

CENTRE D'ETUDES ET DE CONTROLE DES  
ANALYSES EN INDUSTRIE LAITIERE

octobre 1992

# LA LETTRE

# N° 4

# DE

# CECALAIT

CECALAIT INRA SRTAL BP 89 39801 Poligny TEL : 84.73.63.00 / 84.73.63.19 TELECOPIE : 84.37.37.81

Rédaction achevée le 26 Octobre 1992

Equipe rédactionnelle :

R. GRAPPIN, O. LERAY, P. RINGLE, P. TROSSAT, A. BAPTISTE

## SOMMAIRE

Référence, officielle, routine, rapide... que cachent les mots ?

p. 1 - 3

Les chaînes microbiologiques de CECALAIT dans le lait cru

Mesure de la lipolyse dans le lait

p. 4 - 7

Normes parues récemment

p. 7

# REFERENCE, OFFICIELLE, ROUTINE, RAPIDE...

## QUE CACHENT LES MOTS ?

Méthode de référence, méthode officielle, méthode de routine, méthode alternative, méthode rapide... Ces termes, nous les connaissons tous, mais les confondons parfois, et ce d'autant plus que certains concepts sont voisins.

C'est pourquoi, il nous a paru utile de tenter une mise au point terminologique dans ce numéro.

### Deux proches voisins : méthode de référence et méthode officielles

La distinction entre les deux concepts dépend essentiellement du contexte dans lequel on se place. Le concept de méthode de référence relève du domaine du laboratoire, celui de méthode officielle du domaine légal et juridique.

#### METHODE DE REFERENCE

La notion de méthodes de référence est parfois contestée mais reste néanmoins couramment admise. Ce sont :

- soit des méthodes "définition" ou "critère" qui, par définition et consensus international donnent "les valeurs vraies" (justes) des grandeurs à mesurer (elles correspondent aux méthodes de type I du Codex Alimentarius, cf ci-dessous), par exemple, l'azote Kjeldahl ou la flore totale par dénombrement sur PCA;
- soit des méthodes de dosage de composés ou d'organismes chimiquement ou biologiquement définis, qui présentent les meilleurs critères analytiques parmi les méthodes disponibles (elles correspondent aux méthodes de type II du Codex).

Ce sont ces méthodes qu'on utilise en "référence", c'est à dire pour évaluer ou étalonner d'autres méthodes.

Pour être acceptées, les méthodes de référence doivent avoir fait (ou devront faire) l'objet d'une normalisation par un organisme spécialisé, national ou international. On dispose donc d'une description très détaillée de leur domaine d'application, des procédures à suivre et de leurs performances.

### Plusieurs niveaux de normalisation coexistent

#### NIVEAU INTERNATIONAL

On trouve plusieurs organismes non gouvernementaux qui sont :

- soit à caractère professionnel, travaillant sur un secteur donné (FIL : Fédération de l'Industrie Laitière, par exemple, pour l'industrie laitière);
- soit à caractère institutionnel couvrant l'ensemble des secteurs, mais pour un territoire géographique donné.(ISO : International Organization for Standardization , AOAC : Association of Official Analytical Chemists...).

Les normes ISO s'appliquent, en principe à l'ensemble des pays, mais sont en fait peu reprises par les Etats-Unis, le Japon et dans une moindre mesure par l'Allemagne.

Les normes AOAC couvrent essentiellement l'Amérique du Nord , où elles ont, de fait, un statut de méthodes officielles (cf ci-dessous).

Les normes CEN (Comité Européen de Normalisation) s'adressent à la Communauté Européenne.

Il y a, bien sûr, des points de rencontre entre ces différentes organisations. C'est ainsi que depuis un quinzaine d'années, des groupes d'experts FIL, ISO, AOAC collaborent à la mise en oeuvre de nouvelles normes: plus de 50% des normes FIL actuelles -surtout les plus récentes- sont des normes conjointes FIL-ISO-AOAC. De même, le CEN et l'ISO se sont engagés à collaborer dans le but d'éviter les duplications de travaux. Dans le domaine des produits laitiers (pour lequel la commission du CEN est de création récente et n'a pas encore produit de norme), la tendance serait de reprendre intégralement les normes FIL quand elles existent.

Cependant, un certain nombre de méthodes n'ont été traitées et normalisées que par un seul organisme et ne sont pas reprises par les autres, par ex. :

- méthode Gerber, avec une norme ISO uniquement;
- détection des neutralisants dans le lait en poudre : norme FIL, uniquement.

#### NIVEAU NATIONAL

Au niveau national, chaque pays dispose d'un organisme de normalisation. En France, c'est l'AFNOR (Association Française de Normalisation) qui fait partie de l'ISO. Un grand nombre de normes AFNOR sont donc équivalentes ou identiques aux normes ISO (plus de 70% des normes de la classe V 04 concernant les produits laitiers). Cependant, il existe quelques normes AFNOR ne correspondant pas à des textes internationaux, par ex. :

- détermination des teneurs en Na et K (V 04-355)
- détermination de la teneur en lactose (V 04-213).

#### METHODE OFFICIELLE

#### NIVEAU INTERNATIONAL

La Commission (intergouvernementale) du Codex Alimentarius (FAO / OMS : Food and Agriculture Organization / Organisation Mondiale pour la Santé) définit très strictement les produits alimentaires. Pour ce faire, il lui faut aussi définir un certain nombre de méthodes d'analyses. (Le tout est ensuite répertorié dans l'ouvrage qui porte le nom de Codex Alimentarius).

Les méthodes d'analyse sont élaborées dans des commissions spécialisées ou reprises après étude parmi les méthodes publiées

par les organismes cités ci-dessus. Les méthodes sont ensuite classées selon 4 catégories :

- type I et type II, c'est à dire méthodes "définition" ou "critère" et méthodes de référence (cf "METHODE DE REFERENCE", ci-dessus);

- type III : ce sont des méthodes dites "alternatives" -pouvant éventuellement remplacer celles des deux premiers types-, dont les critères analytiques sont suffisamment bons pour être utilisés en routine pour des contrôles réguliers, y compris à des fins réglementaires;

- type IV : ce sont des méthodes dites "provisoires" aux performances analytiques encore mal connues.

Seules les méthodes de type I et II correspondent à des méthodes reconnues comme officielles au niveau international, c'est à dire qu'elles constituent des références officielles en cas de litige (au niveau du GATT -General Agreement on Tariffs and Trade, par exemple).

En fait la quasi totalité des normes communes FIL-ISO-AOAC ont également été acceptées par la FAO et l'OMS.

#### **NIVEAU EUROPEEN**

Au niveau Européen, le Journal Officiel des Communautés Européennes a publié quelques méthodes d'analyses officielles (donc théoriquement obligatoires en cas de litige) : point de congélation, flore totale, activité phosphatase...Mais en fait, ces méthodes semblent être un compromis entre les normes de la FIL et des normes nationales et sont donc, pour l'heure, peu suivies. Cependant la tendance probable sera de donner le statut de méthode officielle européenne aux normes européennes que doit élaborer le CEN... ce qui devrait ramener une certaine harmonie dans ce domaine.

#### **NIVEAU NATIONAL**

Dans certains pays les méthodes normalisées ont de fait un statut de méthode officielle (AOAC et Etats-Unis). Ce n'est pas tout à fait le cas en France, où une méthode officielle est une méthode élaborée ou sélectionnée par la CG d'UMA (Commission Générale d'Harmonisation des Méthodes d'Analyse), puis publiée au Journal Officiel.

Des différences entre méthodes officielles et méthodes de référence normalisées sont possibles, et parfois justifiées -quand les domaines d'application sont légèrement différents, par exemple-. Ainsi, pour la détermination de la matière grasse dans le lait, la méthode officielle est l'extraction éthéro-chlorhydrique (qui est applicable même au laits altérés), qui a certes été normalisée par l'AFNOR, mais ne constitue pas la méthode de référence, ni au plan national, ni au plan international. De même, il y a des différences entre la norme AFNOR de détermination de la matière sèche dans le lait (V 04-367) et le texte du JO (Arrêté du 24.8.1983).

Cependant, depuis 1988, un accord existe entre la CG d'UMA et l'AFNOR pour éliminer les double-emplois. Celui-ci conduit à considérer les normes AFNOR comme méthodes officielles lorsqu'il n'y a pas encore de texte officiel sur le sujet.

Méthodes de référence et méthodes officielles sont donc des concepts voisins. Le choix éventuel entre l'un ou l'autre type de méthodes dépend essentiellement du contexte dans lequel on est placé :

- Raisonne-t-on au niveau national ou international ?
- Est-on en situation de litige ?

#### **D'autres méthodes existent**

Les méthodes évoquées ci-dessus sont le plus souvent de mise en oeuvre très lourde, d'où le développement d'un ensemble de méthodes plus légères et plus rapides.

Ce sont des méthodes alternatives qui permettent d'analyser ou d'estimer pour une catégorie de produits donnés la même grandeur que celle qui est mesurée par la méthode de référence correspondante. Mais elles présentent un ou plusieurs caractères de rapidité, facilité d'exécution, automatisation. Elles correspondent, approximativement, à toutes les méthodes regroupées dans les types III et IV du Codex Alimentarius.

Il s'agit :

- de méthodes manuelles normalisées, qui ont été automatisées;
- de certaines méthodes spécifiques de dosage (Noir Amido, Gerber...);
- de méthodes instrumentales, avec généralement des instruments dévolus uniquement à l'industrie laitière (appareils IR, Bactoscan, Cobra...);
- d'autres méthodes commerciales : kits d'analyse...(en anglais "proprietary technique", "test kit method").

Dans ces deux derniers cas, le plus souvent, une partie, voire la totalité des réactifs et/ou de l'instrumentation est protégée par un brevet et ne peut être obtenue que par l'intermédiaire d'un fabricant donné.

#### **METHODE DE ROUTINE**

L'utilisation de certaines de ces méthodes en tant que méthode de routine est couramment admise car leurs critères analytiques ont été jugés suffisamment bons (type III du Codex). Elles sont alors souvent normalisées ou publiées au JO (avec indication qu'elles ne constituent pas des méthodes de référence).

En France, celles qui sont utilisées aux fins de paiement du lait le sont après autorisation de la Commission Scientifique et Technique du Ministère de l'Agriculture à la suite d'un processus d'étude que nous avons décrit dans notre numéro 0.

Dans tous les cas, ces méthodes doivent être étalonnées par rapport aux méthodes de référence, relatives à l'emploi spécifique qui en est fait.

Un cas particulier de ces méthodes est constitué par les méthodes internes, utilisées en routine, à l'intérieur d'une entreprise ou d'un laboratoire. Elles devraient être sujettes à une validation interne déterminant leur répétabilité et leur justesse.

## AUTRES METHODES COMMERCIALES

La reconnaissance de leurs caractéristiques analytiques aux niveaux international et national suppose une démarche de validation plus ou moins poussée (donc une démarche volontaire et à titre onéreux de la part du fabricant).

Nous vous avons présenté les procédures de validation adoptées par l'AFNOR (dans notre numéro 0) et par l'AOAC (dans notre numéro 2)

Une validation ne donne cependant aucun caractère officiel à une méthode.

L'utilisation de ces méthodes se fait dans le cadre :

- de contrôles de matières premières ou de produits finis lors de transactions;
- du contrôle qualité;
- de différents contrôles réglementaires.

Elle doit toujours tenir compte de la justesse de la méthode commerciale par rapport à la méthode de référence.

## CONCLUSION

D'un point de vue pratique, que peut-on répondre à la question : "Quelle méthode choisir ?"

Dans le domaine des méthodes "alternatives", il est évidemment préférable de s'orienter vers des méthodes dont les performances ont déjà été établies : méthodes de routine, méthodes validées... tout en étant conscient de la nécessité d'étalonnages par rapport à la méthode de référence.

Il subsiste, à l'heure actuelle une certaine confusion entre les méthodes de référence et/ou des méthodes officielles. Cependant la tendance actuelle étant à l'unification et à l'harmonisation, on peut penser que progressivement les deux notions n'en formeront plus qu'une et qu'il y aura de même un rapprochement entre les niveaux national et international (surtout lorsque le CEN sera devenu effectif dans le domaine des produits laitiers). Pour l'heure, sauf dans le cas particulier d'un litige au niveau administratif ou commercial (où seules les méthodes officielles ont valeur juridique), il semble préférable, lorsqu'on a le choix entre plusieurs textes (par ex, une norme française, un texte du JO France, une norme internationale...) de choisir la méthode dont le texte est le plus récent. C'est, en effet, a priori celui qui a le plus fait la synthèse des nouveautés et des difficultés rencontrées dans les laboratoires.

## LES CHAINES MICROBIOLOGIQUES DE CECALAIT DANS LE LAIT CRU

CECALAIT propose, en plus des chaînes d'analyse sur les germes totaux à 30°C et les coliformes à 30°C (4 par an) une chaîne d'analyse sur les spores de Clostridium butyriques (2 par an) et une chaîne d'analyse sur les staphylocoques (4 par an).

Les limites de répétabilité et de justesse adoptées par CECALAIT, ainsi que le % de laboratoires hors-cible lors des dernières chaînes sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Lors de la dernière chaîne (Septembre 1992), comprenant les germes totaux à 30°C, les coliformes à 30°C et les

staphylocoques, nous avons observé un grand nombre d'erreurs qui auraient pu facilement être évitées.

Il s'agit d'erreurs d'inattention dans le recopiage des résultats et dans les calculs du nombre de germes en fonction de la dilution. Ces erreurs ont fortement contribué au mauvais classement de certains laboratoires et dénotent un manque de rigueur. Ce n'est pas parce que les analyses microbiologiques sont moins précises que les analyses chimiques qu'elles doivent être traitées avec moins de soin !

	REPETABILITE				JUSTESSE				
	r en log	RD <sub>95</sub> en %	S <sub>r</sub> en log	GRSD <sub>r</sub> en %	d en log	GR <sub>d</sub> en %	S <sub>d</sub> en log	GRS <sub>d</sub> en %	Labos hors-cible
Germes 30°C en UFC/ml	0,22	67%	0,08	20%	± 0,2	+58% -37%	0,15	40%	59%
Coliformes 30°C en UFC/ml	0,4	150%	0,14	40%	± 0,3	+100% -50%	0,3	100%	18%
Staphylocoques coagulase + en UFC/ml	0,7	400%	0,25	80%	± 0,4	+150% -60%	0,4	150%	35%
Spores butyriques en spores/l	0,7	400%	0,25	80%	± 0,3	+100%	0,3	100%	20%

r : répétabilité

RD<sub>95</sub> : écart-maximum observé dans 95% des cas par rapport à la valeur la plus faible

S<sub>r</sub> : écart-type de répétabilité

GRSD<sub>r</sub> : écart-type relatif géométrique de répétabilité

d : moyenne des écarts à la valeur de référence

GR<sub>d</sub> : écart moyen relatif géométrique des écarts à la référence

S<sub>d</sub> : écart-type des écarts à la référence

GRS<sub>d</sub> : écart-type relatif géométrique des écarts à la référence

# MESURE DE LA LIPOLYSE DANS LE LAIT

## Un phénomène préoccupant

La lipolyse de la matière grasse (MG) est un facteur qui préoccupe de plus en plus les transformateurs en raison de la baisse de qualité (mauvais goûts) qu'elle occasionne dans certains produits laitiers.

Maintenant bien identifiées, les causes principales du développement de la lipolyse sont liées aux modes de traite, de transfert et de conservation du lait dans le lait, qui sont à l'origine de chocs physiques et thermiques plus ou moins fréquents qui fragilisent les globules gras et favorisent le contact de la MG avec les enzymes lipolytiques présentes dans le lait (lipase naturelle du lait, lipases de contamination bactérienne).

Dans certains départements, l'interprofession laitière, ainsi que certaines entreprises ont déjà commencé à prendre en compte le critère "lipolyse" dans le paiement du lait et cette tendance va se développer.

## Une nécessaire harmonisation des méthodes de dosage

Afin de permettre la mesure de la lipolyse, les laboratoires interprofessionnels concernés ont été amenés à faire un choix de méthode de dosage entre deux catégories : les méthodes titrimétriques (famille des méthodes BDI -Bureau of Dairy Industries-) et les méthodes colorimétriques (famille des méthodes aux savons de cuivre ou MSC).

Ces méthodes mesurent toutes l'acidité de la MG, directement liée à la teneur en acides gras libres (AGL), teneur qui croît au fur et à mesure que se développe la lipolyse.

Compte tenu de ce contexte et de l'ouverture du Marché Européen, il devient indispensable d'assurer une homogénéité dans les pratiques et la qualité des résultats des laboratoires français. C'est pourquoi CECALAIT a mis en place, à l'automne 1991, des chaînes nationales d'analyses sur ce critère. Celles-ci ont mis en évidence une diversité de pratiques, qui nécessite une harmonisation dans le cadre d'une utilisation de type réglementaire. Ce travail est actuellement en cours avec l'aide de CECALAIT.

Aussi, nous apparaît-il utile de présenter les deux méthodes de routine du dosage de l'acidité de la MG, BDI et savons de cuivre, d'une part dans ce numéro de la Lettre de Cecalait, d'autre part dans un prochain numéro, afin de souligner les points primordiaux qu'il convient de maîtriser.

## La méthode BDI

Elle a subi de nombreux aménagements et modifications depuis ses premières applications, ce qui fait que l'on a plutôt affaire à une famille de méthodes. On distingue notamment la méthode de Jamotte (1972), la méthode de Driessen et al. (1977), la méthode INRA de Chilliard et al. (1983) et la méthode, adoptée par la Fédération Internationale de Laiterie (FIL), décrite en détail dans le Bulletin FIL N° 265 de 1991. Elle devrait être adoptée comme

norme dans un avenir proche et devrait de ce fait constituer une référence internationale.

Pour une présentation complète de la méthode, on se référera au Bulletin FIL N° 265. Nous traiterons ci-dessous des principes et des points clefs qui nécessitent une harmonisation et un bon contrôle !

## PRINCIPE DE LA METHODE

Par mélange avec une solution détergente, suivi d'une décantation à 95-100°C, la MG du lait est séparée de la phase aqueuse du lait. L'acidité libre contenue dans cette MG est alors titrée (à partir d'un aliquot en solution dans un solvant organique) à l'aide d'une liqueur alcaline en solution alcoolique et en présence d'un indicateur coloré.

## 1 EXTRACTION

L'extraction est la résultante de différents phénomènes physico-chimiques plus ou moins simultanés, qui sont étroitement liés à la nature des produits en présence et à leurs proportions respectives, aux conditions de milieu (pH et température) et à la durée de l'extraction. Ceux-ci conditionnent la libération physique des AGL du lait (une coagulation éventuelle des caséines en retient une partie), et la distribution des AGL entre la phase aqueuse et la phase grasse qui sera analysée (effet de la dissociation des AGL, liée au pH et du coefficient de partage entre phase aqueuse et grasse).

### HARMONISATION

#### ① Température - durée

Les différentes variantes de la méthode BDI s'accordent sur une température d'extraction de 95-100°C pendant 15 mn.

#### ② pH

Les pH d'extraction varient selon les cas entre 5,5 (Chilliard et al. 1983) et 6,6 (Driessen et al., 1977; FIL, 1991), ce qui entraîne des différences moyennes de 10% entre les deux extrêmes (voir Figure 1).

La FIL a donc arrêté son choix sur un pH de 6,6, proche de celui du lait de manière à ce que l'extraction n'entraîne pas de modification dans la dissociation des AGL et donc dans leur distribution entre phase grasse et phase aqueuse.

#### ③ Rapport volume de lait / volume de solution détergente

Une variation même faible de ce rapport entraîne une modification de distribution entre phase aqueuse et phase grasse, du fait d'un coefficient de partage, qui ne varie pas. Selon les différentes variantes de la méthode, le rapport varie entre 1:1 et 4:1 ! Or on a mesuré qu'une modification de ce rapport de 4:1 à 3:1 entraîne une diminution apparente de l'acidité de 10%. La proportion lait / détergent a donc été fixée à 3,5:1, le rapport le plus communément utilisé.

#### ④ Nature des produits de la solution détergente

Toutes les formules utilisées en méthode BDI contiennent du Triton X-100, associé à un polyphosphate de sodium. Le choix du polyphosphate détermine le pH de la solution d'extraction. Certaines ont tendance à s'hydrolyser lors du séjour au bain-marie à 95-100°C et le pH décroît rapidement jusqu'à floculation des caséines. La FIL a adopté l'utilisation du tétraphosphate de sodium, qui permet l'obtention directe d'un pH proche de 6,6 et un ajustement final plus aisé.

Certaines formulations de solutions détergentes incluent soit de l'urée, soit de l'isopropanol qui ont pour effet de modifier le pH ou la polarité de la phase aqueuse. Ces produits sont à proscrire, en tant que sources potentielles de biais.

$\frac{\text{acidité de la MG à pH } x}{\text{acidité de la MG à pH } 6,6}$

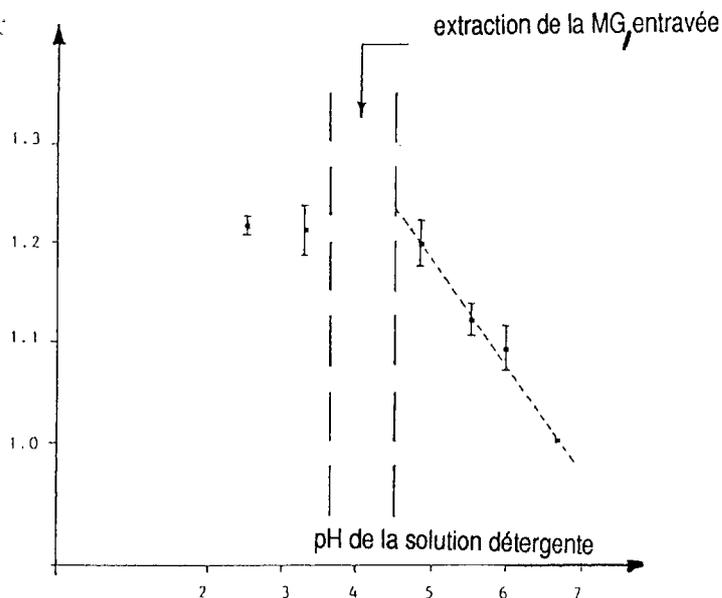


Figure 1 : augmentation relative de l'acidité de la MG du lait en fonction de la décroissance du pH de la solution détergente (Van Reusel, 1989 in Bulletin FIL N°265, 1991)

## 2 TITRATION DE LA MATIÈRE GRASSE

La titration reprend les éléments de la norme FIL 6B:1989, "Dosage de l'acidité de la MG dans les produits à base de MG laitière", mais en les adaptant à de faibles quantités de MG.

Ces faibles quantités sont liées au volume de lait nécessaire qui a été fixé à 16 ml, en fonction de considérations pratiques de prélèvement (volume de prélèvement limité, car il y a d'autres analyses à effectuer) et d'analyse (utilisation de récipients permettant l'analyse de séries importantes, donc de dimensions réduites, tels que les butyromètres de Van Gulik ou les tubes de MONED). Dans ces conditions, un lait à 40 g/l de MG permet d'extraire environ 640 mg de MG, ce qui permet de réaliser chaque dosage en double avec des prises d'essai de 250 mg. En deçà, la précision des résultats risque de devenir incompatible avec une utilisation réglementaire.

Compte tenu des faibles quantités de MG ainsi mises en jeu, il importe de contrôler les points essentiels suivants :

- précision des prises d'essai;
- protection contre le CO<sub>2</sub> de l'air (piégeage, bullage);
- exactitude du titre de la liqueur de titration (dilution précise);
- précision de la distribution de la liqueur de titration (contrôle pondéral, sur tout ou partie de l'échelle);
- détermination du point d'équivalence (indicateur adapté, colorimétrie).

La titration peut être réalisée en continu, comme le préconise la FIL (prises d'essai successives dans le même solvant de la MG) ou en discontinu (changement de solvant et de récipient), mais dans ce dernier cas, des précautions élémentaires sont nécessaires.

### ① précision des prises d'essai

#### a) Normes selon le bulletin N° 265 de la FIL

\* La quantité requise pour le dosage est de 250 mg de MG, précise à 2 mg près, soit une tolérance relative de  $\pm 0,8\%$ , ce qui occasionne un erreur systématique de  $\pm 0,008$  meq/100 g

\* Le système de prise d'essai (seringue calibrée) ne doit pas entraîner d'effet de contamination entre échantillons supérieur à 3%, soit entre une MG à 0,50 meq/100 g et une MG à 1,5 meq/100 g une erreur de 0,03 meq/100 g. Par ailleurs, le système de prise d'essai doit être répétable car l'erreur de répétabilité relative s'applique aux résultats. La titration proprement dite doit respecter la norme 6B:1989, où  $r = 0,05$  meq/100 g soit un CV de 1,8%. La prise d'essai devra donc respecter au moins cette valeur de CV de 1,8%.

#### b) Mesure volumétrique (système en continu)

L'adoption d'un système de distribution se fera après essai par pesée et vérification que le système respecte bien ces normes de précision.

Dans ces conditions, pour un résultat individuel, le cumul des erreurs systématiques et aléatoires tolérées n'excèdera pas  $\pm 4,5\%$ , soit 0,045 meq/100 g au niveau de 1 meq/100 g (l'erreur de contamination vient en addition de cette erreur).

Les seringues à expulsion totale peuvent convenir à ce type d'utilisation.

#### c) Mesure pondérale (système discontinu)

Ce système permet la maîtrise parfaite de la prise d'essai, la précision étant celle de la balance utilisée. Cette balance analytique à  $10^{-4}$  g sera vérifiée régulièrement (poids de référence, service de contrôle agréé).

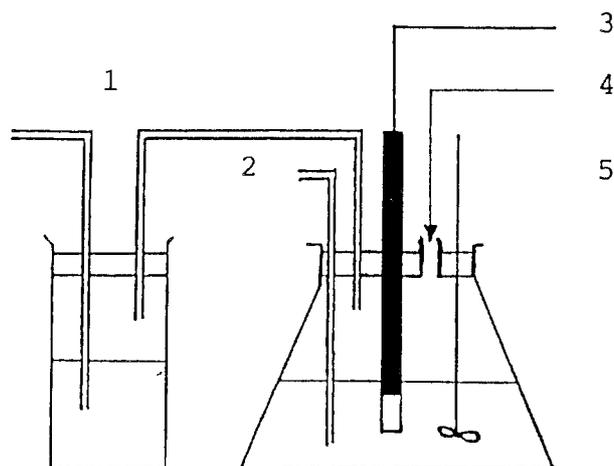
Dans ces conditions, l'erreur de prélèvement est très faible et n'excède pas 0,5% soit 0,005 meq/100 g à un niveau de 1 meq/100 g.

## ② protection contre le CO<sub>2</sub> de l'air

Le gaz carbonique de l'air peut être titré sous forme d'acide carbonique par la liqueur alcaline et fausser les dosages par excès.

### a) Evacuation à l'azote

\* Le montage de titration doit permettre d'éliminer le CO<sub>2</sub>. Un courant d'azote pur, exempt de CO<sub>2</sub> doit permettre de chasser les traces de CO<sub>2</sub> dans le récipient de titration clos, l'azote s'évacuant par l'orifice d'introduction de la prise d'essai dans le cas d'un système de dosage en continu (voir figure 2).



1. arrivée de l'azote, passant par une bouteille de lavage contenant de l'éther de pétrole
2. admission d'une solution alcaline à 0,01N depuis une burette de titration semi-automatique
3. sonde optique, connectée à un colorimètre et à une chaîne de titration
4. orifice d'introduction du solvant de la MG et des prises d'essai
5. agitateur

Figure 2 : Schéma de montage pour la titration successive de différentes prises d'essai dans le même solvant de la MG (in Bulletin FIL N°265, 1991)

\* Dans un montage en discontinu, le nouveau récipient avec prise d'essai sera purgé à l'azote avant l'introduction du solvant dans la MG et le début de la titration.

Un "blanc réactifs" (solvant seul) sera effectué régulièrement (toutes les 10 analyses) et son acidité sera soustraite aux résultats de routine (voir norme FIL 6B:1989).

### b) Choix de la liqueur de titration

La liqueur alcaline préconisée par la FIL (tétra N butylammonium hydroxyde (titrant) dans le 2 propanol / méthanol (solvant)) a l'avantage de solubiliser plus faiblement le CO<sub>2</sub> ambiant par rapport à la classique potasse alcoolique. Néanmoins, elle doit être préparée extemporanément.

## ③ Exactitude du titre de la liqueur de titration

L'erreur relative existant sur ce titre se répercute intégralement sur les résultats des dosages et peut s'additionner aux erreurs de prise d'essai.

Le titrant FIL garantit une bonne stabilité journalière de son titre (peu sensible au CO<sub>2</sub>, faible évaporation du solvant, bonne affinité du titrant et de son solvant), mais ce titre doit être parfaitement déterminé par rapport à une solution étalon d'hydrogénophthalate de potassium, en présence de bleu de thymol. En outre, des analyses de contrôle régulières sur une MG de contrôle (témoin) ou de référence (préparée selon la norme FIL 6B:1989 ou le Bulletin FIL N° 265 de 1991) doivent permettre de vérifier si le titre évolue et, le cas échéant, d'en redéterminer la valeur.

## ④ Précision de la distribution de la liqueur de titration

a) L'erreur relative de la titration se répercute directement sur les résultats : on vérifiera par pesée la justesse du système de distribution sur l'échelle de distribution utilisée.

- en cas de système automatique avec moteur pas à pas, un réglage sera effectué (erreur relative : 0,3%)

- dans le cas de microburette, on mesurera les erreurs éventuelles à différents niveaux de chute pour permettre des corrections si nécessaire (erreur relative autour de 0,5% en valeur relative).

b) La résolution du système de distribution détermine celle de la méthode : une résolution de 0,01 meq/100 g nécessite une mesure de chute de burette de 0,025 ml. Le bulletin FIL 265 de 1991 fixe la division minimale pour une microburette à 0,005 ml qui permet d'obtenir une telle résolution par estimation entre 2 divisions.

## ⑤ Précision de la détermination du point d'équivalence

Meilleure est l'affinité de la liqueur de titration avec le solvant de la MG et celle de ce dernier avec la MG elle-même, meilleure est la neutralisation de l'acidité de la MG, d'où le choix des experts de la FIL.

Compte tenu de la faible ionicité du milieu, la seule méthode de détermination du point d'équivalence est l'utilisation d'un indicateur coloré (une sonde à pH n'est pas appropriée). Le choix de cet indicateur est donc particulièrement important. Le bleu de thymol (dans le 2 propanol) qui a un virage très proche du point d'équivalence, est, de ce fait, le plus approprié.

La détermination du point de virage, réalisée de manière visuelle peut être facilitée par l'utilisation d'une sonde optique à 600-620 µm. On peut y associer une microburette automatique qui simplifiera le travail du laborantin et permet de gagner du temps. Si la densité optique au point d'équivalence est préalablement réglée, l'erreur du manipulateur est supprimée (appréciation du virage, erreur de lecture).

## Conclusion

La procédure publiée par la FIL est le résultat d'une optimisation des différentes étapes de la méthode par des experts

internationaux. Dans ce cadre, la méthode doit permettre de respecter les valeurs de fidélité qui y sont données :

**répétabilité : r = 0,05 meq/100 g**

**reproductibilité : R = 0,08 meq/100 g**

Dans ces conditions, les erreurs systématiques d'un groupe entraîné de laboratoires se distribuent dans la fourchette de  $\pm 0,045$  meq/100 g, ce qui recouvre les différentes erreurs de titration énumérées ci-dessus avec leurs tolérances respectives associées à l'erreur d'extraction.

#### Références citées dans ce texte

**BULLETIN DE LA FIL**, 1991, N° 265. FIL-IDF, Bruxelles.

**CHILLIARD, Y., BAUCHART, D., CARTIER, P. et CHAZAL, M.P.** Etalonnage, comparaison et automatisation de différentes

méthodes de dosage des acides gras libres du lait de vache. Brochure ITEB - INRA, 1983, N° 84031

**DRIESSEN, F.M., JELLEMA, A., VAN LUIN, F.J.P., STADHOUDERS, J. and WOLBERS G.J.M.** The estimation of the fat acidity in raw milk. An adaptation of the BDI method, suitable for routine assays. Neth. Milk Dairy J., 1977, V. 31, p. 40-55

**JAMOTTE, P.** (1972) Note concernant la méthode BDI, utilisée à Gembloux. Documentation FIL. Groupe de travail A3, 1989

**norme FIL 6B:1989** : Produits à base de matière grasse laitière et beurre : détermination de l'acidité de la matière grasse

**VAN REUSEL, A.** Contribution à l'étude de la détermination des acides gras libres dans le lait et les produits laitiers. Gembloux (Belgique) : Centre de Recherches Agronomiques de l'Etat, 1989, Mémoire N° 12, ISBN 2 - 87286 -000 -2

## NORMES PARUES RECEMMENT

### Liste des révisions ou des nouvelles normes FIL parues de Juillet à Octobre 1992.

**LAIT CONCENTRE SUCRE : 35A:1992** (équivalente à ISO 2911, révision de 1976) Détermination de la teneur en saccharose (*méthode polarimétrique*)

**LAIT ET PRODUIT LAITIERS : 136A:1992** (équivalente à ISO 8197) Echantillonnage - Contrôle par mesures

**LAIT ET BOISSONS LACTEES : 155:1992** (équivalente à ISO 11816) Détermination de la phosphatase alcaline (*méthode fluorimétrique*)

**FROMAGES ET FROMAGES FONDUS : 34C:1992** (équivalente à ISO 2963) Détermination de la teneur en acide citrique (*méthode enzymatique*)

**FROMAGES FONDUS : 52A:1992** Détermination par calcul de la teneur (exprimée en acide citrique) en émulsifiants ajoutés à base de citrate

**MATIERE GRASSE LAITIERE ET PRODUITS A BASE DE CETTE MATIERE GRASSE : 159:1992** (équivalente à ISO /CD 12078) Détermination du cholestérol

**LEVAINS LACTIQUES : 149:1991** Normes d'identité

### Du côté de L'AFNOR

**ANALYSE SENSORIELLE : V 00-150 (NF ISO 5492) Mai 1992**  
Vocabulaire