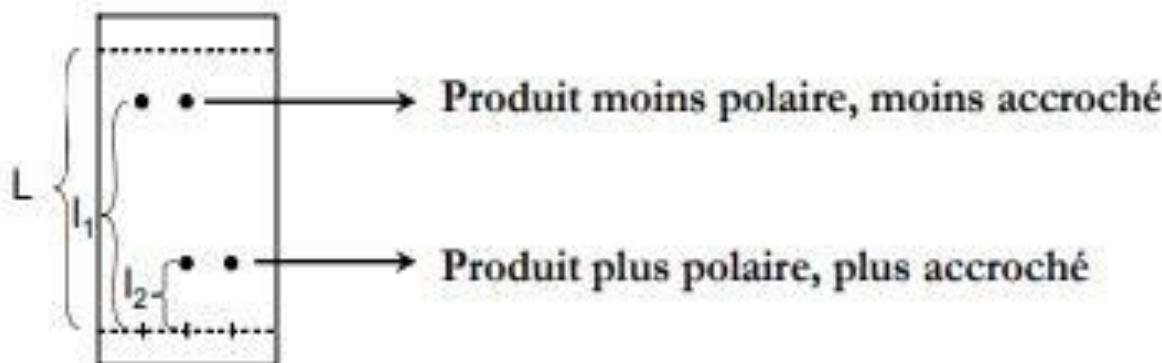


Protocole de la chromatographie sur couche mince



Mesure du R_f

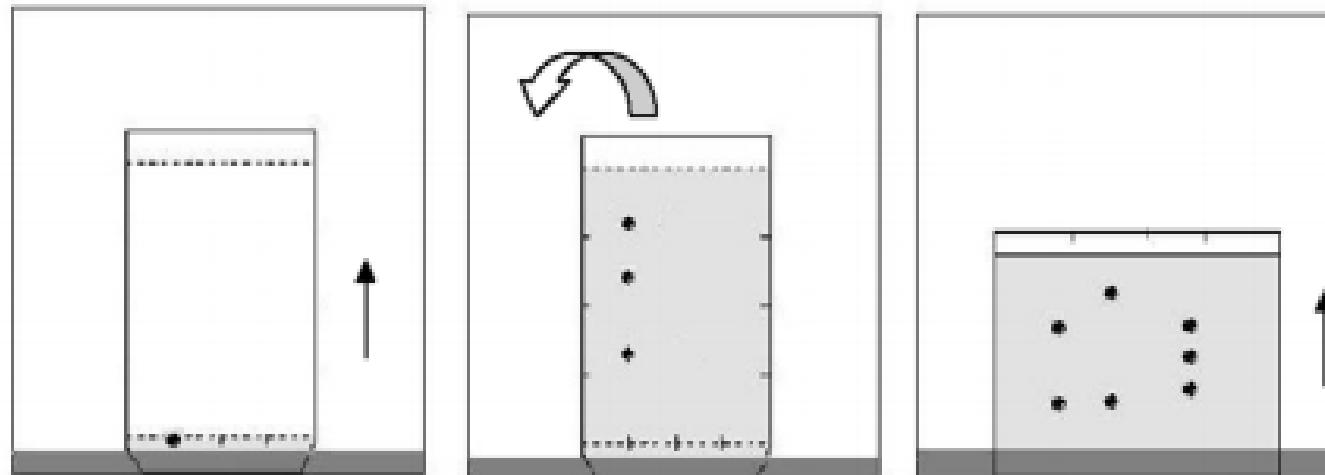
Le R_f (rapport frontal ou rétention frontale) est caractéristique d'un produit dans un éluant donné et pour une phase stationnaire donnée.



$$R_f = \frac{\text{Hauteur de migration}}{\text{Hauteur du front de solvant}} = \text{valeur entre 0 et 1}$$

CCM bidirectionnelles

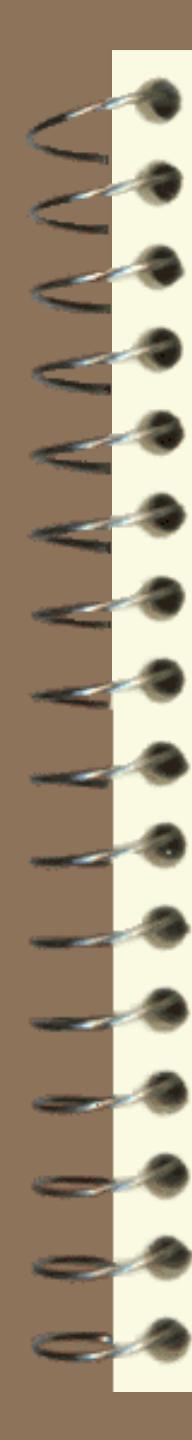
C'est une expérience qui permet de prouver si un produit décompose sur la silice, ou si un "spot" de la CCM contient en fait deux produits.



Si élué dans un autre solvant

I.6. Chromatographie sur papier

- est une méthode de séparation dont le principe repose surtout sur des phénomènes de partage. La phase mobile est le plus souvent un solvant organique et l'eau ; la phase stationnaire est constituée par l'eau elle même, absorbée par la cellulose du papier ou liée chimiquement à elle
- l'échantillon, mis en solution, est déposé en un point ~~spè~~ du papier et le solvant qui se déplace par capillarité fait migrer les composants de l'échantillon à des vitesses variables selon leur solubilité.
- les composés les plus solubles dans l'eau ou ceux qui forment facilement des associations par liaisons hydrogène sont fortement retenus par la phase stationnaire et migrent donc lentement.



¶ elle est employée principalement pour l'analyse de composés très polaires, tels que les acides aminés, les sucres et les composés polyfonctionnels.

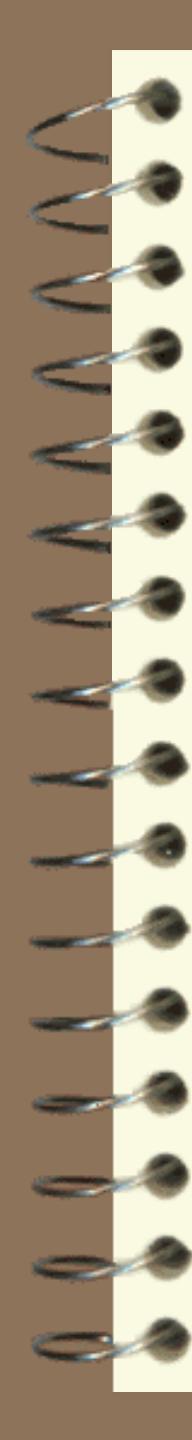
¶ Ses plus grands inconvénients par rapport à la CCM sont :

- une durée de développement beaucoup plus longue
- une séparation généralement moins bonne.

Papier utilisé (phase stationnaire)

 papier filtre ordinaire, mais il est préférable de procurer du papier conçu pour cet usage, ayant un faible taux d'impuretés et dont les caractéristiques physiques sont uniformes.

 Les marques principales sont Whatman (8 catégories dont le n°1 est le plus utilisé), Schleider et Schüll, Durieux, Arches.



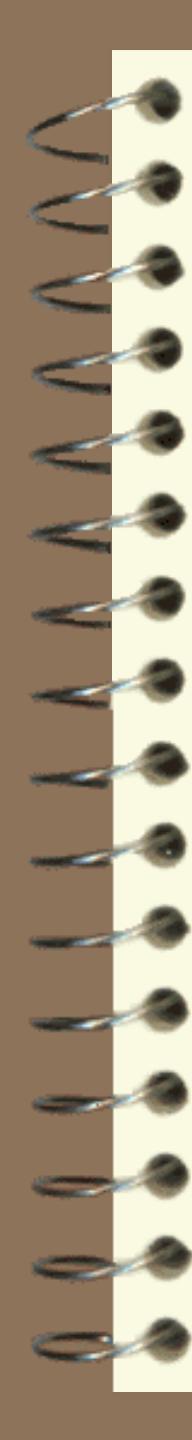
II. Les méthodes spectrales

 La spectroscopie, ou spectrométrie, est l'étude expérimentale du spectre d'un phénomène physique, c'est-à-dire de sa décomposition sur une échelle d'énergie, ou toute autre grandeur se ramenant à une énergie (fréquence, longueur d'onde, etc.).

 Historiquement, ce terme s'appliquait à la décomposition, par exemple par un prisme, de la lumière visible émise (spectrométrie d'émission) ou absorbée (spectrométrie d'absorption) par l'objet à étudier.

II.1. La spectroscopie d'absorption

- La spectroscopie d'absorption est une **technique** dans laquelle la puissance d'un faisceau de lumière avant et après interaction avec un échantillon est comparée.
- Techniques d'absorption spécifiques ont **tendance** à être visibles par la longueur d'onde de rayonnement mesuré comme ultraviolette, la spectroscopie d'absorption infrarouge.



a. La spectroscopie UV

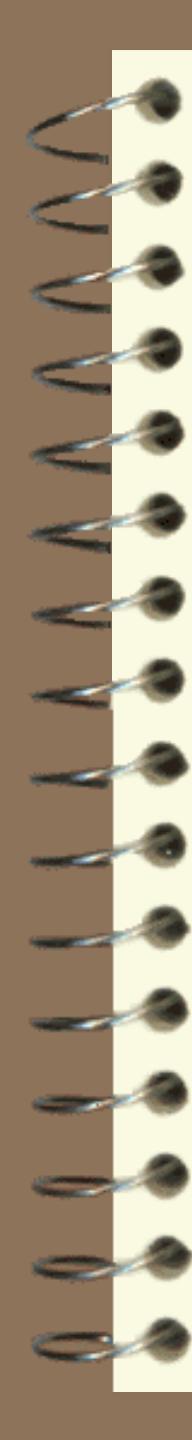
 Elle peut être employée pour mesurer la concentration de la protéine et de l'ADN dans une solution. Beaucoup d'acides aminés (tryptophane y compris) absorbent la lumière dans la gamme de 280 nm tandis que l'ADN absorbe la lumière dans la gamme de 260 nm.

b. La spectroscopie d'infra rouge

 la spectroscopie d'IR mesure les différents types de vibrations obligatoires inter atomiques à des fréquences différentes, c'est une méthode importante pour l'analyse des constituants tels que des polymères , des charges, des pigments et des plastifiants

II.2. La spectroscopie d'absorption atomique

 la **SAA** est une technique de spectroscopie atomique servant à déterminer la concentration des éléments métalliques ainsi que les métalloïdes dans un échantillon. Ceux-ci sont atomisés à l'aide d'une flamme alimentée d'un mélange de gaz ou d'un four électromagnétique.



une flamme d'une plus basse température est employée pour ne pas exciter les atomes de l'échantillon. L'excitation par contre est réalisée par une lampe qui brille à travers la flamme à différentes longueur d'onde pour chaque type de substance à analyser.

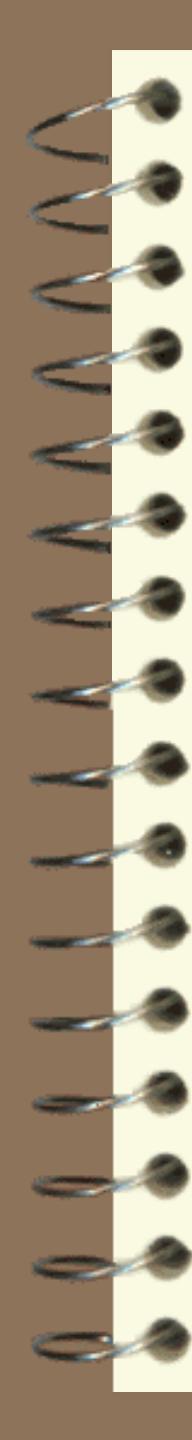
La quantité d'analyte actuelle dans l'échantillon d'étude est déterminée en se basant sur l'intensité de la lumière absorbée.

l'atomisation, étape pendant laquelle un échantillon en solution est transformé en vapeur atomique en utilisant une source de chaleur appropriée.

La solution de l'échantillon est chauffée dans l'instrument à une température entre 2000 et 3000 °C pour couper les liaisons chimiques, libérant les éléments et les transformant dans l'état atomique gazeux, c'est l'atomisation gazeux (aérosol en vapeur atomique).

II.3. La spectroscopie d'émission atomique

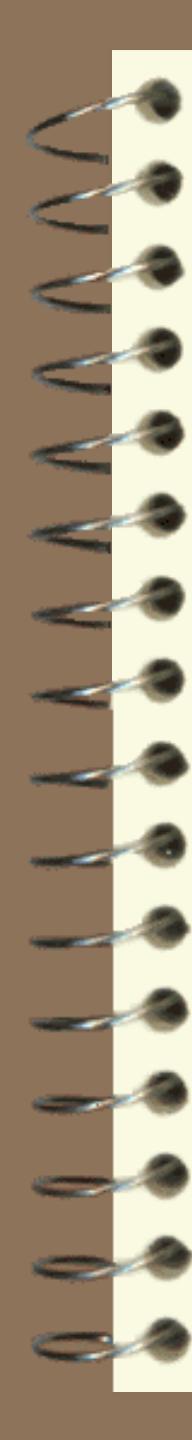
- Cette méthode utilise l'excitation des atomes de l'échantillon à analyser pour émettre de la lumière par une chaleur supérieur à celle de SAA.
- Utilisée généralement pour l'analyse d'éléments alcalins.



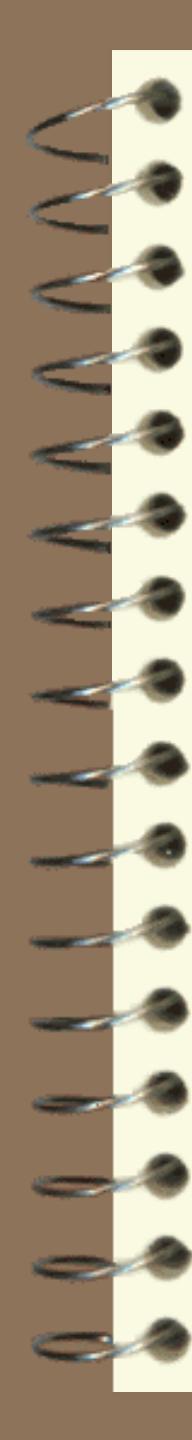
II.4. La spectroscopie de fluorescence

■ La spectroscopie de fluorescence, ou ~~en~~ fluorométrie ou spectrofluorométrie, est un type de spectroscopie électromagnétique qui analyse la fluorescence d'un échantillon.

■ Elle implique l'utilisation d'un rayon de lumière (habituellement dans l'ultraviolet) qui va exciter les électrons des molécules de certains composés et les fait émettre de la lumière de plus basse énergie, typiquement de la lumière visible.

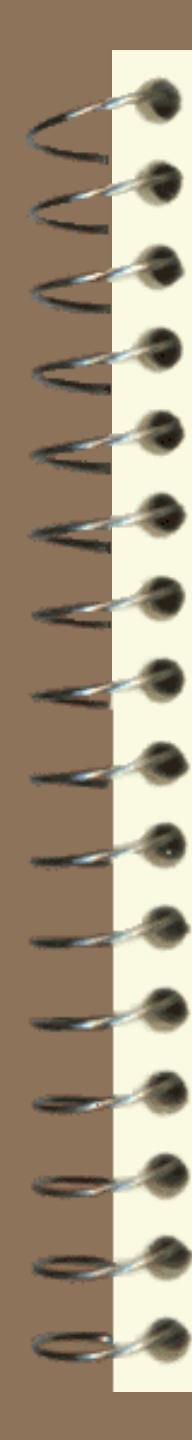


 La spectroscopie de fluorescence peut être une spectroscopie atomique ou une spectroscopie moléculaire. Pour le dosage d'ultra-traces (gamme du $\mu\text{g/L}$) l'excitation peut-être effectuée par Laser, dans ce cas il peut être réalisé une fluorescence atomique.



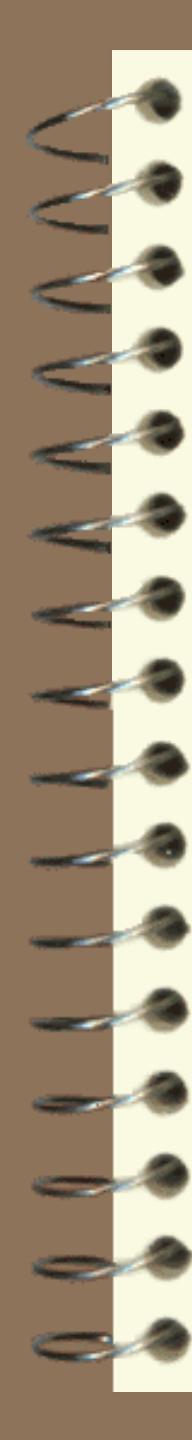
II.5. La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire

 C'est une méthode importante pour analyser les composés organiques parce qu'elle exploite les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques (produits chimiques et examen médical).



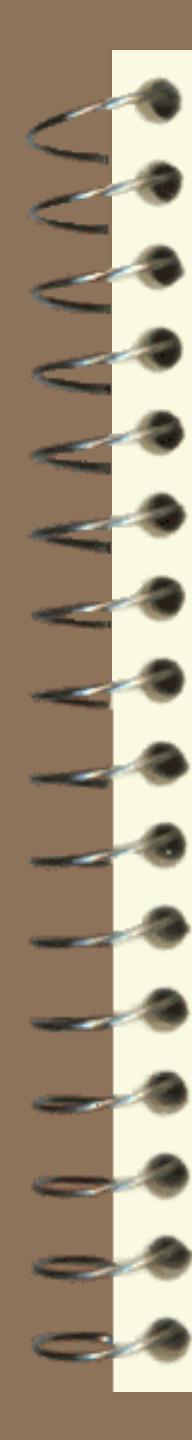
III. La filtration

- Utilisée pour faire un contrôle bactériologique des boissons et solutions consommables,
- Pour stériliser les liquides renfermant des solutions thermolabiles,
- Purifier l'eau destinée à l'industrie alimentaire
- Utilisation des membranes filtrantes de l'ade de 0,1 micron (microfiltration).



IV. Centrifugation

 Pour décanter les toxiques et les molécules à poids moléculaire faible (recherche des enzymes, des antibiotiques.....)



Techniques d'analyse

I. Analyse des colorants alimentaires

 Les colorants alimentaires sont utilisés pour ajouter de la couleur à une denrée alimentaire, ou pour simuler la couleur originale si celle-ci a été altérée par les procédés de transformation utilisés dans l'agro-alimentaire.

Analyse par CCM

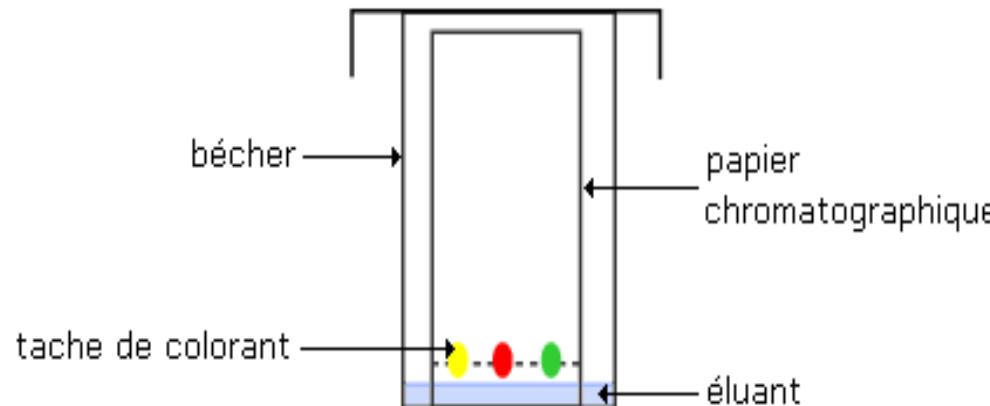
 On considère les **colorants alimentaires** vendus dans le commerce.

 Le colorant rouge est codé, selon la **nomenclature internationale**, E122 (azorubine).

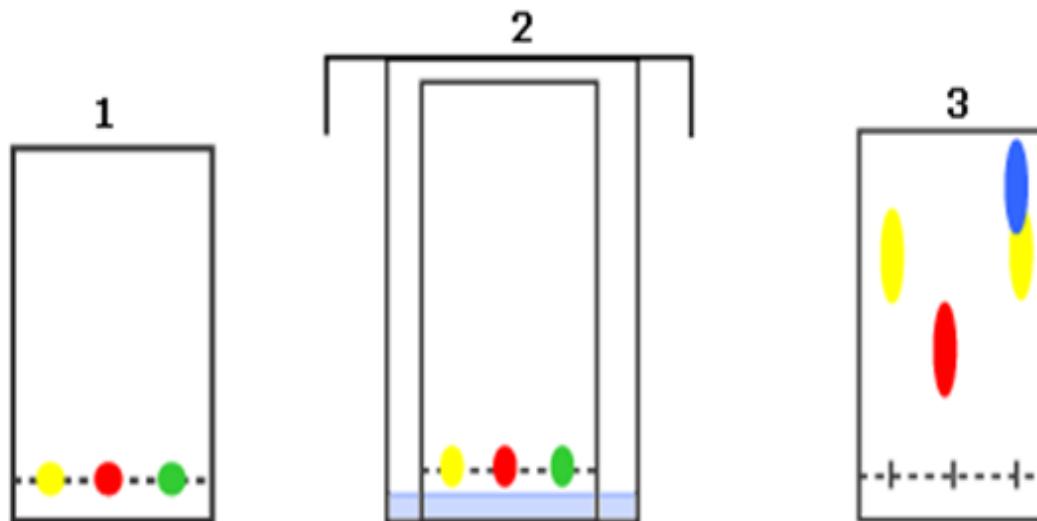
 Le colorant jaune est codé E102 (tartrazine).

 Le colorant vert n'est quant-à-lui pas codé : il s'agit du **mélange homogène** à étudier.

La phase mobile est constituée par l'eau salée

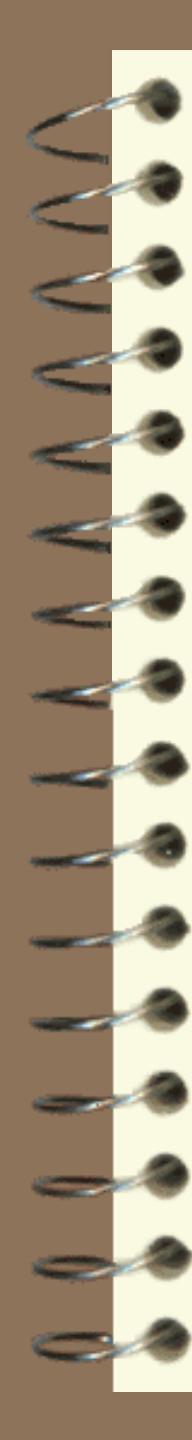


Montage pour une chromatographie de colorants alimentaires.

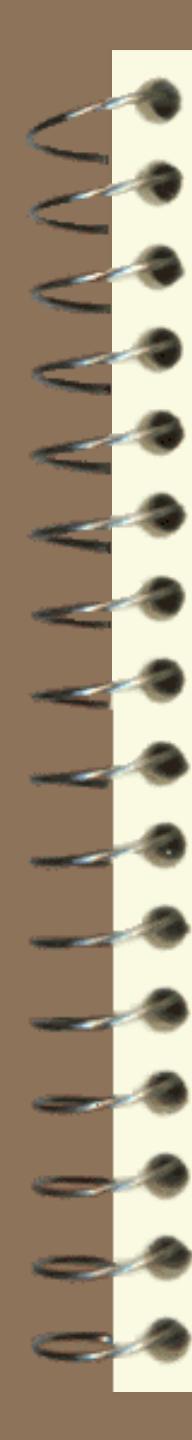


Chronologie d'une chromatographie de colorants alimentaires.

Le colorant vert est effectivement un mélange homogène constitué de deux colorants : le jaune tartrazine (E102) et le bleu patenté (E131).



II. Analyse des pesticides



II.1. Les aliments les plus riches en pesticides

■ Fruits et légumes: pommes surtout dans l'apeau, le raisin et les fraises, le poivron, la salade, les épinards et la pomme de terre, des pois, des haricots et des lentilles.

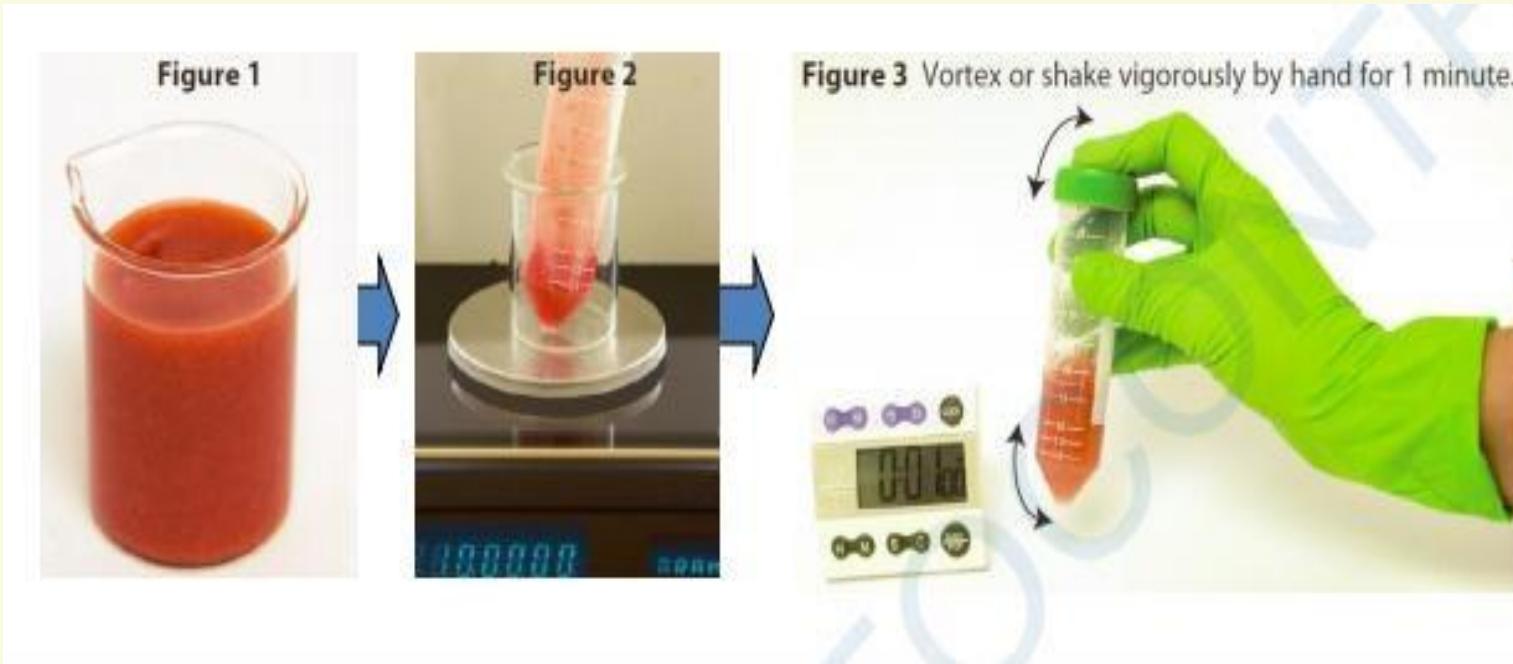
■ Viande et produits laitiers, eux-aussi touchés: herbivores et carnivores par conséquent.



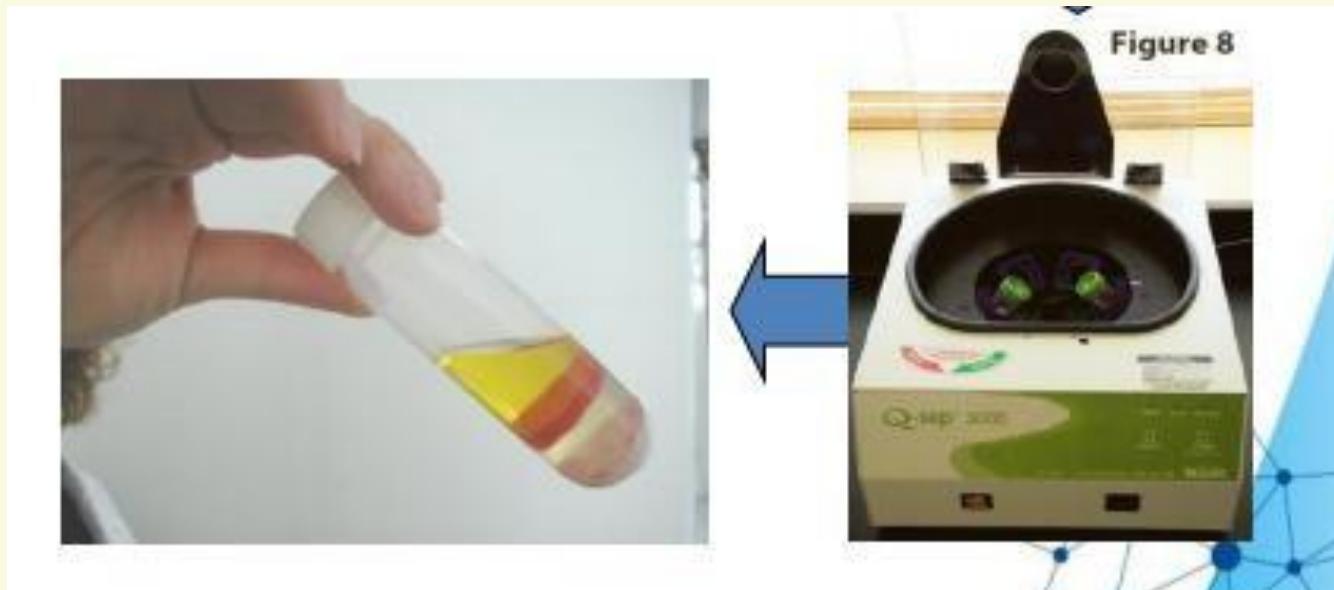
II.3. Extraction

 L'extraction des pesticides s'effectue dans d'acétonitrile en présences de sels (MgSO₄, NaCl

Exemple: tomate

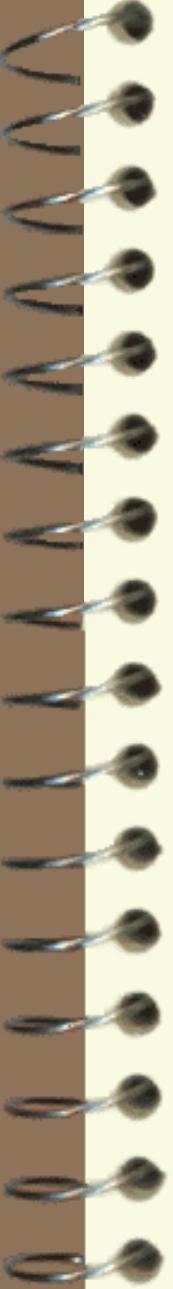


Centrifuger pendant 5 min à 3000 U / min



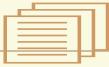
II.4. Méthodes d'analyse

- HPLC: Spécifique pour : urées, carbamates, triazines, strobilurines et la plupart des molécules polaires.
- CPG: Spécifique pour les pesticides organophosphorés, organochlorés, pyréthrinoïdes, triazoles
- Couplage GC/MS, LC/MS: elle donne des spectres reproducibles, identifiables à ceux d'une bibliothèque, pour des quantités injectées de l'ordre de 10ng/10 g.
- DéTECTEURS : visible ou UV

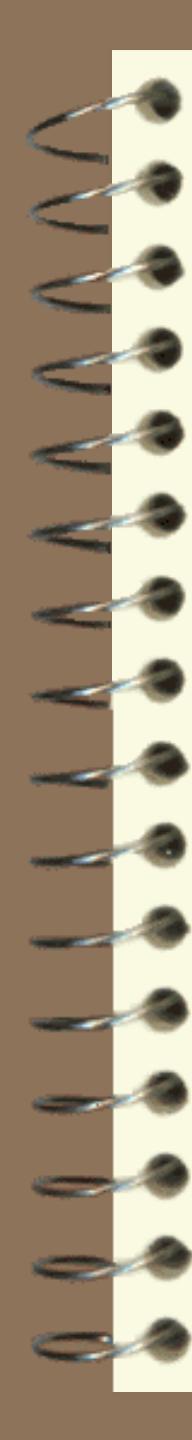


III. Les métaux lourds

III.1. Les aliments absorbant les métaux lourds

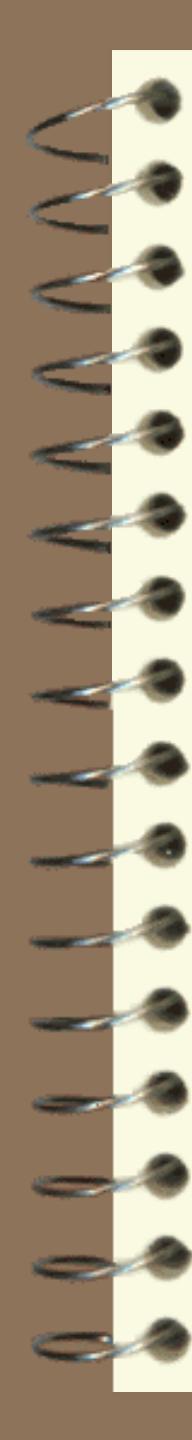
 **1. La chlorelle:** micro algue très riche en nutriments dont les protéines et les vitamines, elle a la capacité de capter les métaux lourds et notamment le plomb, le mercure et le cadmium, ainsi que les pesticides présents dans l'organisme et de les évacuer par les voies naturelles.

 **2. La coriandre:** plusieurs études ont montré que les taux de mercure, d'aluminium et de plomb dans les urines augmentent de manière considérable après avoir consommé des grandes quantités de coriandre.



3. La spiruline (une algue): malgré sa richesse en acides aminés, vitamines et minéraux particulièrement le fer et le cuivre elle est considérée comme un puissant accumulateurs de métaux lourds.

4. Le jus d'herbe d'orge: est un aliment qui est extrêmement riche en nutriments. Gorgée de chlorophylle, riche en vitamines, elle est aussi une source d'enzymes, d'oligo-éléments et d'acides aminés. Parmi ses nombreuses vertus, elle possède la propriété de piéger les métaux lourds et de détoxifier l'organisme de différents polluants.



5. La dulse: Elle est une algue particulièrement utile pour attirer le plomb, l'aluminium, le mercure, le cuivre, le cadmium et le nickel. Par rapport aux autres algues, sa particularité réside dans le fait qu'elle est très puissante pour chasser le mercure de l'organisme.

6. Les fraises: très efficaces pour évacuer le mercure. Les fibres de la fraise sont très solides et relativement difficiles, elles traversent notre système digestif sans être trop détériorées.

III.2. Extraction des métaux lourds

- L'extraction des métaux lourds s'effectue par minéralisation (digestion).
- Plusieurs solvants sont utilisés:
 - H_2SO_4 , HNO_3 , HClO_4 et par l'eau oxygénée: cas d'un aliment végétal.
 - $(\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2)$ 2V/1V:cas d'un aliment animal.
 - Acide nitrique: cas de l'eau potable.

III.3. Méthodes d'analyse des métaux lourds

La spectrométrie d'Absorption Atomique (SAA):

Les limites de Quantification sont de l'ordre de 1 à quelques mg/kg selon les matrices analysées.

La spectrométrie d'Emission Optique ou la

spectrométrie de masse couplée à un plasma

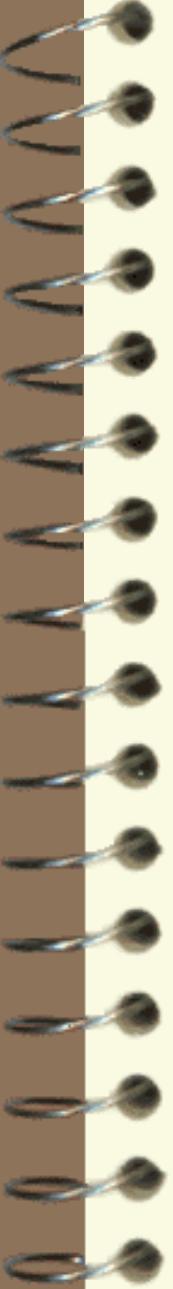
inductif (ICP-AES ou ICP-MS) : Les limites de

Quantification sont de l'ordre de 0,01 à 1 mg/kg en fonction des matrices.

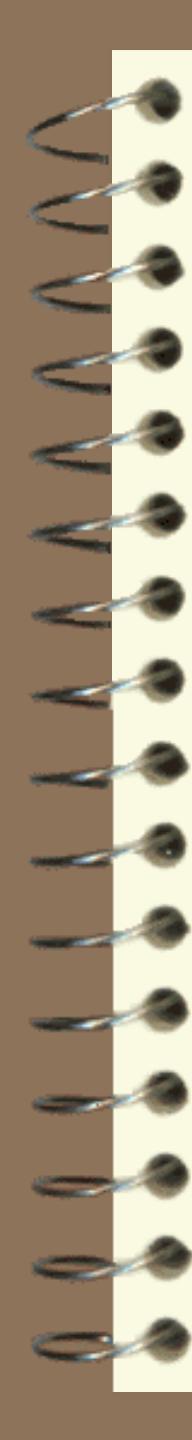
VI. Nitrates et nitrites

L'ion nitrate (NO_3^-) est la principale forme d'azote combiné trouvée dans les eaux naturelles. Il constitue le stade final de l'oxydation de l'azote.

La concentration des ions nitrate et nitrite est mesurée pour différentes activités et applications réglementaires: qualité de l'eau potable, le contrôle de l'affluent et de l'effluent d'usines d'épuration, Politique de protection des sols

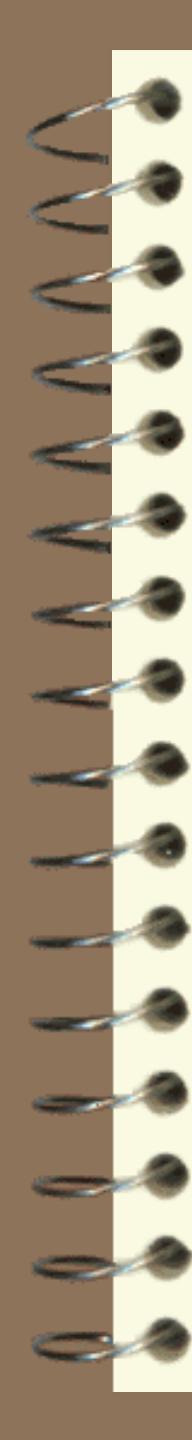


VI.1. Utilisation des nitrates et nitrites



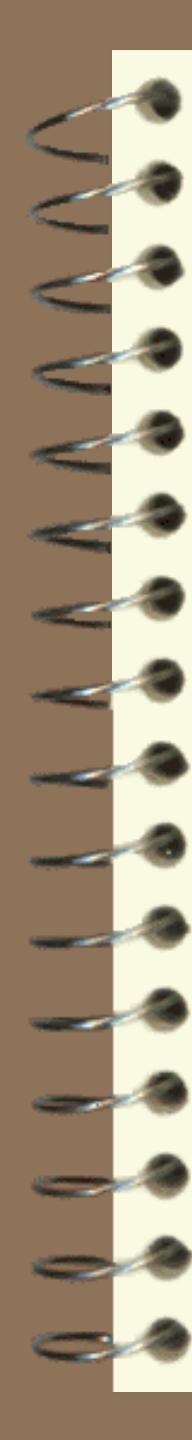
Dans le domaine agricole

Utilisés sous formes des engrais inorganiques azotés pour fertiliser les terres agricoles et par conséquent gagne les écosystèmes aquatiques: eaux de surface, souterraines.



Dans le domaine alimentaire

Des nitrates ou des nitrites peuvent être ajoutés aux charcuteries, en qualité d'additifs alimentaires, à la dose maximale de 150 mg par kilo d'aliment : **nitrate de potassium (E 251)**, **nitrate de sodium (E 252)**, **nitrite de potassium (E 249)**, **nitrite de sodium (E 250)**



VI.2. Dosage des nitrates et nitrites

VI.2.1. Dosage dans l'eau potable:

En présence de salicylate de sodium, les nitrates donnent du paranitrosalicylate de sodium coloré en jaune susceptible d'un dosage spectrométrique.

VI.2.2. Dosage dans les denrées alimentaires

■ Echantillonnage



Les aliments les plus consommés en Algérie (contenant les nitrates et nitrites)

- Fruits: tomates, abricots, pommes, pêches, oranges,...
- Racines : carotte, betteraves, ... ;
- Tubercules : pommes de terre, patates douces, ... ;
- Feuilles : épinards, laitues, ... ;
- Fleurs : artichauts, choux fleurs, ... ;
- Produits carnés : viandes, poissons,
- Mais aussi quelques produits de charcutiers : saucisses, ... et quelques plantes médicinales : menthe, romarin.

Extraction et préparation de l'échantillon à analyser (méthode de Griess)

- Prélèvement et échantillonnage
- Séchage
- Extraction dans l'eau chaude
- Filtration
- Dosage des nitrites par la méthode de Griess, cette méthode est basée sur la formation d'un complexe rouge de NaNO_3 avec le réactif de Griess (chlorure de naphtyléthylène diamine) après réduction préalable des nitrates en nitrites.
- Généralement utilisée pour les produits carnés ayant une teneur en nitrates et nitrites de 10 à 50 mm/kg.
- Mesure photométrique à une longueur d'onde 538nm

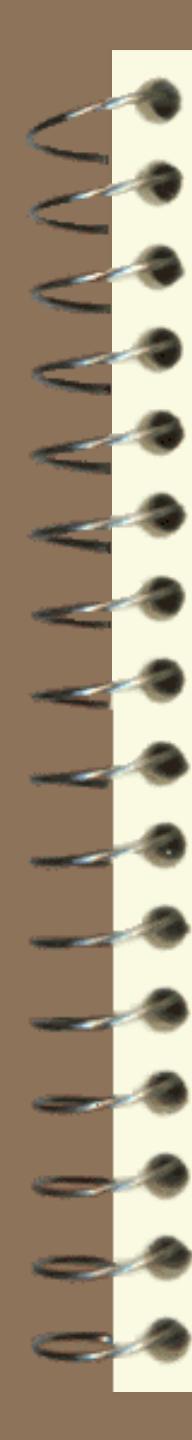
Autres méthodes d'analyse

- Méthode électrochimique : à l'aide d'une électrode nitrate
- Méthode enzymatique: dosage de la teneur des nitrates dans les aliments à base des légumes, les nitrates sont réduits en nitrites par nitrate réductase.
- Méthode diphénylamine: Cette méthode basée sur l'addition d'un réactif diphénylamine (0,5% dans l'acide sulfurique 90%), elle est utilisée pour les microquantités de nitrate présentes dans l'échantillon sous forme de nitrates de cellulose.
- HPLC/CI: pour déterminer la teneur en nitrates dans des légumes et des produits à base de légumes.
- Chromatographie ionique: pour la teneur des nitrates et nitrites dans les produits à base des viandes.

V. Les substances alcaloïdes

- Ce sont des substances d'origine biologique et le plus souvent végétale (il n'en existe que des rares représentants dans le règne animal), éventuellement reproductibles par synthèse, azotées, de réactions alcalines plus ou moins prononcées et douées à faible dose de propriétés pharmacodynamiques marquées.
- Leurs noms se terminent toujours par « ine » (quinidine, hydroquinidine, cinchonidine, cinchonine....).
- Les alcaloïdes renferment toujours du carbone, de l'hydrogène et de l'azote, et le plus souvent, en plus, de l'oxygène (exceptionnellement quelques alcaloïdes

contiennent du soufre).



Aliments contenant les alcaloïdes

- les céréales en raison de la contamination des grains ;
- les compléments alimentaires ;
- le thé et les tisanes;
- les légumineuses (séchées) ;
- les graines oléagineuses.
- Le lait particulièrement le lait de vache et de chèvre.
- Les œufs
- Les viandes
- Le miel

Extraction des alcaloïdes

- Il existe 3 types généraux d'extraction des alcaloïdes: Extraction par les solvants organiques non polaires (CHCl_3 , éther, toluène) en milieu alcalin(NH_4OH , NaOH). Extraction par les solvants organiques polaires (éthanol, méthanol, HCl). Extraction par l'eau acide.
- lavage (H_2O), séchage (Na_2SO_4 anhydre) & évaporation.

Réaction de précipitation

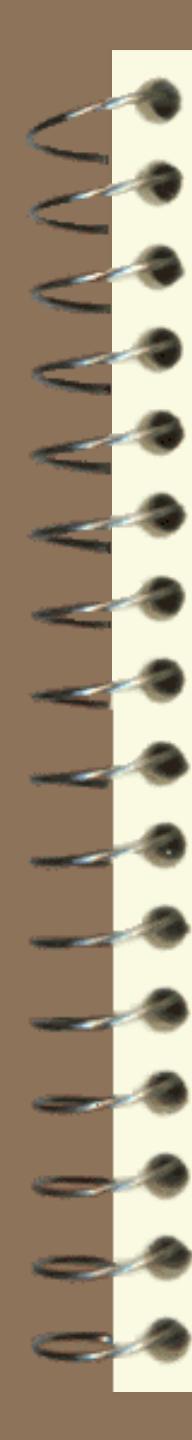
- Les alcaloïdes précipitent sous l'action de certains réactifs appelés « les réactifs généraux des alcaloïdes ». Cette réaction est fondée sur la capacité des alcaloïdes à se combiner aux métaux lourds (Bismuth, Mercure, Iode).
- Réactif de Valser-Meyer (tétra-iodomercurate de potassium): précipité blanc jaunâtre
- Réactif de Dragendorff (tétra iodobismuthate de potassium): précipité rouge orangé
- Réactif de Bouchardat (Iodoiodurée de potassium): précipité brun.

Dosage des alcaloïdes totaux

- Méthode gravimétrique: consiste en une simple pesée du résidu d'alcaloïdes totaux.
- Méthode volumétrique: elle met à profit le caractère basique des alcaloïdes, le principe de cette méthode repose sur le titrage par une solution acide, exemple : le résidu d'alcaloïdes totaux est neutralisé par une quantité d'acide de titre connu (généralement le HCl ou H₂SO₄ 0.1 ou 0.01N).

Réactions de colorations spécifiques des alcaloïdes

 Consiste à l'utilisation des réactifs pour colorer les alcaloïdes exemple le sulfate de cérium et d'ammonium : qui différencie les indols (jaunes), les dihydroindols (rouges), les β -anilinoacrylates (bleus).

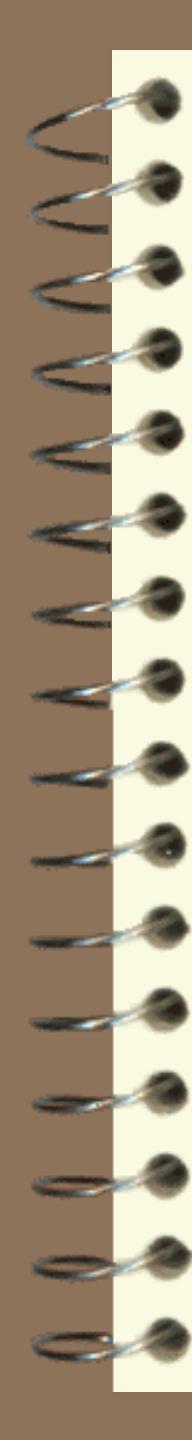


CCM

 la phase mobile est constituée par le chloroforme –méthanol (93/7), la révélation s'effectue par les UV mais le plus souvent on utilise le réactif de du Dragendorff.

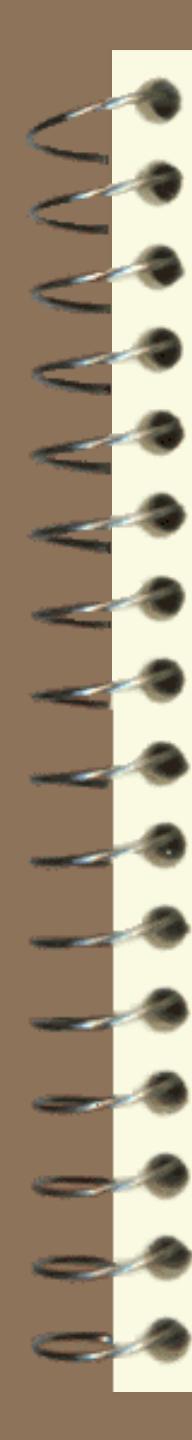
HPLC

 La phase stationnaire est constituée par le chloroforme, la phase mobile est constituée par: chloroforme 940 ml, isopropanol 57 ml, diéthylamine 1 ml, eau 2.65 ml. Le débit est de 1.2 ml/min. La longueur d'onde de mesure est 295- 312 nm. Avec injection des témoins (0,2mg/ml).



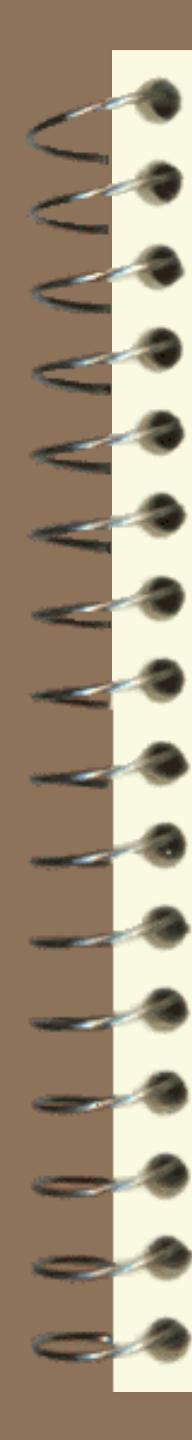
Le couplage CPG/SM

 La séparation s'effectue par la CPG dont la phase mobile est constituée par le gaz hélium, la température de l'injecteur 270°C, la détection s'effectue par la spectroscopie de masse.



VI. Les halogènes et sels

 Les halogènes sont cinq éléments non métalliques. Trouvé dans le groupe du tableau périodique. Le nom "halogène" signifie "générateur de sel". Il y a cinq éléments halogènes : fluor (F), chlore (Cl), brome (Br), iodé (I) et astate (At).



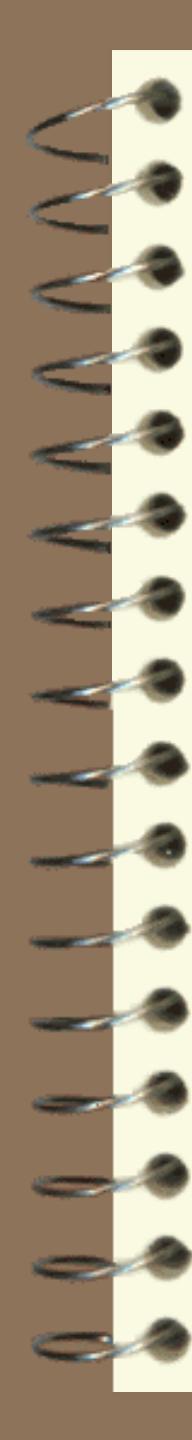
Utilisation des halogènes

 Le téflon est fabriqué en liant le fluor au carbone, créant une surface solide qui ne réagit pas avec d'autres matériaux. Les revêtements en téflon se retrouvent sur les surfaces de cuisson et dans l'électronique. Le chlore, le brome et l'iode sont tous utilisés comme désinfectants, tandis que le chlore est aussi particulièrement efficace comme agent de blanchiment.

1. Le chlore

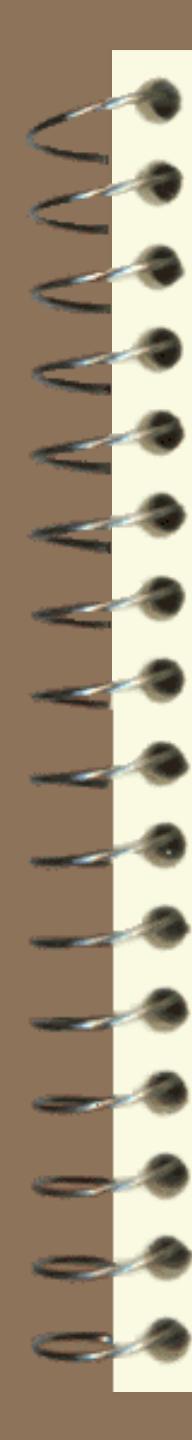
 Le chlore sous forme d'hypochlorite de sodium (eau de javel) ou d'hypochlorite de calcium (les briques poreuses) est utilisé pour la désinfection de l'eau de boisson.

 Dosage du chlore s'effectue par méthode iodométrique, méthode colorimétrique et par chromatographie ionique (cas des ions iodures).



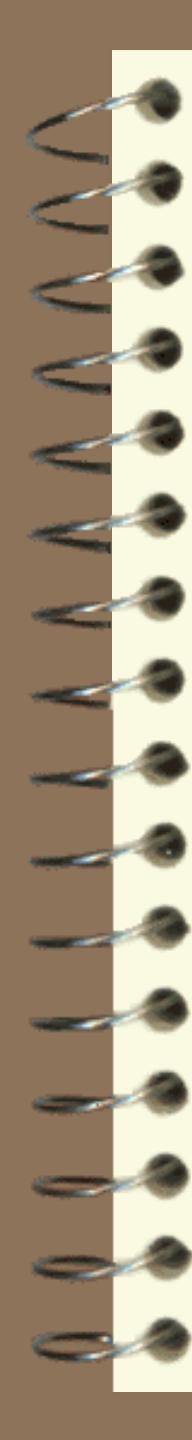
2. L'iode

 L'iode est un oligoélément essentiel : il participe à la croissance et au fonctionnement des organes de notre organisme (en particulier du cerveau et la thyroïde).



Aliments riches en iode

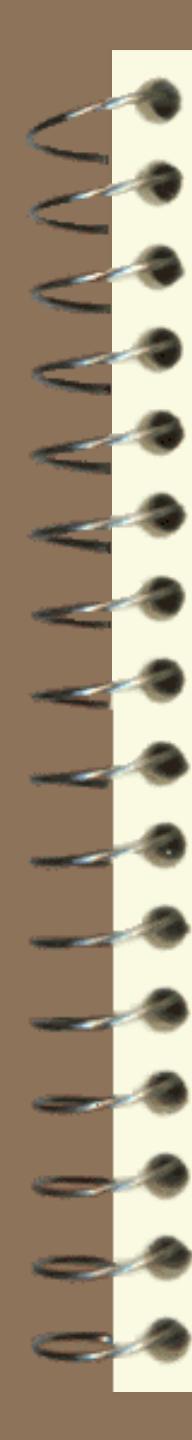
 Le sel blanc marin iodé, le poisson, meloukhia en poudre, le foie de morue (reste l'aliment le plus riche en iode 368µg dans 100g du foie), les moules, le jaune d'œuf cuit, fromage préparé à partir du lait de brebis, le crabe et le Homard.



Extraction de l'iode

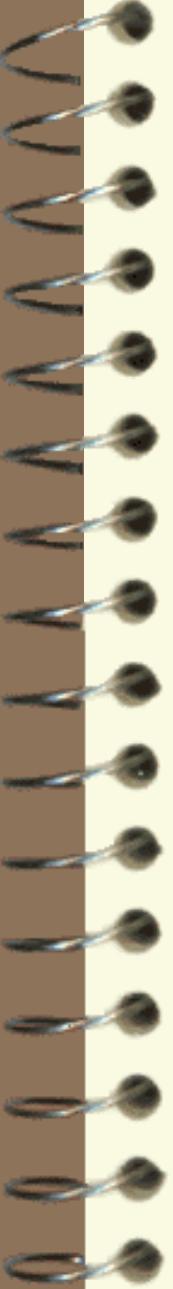
Extraction par la soude suivie par
acidification par l'acide sulfurique

La solution prend la couleur marron foncé.

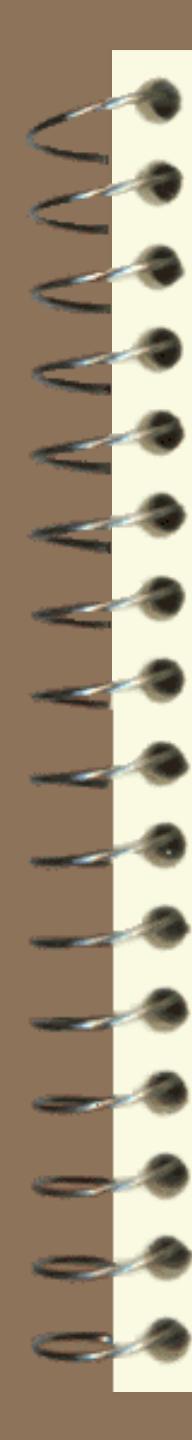


Méthodes de dosage de l'iode

- Spectrophotométrie à la longueur d'onde $\lambda 420$ nm.
- Chromatographie ionique: pour les iodures.



3. Fluor et fluorures



Aliments absorbants le fluor

- Le fluor est apporté par l'alimentation en faibles quantités. On le retrouve plus particulièrement dans le sel de table enrichi en fluor et dans certains aliments qui contiennent naturellement du fluor tels que le thé, les poissons de mer, les dattes, les choux, les carottes, les oignons, les asperges, les épinards et l'eau.
- La teneur maximale en fluor autorisée dans les eaux de distribution publique a été fixée par une valeur de 1,5 mg par litre.

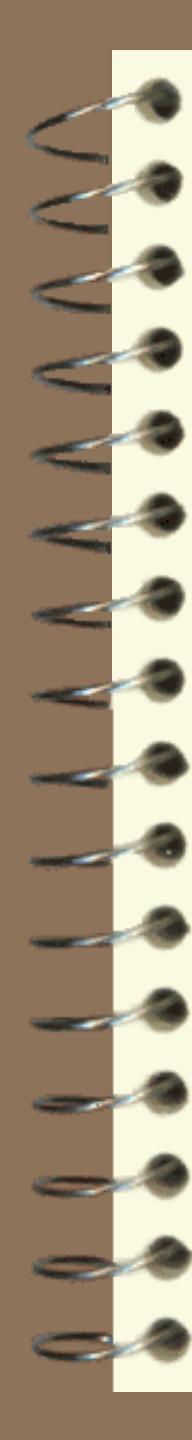
Extraction du fluor

 Extraction acide par HNO_3 suivie par  extraction alcaline dans le KOH et addition de citrate de sodium à 0.4 M. Le pH est ajusté à 5.5.

Dosage du fluor

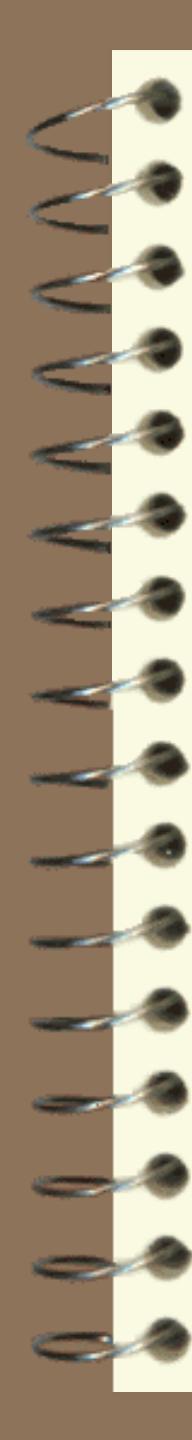
 Par électrode spécifique.

 Méthode colorimétrique: Méthode d'BELCHER – WEST [à l'Alizarine complexone]



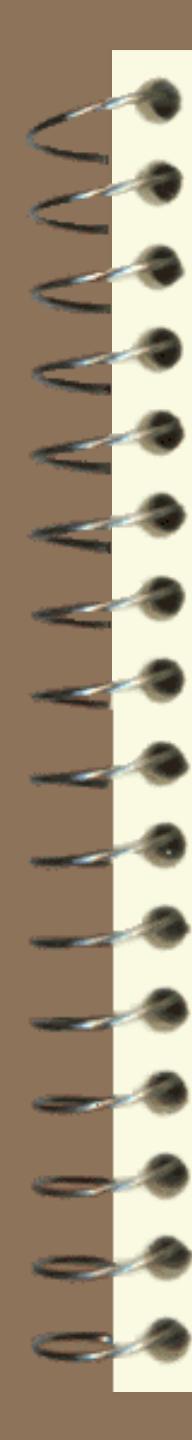
4. Le brome

- Le brome est un liquide aisément volatil et foné rougeâtre-brun avec une odeur forte et désagréable
- A un effet irritant sur les yeux et la gorge. C'est le seul élément non métallique qui est liquide dans des conditions ordinaires. Plusieurs des composés du brome sont des sels ou des bromures. Le brome se produit sous forme de sels dans l'eau de mer et d'océan.



Aliments riches en brome

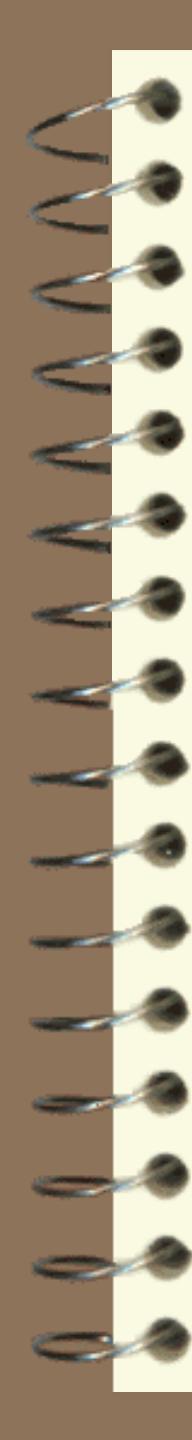
 Les poissons, les grains et les noix sont des sources riches de bromure.



Dosage du brome dans l'eau

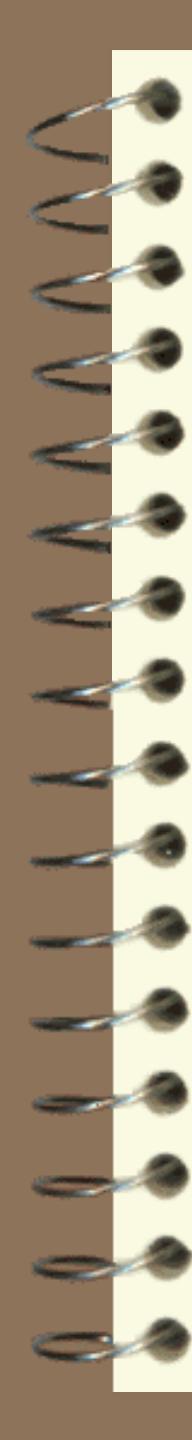
Test de bandelettes

Test colorimétrique par utilisation des pH mètres électronique et pH mètre à électrode spécifique.



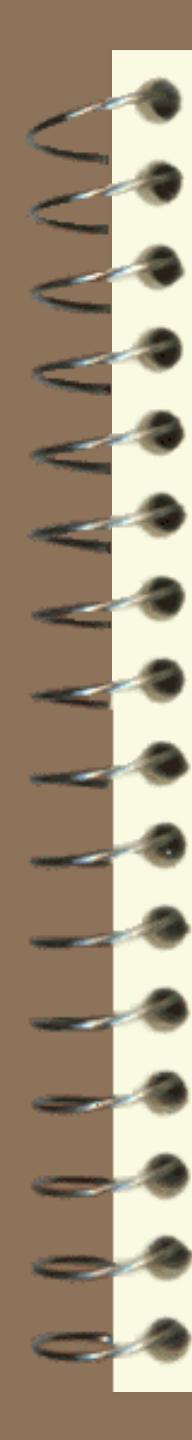
VII. Les composés organiques volatils (COV)

 Les composés organiques volatils sont des composés organiques dont la pression de vapeur est au 13.3 Pa à 25 ° C.



COV et alimentation

- La détérioration de produits alimentaires ~~hautement~~ périssables tels que le poisson frais les fruits est généralement due à une activité microbienne qui entraîne la production de composés organiques volatiles (COV).
- Pas nécessairement un risque d'intoxication, des ~~odeurs~~ désagréables et d'autres changements désagréables impactant la qualité sensorielle rendent le produit impropre à la consommation.
- Ces composés pourraient être utilisés comme ~~indicateurs~~ de détérioration et donc pour la surveillance de la qualité de produits alimentaires emballés.
- Les COV peuvent avoir comme origine aussi l'emballage.



Extraction des COV

 Grâce au cycle : volatilisation suivie de condensation, il est possible d'isoler le toxique du substrat qui le supporte.

But de l'extraction

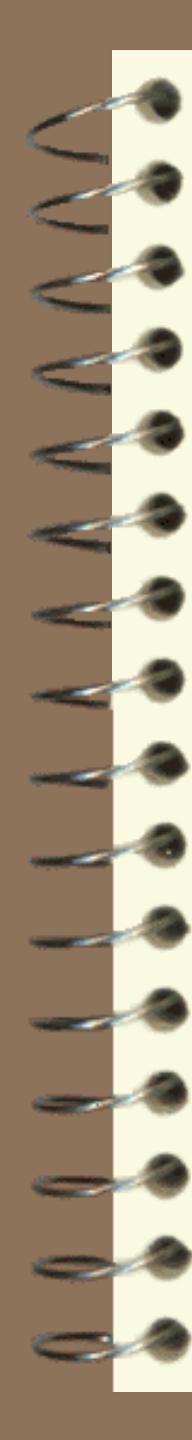
- Aider au diagnostic des intoxications
 à (agents anesthésiants)
- Confirmer une exposition chronique à des substances volatiles surtout dans le cadre de la médecine du travail.
- Faciliter la recherche sur les situations d'intoxication par des substances volatiles (alcool).
- Faire des enquêtes sur les causes d'un incendie si des produits volatils ont été incriminés.
- Évaluation environnementale dans les cas de pollutions par les rejets industriels.

Analyse des COV

- La détection des COV s'effectue par CPG/SM, CPG couplée avec un détecteur à ionisation de flamme (FID) à une température de 300 °C.
- Les gaz utilisés par le détecteur sont l'hydrogène ($40 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$) et l'air ($400 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$).
- Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit a été fixé à $1 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$.
- La température de l'injecteur est fixée à 200 °C.

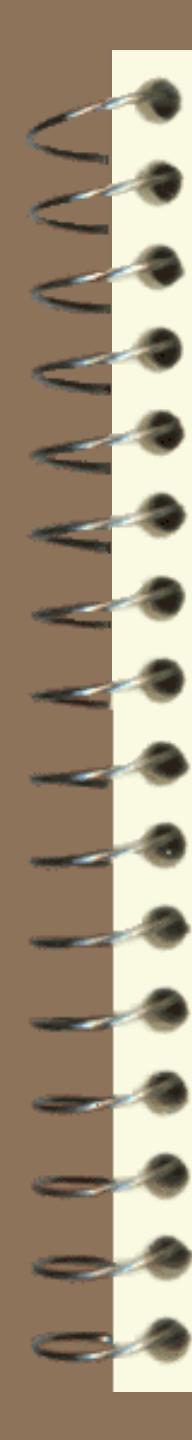
VIII. Les hydrocarbures

- Un hydrocarbure (HC) est un composé organique constitué exclusivement d'atomes de carbone (C) et d'hydrogène (H). Sa formule brute est donc de la forme : C_nH_m.
- Ils sont le résultats de la distillation des pétroles.
- Exemple: charbon, pétrole et gaz naturel.
- On distingue les hydrocarbures saturés (les alcanes), les hydrocarbures insaturés (les alcènes, les alcynes et les hydrocarbures aromatiques).
- Les hydrocarbures aromatiques polycycliques ou HAP sont des composés chimiques produits lors de la combustion de graisses au contact de combustibles fossiles (pétrole, charbon).



Origine des hydrocarbures dans les aliments

 Les huiles contaminent les aliments tout au long de leur fabrication industrielle et même au-delà. Les produits utilisés par les machines, la pollution environnementale, ou encore l'emballage et le conditionnement (plus particulièrement les emballages à base de papier recyclé), sont cités comme des causes majeures de cette migration indésirable.



Aliments contenant les hydrocarbures

Les aliments fumés de façon familiale et les viandes cuites au bois ou au charbon de bois.

Extraction et dosage des hydrocarbures totaux

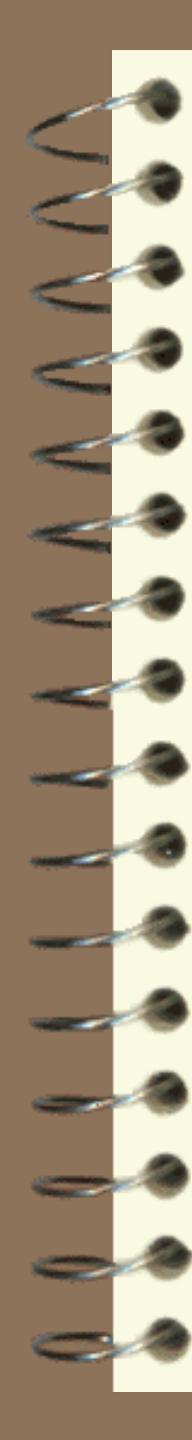
Les hydrocarbures totaux dissous sont extraits dans le tétrachloéthylène ou tétrachlorure de carbone puis filtrés.

L'analyse s'effectue par spectrophotomètre à l'infrarouge à la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption (420 nm).

La concentration des hydrocarbures est exprimé en mg/eqCH₂

VVI. Résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale

- Les antibiotiques sont très utilisés dans l'élevage (poulets par exemple) et dans la production de certains denrées alimentaires (viande bovine, ovine et caprine et de même porcine).
- Utilisation d'antibiotiques à titre thérapeutique ou promoteur de croissance..
- Utilisation des antibiotiques comme additifs alimentaire
- De nombreux éleveurs traitent leurs animaux sans ménager sur les conditions et les quantités à administrer ou les délais d'attente.
- L'utilisation sans contrôle des ATB formation de résidus risques pour le consommateur.



Les risques potentiels liés à la présence des résidus

- Risques cancérogènes (Nitrofuranes)
- Risques allergiques (Pénicillines, Streptomycine)
- Risques toxiques (Chloramphénicol)
- Modification de la flore intestinale (Tétracyclines)
- Sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques (plusieurs antibiotiques).
- Antibiorésistance importante échecs thérapeutiques en médecine humaine et vétérinaire

Résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale

 Deux types sont utilisés:

 Tests microbiologiques qui utilisent le principe de la croissance bactérienne, ce sont des méthodes bactériennes encore appelés méthodes d'inhibition.

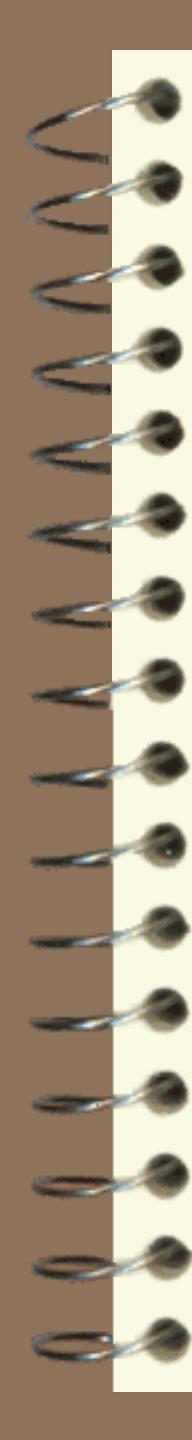
 Tests physicochimiques, tel que la CCM, HPLC ou la CPG, des techniques enzymatiques ou des techniques immunologiques.

Tests microbiologiques

1. Méthode alternative (Presti Test)

■ Elle permet de déterminer les substances antibactériennes présentes dans la viande fraîche, la charcuterie, les reins, les poissons et les œufs.

■ Ce test permet de détecter un grand nombre d'antibiotiques couramment utilisé pour la viande en moins de 4 heures.



Tests microbiologiques:

2. méthode de quatre boîte

- Prélèvement des échantillons et conservation au congélateur pour utilisation ultérieure.
- Raclez la surfaces du muscle pour éliminer les impuretés.
- Préparer des rondelles de 2 mm d'épaisseur et 8 mm de diamètre.

Méthode de quatre boîte

Ensemencement d'un microorganisme sensible aux substances antibactériennes

Famille d'antibiotique recherchée	Microorganisme test
Bétalactamines, sulfamides, aminosides, tétracyclines	<i>Bacillus subtilis</i>
Bétalacamines et macrolides	<i>Micrococcus luteus</i>

Dépôt sur la surface du milieu ensemencé d'une rondelle de muscle congelé.

Incubation

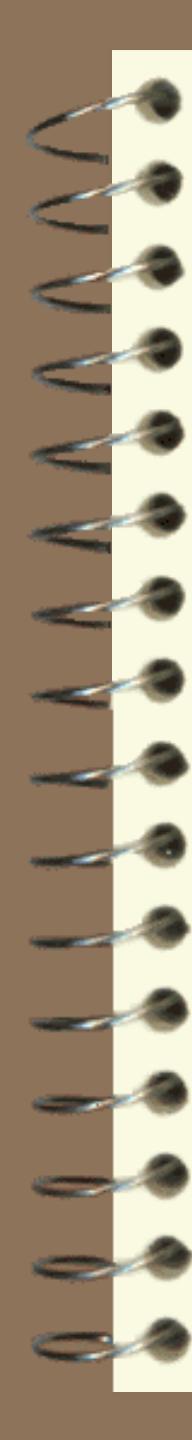
Méthodes physicochimiques: Extraction et préparation

 L'extraction s'effectue dans un mélange méthanol/acétonitrile en présence de EDTA et sulfate de sodium anhydre suivie par une centrifugation filtration sur papier filtre de 0,2µm.

Méthodes physicochimiques:

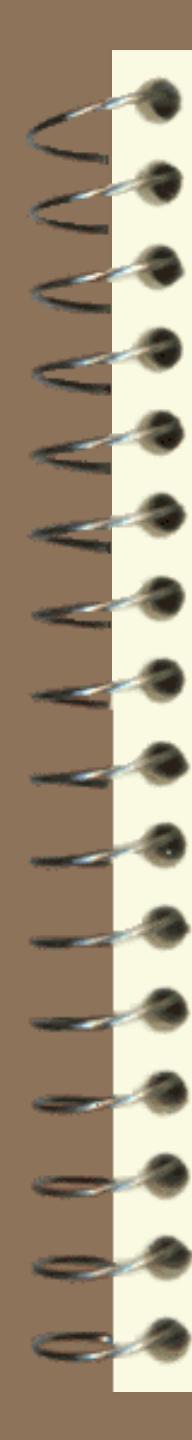
1. Méthodes enzymatiques

 Elles ont pour principe l'inhibition d'un enzyme en présence d'un résidu d'antibiotique. Cette enzyme n'est alors plus révélée par un indicateur coloré.



Méthodes physicochimiques: 2. méthodes immunoenzymatiques et immunologiques

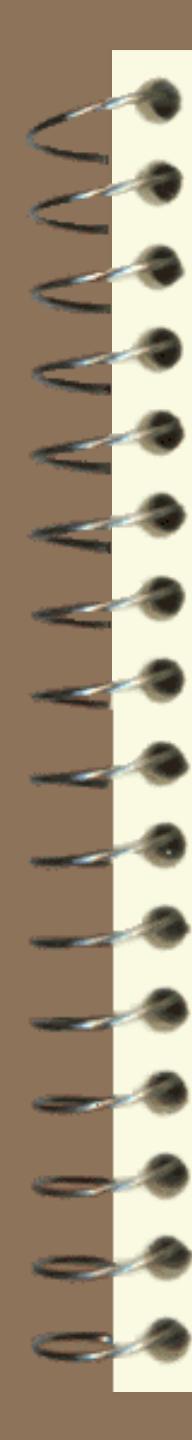
- ¶ Elles sont basées sur l'interaction anticorps-antigène, qui est très spécifique pour un résidu particulier. La technique la plus utilisée est celle de ELISA basée sur la mesure de la radioactivité du complexe immunologique formé.
- ¶ Généralement utilisé lors du contrôle d'aie, c'est un test très rapide.



Méthodes physicochimiques:

3. Capteurs biologiques

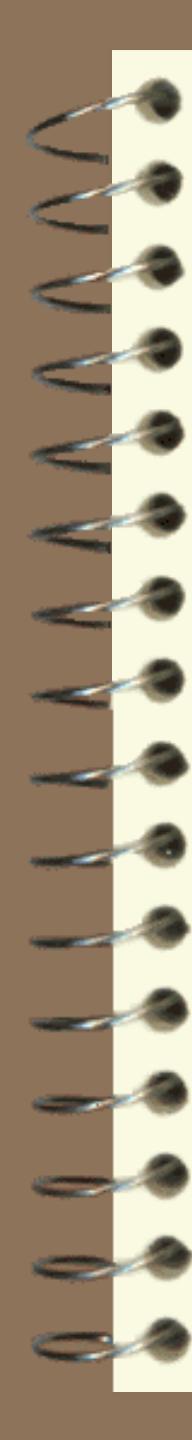
- Ces capteurs contiennent un **anticaps** comme élément de reconnaissance qui interagit avec l'analyte.
- Le signal biochimique qui en résulte est mesuré optiquement.



Méthodes physicochimiques:

4. HPLC

Utilisée pour la détection de multiples résidus d'antibiotiques dans des échantillons variés (le laits et les tissus): quinolones, sulfonamides, béta lactamine, tétracyclines



Méthodes physicochimiques:

5. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

Pour la détermination sensible des traces éléments dans le laits, les poissons, les tissus musculaires et le sol.