Original article

Application de la technique FIA (*Flow Injection Analysis*) au dosage des fractions azotées du fromage

M. Courroye¹, J.L. Berdagué² et O. Leray³

¹ Institut technique du gruyère, Zone artisanale, 70190 Rioz;

² Institut technique du gruyère, INRA-Poligny, 39800 Poligny;

³ Institut technique de l'élevage bovin, INRA-Poligny, 39800 Poligny, France

(reçu le 4 juillet 1988, accepté le 23 janvier 1989)

Résumé — L'application de la technique FIA (*Flow Injection Analysis*) au dosage des fractions azotées du fromage permet d'automatiser la titration des ions ammonium après minéralisation de l'azote. Le dosage par la technique FIA de l'azote total, de l'azote soluble et de l'azote non protéique a été comparé au dosage par la méthode Kjeldahl, normes FIL 20A, 1986.

Dans le cas de l'ammoniaque du fromage, un dosage direct par la technique FIA a été mis au point et comparé à la méthode par distillation d'Amariglio (1986).

La répétabilité de la technique FIA (exprimée en %) est comprise entre 0,49 pour l'azote total et 2,37 pour l'ammoniaque. La comparaison à la méthode de Kjeldahl a permis d'observer des précisions d'estimation (exprimées en %) situées entre 1,03 pour l'azote total et 3,95 pour l'ammoniaque.

fromage — fractions azotées — ammoniaque — dosage

Summary — The FIA (*Flow Injection Analysis*) technique in nitrogen fraction analysis. FIA technique is used for nitrogen fraction analysis. It allows the automation of ammonia titration after a preliminary mineralisation.

The FIA technique was compared to the Kjeldahl method (IDF standard 20A, 1986) for the total nitrogen, the soluble nitrogen and the nonprotein nitrogen measurements. The direct measurement of cheese ammonia was tested and was compared to the distillation method of Amariglio (1986).

The repeatability of analysis, expressed as the coefficient of variation (CV) was between 0.49 (for total nitrogen) and 2.37% for ammonia. Accuracy measured against Kjeldahl method and expressed by the CV of regressions, was between 1.03 for total nitrogen and 3.95% for ammonia.

cheese — nitrogen fractions — ammonia — determination

Introduction

L'analyse des fractions azotées fournit d'utiles renseignements, pour apprécier le

degré d'affinage du fromage et prévoir son évolution. Il est indispensable, dans cette perspective, de disposer de méthodes de dosage rapides et faciles d'em-

ploi. La méthode classique de dosage de référence selon Kjeldahl (Norme FIL 20A, 1986) requiert une technicité et un soin particuliers; chaque étape de la méthode (minéralisation, distillation, titration) étant une source d'erreurs potentielle. L'utilisation de la technique FIA (*Flow Injection Analysis*) ne supprime pas l'étape de la minéralisation, mais remplace les étapes de distillation et de titration par une séparation des ions ammonium à travers une membrane, suivie d'un dosage colorimétrique. La cadence d'analyse peut être de 60 échantillons à l'heure.

Plusieurs fractions azotées ont été dosées par la technique FIA développée par Tecator. Ces fractions sont l'azote total (NT), l'azote soluble et l'azote non protéique (respectivement NS et NPN, extraits selon Lenoir, 1962) après minéralisation Kjeldahl. L'ammoniaque est directement dosée à partir d'un lait de fromage.

Dans cet article, nous nous proposons d'évaluer les caractéristiques de fidélité (répétabilité) des dosages FIA pour chaque fraction azotée et de les comparer à celles des méthodes prises comme références: norme FIL 20A (1986) pour l'azote total, les fractions NS et NPN, et la méthode par distillation d'Amariglio (1986), appliquée au fromage pour l'ammoniaque. Nous avons comparé la procédure d'étalonnage standard à partir de solutions de chlorure d'ammonium à l'étalonnage classique obtenu à l'aide d'un échantillon représentatif de la population dosée selon les directives de la norme FIL128-1985. La précision d'estimation de la méthode FIA par rapport aux méthodes choisies comme références a également été calculée.

Dans le cas de l'azote total, des fractions NS et NPN, on notera que pour les deux méthodes comparées, la minéralisation est effectuée de manière identique,

mais que les dosages sont faits à partir de minéralisats distincts puisqu'il est nécessaire de distiller la totalité du contenu des matras de Kjeldahl. Ainsi, une part d'erreur de minéralisation s'introduit-elle dans la comparaison des méthodes de titration.

Principe et fonctionnement du dosage des fractions azotées par la technique FIA

Le principe de fonctionnement (Fig. 1) repose sur la technique d'analyse en flux continu non segmenté proposé par Ruzicka et Hansen (1975, 1981). L'analyse consiste à injecter un volume défini d'une solution aqueuse d'ions ammonium dans un liquide vecteur tamponné, de composition déterminée (Tecator, 1982; Van Son *et al.*, 1983). Après mélange avec de l'hydroxyde de sodium, il y a libération d'ammoniac par neutralisation selon le schéma:

L'ammoniac diffuse à travers une membrane téflon de porosité déterminée (Van Son *et al.*, 1983) et réagit avec un indicateur coloré dans la cellule de réaction ou «chemifold» suivant:

L'augmentation de la concentration en ions I^- est associée à un changement de couleur de l'indicateur coloré, que l'on mesure par photométrie à 590 nm.

La reproductibilité parfaite du temps de séjour et l'homogénéité de la dispersion des solutés dans la cellule réactionnelle sont deux conditions de base de la technique FIA.

Fig. 1. Schéma de fonctionnement de l'analyseur FIA. L'échantillon S contenant les fractions azotées est injecté dans un liquide vecteur ou carrier : C. Ce flux est mélangé avec de la soude (R_1). Il se produit alors un dégagement d'ammoniac qui diffuse à travers une membrane (M), dans un courant indicateur (R_2). Le changement de couleur de l'indicateur est mesuré dans un détecteur (D) à 590 nm.

Matériel et méthodes

Nature et choix des échantillons de fromage

Les analyses ont porté sur une série de fromages d'Emmental et de Beaufort choisis à différents stades de l'affinage, afin d'obtenir une gamme de variation de la composition des fractions azotées du fromage suffisamment étendue.

Dosages de référence

- Azote total: dosage selon la norme FIL-IDF 20A (1986).
- Azote soluble et azote non protéique: les fractions azotées solubles et non protéiques sont extraites selon Lenoir (1962). L'azote de ces fractions est dosé selon la norme FIL-IDF 20A (1986).
- Ammoniaque: dosage selon la méthode par distillation adaptée au fromage (Amariglio, 1986), à partir de 5 g de fromage placés dans 50 ml d'eau distillée, en présence d'un gramme de magnésie.

Dosages par la technique FIA

Appareillage: le système FIA se compose des éléments suivants:

- unité de base *Flow Injection Analyser* 5020;
- Injecteur L 100-1;
- Chemifold type V;
- Photomètre 5006, filtre réglé à 590 nm;
- Contrôleur 5032.

Produits et réactifs:

- liquide vecteur C = acide sulfurique Normapur: 60 ml, sulfate de potassium: 14 g, eau QSP 1 000 ml;
- flux R_1 = hydroxyde de sodium 2N;
- flux R_2 = indicateur coloré composé de solution "Stock" (brevet Tecator): 20 ml, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$: 16 ml, eau QSP 1 000 ml.
- solution indicateur Stock: 0,25 g, hydroxyde de sodium 0,1N: 1,25 ml, eau QSP 50 ml.

Mode opératoire:

- azote total: après minéralisation selon la norme FIL-IDF 20A, le minéralisant est ajusté à 250 ml avec de l'eau distillée. La prise d'essai est de 30 microlitres;
- azote soluble et azote non protéique: la préparation des échantillons jusqu'à la minéralisation est identique à celle effectuée pour les dosages de référence. Le minéralisant est ajusté à 250 ml avec de l'eau distillée. La prise d'essai est de 100 microlitres;
- ammoniaque: injection directe de 100 microlitres d'un lait de fromage préparé comme suit: pesée précise de 1 g de fromage, dilution dans 100 ml de tampon sulfate pH: < 1 (acide sulfurique Normapur: 35 ml, sulfate de potassium: 23,4 g, eau QSP 1 000 ml), broyage 30 sec à l'ultradisperseur.

Méthode de calibrage: le calibrage de l'appareil est réalisé selon la méthode de Lagrange.

Exploitation statistique des résultats

Dans un premier temps, les deux méthodes testées sont comparées d'après le critère de répétabilité, mesuré par l'écart type de répétabilité:

$$Sr = \left(\frac{1}{2n} \sum_{i=1}^n W_i^2 \right)^{1/2}$$

à partir des écarts W_i entre les i doubles de chacune des méthodes et pour chaque catégorie d'analyse. Ce paramètre peut être exprimé également en valeur relative par rapport à la moyenne des taux estimés (écart type relatif: $Sr \% = Sr/\bar{x} \cdot 100$).

Dans un second temps, la méthode FIA est évaluée sur le critère de justesse, par rapport à la méthode Kjeldahl choisie comme référence, à l'aide des critères définis par Grappin (1976) selon la norme FIL 128 (1985). Ces critères sont:

- la *précision d'estimation de la méthode*, mesurée à partir de l'écart type résiduel de la régression linéaire:

$$\sigma_y, x = \left[\sum_{i=1}^n \frac{(y_i - bx_i - a)^2}{n-2} \right]^{1/2}$$

est donnée par les limites de l'intervalle de confiance à l'intérieur duquel se situe la vraie valeur fournie par la méthode de référence, avec une probabilité de 95 %. Elle est ici définie par l'écart type de l'accord entre la méthode Kjeldahl et la technique FIA;

- la *précision d'ajustement de l'étalonnage*, selon la technique préconisée par le constructeur, mesure l'exactitude de l'étalonnage. La technique d'étalonnage FIA peut être jugée satisfaisante si la relation Kjeldahl = $b(\text{FIA}) + a$ calculée par la méthode des moindres carrés n'est pas statistiquement distincte de la relation d'égalité Kjeldahl = FIA; soit $b = 1$ et $a = 0$.

En d'autres termes, on vérifiera que le coefficient b de l'équation de régression n'est pas statistiquement différent de 1 ($P < 0,05$) et que la moyenne des écarts entre les deux

méthodes ne diffère pas statistiquement de 0 ($P < 0,05$).

La conformité de l'ordonnée à l'origine est un corollaire de celle des deux premiers paramètres, l'essentiel étant que le meilleur ajustement entre les méthodes comparées soit réalisé dans la zone des valeurs habituellement rencontrées lors des analyses.

Le dépouillement statistique a été réalisé à l'aide d'un logiciel de régression Calcont, établi par Leray (1985).

Résultats et discussion

L'échantillonnage retenu pour les différentes fractions azotées dosées est décrit dans le Tableau I.

Les moyennes et les écarts types des échantillons permettent d'apprécier la plage de variation des taux des différentes gammes (environ la moyenne ± 2 écarts types).

Etude de la répétabilité

Les écarts types de répétabilité entre doubles présentent des valeurs très voisines, qu'il s'agisse de la technique FIA ou de la méthode Kjeldahl, prise comme référence (Tableau I). Dans le cas de l'azote total, de l'azote soluble et de l'ammoniacal, l'écart type de répétabilité de la technique FIA est légèrement inférieur quoique de manière non significative à celui de la méthode Kjeldahl. L'écart type de répétabilité relatif, observé pour la technique FIA, s'élève à 0,49 pour l'azote total NT, 1,62 pour la fraction NS, 1,96 pour la fraction NPN et 2,37 pour l'ammoniacal.

Ces valeurs concordent avec les coefficients de variation de répétabilité de 0,5 à 1,2 % observés par Oltner *et al.* (1985), dans le dosage de l'urée du lait par la

Tableau I. Etude comparée de la répétabilité de la méthode Kjeldahl et de la méthode FIA. n = nombre d'échantillons, $\bar{x}$ = moyenne (méthode Kjeldahl), σx = écart type de taux des différents échantillons (méthode Kjeldahl), σ = écart type de répétabilité, $\sigma\%$ = écart type de répétabilité relatif.

Fractions azotées étudiées	n	$\bar{x}$ (réf.)	σx	Méthode Kjeldahl		Technique FIA	
				σ	$\sigma\%$	σ	$\sigma\%$
Azote total (g % g de fromage)	50	28,12	1,05	0,18	0,64	0,14	0,49
Azote soluble (g % g de fromage)	38	7,58	0,96	0,15	1,98	0,12	1,62
Azote non protéique (g % g de fromage)	35	4,83	0,51	0,10	2,10	0,10	1,96
Ammoniaque (mg % g de fromage)	39	91,76	24	2,75	2,99	2,17	2,37

technique FIA après dégradation enzymatique en ammoniaque à l'aide d'une uréase. Il est néanmoins probable que les valeurs que nous mesurons soient légèrement surestimées du fait de prises d'essai en doubles faites sur des minéralisats distincts.

Etude de la justesse: exactitude de l'étalement et précision d'estimation

Exactitude de l'étalement

Les équations de régression linéaire exprimant la référence (Kjeldahl) en fonction de la technique étudiée (FIA) sont calculées selon la méthode des moindres carrés pour chacune des fractions azotées à partir des moyennes des deux déterminations faites sur chaque échantillon. Ces équations, présentées sur la Figure 2, correspondent dans chacun des cas à:

- azote total: Kjeldahl = $0,93 \text{ FIA} + 1,90$;
- azote soluble: Kjeldahl = $1,06 \text{ FIA} - 0,42$;

- azote non protéique: Kjeldahl = $0,96 \text{ FIA} + 0,17$;
- ammoniaque: Kjeldahl = $0,96 \text{ FIA} + 4,17$.

Ces équations ont été obtenues à partir de l'ensemble des analyses, dans les cas du dosage de l'azote total et de la fraction NPN. En ce qui concerne le dosage de la fraction NS, les résultats de deux échantillons n'ont pas été pris en compte dans le calcul de la régression (Fig. 2). En effet, les contributions importantes de ces deux points à la variance résiduelle de la régression, respectivement de 49,2 et 14,5 %, indiquent que ces deux points déséquilibrent la régression et sont susceptibles de fausser l'appréciation de l'étalement. De même, dans le cas de l'ammoniaque, un résultat d'analyse n'a pas été pris en compte (Fig. 2), avec une contribution de 12,8 % à la variance résiduelle de la régression.

Les principaux paramètres d'estimation des méthodes d'analyses de routine sont présentés dans le Tableau II. Ils vont nous

Fig. 2. Droite d'étalonnage estimée pour le dosage de l'azote total (2A), de l'azote soluble (2B), de l'azote non protéique (2C) et de l'ammoniaque (2D) par la méthode FIA, par rapport à la méthode Kjeldahl.

permettre d'apprécier la justesse de la technique FIA.

Les tests statistiques réalisés sur les paramètres calculés montrent que, pour les quatre fractions azotées (Tableau II), les coefficients de régression b ne sont pas significativement différents de 1 et que les ordonnées à l'origine ne sont pas non plus significativement différentes de 0 ($P < 0,01$). Ceci indique que la technique d'étalonnage préconisée par le constructeur n'apporte pas de biais sensible aux résultats sur les plages de taux considérés dans les essais.

Précision d'estimation

La précision d'estimation peut être appréciée par les écarts types résiduels liés aux régressions linéaires de la méthode de référence en fonction de la méthode FIA (Tableau II). Exprimés en valeur relative, ils sont respectivement de 1,03, 1,99, 2,13 et 3,95 % pour les dosages de l'azote total, NS, NPN et ammoniacque. Ces valeurs sont sensiblement du même

ordre de grandeur que les écarts types de répétabilité correspondants. Dans l'absolu, ces valeurs sont très satisfaisantes, si on les compare aux méthodes rapides de dosage des protéines du lait dont les coefficients de variation sont compris entre 1 et 2 %. Oltner *et al.* (1985) se référant à des ajouts dosés pour le dosage de l'urée du lait par la technique FIA ont observé un coefficient de variation de 1,8%.

Conclusion

Pour le dosage de l'azote total, des fractions azote soluble et non protéique, la méthode FIA intégrant une minéralisation Kjeldahl ne présente pas de différence notable de répétabilité avec la méthode Kjeldahl (Norme FIL 20A, 1986).

Sur les gammes de taux choisies aussi larges que possible, il n'a pas été mis en évidence de biais significatif d'étalonnage par rapport à la méthode Kjeldahl, avec

Tableau II. Présentation des principaux paramètres d'estimation des analyses de routine, appliquée à la comparaison des dosages de l'azote total, de l'azote soluble, de l'azote non protéique et de l'ammoniacque par la technique FIA et par la méthode Kjeldahl. n = nombre d'observations, $b \pm \sigma b$ = pente $\pm$ écart type de la pente, a = ordonnée à l'origine, r = coefficient de corrélation linéaire, σx , y = écart type résiduel lié à la régression, $\bar{\Delta} \pm \sigma \bar{\Delta}$ = moyenne des écarts types (FIA-Kjeldahl) $\pm$ écart type de la moyenne.

Fractions azotées	n	$b \pm \sigma b$	t	a	$\bar{\Delta} \pm \sigma \bar{\Delta}$	t	r	$\sigma y, x$	$\sigma y, x\%$
Azote total	50	$0,933 \pm 0,039$ NS		1,903	$-0,019 \pm 0,042$ NS		0,962	0,29	1,03
Azote soluble	38	$1,060 \pm 0,028$ NS		-0,422	$-0,031 \pm 0,041$ NS		0,988	0,15	1,99
Azote non protéique	35	$0,960 \pm 0,032$ NS		0,170	$0,024 \pm 0,017$ NS		0,982	0,10	2,13
Ammoniacque	39	$0,961 \pm 0,024$ NS		4,166	$-0,621 \pm 0,590$ NS		0,989	3,63	3,95

t = test de comparaison de Student à une valeur fixe : 1 pour la pente b et 0 pour la moyenne des écarts; Seuils de signification : NS = Non Significatif.

des calibrages réalisés à partir de solutions pures d'ammoniaque.

La précision de la méthode (qui prend en compte la minéralisation), par rapport à la méthode Kjeldahl, reste dans des valeurs normalement observées et satisfaisantes en regard des applications souhaitées.

Au niveau d'un laboratoire, si la phase de minéralisation, longue, demeure incompressible, le temps nécessaire à la distillation et à la titration peut être divisé par 6 en utilisant un système à flux continu type FIA.

Il est également possible de doser l'ammoniaque directement à partir d'un lait de fromage avec une répétabilité et une précision de la méthode non significativement différentes de celles de la méthode par distillation d'après Amariglio (1986), appliquée au fromage.

Références

- FIL 20 A (1986) *Milk. Total Nitrogen content (Kjeldahl method)*. 1-3
- FIL 128 (1985) *Milk. Overall accuracy*. 1-11
- Amariglio S. (1986) *Contrôle de la qualité des produits laitiers. Recueil de normes françaises AFNOR-ITSV, Tour Europe, Cedex 7, 92080 Paris-La Défense*, 277-278
- Grappin R. (1976) Guide pour l'évaluation des méthodes d'analyses de routine. *Lait* 56, 608-621
- Lenoir J. (1962) Note sur la dégradation des protides au cours de la dégradation du camembert. *Lait* 43, 154-165
- Leray O. (1985) Logiciel Calcont, ITEB-INRA, Station de recherche laitière, 39800 Poligny
- Oltner R., Bengtsson S. & Larsson K. (1985) Flow Injection Analysis for the determination of urea in cow's milk. *Acta Vet. Scand.* 26, 396-404
- Ruzicka J. & Hansen E.H. (1975) Flow Injection Analysis. Part 1 : A new concept of fast continuous flow analysis. *Anal. Chem. Acta* 78, 145-157
- Ruzicka J. & Hansen E.H. (1981) *Flow Injection Analysis*. Wiley & sons
- Tecator (1982) *Application note : Determination of ammonia nitrogen by flow injection analysis and gas diffusion*. AN 50/82, 1-5
- Van Son M., Schothorst R.C. & Den Boef G. (1983) Determination of total ammoniacal nitrogen in water by flow injection analysis and a gas diffusion membrane. *Anal. Chem. Acta* 153, 271-275