

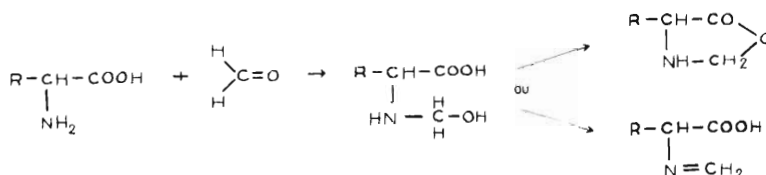
## LE MICRODOSAGE DU FORMOL DANS LES PRODUITS MARINS

par France SOUDAN

Le formol ou ses dérivés tels que l'hexaméthylènetétramine sont fréquemment ajoutés aux produits marins conservés sans stérilisation par la chaleur ; ils peuvent aussi y exister normalement du fait du traitement subi (fumage) ou par suite d'interréaction de leurs constituants.

Leur concentration exprimée en formol est habituellement de 200 à 1 000 mg par kg de produits aseptisés, 10 à 45 mg par kg de produits fumés [HENDERSON (12), SHEWAN (21)], 4 à 500 mg par kg de poisson salé [REAY (17)]. Les intervalles de variation sont donc trop rapprochés pour être distingués autrement que par un dosage : une réaction qualitative suffisamment sensible pour déceler sûrement, dans une prise d'essai de quelques grammes, une dose de formol inférieure au milligramme sera probablement positive avec une quantité cinq fois moindre, valeurs qui correspondent respectivement à une adjonction ou à une présence normale. La distinction revêt une certaine importance dans les pays comme la France où l'addition de tout antiseptique aux matières alimentaires est interdite et passible de poursuite judiciaire.

La première phase du dosage consiste à isoler le formol des combinaisons dans lesquelles il se trouve engagé : hexaméthylènetétramine ou produit de condensation avec les protéines. La réaction du type indiqué ci-après, qui a lieu de gauche à droite en milieu neutre ou basique, est réversible en milieu acide. Le formol libéré par un acide fort sera recouvré par une distillation.

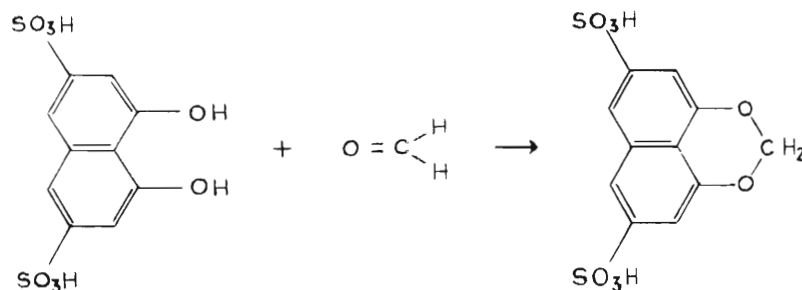


La distillation se fera sur les solutions en présence d'acide phosphorique ou, s'il s'agit de matières solides, sur le défécât phosphotungstique. La distillation permet de récupérer le formol plus complètement qu'un entraînement à la vapeur d'eau : si elle est conduite presque à sec deux fois de suite avec une reprise intermédiaire par l'eau, le rendement est compris entre 95 et 100 % (résultats de 5 distillations de 4.8 mg formol).

### Technique du dosage.

**Principe.** Une des méthodes de microdosage les plus sensibles est celle indiquée par EGGRIWE [BOYD et LOGAN (4)] qui utilise le colorant formé par condensation de formol sur l'acide chromotrope en milieu sulfurique suivant la réaction indiquée ci-après.

La coloration violette qui se développe a un maximum d'absorption à 330 et 342 m $\mu$ . Elle est stable plus de cinq jours. Elle est proportionnelle à la concentration en formol entre 0 et 16  $\gamma$ . Elle peut être mesurée à l'électrophotomètre Meunier (écran vert) avec une grande sensibilité : une déviation de une division du tambour correspond à 0.02  $\gamma$  de formol si la mesure est faite sous une épaisseur de 20 mm.



La réaction est spécifique. Parmi les substances de formule voisine, les alcools méthylique et éthylique ne donnent aucune réaction ; l'ion formique réagit un peu mais à une concentration beaucoup plus élevée ; le furfural donne une faible teinte rose [ALEXANDER et coll. (1)] mais il n'est pas entraînable à la vapeur d'eau et ne se trouve pas normalement dans les préparations de poisson. Parmi les inhibiteurs, citons l'excès de Sn<sup>4+</sup>.

**Mode opératoire.** Les conditions ci-après ont été choisies pour permettre la mesure de quantités de formol supérieures à 1 mg pour 100 g. La sensibilité peut être augmentée le cas échéant en jouant sur la prise d'essai, le volume de distillat et l'épaisseur de la cuve photométrique.

Soit 5 g de produit homogénéisé + 25 ml d'eau + 20 ml d'acide phosphotungstique à 5 %, broyés mécaniquement et filtrés : 25 ml de filtrat sont placés dans un ballon pyrex à fond rond de 100 cm<sup>3</sup> muni d'une ampoule à brome et d'un réfrigérant descendant droit. Celui-ci est terminé par un tube effilé qui plonge dans 1 ou 2 ml d'eau contenu dans une fiole jaugée de 50 cm<sup>3</sup>. Distiller jusqu'à ce que le ballon soit presque à sec. Interrompre un instant le chauffage, introduire 10 ml d'eau par l'ampoule à brome. Aller de nouveau à sec et répéter l'opération. Compléter finalement la fiole à 50 ml.

La réaction avec l'acide chromotropique est effectuée dans des tubes à essais rodés de 25 cm<sup>3</sup> et doit porter sur un volume maximum de 4 ml de solution. Habituellement 1 ml de distillat sont additionnés de 3 ml d'eau puis de 4 ml d'acide sulfurique RP goutte à goutte en maintenant le tube dans la glace pilée. Après retour à température ambiante, ajouter 0,1 ml du réactif chromotropique, boucher, homogénéiser et porter au bain-marie bouillant une demi-heure. Refroidir sous eau courante et colorimétrer.

Une gamme étalon est préparée simultanément avec une solution de formol : 0-1-2-3-4 ml d'une solution à 4  $\gamma$  par ml fournissent une gamme de 0 à 16  $\gamma$ . La déviation est ordinairement supérieure à 16 div. par  $\gamma$  de formol (moyenne de 15 étalonnages) ce qui donne un résultat à  $\pm 0,5$  pour 1 000 dans les conditions indiquées.

La sensibilité de la méthode impose l'emploi d'une verrerie parfaitement propre mais les détergents genre Teepol sont à éviter. Les lavages à l'acide, à l'eau ou à la vapeur (pour l'appareil à distiller), permettent des résultats plus réguliers.

La solution de formol est obtenue par dilution d'une solution-mère préparée suivant les indications de BOYD et LOGAN (4) par entraînement à la vapeur d'eau en milieu phosphorique de para-formaldéhyde ou de trioxyméthylène. Le distillat est stabilisé par 1 ml SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> 2N par litre. Son titre, établi par iodométrie, reste constant pendant plus d'un an.

Le réactif chromotropique est une solution aqueuse d'acide chromotropique à 1 % additionnée de 50 mg de chlorure stanneux pour 100 ml. Il peut se garder 8 jours à 0° C en flacon de verre jaune, mais l'intensité de coloration par unité de formol baisse de jour en jour et il est préférable de préparer une solution fraîche chaque jour.

### Interférence de l'oxyde de triméthylamine.

La méthode appliquée telle quelle aux produits marins y décèle souvent quelques dizaines de mg de formol alors qu'aucune addition n'y a été faite. La présence naturelle d'un peu de formol dans les chairs d'animaux marins a déjà été signalée par plusieurs auteurs. Son origine vue d'abord dans l'oxydation des amines volatiles [LUNDE et MATHIESEN (15), REAY (17)] est maintenant attribuée à la décomposition de l'oxyde de triméthylamine [HATTORI (11), REAY et coll. (19), SHEWAN (22)].

On sait que l'oxyde de triméthylamine est un constituant normal des tissus d'animaux marins. Il avait même passé pour spécifique, mais des mesures plus précises en ont révélé aussi un peu chez les animaux aquatiques d'eau douce [SHEWAN (22), DYER (7), ANDERSON et FELLERS (2), VENKATARAMAN (27)].

Les teneurs habituelles en oxyde de triméthylamine de plus de cent animaux aquatiques de consommation courante ont été réunies par DYER (7) à partir des données publiées. Elles s'échelonnent entre 0 et 1,5 g pour 100 g de muscle frais. Les teneurs les plus élevées se rencontrent chez les élastomobranches (le plus souvent 1 g environ avec des valeurs extrêmes de 0,25 et 1,5 g), les crustacés (crevettes du Pacifique 0,20 à 0,50 g, langoustes de l'Atlantique 0,15 à 0,65 g), certains mollusques comme l'encornet (0,8 g dans le Pacifique, 0,4 g dans l'Atlantique) ou les pectens (0,25 à 0,55 g). D'autres mollusques (huîtres, moules, praires, etc.) ou échinodermes marins en sont dépourvus. Les téléostéens marins contiennent couramment 0,1 à 0,5 g d'oxyde de triméthylamine pour 100 g ; les anadromes sont parmi les plus pauvres.

Pour une même espèce la teneur paraît varier

suitant la zone d'habitat, teneur plus élevée dans l'Océan Arctique qu'en Mer du Nord ;

suitant la saison : chez le hareng, teneur plus forte en hiver qu'en été ;

suitant la taille et suivant la nourriture [(2) RONOLD et JACOBSEN (18), BENOIT et NORRIS (3)].

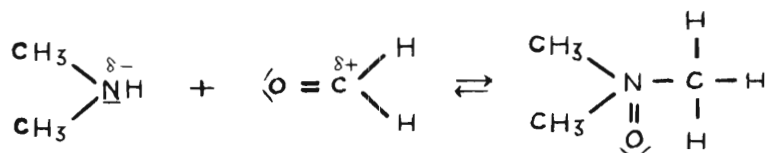
En fait, l'influence de ces différents facteurs n'est peut être que la manifestation secondaire de celle de la nourriture à laquelle certains auteurs attribuent l'origine de l'oxyde de triméthylamine qui serait synthétisé initialement par le plancton. Cette thèse est controversée par ceux qui voient dans l'oxyde un régulateur de la pression osmotique ou un produit d'excrétion du métabolisme azoté. Leurs arguments sont :

l'oxyde atteint toujours à peu près le même taux dans une espèce donnée ;

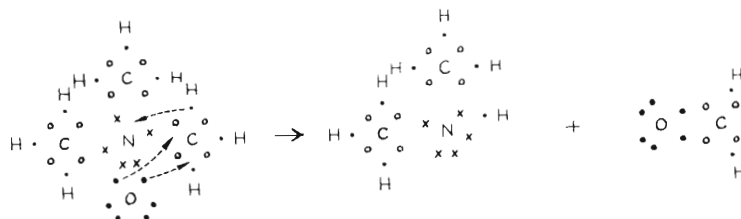
le rapport de sa concentration dans le sang et les muscles est quasi constant : environ 1/2 chez les élastomobranches, 1/100 chez les téléostéens ;

enfin l'oxyde est trouvé dans des espèces vivant en eau douce, alors que leur nourriture ne contient probablement pas d'oxyde (7).

L'oxyde de triméthylamine peut être considéré comme l'aldimine de la diméthylamine et du formol :



La réaction qui permet la préparation de l'oxyde est réversible en milieu acide ou sous l'influence de certains catalyseurs qui activent le déplacement électronique ci-après :



C'est ainsi que la distillation d'une solution d'oxyde en présence d'acide phosphorique ou phosphotungstique dans les conditions indiquées précédemment, produit respectivement 87 et 19 pour 100 des quantités de formol correspondant théoriquement à l'oxyde mis en jeu (8,24 et 2,20 mg).

Il est donc indispensable d'éliminer l'oxyde de triméthylamine des extraits de poisson avant de les distiller pour doser le formol. Un procédé consiste à le réduire en triméthylamine qui sera fixé à l'état de sel.

Parmi les systèmes réducteurs qui ont été proposés, les sels titanéux conviennent le mieux [HJORTH-HANSEN (13)] ; les sels stanneux réduisent l'oxyde moins complètement (tableau I). Le réducteur est ajouté à la solution d'oxyde (20 ml) quelques minutes avant l'acidification par 5 ml d'acide phosphotungstique à 5 %, puis la distillation est conduite comme ci-dessus.

TABLEAU I. — Formol produit par distillation en milieu acide phosphotungstique de l'oxyde de triméthylamine réduit.

Oxyde mis en jeu	Réducteurs	Formol trouvé	Rendement % théorie
288,0 mg	5 ml Cl <sub>3</sub> Ti 15 %	2,7 mg	2,3 %
57,6	2 ml	63,7	0,27
57,6	2 ml	52,5	0,23
même solution après 7 semaines à 0°.			
57,6 mg	2 ml Cl <sub>3</sub> Ti 15 %	40,6 mg	0,18 %
57,6 mg	0,2 g Cl <sub>2</sub> Sn. 2H <sub>2</sub> O	533 mg	2,4 %
57,6	0,5 g	325	1,4

La triméthylamine distillée dans ces conditions ne produit que 0,1 mg de formol pour 100 mg ; la quantité trouvée en l'absence de réducteur est un peu plus élevée (1,6 mg) en raison du passage transitoire possible à l'état d'oxyde de triméthylamine. La diméthylamine dégage aussi un peu de formol par décomposition pendant la distillation : 0,35 mg pour 100 mg. Mais aux doses où les amines volatiles se trouvent dans les produits marins mis à la consommation, le formol issu de ces réactions secondaires est négligeable devant celui provenant d'une addition d'antiseptique et même devant celui qui peut s'être formé naturellement.

Le chlorure de titane ne modifie pas la distillation du formol (tableau II) ; des quantités connues d'hexaméthylène tétramine sont aussi retrouvées intégralement.

La seule précaution à prendre dans la distillation est d'éviter l'entraînement des sels de titane qui donnent une réaction légèrement positive avec l'acide chromotropique même en l'absence de formol ; l'ion Cl<sup>-</sup> ne paraît pas intervenir directement dans la réaction. Comme le chlorure de

titane  $\text{Cl}_3\text{Ti}$  formé dans la réduction bout à  $136^\circ$ , la distillation est arrêtée dès que les gouttelettes condensées hors du ballon commencent à jaunir. Il semble néanmoins que des traces soient entraînées en cours d'opération et viennent perturber légèrement les mesures faites sur un volume de distillat trop restreint. Les mesures sur une dilution au 1/10 ou au 1/100 du distillat ont toujours été plus satisfaisantes que les mesures directes.

TABLEAU II. — *Formol retrouvé après distillation d'une solution en présence de chlorure de titane.*

Formol mis en œuvre	Addition sol. $\text{Cl}_3\text{Ti}$ 15 %			
	néant		a) 2 ml b) 1 ml	
	Formol trouvé	Rendement % théorie	Formol trouvé	Rendement % théorie
a) 0,407	0,410	100,5	0,410	100,5
	0,382	94	0,382	94
b) 4,8	4,87	101,6	4,75	99,1
	4,62	96,5	4,38	91,2
			4,44	92,5

La dissociation de l'oxyde de triméthylamine en formol et diméthylamine a lieu même à température relativement basse et dans des milieux peu acides. Elle a été mise en évidence dans des solutions d'oxyde (288 mg dans 50 ml) gardés à  $0^\circ$  et  $35^\circ$  C, tamponnées à des pH compris entre 5,5 et 6,55 :

acide acétique-acétate de sodium M/12,5 pH 5,5 et 5,9 ;

phosphates monopotassique et disodique M/15 pH 6,2 et 6,5 ;

acide lactique-lactate de sodium M/10 pH 6,55.

La réaction tend vers un équilibre : le formol libéré par molécule d'oxyde est 74 mg en 24 h à  $35^\circ$  C, 88 mg en 72 h, soit environ 3 pour 1 000 de la quantité qui serait obtenue dans une dissociation totale. L'équilibre a été atteint légèrement plus vite dans les milieux les plus proches de la neutralité ; il dépend peu de la température dans l'intervalle où nous l'avons observé.

La diméthylamine peut être caractérisée également, en particulier par colorimétrie du diméthyl-dithiocarbamate de cuivre selon DYER et MOUNSEY (8). Le dosage a lieu à température ambiante en milieu fortement alcalin, ce qui exclut l'éventualité de la décomposition de l'oxyde en cours de réaction par la chaleur ou la forte acidité du milieu. Mais l'alcalinité du réactif favorise la recombinaison de la diméthylamine avec le formol de sorte que les quantités de base isolées sont de l'ordre de 10 % de celle du formol dosé par ailleurs.

La solution d'oxyde de triméthylamine à 5,76 g pour 100 donne une réaction faiblement positive qui paraît indiquer une légère dissociation en solution aqueuse.

### Présence normale de formol dans les produits marins.

Si la dissociation de l'oxyde de triméthylamine peut paraître insignifiante lorsqu'il est seul, il n'en est plus de même dans un milieu complexe comme le poisson, où le formol libéré peut se combiner de façon multiple avec les innombrables radicaux réagissants des protéines (10). Beaucoup des combinaisons formées sont réversibles et ont un équilibre de dissociation proche de celui trouvé pour

l'oxyde, mais vu le nombre de radicaux susceptibles de réagir, la loi d'action de masse joue. Ainsi la décomposition de l'oxyde de triméthylamine en formol et diméthylamine se produit-elle parallèlement ou de préférence à la réduction bien connue en triméthylamine.

TABLEAU III. — Teneur en oxyde de triméthylamine et en formol de quelques crustacés frais ou en conserves.

	Oxyde de triméthylamine (mg pour 100 g)			Formol (mg pour 100 g) après distillation	
				avec Cl <sub>3</sub> Ti	sans Cl <sub>3</sub> Ti
Crevettes fraîches cuites :	corps	déchets	entières		
I .....	59	59	59		
II .....	129	100	100		
III .....	139	86	105		
IV .....	91				7,07
	91	+ 77	ajouté		11,09
CONSERVES (chair)					
Crevettes de Norvège ..		150		0,42	4
		192		0,55	5,01
		195		0,85	
		201		1	
		213		0,50	
		330		1,09	
		186		1,9	
Langoustines de Norvège.		163		0,23	
		268		0,20	
Langoustines françaises ..		161		1,4	
Langoustes .....		160			
Homards français .....		103			
Crabes français .....		95		2,2	
		45		1,2	

1° **Poisson frais.** Aussitôt après la mort, le milieu légèrement acide s'acidifie davantage par suite de la glycogénolyse. Suivant l'espèce, la réserve initiale en glycogène, les conditions de pêche du poisson, le pH peut descendre au voisinage de 6,0, exceptionnellement 5,5 dans certaines espèces [cf. revue de CUTTING (6)]. A ce moment la réserve d'oxyde de triméthylamine est intacte : les bactéries qui l'utilisent comme accepteur d'hydrogène sont plus ou moins inhibées par le milieu acide qui réduit l'activité de leur enzyme, la triméthylaminoxidase, dont le pH optimum est 7,0 à 7,2 [WATSON (29-30), TARR (26-27), NEILANDS (16), CASTELL et SNOW (5), ELIOTT (9)]. L'oxyde pourra se dédoubler. REAY a trouvé que le taux de formol qui était de 4 à 32 mg par kg de morue fraîche était passé entre 20 et 160 mg après 12 jours en glace (8 échantillons). Notons que la formation de diméthylamine a été également reconnue dans le muscle de poisson (21-22) et a même été proposée pour suivre la dégradation commençante des tissus.

2° **Poisson salé.** La réaction pourra se développer mieux que dans le poisson frais en raison de la conservation prolongée à température ambiante. Le milieu est légèrement acide (pH de la morue salée 6,3 à 6,5). Il contient encore une partie de son oxyde malgré une élimination importante dans

les saumures ; la réduction en triméthylamine est très lente notamment en raison de l'inhibition de la triaminoxidase par ClNa (9). La présence de formol dans le poisson salé a été signalée plusieurs fois (12-17-23) ; nous avons trouvé 14 à 16 mg de formol par 100 g de morue salée (7 échantillons).

3° **Poissons et crustacés en conserves.** Les conditions favorables à une dissociation de l'oxyde de triméthylamine en formol et amine secondaire sont encore réunies dans les conserves. Le milieu est légèrement acide : pH de 6,5 à 4,5 selon que la conserve est au naturel ou à la marinade ; les enzymes ont été rendues inactives par la chaleur, de sorte que tout l'oxyde est disponible. En fait, une partie de l'oxyde peut être réduit dans les boîtes en fer blanc par réaction avec l'étain et l'hydrogène sulfuré provenant de l'hydrolyse des protéines soufrées [RONOLD et JACOBSEN (20), JACOBSEN et MATHIESEN (14), SOUDAN (25)]. Si la boîte est vernie intérieurement et mieux, si le poisson est enveloppé dans une feuille de papier sulfurisé ou de plastique, l'oxyde demeure. Il peut se décomposer selon le déplacement électronique indiqué plus haut, en particulier pendant la stérilisation (19). La réaction pourra se poursuivre pendant le stockage. Elle sera plus intense lorsque la concentration en oxyde est forte comme dans les conserves de crustacés.

Nous réunissons dans le tableau III quelques résultats obtenus à partir de crustacés frais ou en conserve.

*En résumé*, la présence naturelle d'un peu de formol dans les produits marins est certaine. Une addition de formol n'est prouvée que si la dose reconnue, après avoir évité l'interférence de la réaction de l'oxyde de triméthylamine, est nettement supérieure aux doses qui peuvent exister normalement.

#### BIBLIOGRAPHIE

1. ALEXANDER (B.), LANDWEHR (G.) et SELIGMAN (A.), 1945. — A specific micromethod for the colorimetric determination of glycine in blood and urine. — *J. Biol. Chem.*, **160** : 51-59.
2. ANDERSON (D.) et FELLERS (C.), 1952. — The occurrence of trimethylamine and trimethylamine oxide in fresh water fishes. — *Food Res.*, **17** : 472-74.
3. BENOIT (G.) et NORRIS (E.), 1945. — Studies on trimethylamine oxide -- II. The origine or trimethylamine oxide in young salmon. — *J. Biol. Chem.*, **158** : 429-40.
4. BOYD (J.) et LOGAN (M.), 1942. — Colorimetric determination of serine. — *J. Biol. Chem.*, **146** : 279-87.
5. CASTELL (C.) et SNOW (J.), 1951. — Reduction of trimethylamine oxide by bacterial enzymes. — *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **8** : 195-206.
6. CUTTING (G.), 1953. — Changes in the pH and buffering capacity of fish durings spoilage. — *J. Sci. Food. Agri.*, **4** : 597-603.
7. DYER (J.), 1952. — Amines in fish muscle — VI. Trimethylamine oxide content of fish and marine invertebrates. — *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **8** : 314-24.
8. DYER (J.) et MOUNSEY (Y.), 1945. — Amines in fish muscle — II. Development of trimethylamine and other amines. — *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **6** : 359-67.
9. ELLIOTT (P.), 1952. — Reduction of trimethylamine oxide in dog fish flesh. — *Food Res.*, **17** : 225-34.
10. FRENCH (D.) et EDSALL (J. T.), 1945. — The reactions of formaldehyde with amino acids and proteins. — *Adv. in protein chem.*, **2** : 278-333.
11. HATTORI (Y.), 1940. — Trimethylamine oxide in meats and fishes — IV. Mecanism of the formation of formaldehyde from trimethylamine oxide. — *J. Pharm. Soc. Japan*, **60** : 24-45.
12. HENDERSON (J.), 1936. — Formaldehyde in smoked fish. — *Analyst*, **61** : 340-41.
13. HJORTH-HANSEN (J.), 1952. — Méthode pour le dosage de l'oxyde de triméthylamine. — *Anal. chim. Acta.*, **6** : 438-41.
14. JACOBSEN (F.) et MATHIESEN (E.), 1946. — Corrosion of containers for canned foods. — *Skript. Morsk. Viden Akad. Oslo*, 112 pp. cf. 54-58 et 65-68.

15. LUNDE (G.) et MATHIESEN (E.), 1934. — Formaldehyde in marine products. — *Industr. Engng. Chem.*, **26** : 974-76.
16. NEILANDS (J.), 1945. — Factors affecting triaminoxidase — I. Inhibition of the enzyme. — *J. Fish. Res. Bd Canada*, **6** : 368-79.
17. REAY (G.), 1936. — Testing for the formaldehyde in saltcured ling. — *Analyst*, **61** : 78-85.
18. REAY (G.), 1936. — Formaldehyde in marine products. — *Food Invest. Bd.*, (1935) : 109-11.
19. REAY (G.), CUTTING (C.) et SHEWAN (J.). 1943. — The chemical composition of fish. — *J. Soc. Chem. Ind.*, **62** : 77-85.
20. RONOLD (A.) et JACOBSEN (F.), 1947. — Trimethylamine oxide in marine products *J. Soc. Chem. Ind.*, **66** : 160-6.
21. SHEWAN (J.). 1937. — The spoilage of haddocks stowed in ice. — *Food Invest. Bd.*, 75-78.
22. SHEWAN (J.), 1939. — Trimethylamine formation in relation to the viable population of spoiling fish muscle. — *Nature*, Londres, **143** : 284.
23. SHEWAN (J.), 1948. — A note on the estimation of sulfur dioxide in fish muscle. — *Analyst*, **73** : 605-7.
24. SHEWAN (J.), 1951. — The chemistry and metabolism of the nitrogenous extractives in fish. — *Bio chem. Soc. Symposia*, **6** : 28-48.
25. SOUDAN (F.), 1956. — La corrosion dans les boîtes de conserves de hareng à l'huile et tomate. — *Science et Pêche*, **36** : 3-4.
26. TARR (H.), 1939. — The bacterial reduction of trimethylamine oxide to trimethylamine. — *J. Fish. Res. Bd Canada*, **4** : 367-77.
27. TARR (H.), 1940. — Specificity of triaminoxidase. — *J. Soc. chem. Ind.*, **59** : 349.
28. VENKATARAMAN (R.), 1953. — Isolation of trimethylamine oxide in some Indian fishes. — *Current Science*, **22** : 86.
29. WATSON (D.), 1939. — The bacterial reduction of trimethylamine oxide. — *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **4** : 252-66.
30. WATSON (D.), 1939. — The role of trimethylamine oxide in the respiration of *Achromobacter* — *J. Fish. Res. Bd Canada*, **4** : 267-80.