

# DETERMINATION DE LA TENEUR EN UREE PAR pHMETRIE DIFFERENTIELLE A L'AIDE DU CL10

(Résumé de l'intervention de M. LEFIER de l'INRA Poligny lors de l'Assemblée Générale de CECALAIT)

De nombreuses méthodes de dosage existent pour déterminer la teneur en urée dans le lait. Celle présentée associe la transformation enzymatique de l'urée en ammoniacque avec la mesure de variation de pH induite, via l'appareil CL10 d'EUROCHEM. Suite à une évaluation du potentiel de l'appareillage, celui présente des performances acceptables permettant d'envisager une solution économique et technique au problème des méthodes enzymatiques (pas de préparation de l'échantillon, peu de réactifs, automatisable)

Cette méthode de dosage de l'urée a été retenue par le groupe FIL E302 pour être étudiée comme méthode de référence internationale possible.

L'appareil CL 10 est un appareil de mesure de pHmètrie différentielle fabriqué par la société EUROCHEM (Italie) et commercialisé par la société FOSS. Cette technique est un intérêt général dont les avantages intrinsèques permette de la considérer comme une alternative à la spectrophotométrie.

L'étude présentée ne correspond pas à une étude de validation au sens strict, mais la campagne d'analyse menée, à partir d'échantillons disponibles, permet d'évaluer les potentialités de la technique.

Elle a eu lieu à l'INRA de Poligny au laboratoire de physico-chimie pendant les mois de Décembre 1996 et janvier 1997.

*Remarque :* Les différences méthodes de dosage de l'urée dans le lait ont fait l'objet d'un résumé publié dans la Lettre de CECALAIT n°19.

## DESCRIPTION

L'appareil se compose :

- \* d'une chambre de réaction
- \* d'un bloc de mesure thermostaté contenant deux électrodes capillaires de mesure de pH
- \* de deux groupes de pompes péristaltiques,
- \* d'un amplificateur et microprocesseur.

L'ensemble est piloté par un micro-ordinateur annexe.

Le principe de la méthode repose sur la variation de pH induite lors de la transformation enzymatique de l'urée en ammoniacque.

Le dosage s'effectue en deux étapes :

- \* ajout de 20µl de lait dans la cellule et mise à l'équilibre des deux électrodes avec le mélange échantillon-tampon,
- \* ajout de l'enzyme dans la chambre de réaction pour catalyser la réaction, et mesure de la variation de pH entre le mélange échantillon-tampon (électrode 1) et le mélange enzyme-échantillon-tampon (électrode 2).

La différence de pH est directement corrélée à la teneur en urée, via la calibration préalable.

## ESSAIS

La méthode pHmètrie a été comparée à la méthode colorimétrique au DMAB après défécation des protéines au TCA à une concentration finale de 12% et à la méthode enzymatique conformément à la norme NF V04-217. Les travaux ont été effectués en collaboration avec le Laboratoire départemental d'analyses agricoles de Poligny (LDA 39), pour la méthode colorimétrique.

Les échantillons proviennent de différentes origines:

- 79 laits individuels fournis par le LDA 39, analysés en parallèle par la méthode colorimétrique;
- 28 laits de producteurs fournis par l'union des producteurs de Beaufort (Chambéry, Savoie) analysés en parallèle par la méthode enzymatique à la SRTAL;
- 11 laits résultant d'une gamme d'un essai inter-laboratoires CECALAIT et élaborée de telle manière que les teneurs des composants majeurs du lait restent constantes. Là aussi, la détermination de la teneur en urée a été effectuée selon la norme NF V04-217 et ce dans les mêmes conditions que précédemment.

## ● EVALUATION DE LA REPETABILITE-REPRODUCTIBILITE

La répétabilité de la méthode pHmètrie a été évaluée sur la population des 118 laits répartis sur 5 périodes d'analyse au cours des deux mois de mise à disposition de l'appareil.

Dans le but d'une comparaison avec la méthode normalisée, la répétabilité a été estimée sur 39 échantillons.

L'ensemble des résultats est rassemblé dans le tableau 1.

méthode	N	S <sub>r</sub>	caractéristiques de la population de laits analysés			
			moyenne	écart type	minimum	maximum
pH-mètrie	118	0.28	30.04	11.87	9.05	57.71
pH-mètrie	39	0.27	29.10	9.57	18.35	57.71
NF V04-217	39	0.34	29.03	9.74	18.04	57.48

Tableau 1 : Répétabilité sur l'ensemble des laits (en mg/100ml).

N : nombre d'échantillons

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

Ces résultats tendent à montrer la bonne répétabilité de la méthode et des écarts entre double non liés à un effet niveau de la teneur en urée. De même, les essais de reproductibilité dans le temps sont tout à fait satisfaisants pour l'appareil, quelque soit la concentration d'urée dans les échantillons.

### ⑨ INCIDENCE DU CONSERVATEUR

Trois doses de conservateurs ont été testés ainsi que la forme du bronopol; les résultats sont rassemblés dans le tableau 2. Bien que les résultats donnés portent sur un nombre limité de laits, l'augmentation de la teneur en bronopol n'a pas d'effet significatif pour le dosage selon la méthode pHmétrique

CONSERVATEUR		Lait 1	Lait 2	Lait 3	Lait 4
bronopol 0.02%	liquide	33.94	40.34	26.82	41.76
bronopol 0.04%	liquide	33.72	40.76	26.46	41.87
bronopol 0.08%	liquide	34.94	40.48	25.82	41.33
bronopol 0.02%	pastille	34.51	40.12	26.5	41.80

Tableau 2 : Effet du conservateur (en mg/100ml).

### ⑩ EVALUATION DE LA PRECISION

Dans un premier temps, la méthode pHmétrique est comparée à la méthode colorimétrique. La figure 1 illustre la bonne corrélation entre les deux méthodes, sachant que l'analyse des 79 laits a été effectuée sur trois périodes différentes.

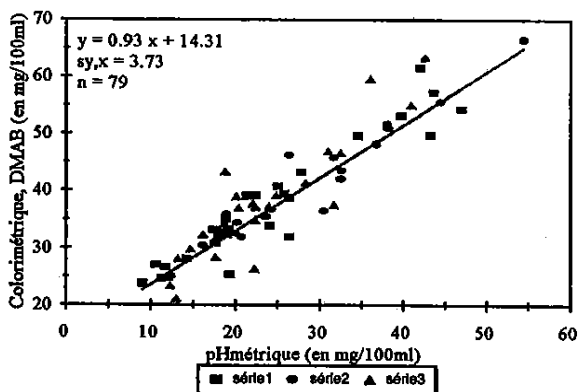


Fig. 1 : comparaison entre la méthode colorimétrique et la méthode pHmétrique.

Dans un second temps, la méthode pHmétrique est comparée à la méthode de référence issue de la norme NF V04-217 (les défécations ont été réalisées le jour de l'analyse en pHmétrique différentielle). Sachant que la répétabilité des déterminations selon les deux méthodes sont équivalentes et conformes aux résultats donnés dans la norme, la figure 2 illustre la bonne précision de la méthode par rapport à la référence. Bien que le principe de mesure soit identique pour les deux méthodes, basé sur le dosage de  $\text{NH}_3$  résultant de l'activité de l'uréase introduite dans l'échantillon à doser, ces deux méthodes se discernent par le principe de quantification de cette production de  $\text{NH}_3$ .

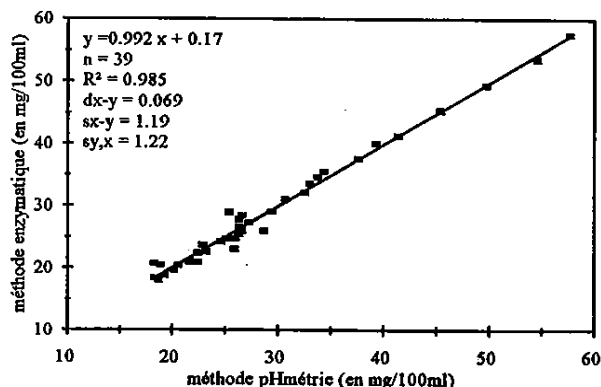


Fig. 2 : comparaison des méthodes enzymatiques et pHmétrique.

### ⑪ CONCLUSION GENERALE

Bien que l'étude reste partielle, le dosage par pHmétrique peut être considéré comme une méthode de routine prometteuse. Le principe de pHmétrique différentielle peut s'appliquer à d'autres types de dosage tels que le lactose, les acides lactique ou citrique.

#### Références

NF V 04-247 (1992). LAIT ET PRODUITS LAITIERS. Détermination de la teneur en ammoniac et en urée. Méthode enzymatique.

D. LEFIER. Bulletin FIL 135, oct 96. Analytical methods for the determination of urea content in milk.

(par D. Lefier et M.H. Duployer)