



**HAL**  
open science

# Etude analytique d'un réactif de transparisation du lait et des produits laitiers

Emmanuelle Benoit

► **To cite this version:**

Emmanuelle Benoit. Etude analytique d'un réactif de transparisation du lait et des produits laitiers. Chimie analytique. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1989. Français. NNT : 1989NAN10041 . tel-01748140

**HAL Id: tel-01748140**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748140v1>**

Submitted on 29 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

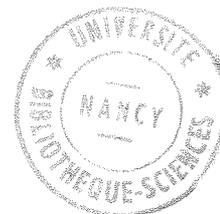
UNIVERSITE DE NANCY I

U.E.R. SCIENCES DE LA MATIERE

**THESE**

présentée à  
l'Université de NANCY I

pour l'obtention du titre de



**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANCY I  
en CHIMIE ANALYTIQUE**

par  
Emmanuelle **BENOIT**

Sujet:

**ETUDE ANALYTIQUE D'UN REACTIF  
DE TRANSPARISATION DU LAIT  
ET DES PRODUITS LAITIERS**

---

Soutenue publiquement le 7 Juillet 1989 devant la Commission d'Examen

*Jury*  
*sous la Présidence de*  
M. G. LINDEN *Rapporteur*

MM. J. BESSIERE  
P. COUTROT  
C. LOUIS  
B. SEBILLE *Rapporteur*  
C. VIGNERON

Je remercie vivement Monsieur le Professeur J. BESSIERE de m'avoir accueillie au Laboratoire de Chimie et d'Electrochimie Analytique, de m'avoir proposé un sujet de recherche nouveau, et d'avoir suivi mes travaux avec autant de bienveillance et de disponibilité.

Je tiens à remercier Claire LOUIS, Maître de Conférences pour ses précieux conseils, toujours prodigués avec gentillesse, et pour avoir accepté de juger ce travail.

Messieurs les Professeurs G.LINDEN, B. SEBILLE, C. VIGNERON et P. COUTROT m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail; je les en remercie et leur exprime toute ma reconnaissance.

Je voudrais exprimer ma gratitude, à tous ceux qui m'ont aidée, lors de mon arrivée, à m'intégrer au Laboratoire.

## ABREVIATIONS

DTNB: Acide 5-5' dithiobis(2-nitrobenzoïque)

ECS: Electrode au calomel saturé en chlorure de potassium

EDTA: Acide éthylène diamino-tétracétique

$\epsilon'$ : Constante diélectrique

$E_0$ : Potentiel normal d'un système redox

$E_{1/2}$ : Potentiel de demi-vague

-NH<sub>2</sub>: Groupement amine

pK: -lg K (K: constante de dissociation du complexe)

pK<sub>a</sub>: -lg K<sub>a</sub> (K<sub>a</sub>: constante de dissociation de l'acide)

pK<sub>i</sub>: -lg K<sub>i</sub> (K<sub>i</sub>: produit ionique du solvant)

-SH: Groupement sulfhydryle

TNBS: Acide 2,4,6-trinitrobenzènesulfonique

Triton X 100<sup>®</sup>: Octylphenoxy polyethoxyethanol

<b>PLAN</b>	<b>Page</b>
INTRODUCTION	1
Chapitre 1: Caractéristiques générales du réactif de transparisation.	5
1. Les mélanges dissolvants du lait et des produits laitiers	5
2. Composition du réactif de transparisation R	7
3. Utilisation du réactif de transparisation R	7
4. Protocole de transparisation	9
5. Composition des mélanges hydroorganiques étudiés	10
6. Propriétés spectroscopiques du réactif R	11
7. Etude diélectrique	11
7.1. Mélanges du réactif R avec l'eau	11
7.2. Comparaison lait-lait transparisé	14
8. Etude conductimétrique classique	15
8.1. Etude de l'effet d'ions sur la conductance des milieux transparisés	15
8.2. Etude de l'effet de l'ajout de chlorure de sodium à des laits transparisés ou non	16
Conclusion	17

Chapitre 2: Etude des réactions acide-base en milieu transparisé	19
1. Echelles de pH dans les milieux transparisés	21
1.1. Méthode d'étude des réactions acide-base	21
1.2. Couples acide-base envisagés Allure des courbes de titrage	23
1.3. Analyse des courbes de titrage	23
2. Détermination de la zone de virage d'indicateurs colorés	27
3. Etude pH-métrique du lait transparisé	29
3.1. Détermination de la limite de transparisation	
3.2 Courbe de titrage d'un lait transparisé	30
Conclusion	31
Chapitre 3: Etude des réactions d'oxydo-réduction dans les milieux transparisés	33
1. Etude des systèmes redox dans les milieux privés de soude	34
1.1. Détermination des grandeurs thermodynamiques de systèmes rapides	35
1.2. Autres systèmes	37
1.2.1. Système du cuivre (II)	37
1.2.2. Cas de l'iode	38
1.2.3. Cas du permanganate de potassium	39
1.2.4. Cas du thiocyanate	40
a. Electrode de platine	41
b. Electrode d'argent	41

2. Caractère réducteur des ions hydroxyde	42
Conclusion	44
Chapitre 4: Analyse des réactions de complexation dans les milieux transparisés	47
1. Etude de réactions de complexation d'espèces minérales	48
1.1. Les ions chlorure	48
1.1.1. Réaction de l'ion chlorure avec l'ion argent	48
1.1.2. Dosage des ions chlorure dans le lait transparisé	50
1.2. Les ions thiocyanate	51
2. Réaction de complexation des groupements sulfhydryle par l'ion argent	54
2.1. Choix du milieu réactionnel	56
2.2. Conditions de la détection ampérométrique	57
2.3. Réponse de l'électrode à l'ajout d'argent	57
2.4. Comparaison du dosage de la cystéine dans deux milieux	58
2.5. Allure de la courbe de titrage de la cystéine- Détermination de la constante de complexation cystéine-argent	58
2.6. Droite d'étalonnage	59
2.7. Dosage des groupements sulfhydryle du lait	60
Conclusion	62

CONCLUSION-DEVELOPPEMENTS	64
ANNEXES	69
Annexe I: Transparisation du lait	70
Annexe II: Tracé des spectres UV-Visible	71
Annexe III: Mesure de la constante diélectrique	71
Annexe IV: Mesure de la conductance	72
Annexe V: Réalisation de courbes de titrage potentiométriques à l'électrode de pH	73
Annexe VI: Tracé des courbes voltampérométriques	75
Annexe VII: Tracé des courbes de titrage à l'électrode d'argent	78
Annexe VIII: Préconditionnement de l'électrode d'argent en vue du titrage des ions thiocyanate	79
Annexe IX: Détermination ampérométrique des groupements sulfhydryle	80
Annexe X: Courbe voltampérométrique d'un lait transparisé	82
BIBLIOGRAPHIE	83

## INTRODUCTION

Dans le domaine alimentaire, la complexité des produits envisagés et les exigences accrues de contrôle, réclament d'augmenter les possibilités d'analyse, notamment en développant des méthodes et des réactifs nouveaux. De plus, ce secteur est demandeur de techniques d'analyse rapides.

La difficulté d'analyse réside dans l'hétérogénéité des substrats qui rend indispensables des étapes de séparation telles que la défécation, la centrifugation ou la filtration. Ces diverses opérations ont pour effet d'allonger le temps d'analyse, et présentent aussi l'inconvénient d'entraîner la perte de certaines espèces restées adsorbées sur les précipités. De plus, certains dosages sont limités par l'eau en tant que solvant, et le recours à d'autres milieux réactionnels, (tels que l'acide acétique, par exemple), a été envisagé.

C'est pourquoi, dans le domaine laitier, ont été développées des méthodes de transparisation: elles sont basées sur le développement d'une réaction colorée dans le lait (ou dans une suspension de produit laitier), la lecture de l'absorbance étant réalisée directement après une étape de transparisation. Cette étape a pour intérêt de rendre le milieu limpide et homogène, et permet de s'affranchir des étapes de séparation.



Bosset et coll., en 1974, proposent deux formules permettant la dissolution intégrale du lait: le mélange eau/ soude/ tétrahydrofurane et le mélange eau/ soude/ n-butylamine.

Linden et coll., en 1981, mettent au point un réactif dit de "transparisation" constitué de n-butylamine/ cyclohexanone/ Triton X100 et permettant de rendre le lait parfaitement limpide.

En 1984, Owen et coll. clarifient le lait à l'aide d'un mélange d'EDTA et de Triton X100.

En 1986, Linden et coll. améliorent leur premier réactif, et mettent au point le réactif R. Dans sa composition entrent l'eau, la soude, la butanone, et comme détergents, le laurylsulfate de sodium et le Triton X100: c'est ce réactif qui fait l'objet de notre travail.

Ces divers mélanges constituent des milieux originaux permettant la dissolution des associations protéino-lipidiques: c'est cette originalité qui justifie l'étude plus approfondie des propriétés du réactif R.

Les *objectifs* de notre étude se sont situés à plusieurs niveaux:

. Dans une première étape, améliorer la connaissance du milieu transparisant afin de trouver des moyens de repousser ses limitations actuelles.

. Dans une seconde étape, effectuer l'opération de transparisation avant de développer les réactions chimiques de dosage: c'est une nouvelle manière d'aborder l'utilisation du réactif R, qui permettrait d'envisager certaines caractérisations impossibles sur le lait seul.

. Enfin, sur un plan plus fondamental, connaître, les milieux transparisés complexes, dont les applications peuvent déborder largement le cadre du lait.

Dans notre *approche*, la démarche adoptée est celle de l'analyste: dans un milieu complexe, l'analyse des réactions chimiques se fait à partir des trois équilibres élémentaires: pH, redox et complexation:

. Sur un plan général, il s'agit de savoir si les raisonnements connus dans l'eau pour prévoir les réactions sont applicables dans les milieux transparisés contenant des proportions différentes en solvant organique. La connaissance de la constante diélectrique des milieux permettant de répondre à cette question, une étude diélectrique et conductimétrique a été envisagée. (Chapitre 1)

. La prévision des équilibres acido-basiques se fait à partir des constantes thermodynamiques: est-ce que celles-ci varient dans les milieux transparisés? Les échelles de pH sont-elles différentes dans ces milieux ? Sur un plan pratique, est-ce que les moyens de contrôle du pH utilisés dans l'eau sont transposables à ces milieux nouveaux ?

Dans le domaine laitier, est-il possible de reconnaître des laits ayant subi des traitements particuliers ou ayant une origine différente, à partir de leur caractérisation acido-basique après transparisation? (Chapitre 2)

. L'oxydo-réduction est un volet important: en effet, la formation et la stabilité de nombreuses colorations dépendent des conditions de potentiel; dans l'eau, les virages des indicateurs colorés dépendent de leur diagramme potentiel-pH, et il est probable qu'il en est de même dans les milieux transparisés.

Aussi est-il important de connaître le caractère réducteur du lait transparisé et de voir s'il reflète les propriétés redox du lait ou du seul agent de transparisation.

Parallèlement, sur le plan des réactions chimiques, la détermination des constantes thermodynamiques permet de mettre en évidence les différences majeures pouvant éventuellement exister au niveau redox par rapport à l'eau. (Chapitre 3)

L'étude de la complexation permet d'apprécier la différence de solvation des ions d'un milieu à l'autre; de plus, sur un plan pratique, de nombreux dosages chimiques font intervenir ce type de réactions, comme par exemple celui des ions chlorure par les ions argent.

Comme dans les cas précédents, il s'agit de savoir si l'ajout de transparisant modifie sensiblement les propriétés du lait, et s'il est possible de réaliser, in situ, des dosages complexométriques dans le lait transparisé ( par exemple, le dosage des ions chlorure ou des groupements sulfhydryle).

Un autre aspect de ce chapitre est de savoir si la transparisation modifie le nombre de groupements sulfhydryle libres du lait, du fait de l'action notoire du réactif R sur les protéines. Si c'est le cas, cela justifie l'utilisation de la transparisation comme étape ultérieure au dosage; dans le cas contraire, la réaction peut être envisagée in situ avec des avantages particuliers. (Chapitre 4)

Cette étude générale permettant de connaître le rôle du transparisant au niveau des équilibres simples nous semble une étape indispensable avant d'envisager l'étude du comportement d'entités plus complexes comme les protéines ou certaines réactions organiques plus compliquées.

## **CHAPITRE 1: CARACTERISTIQUES GENERALES DU REACTIF DE TRANSPARISATION**

### 1. Les mélanges dissolvants du lait et des produits laitiers

Plusieurs mélanges de dissolution des constituants colloïdaux du lait à des fins analytiques ont été décrits antérieurement au réactif R étudié.

En 1970, un traitement par de l'acide acétique concentré a été proposé afin de rendre le lait complètement transparent; ce procédé s'accompagne d'une dilution de l'échantillon au centième; ses applications ont permis la mesure directe de l'absorbance des protéines du lait à 280 nm, ainsi que la détermination du taux de matière grasse à 400 nm en présence d'un mélange urée-imidazole (1).

Une méthode de dissolution intégrale du lait à l'aide des mélanges eau/soude/tétrahydrofurane et eau/soude/n-butylamine a été proposée dans le but d'adapter au lait et aux produits laitiers la technique de dosage des protéines totales par la méthode du Biuret (2)(3)(4)(5); un lait entier traité avec ces mélanges présente une densité optique résiduelle de 0,2 à 500 nm pour des dilutions respectives au centième et au cinquantième.

Le réactif dit de "transparisation" utilisé par Linden et Paquet en 1981 est constitué par un mélange de solvants organiques et d'un détergent: n-butylamine/cyclohexanone/Triton X100 en présence d'acide chlorhydrique concentré. Au contact de ce mélange, le lait perd sa turbidité naturelle et devient complètement limpide. Un lait transparisé présente une densité optique résiduelle inférieure à 0,1 entre 400 et 800 nm; la dilution minimale utilisée est de 8 fois. Ce réactif a permis la

détermination des activités de quelques enzymes du lait(7)(8)(9), avec une bonne corrélation avec les méthodes habituelles; il a été aussi appliqué au dénombrement de bactéries dans le lait (10). Cependant, la n-butylamine présente le double inconvénient d'être agressive vis à vis des cuves jetables pour spectromètre , et d'être malodorante.

En 1984, un travail (11) montre qu'il est possible de clarifier le lait par un mélange de Triton X100 et d'EDTA. Avec une dilution du lait inférieure au tiers, la densité optique résiduelle est de 0,5 à 400 nm. De plus ce procédé nécessite un temps de contact relativement long pouvant aller jusqu'à 30 minutes à 60°C. Il a été utilisé pour l'estimation des protéines totales par la méthode du Biuret, pour la détermination des groupements  $-NH_2$  par la méthode au TNBS, et la détermination de l'activité enzymatique de la phosphatase acide du lait ; l'analyse des groupements  $-SH$  du lait par le DTNB a aussi été envisagée (11).

Devant les inconvénients présentés par ces divers réactifs, l'équipe de Linden s'est proposée de mettre au point un nouveau réactif, répondant aux exigences suivantes (12):

- la dilution maximale des échantillons est de un quart,
- la butylamine est remplacée par un solvant inerte vis à vis des cuves à usage unique, moins malodorant, et ne contenant pas dans sa structure de groupements aminés provoquant des interférences lors du dosage des groupements  $-NH_2$  des protéines du lait,
- le pH d'utilisation (entre 10,4 à 11,5) est abaissé par rapport à leur ancien réactif qui nécessitait une zone de pH de 11,2 à 12,8;
- l'absorbance à 410 nm doit être de 0,1 au maximum.

C'est ce nouveau réactif qui fait l'objet de notre travail et qui est présenté dans le paragraphe suivant.

## 2. Composition du réactif de transparisation R

Le réactif étudié, R, a été mis au point par G. Linden et son équipe (12)(13). Il a fait l'objet d'un brevet (14) et est actuellement en voie de commercialisation par la Société Prolabo.

Il est constitué par un mélange de butanone, de Triton X100, de laurylsulfate de sodium, de soude et d'eau.

La transparisation du lait est le résultat de l'action conjuguée de ces différents constituants:

- . La butanone, solvant des lipides, permet de dissoudre les globules gras présents dans le lait.

- . La soude rend les protéines solubles, notamment en dispersant les micelles de caséine par rupture des ponts disulfure, des liaisons hydrogène et des liaisons hydrophiles qui s'établissent entre les molécules, ou, au sein de chaque molécule pour maintenir la structure micellaire et les structures secondaires, tertiaires et quaternaires.

- . Les détergents augmentent les propriétés dissolvantes des deux constituants précités, et diminuent la tension superficielle du mélange, évitant ainsi la formation d'émulsion.(12)

## 3. Utilisation du réactif de transparisation R

Le réactif R est actuellement utilisé dans le contrôle analytique du lait et des produits laitiers (tels que yaourts, crème fraîche, fromage) (13).

En contrôle analytique, le réactif R est utilisé pour des dosages chimiques ou enzymatiques: dans ces deux cas, il est toujours ajouté au

milieu réactionnel après développement d'une réaction colorée, son rôle étant de transpariser le milieu juste en amont de la lecture au spectromètre. Il évite ainsi les étapes de séparation habituellement nécessaires pour obtenir une solution limpide et homogène à partir du lait.(11)

Les dosages chimiques actuellement proposés sont ceux des groupements aminés et des groupements sulfhydryle libres du lait:

. Le dosage des groupements aminés est basé sur la formation d'un complexe coloré trinitrophénylé entre ces groupements et l'acide 2,4,6 trinitrobenzène sulfonique. Il permet en particulier de suivre la dégradation de la partie protéique du lait (18).

. Le résultat de la détermination du taux de groupements sulfhydryle, par formation d'un complexe coloré avec l'acide 5-5' dithio-bis-2 nitrobenzoïque, peut être relié au traitement thermique subi par le lait (19).

Les dosages enzymatiques sont réalisés par réaction de l'enzyme sur des substrats trinitrophénylés libérant dans le milieu un composé coloré:

. La détermination de l'activité de la phosphatase alcaline permet de contrôler le traitement thermique subi par le lait;

. Celle de l'activité protéasique permet de surveiller la qualité protéique, ou de suivre l'affinage lors de la fabrication de fromages.  
(9)(13)

#### 4. Protocole de transparisation

Le tableau 1 donne une formule de transparisation de lait demi-écrémé et de lait entier. C'est d'après cette formule que nous avons développé notre étude analytique des milieux transparisés.

	R	eau distillée	lait
lait demi-écrémé	2	1	1
lait entier	4	0	1

Tableau 1: Volumes de R, d'eau distillée et de lait nécessaires à la transparisation

L'opération de transparisation nécessite une incubation de deux à trois minutes à 37°C. (annexe I)

### 5. Composition des mélanges hydroorganiques étudiés.

Les proportions en volume de réactif R et de phase aqueuse étant susceptibles de varier lors de la transparisation ( tableau 1), les mélanges de différentes compositions hydroorganiques utilisés dans la suite de ce travail comme modèles de milieux transparisés sont définis dans le tableau 2.

Milieu	R62%	R44%	R40%	R0%
R(sans soude)	1	3	4	
Eau distillée	1	1	1	
Butanone				1
Triton X100				1
Volume d'eau* ( %, V/V)	62	44	40	0

\*: Volume tenant compte de l'eau apportée par R

Tableau 2: Composition des milieux R62%, R44%, R40% et R0%  
(volumes)

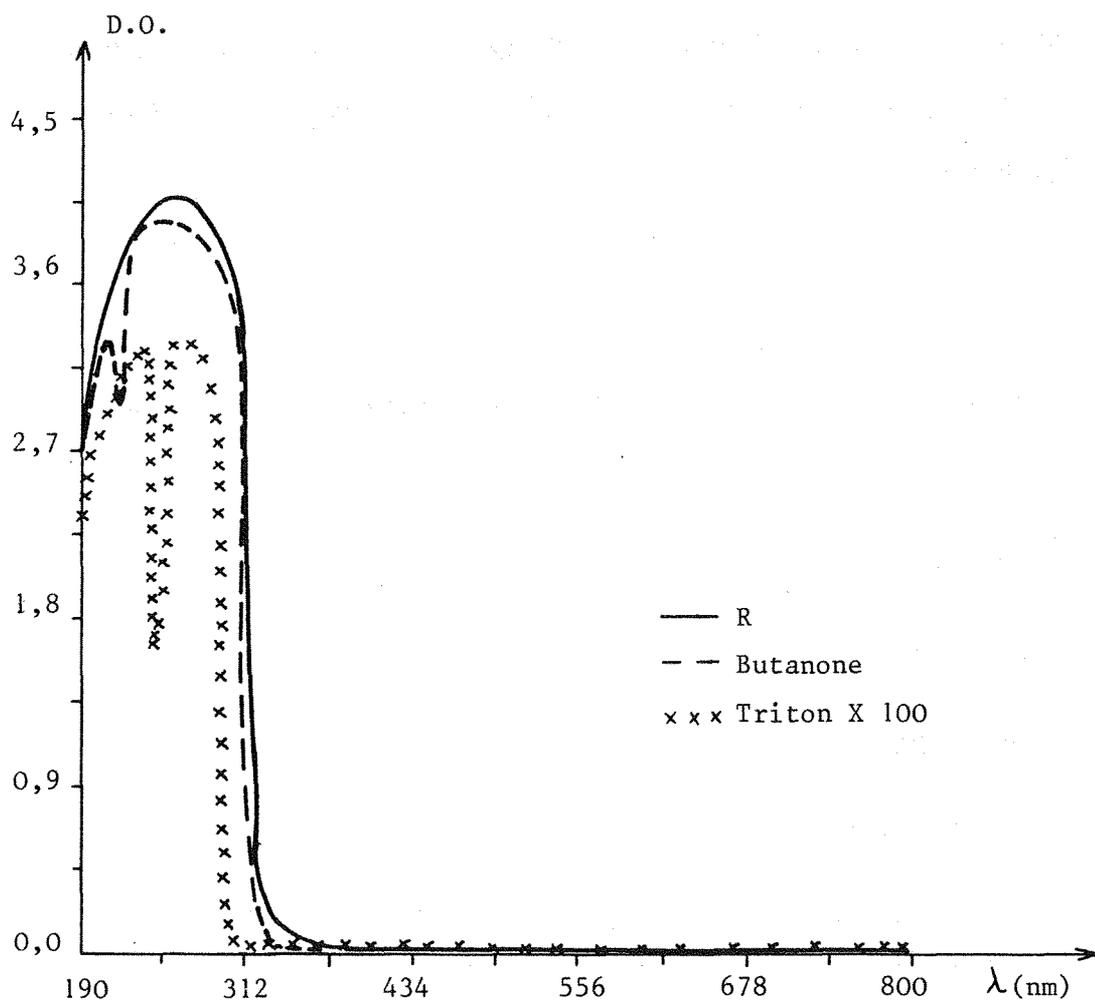


Figure 1: Spectres d'absorption moléculaire de R dilué au demi, de la butanone et du Triton X 100

## 6. Propriétés spectroscopiques de R

Le spectre d'absorption moléculaire dans l'ultra-violet et le visible du réactif R présente une bande d'absorbance très importante de 190 à 320 nm. La figure 1 montre le spectre obtenu pour le réactif de transparisation R dilué au demi avec de l'eau distillée, et pour les constituants responsables de cette absorbance: la butanone et le Triton X100 (annexell).

La faible absorbance résiduelle du réactif dans le domaine du visible permet d'y développer des réactions colorées (18)(19).

Sa composition a été mise au point de façon à ce que l'absorbance résiduelle dans le domaine du visible soit minimale: elle est de 0,075 à 400nm pour un trajet optique de 1cm (12)(13).

## 7. Etude diélectrique.

### 7.1. Mélanges du réactif R avec l'eau

La constante diélectrique d'un solvant permet de le classer parmi les solvants dissociants ( $\epsilon' > 30$ ) ou non dissociants ( $\epsilon' < 15$ ) (20)(21).

Dans le premier cas, les espèces existant en solution sont sous forme moléculaire ou d'ions libres, et l'analyse et la prévision des réactions se font, comme dans l'eau ( $\epsilon' = 78$ ), à partir des constantes thermodynamiques.

Par contre, dans le cas de solvants de basses constantes diélectriques, les solutés sont sous forme de paires d'ions ou de molécules, les ions libres n'existant pratiquement pas du fait de la forte association des espèces chargées par effet électrostatique. Il en résulte

un changement dans la nature des équilibres (21).

Par exemple, l'action de  $\text{NH}_3$  sur l'acide acétique se traduit en milieu dissociant par une réaction à quatre termes engageant les deux couples acide-base  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$  et  $\text{AcOH}/\text{AcO}^-$ .

En milieu peu dissociant, la réaction est la suivante:



C'est une réaction à trois termes, et la notion de couple acide-base est moins évidente que dans le cas précédent. Il en résulte une plus grande difficulté dans la prévision des réactions.(21)

Il importe de savoir si l'analyse des réactions dans les milieux transparisés peut se faire comme dans l'eau, ou s'il y a lieu de prendre des précautions particulières du fait de la présence de paires d'ions. Ceci nous a conduit à évaluer la constante diélectrique des milieux transparisés

(annexe III). Ces milieux correspondent au mélange de Triton X100 peu dissociant, de butanone moyennement dissociante, et d'eau, milieu dissociant ( Tableau 3).

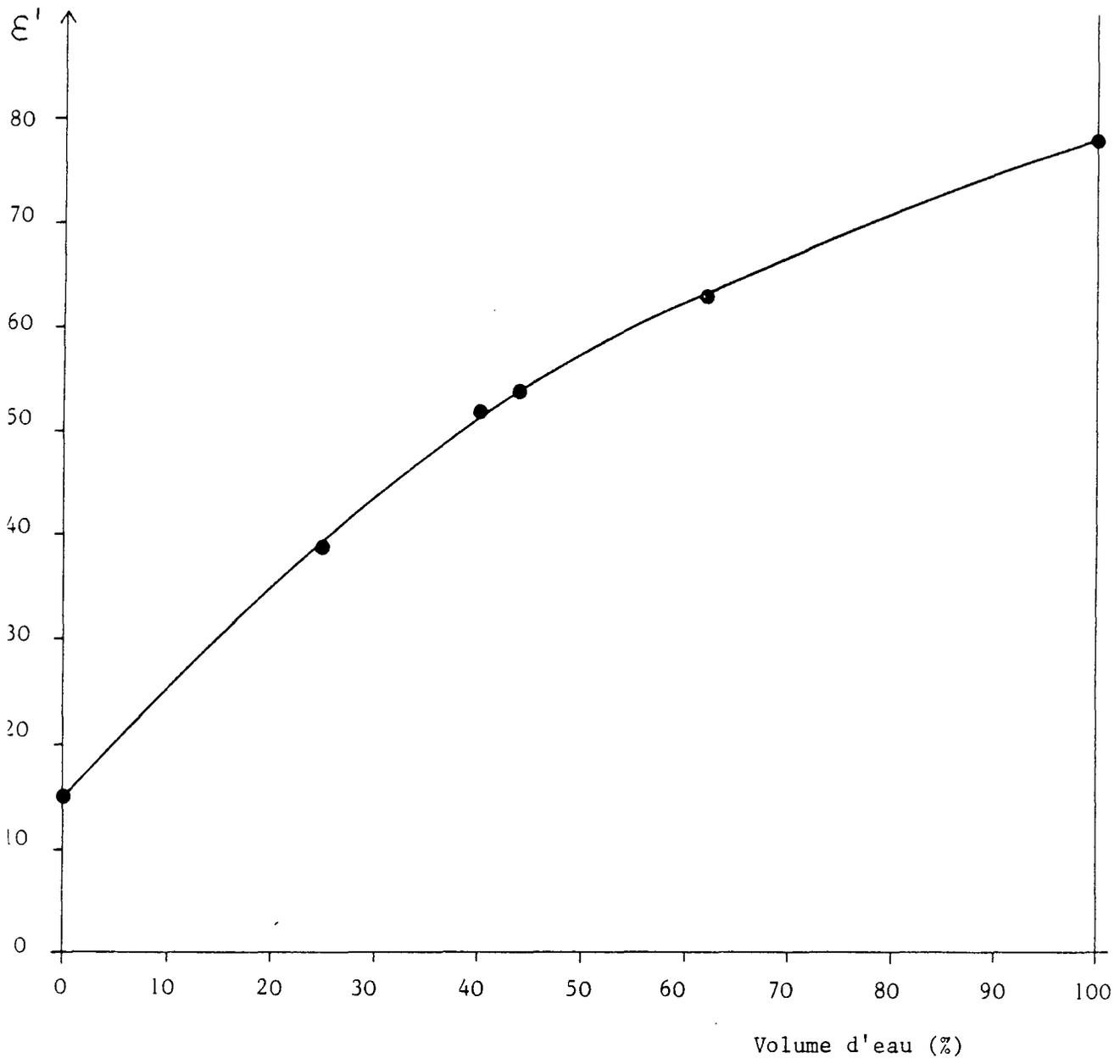


Figure 2: Effet de la teneur en eau sur la constante diélectrique des milieux résultant du mélange de R avec l'eau

	$\epsilon'$ à 1MHz et 20°C	$\epsilon'$ littérature
Triton X100	7,7	-
Butanone	18,4	18,4 à 20°C (22)
Eau	80,2	78,2 à 25°C (22)

Tableau 3: Valeurs expérimentales des constantes diélectriques des constituants majeurs de R

La valeur obtenue pour la butanone (18,4 à 20°C) nous permet de valider notre méthode de mesure puisque c'est la valeur indiquée par la littérature à la même température.

Pour connaître les propriétés dissociantes des équivalents aqueux des laits transparisés, leur constante diélectrique a été mesurée en diminuant la proportion d'eau ( R62%, R44%, R40%, R0%). La figure 2 présente les résultats obtenus et montre que, pour les teneurs hydroorganiques correspondant à la transparisation du lait, la constante diélectrique est supérieure à 52 (c'est à dire pour les milieux R62%, R44%, R40%).

Ces milieux sont dissociants et peuvent être analysés en utilisant les raisonnements définis en solution aqueuse.

Les valeurs relativement élevées des constantes diélectriques des solutions transparisées ne laissent prévoir qu'un faible effet sur les constantes d'équilibre.

## 7.2. Comparaison lait-lait transparisé

Le tableau 4 permet de comparer les valeurs de constante diélectrique pour un lait demi-écrémé, pour le même lait transparisé, et pour le milieu R62% qui est son équivalent aqueux.

	lait demi écrémé UHT	eau pure	lait demi écrémé UHT transparisé	R62%
$\epsilon'$ à 1MHz et 20°C	121	78	80	63
$\epsilon'$ à 20MHz et 20°C	85	78	58	54

Tableau 4: Comparaison des constantes diélectriques du lait et du lait transparisé

On note une importante différence de constante diélectrique entre le lait et l'eau pour la fréquence de 1MHz: on pourrait envisager de relier cette valeur de constante diélectrique pour le lait pur à son origine, aux traitements chimiques, bactériologiques, voire même thermiques qu'il a subis (23).

La valeur élevée de la constante diélectrique du lait par rapport à l'eau à 1 MHz pourrait s'expliquer par le fait que, bien que constitué essentiellement d'eau, le lait présente une structure différente puisque c'est une émulsion.

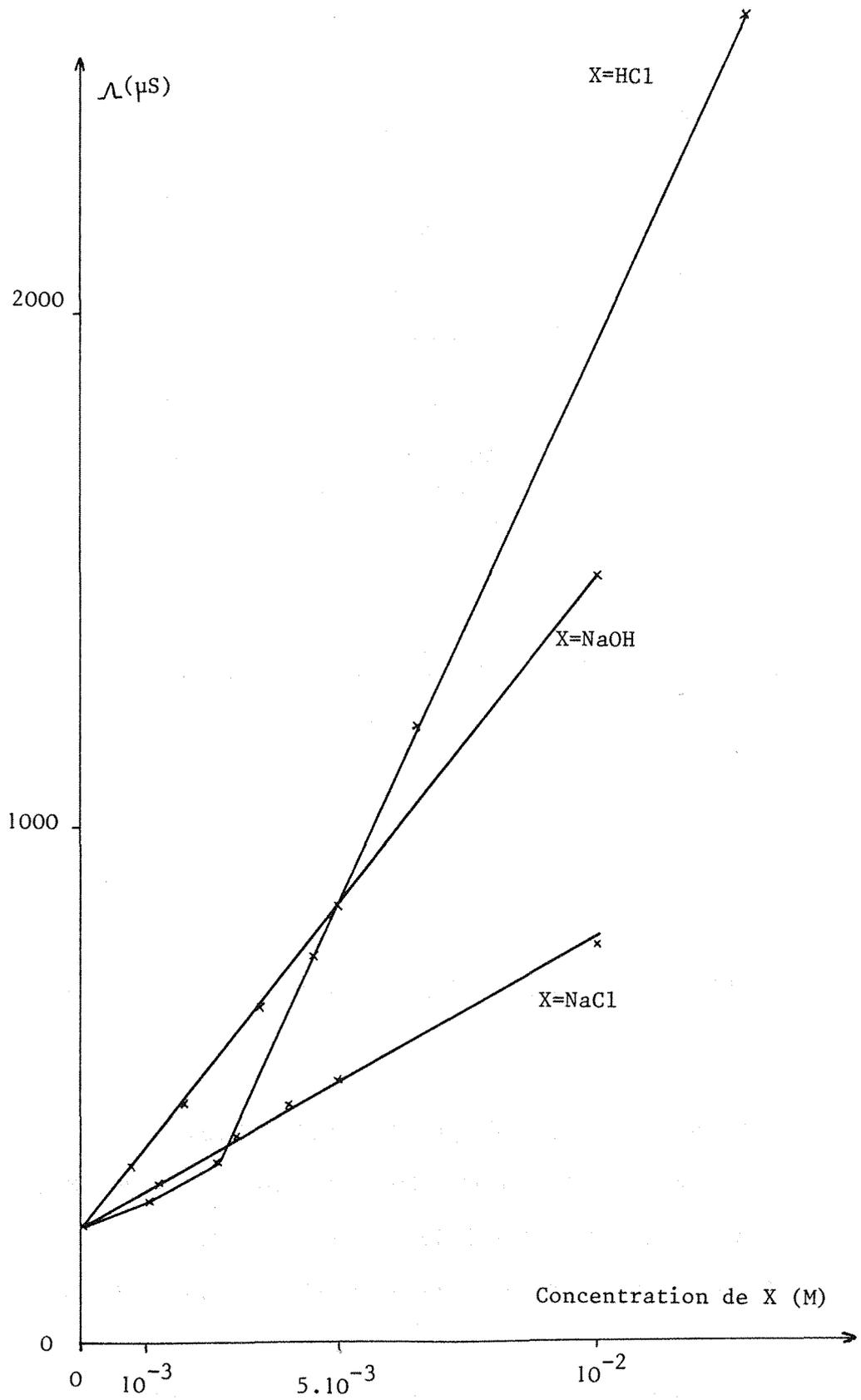


Figure 3: Conductance de HCl, NaOH et NaCl dans le milieu R62%

Par contre, cette différence s'atténue lorsque l'on augmente la fréquence de mesure à 20MHz.

Si l'on compare le lait demi-écrémé transparisé et son équivalent aqueux R62%, on note une faible différence de constante diélectrique: le transparisant R semble imposer sa constante au milieu (plus que le lait). La constante est un peu plus élevée pour le lait transparisé que pour R62%: en effet, nous avons constaté (lors de nos mesures) que l'accroissement de la concentration en sels ionisés a pour conséquence une élévation de la constante diélectrique, or le lait apporte des sels au milieu.

## 8. Etude conductimétrique classique

La conductimétrie classique fait appel à une fréquence de mesure beaucoup plus basse: 50Hz. La conductance peut être reliée à la concentration des sels dissous en solution. Nous avons vérifié que les variations linéaires observées en solution aqueuse étaient conservées dans les milieux transparisés.

### 8.1. Etude de l'effet d' ions sur la conductance des milieux transparisés.

L'étude de l'influence de HCl, NaCl, et NaOH a été envisagée (annexe IV). Les figures 3, 4, et 5 montrent la variation de la conductance quand les concentrations des espèces ajoutées varient de 0 à  $10^{-2}$  M: dans ce domaine de concentration, la conductance varie linéairement en fonction de la concentration en sel ajouté, comme pour les solutions aqueuses

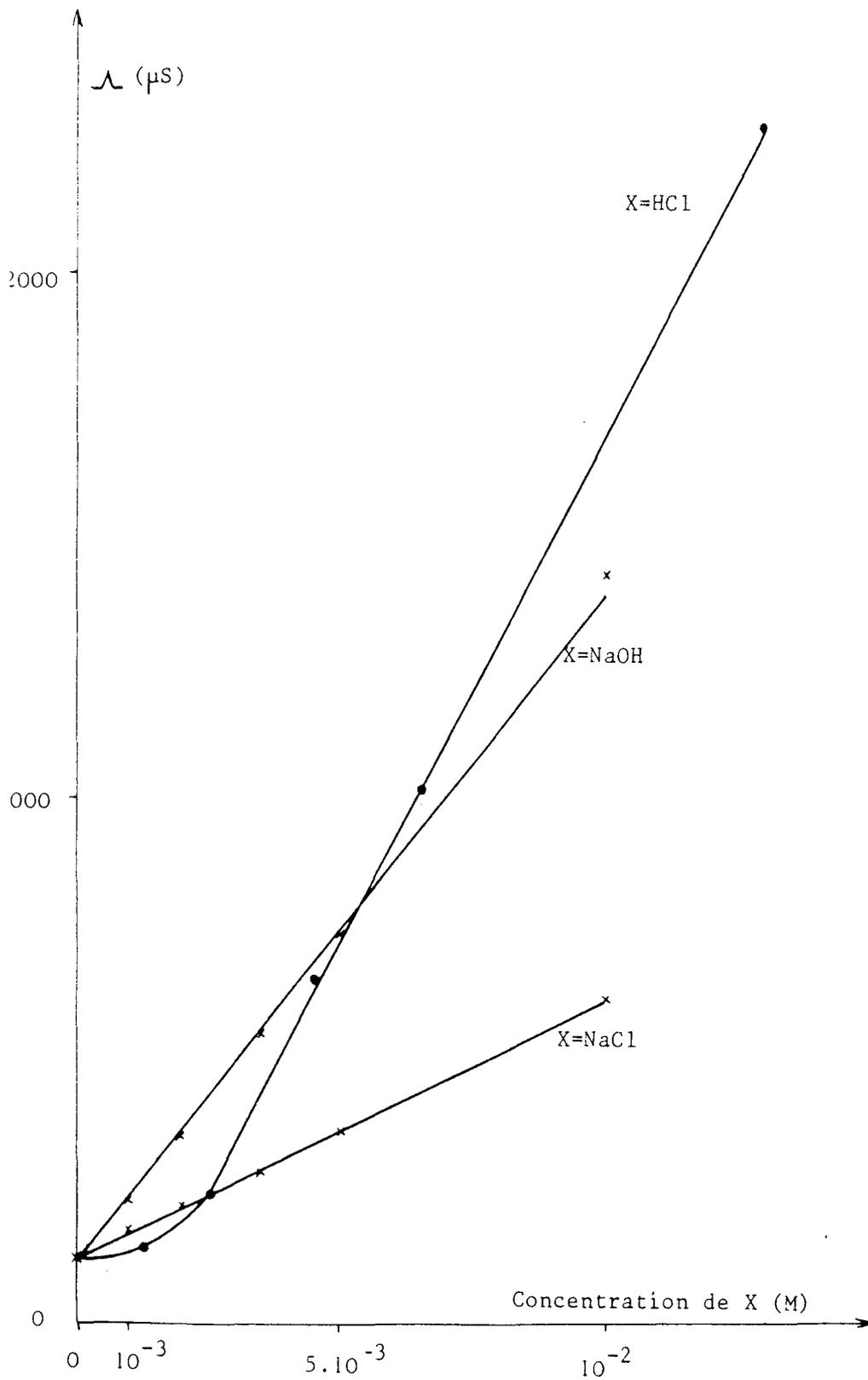


Figure 4: Conductance de HCl, NaOH et HCl dans le milieu R62% privé de laurylsulfate de sodium

diluées(24).

L'ordre des conductivités est le même que dans l'eau: la conductivité due au proton est supérieure à celle de l'ion hydroxyde, elle-même supérieure à celle de l'ion chlorure.

Les figures 3 et 4 mettent en évidence, pour HCl, une rupture de pente correspondant au fait que les premiers ajouts d'acide au milieu réagissent avec les impuretés de nature basique qu'il contient, et c'est seulement après neutralisation totale de ces impuretés que l'on retrouve la pente de réponse relative à HCl (chapitre 2).

D'après la figure 4, le laurylsulfate de sodium apporté par le réactif R n'a pas une influence significative sur l'allure des courbes obtenues, (à part un léger décalage de conductance initiale): ceci peut s'expliquer par sa faible concentration dans le transparent.

La figure 5 montre l'influence de la proportion en eau du milieu transparent sur sa conductance: pour les milieux hydroorganiques correspondant à la transparentisation de lait (R62% et R40%), l'amplitude de variation est très proche, alors que celle observée pour un même ajout de soude dans l'eau est beaucoup plus importante; ces résultats peuvent s'expliquer par la baisse de mobilité des ions dans les milieux transparents, due à leur viscosité ou à leur constante diélectrique (25).

### 8.2. Etude de l'effet de l'ajout de chlorure de sodium à des laits transparents ou non

Pour envisager l'application de la conductimétrie au cas des laits transparents, nous avons étudié l'effet de l'ajout de sel (NaCl) à des laits transparents ou non. En effet, il est intéressant de savoir si l'on peut suivre par conductimétrie une réaction chimique ou une réaction de titrage

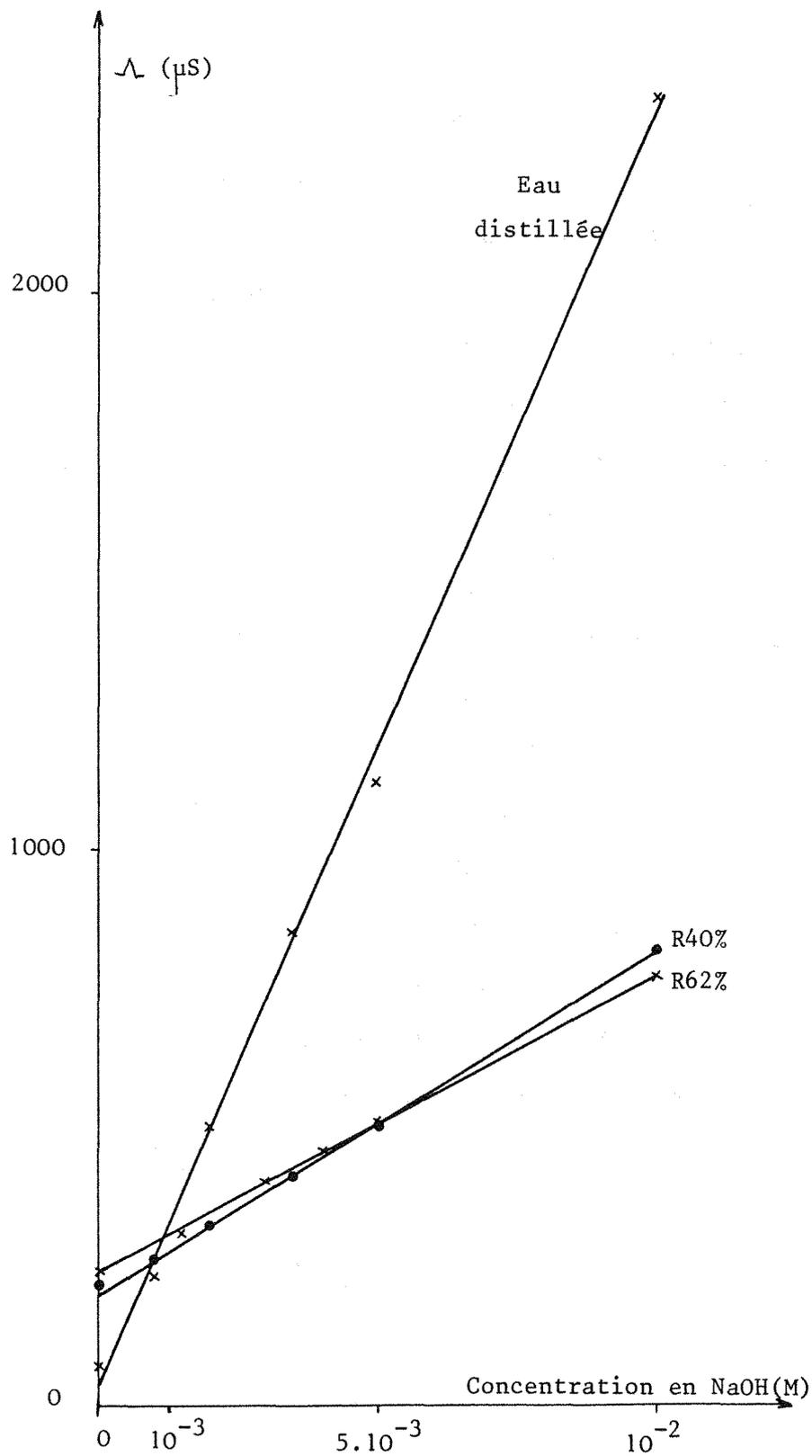


Figure 5: Conductance de NaOH dans l'eau distillée, R40% et R62%

dans le lait tel quel ou transparisé, et d'évaluer l'influence des ions apportés par le lait sur la conductance générale des solutions.

On sait que la conductimétrie et l'ampérométrie sont des techniques sensibles puisque les grandeurs mesurées (conductance, courant) varient linéairement en fonction de la concentration en espèce et non pas en fonction du logarithme de la concentration comme en potentiométrie (27).

La figure 6 présente les variations de la conductance avec l'ajout de NaCl pour chaque lait, ainsi que celles obtenues dans l'eau et dans le milieu R62%.

La conductance des laits transparisés est plus faible que celle des laits tels quels, d'un facteur 4 environ, attribuable à la dilution au quart des constituants ionisés du lait qui apparaît lors de la transparisation.

Comme on pouvait s'y attendre, dans les milieux riches en sel à l'origine, comme le lait ou le lait transparisé, la variation de concentration de l'espèce ionisée ne se traduit pas par une variation sensible de conductance, au contraire de ce que l'on observe dans l'eau pure.

Cette constatation tend à prouver qu'il sera difficile de suivre un dosage par conductimétrie dans le lait transparisé, notamment s'il s'agit d'espèces présentes à faible concentration.

### Conclusion

Les liquides transparisés sont dissociants, il sera donc possible de prévoir les réactions chimiques à partir des constantes d'équilibre définies comme dans l'eau.

Les variations de conductance mesurées dans les milieux transparisés

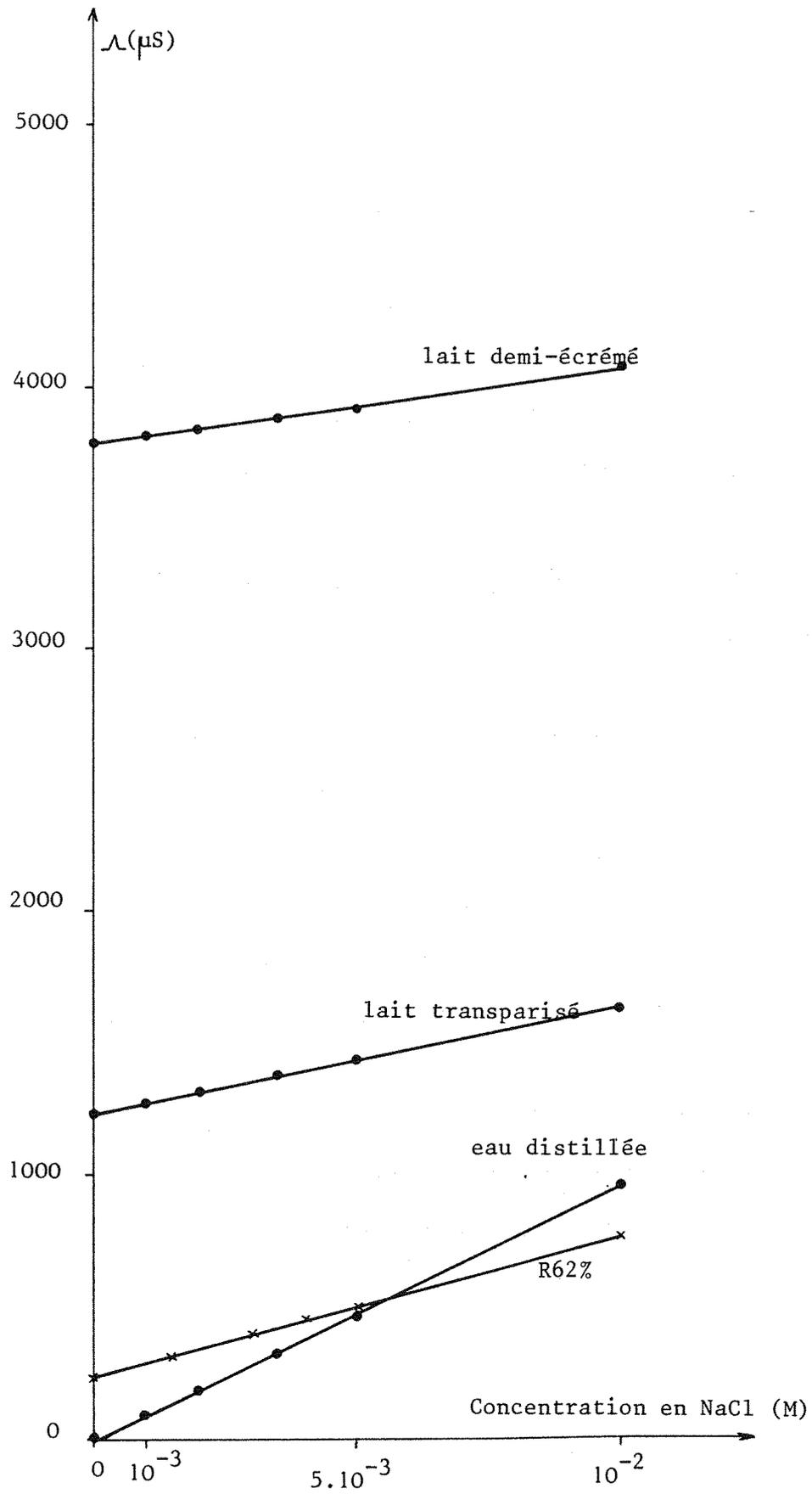


Figure 6: Effet sur la conductance de l'ajout de NaCl, dans le lait, le lait transparisé, l'eau et R62%

sont sensiblement atténuées par rapport à ce que l'on connaît dans l'eau, soit en raison de la viscosité élevée de ces milieux, soit du fait de la baisse de la constante diélectrique.

La présence d'ions en forte concentration dans le lait pur et dans le lait transpirisé est défavorable aux titrages par conductimétrie de solutés en concentration faible: l'ampérométrie, plus spécifique, devrait permettre de s'affranchir de cet inconvénient.

Du fait de la richesse des milieux transpirisés en divers constituants organiques, on pouvait attendre de grandes différences de propriétés par rapport à l'eau, pourtant l'étude de leurs caractères physiques montre que c'est l'eau qui impose ses propriétés aux milieux transpirisés. Nous verrons ultérieurement que la détermination des constantes thermodynamiques va confirmer ces observations.

## CHAPITRE 2: ETUDE DES REACTIONS ACIDE-BASE EN MILIEU TRANSPARISE

Les valeurs des constantes diélectriques déterminées précédemment laissent présager une faible influence sur les  $pK_a$  des couples acide-base, étant donné que la basicité des milieux en l'absence de soude est fixée par l'eau dont la teneur est importante (32).

Les propriétés basiques du Triton X100 et de la butanone sont moins marquées que celles de l'eau, c'est pourquoi, dans ces mélanges riches en eau, c'est elle qui impose ses propriétés basiques, ce qui permet de conclure que les origines des échelles de pH dans les différents milieux transparisés et dans l'eau, correspondront à un même niveau d'acidité.

Rappelons brièvement l'influence de la constante diélectrique sur le  $pK_a$  des couples acide-base (28). Si l'on compare la valeur de  $pK_a$  d'un même couple dans deux solvants de constantes diélectriques différentes, mais de basicité identique, la différence de constante diélectrique est le principal facteur responsable de la différence des  $pK_a$ .

Afin de prévoir cette influence, il est nécessaire de distinguer entre les différents types de couples acide-base:

a. *couples  $HB^+/B$* , (par exemple  $NH_4^+/NH_3$ ): il n'y a pas d'attraction électrostatique entre les espèces  $H^+$  et  $B$  solvatées; la constante diélectrique est sans influence.

b. *couples HA/A<sup>-</sup>*, (par exemple CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>): il y a attraction entre H<sup>+</sup> et A<sup>-</sup>; des formules permettent de prévoir l'influence de la constante diélectrique, et une approximation très utile en pratique permet de relier linéairement la variation de pKa d'un solvant à l'autre à l'inverse de la différence des constantes diélectriques, soit:

$$\Delta(\text{pKa}) = k \cdot \Delta(1/\epsilon')$$

c. *couples HA<sup>-</sup> / A<sup>2-</sup>*, (par exemple HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>): la formule précédente devient:

$$\Delta(\text{pKa}) = 2k \cdot \Delta(1/\epsilon')$$

Ce sont ces couples acide-base qui sont les plus sensibles aux modifications de constantes diélectriques.

Dans le cas des milieux transparisés, la constante diélectrique étant supérieure à 52, la différence des constantes diélectriques (78 - 52), ne devrait pas provoquer de fortes variations par rapport aux valeurs de pKa dans l'eau.

Pratiquement, il est nécessaire de savoir, d'une part, si la pHmétrie classique est utilisable dans les mélanges transparisés, et d'autre part si les indicateurs colorés présentent dans ces milieux les mêmes zones de virage que dans l'eau, s'ils permettent donc d'évaluer le pH et de mettre en évidence les points d'équivalence des titrages acide-base.

Au niveau du lait transparisé, il est intéressant de connaître la zone de pH dans laquelle il conserve sa transparence, et de connaître l'allure de sa courbe de titrage par une solution d'acide.

## 1. Echelles de pH dans les milieux transparisés

Les échelles de pH ont été déterminées dans les milieux hydroorganiques R62%, R44%, R40% équivalents aux laits transparisés (tableau 2).

### 1.1. Méthode d'étude des réactions acide-base

Les équilibres acido-basiques ont été étudiés par potentiométrie en utilisant l'électrode de verre à remplissage aqueux pour le milieu R62%. Pour les autres milieux à teneur organique plus élevée, où l'électrode à remplissage aqueux ne fonctionne pas de façon satisfaisante, nous avons employé une électrode de verre à remplissage de mercure (Tacussel), maintenant largement utilisée en milieu non aqueux.

L'utilisation des indicateurs colorés est envisagée essentiellement pour mettre en évidence le point équivalent des réactions et pour effectuer des déterminations rapides de pH. Il faut cependant signaler que la détermination spectrométrique engageant les indicateurs de Hammett (29)(30), nécessaire pour placer les échelles de pH les unes par rapport aux autres, a conduit à des résultats médiocres: le taux de protonation de l'indicateur ne suit pas les règles attendues lorsque l'on ajoute un acide fort (HCl et HClO<sub>4</sub> dans le cas de la paranitro-aniline).

Ceci est dû à la présence d'impuretés basiques, en particulier dans le Triton X100. Il n'en reste pas moins vrai qu'en première approximation les virages de ces indicateurs donnent des résultats voisins lorsque l'on passe du milieu R62% au milieu R40%.

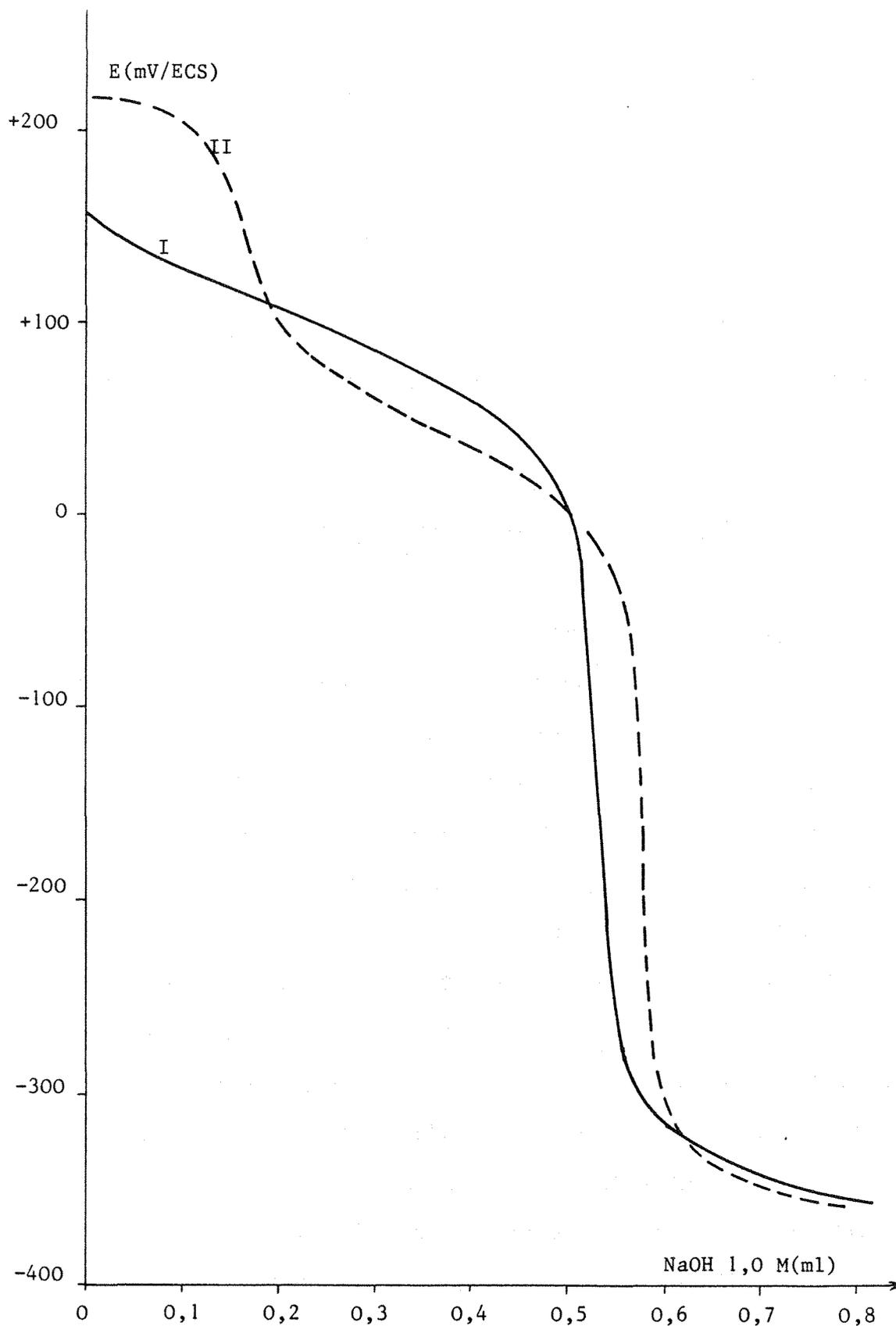


Figure 7: Courbes de titrage -I: de l'acide lactique

-II: du mélange acides perchlorique  
et acétique, dans le milieu R62%

(37°C: électrode de verre à remplissage aqueux)

La détermination des échelles de pH a donc été réalisée par potentiométrie (annexe V), ce qui permet d'accéder directement à tout le domaine de pH, alors que dans le cas de la spectrométrie, il est nécessaire de répéter l'étude de réactions différentes pour couvrir tout le domaine acido-basique.

Les mesures potentiométriques ont, elles aussi, été perturbées par les impuretés du Triton X100: en effet, les courbes de dilution d'acides et de bases forts dans les milieux envisagés n'étaient pas des droites de type

$E = a + b \cdot \lg c$  comme on s'y attendait, mais des courbes en "S" caractérisant le titrage des impuretés acides et basiques présentes dans le milieu: nous avons déjà mis en évidence leur présence lors de l'étude de la conductance de ces milieux.

Il était nécessaire de vérifier que c'étaient bien les impuretés contenues par le Triton X100 qui perturbaient la réponse de l'électrode, et non la nature même de ce surfactant. Pour cela, nous avons montré que le potentiel de l'électrode pour une solution d'acide ne variait pas lors de l'addition de Triton X100, à condition que la concentration de l'acide soit bien supérieure à celle des impuretés du Triton.

Il est donc possible de conclure que dans le milieu R62%, d'après les mesures de conductance et de potentiel, la concentration en impuretés de nature acide est de l'ordre de  $2,5 \cdot 10^{-3} M$ . Le fabricant indique pour leur nature des acides carboxyliques type acétique.

Les courbes de dilution d'acides ou de bases forts étant impossibles à exploiter, le bon fonctionnement des électrodes a été vérifié à partir de courbes de titrage d'acides et de bases faibles en concentration suffisamment élevée (environ  $10^{-2} M$ ). L'analyse mathématique de ces courbes nous a permis de déterminer la pente des électrodes dans chaque milieu et les valeurs des constantes thermodynamiques (31).

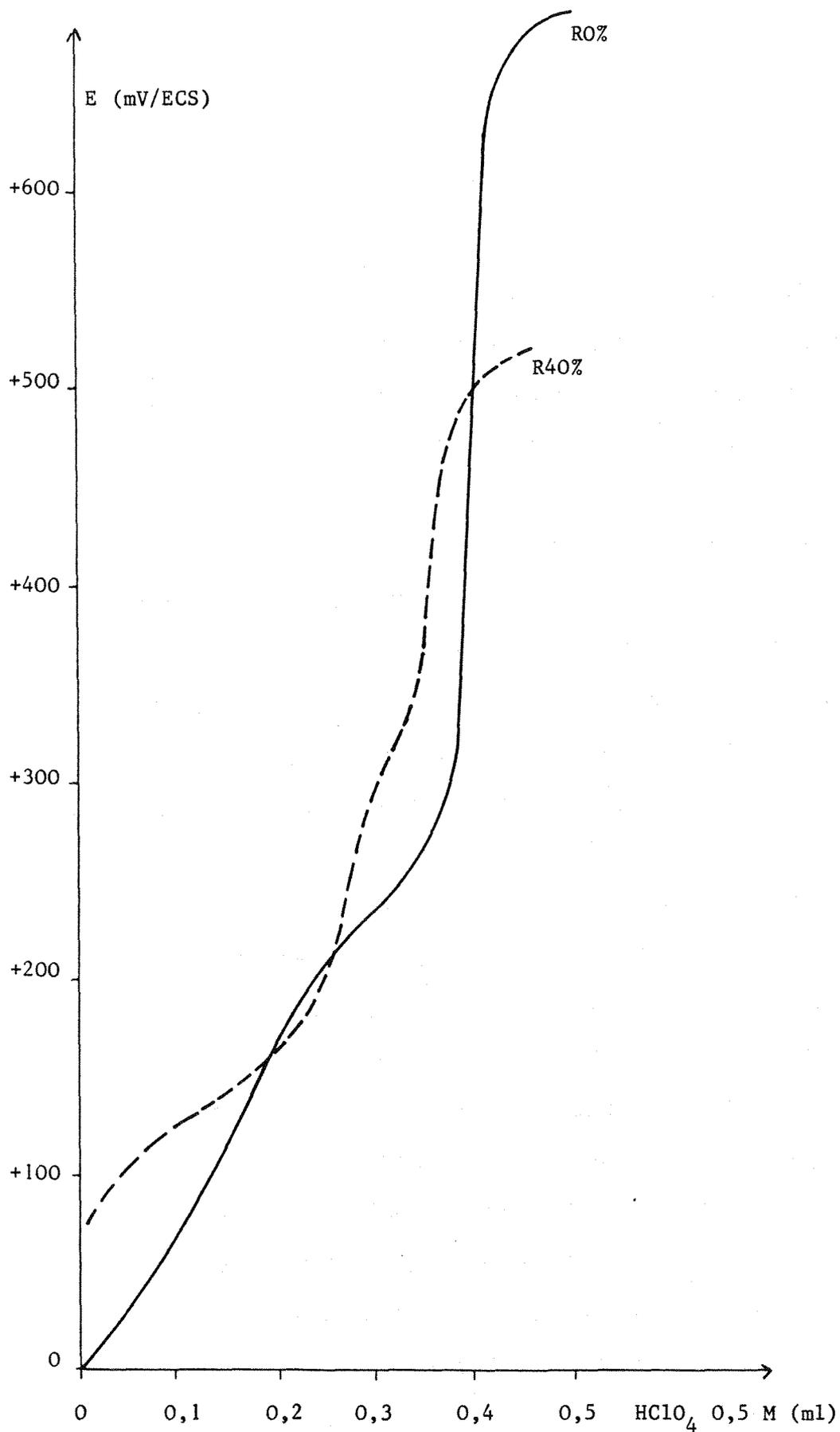


Figure 8: Courbe de titrage de l'éthanolamine dans les milieux RO% et R40% (37°C, électrode de verre à remplissage de mercure)

## 1.2. Couples acide-base envisagés - Allure des courbes de titrage

Dans les quatre milieux, ont été réalisées les courbes de titrage de divers constituants organiques tels que les acides acétique et lactique (type HA/A<sup>-</sup>), l'éthanolamine (HB<sup>+</sup>/B), ainsi que le titrage d'un acide fort par une base forte (acide perchlorique par la soude).

Seul le milieu R62% a pu être étudié à l'aide de l'électrode à remplissage aqueux; dans les milieux à plus forte teneur organique, où elle pose des problèmes de stabilisation de potentiel, l'électrode de verre à remplissage de mercure a été utilisée.

Les figures 7 à 9 montrent des exemples des courbes de titrage obtenues. D'allure classique, elles mettent en évidence la présence des impuretés acido-basiques apportées par le réactif (figures 8 et 9).

Ces impuretés pourraient constituer une limite lors de certains dosages d'espèces en faible concentration, et dans ce cas, il serait nécessaire d'utiliser un détergent pur.

## 1.3. Analyse des courbes de titrage

L'analyse mathématique des courbes nous a permis d'accéder aux grandeurs thermodynamiques. Le tableau 5 donne les valeurs des pentes des électrodes dans les quatre milieux.

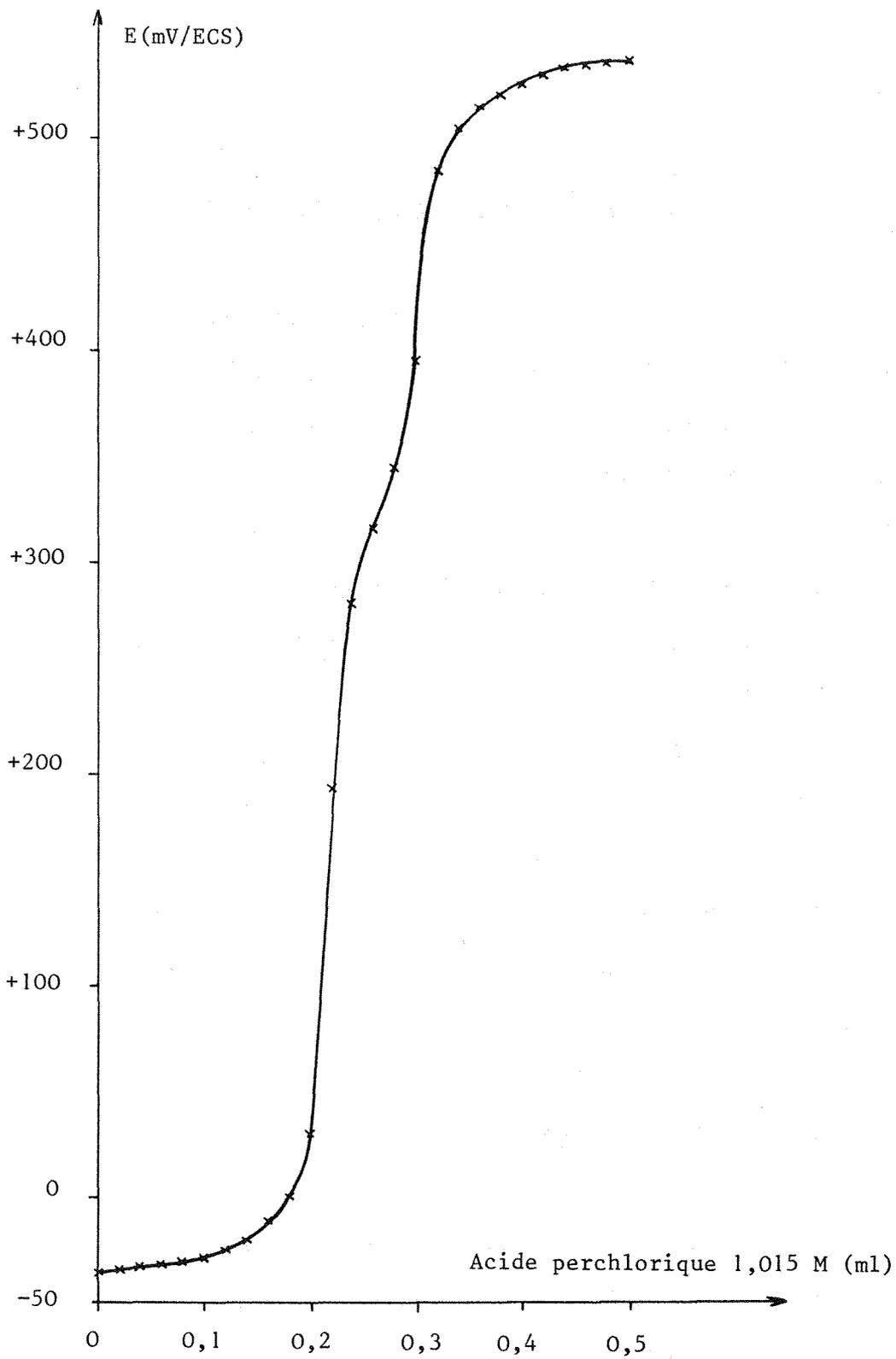


Figure 9: Courbe de titrage d'une solution de soude par l'acide perchlorique dans le milieu R44% (électrode à remplissage de mercure; 37°C)

	acide acétique par soude	éthanolamine par acide perchlorique	pen­te
R62% (remplissage aqueux)	-63	-57	- 60
R44% (remplissage mercure)	-58	-55	- 56
R40% (remplissage mercure)	-65	-58	- 61
R0% (remplissage mercure)	-59	-59	- 59

Tableau 5: Pente (mV par unité de pH) des électrodes de verre dans les milieux R62%, R44%, R40% et R0% de composition hydro-organique variable

La valeur théorique de la pente à 37°C étant de -60 mV/unité de pH, on constate que la réponse des électrodes dans les milieux considérés est correcte.

Le tableau 6 résume les valeurs de pK<sub>i</sub> et pK<sub>a</sub> calculées pour les quatre milieux étudiés, et indique les valeurs trouvées dans la littérature pour l'eau à une température de 25°C.

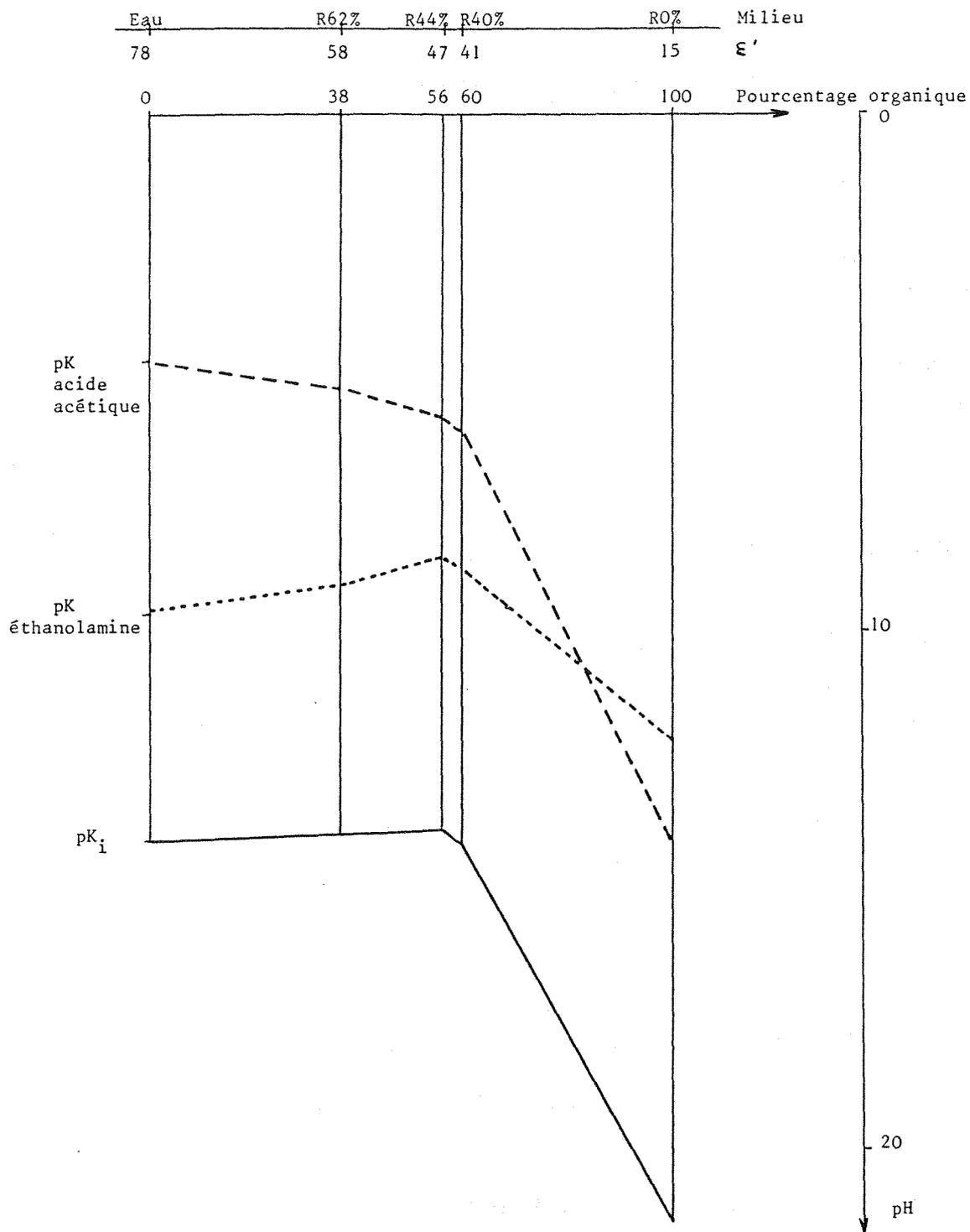


Figure 10: Comparaison des échelles de pH pour l'eau et les milieux R62%, R44%, R40%, R0%

Milieu	eau	R62%	R44%	R40%	R0%
pKi	14,0	13,8	13,7	14,0	21,3
pKa acétique	4,75	5,2	5,8	6,0	14,0
pKa éthanolamine	9,5	9,0	8,5	8,8	12,0
pKa lactique	3,9	3,7			
pKa monochloracétique	2,9	3,4			

Tableau 6: Valeurs expérimentales de pKi et pKa dans les milieux R62%, R44%, R40%, R0% à 37°C, et valeurs pour l'eau à 25°C (32).

Nos mesures ont été effectuées à 37°C, mais d'une manière assez générale, on note peu de variations pour les valeurs de pKa par rapport aux valeurs connues à 25°C, si l'on reste dans le domaine de précision adopté.

La figure 10 visualise les résultats précédents relatifs à la comparaison des échelles de pH obtenues dans les milieux considérés, en fonction du pourcentage de solvant organique des milieux et de leur constante diélectrique. En faisant l'hypothèse que les origines des échelles acide-base correspondent à un même niveau d'acidité, (c'est à dire qu'elles sont sur une même horizontale), il apparaît clairement que dans le cas de R0% qui ne contient pas d'eau du tout, l'effet de constante diélectrique est important: en effet, la grande différence de pKa observée pour l'acide acétique (type HA/A<sup>-</sup>), entraîne une inversion de sa position

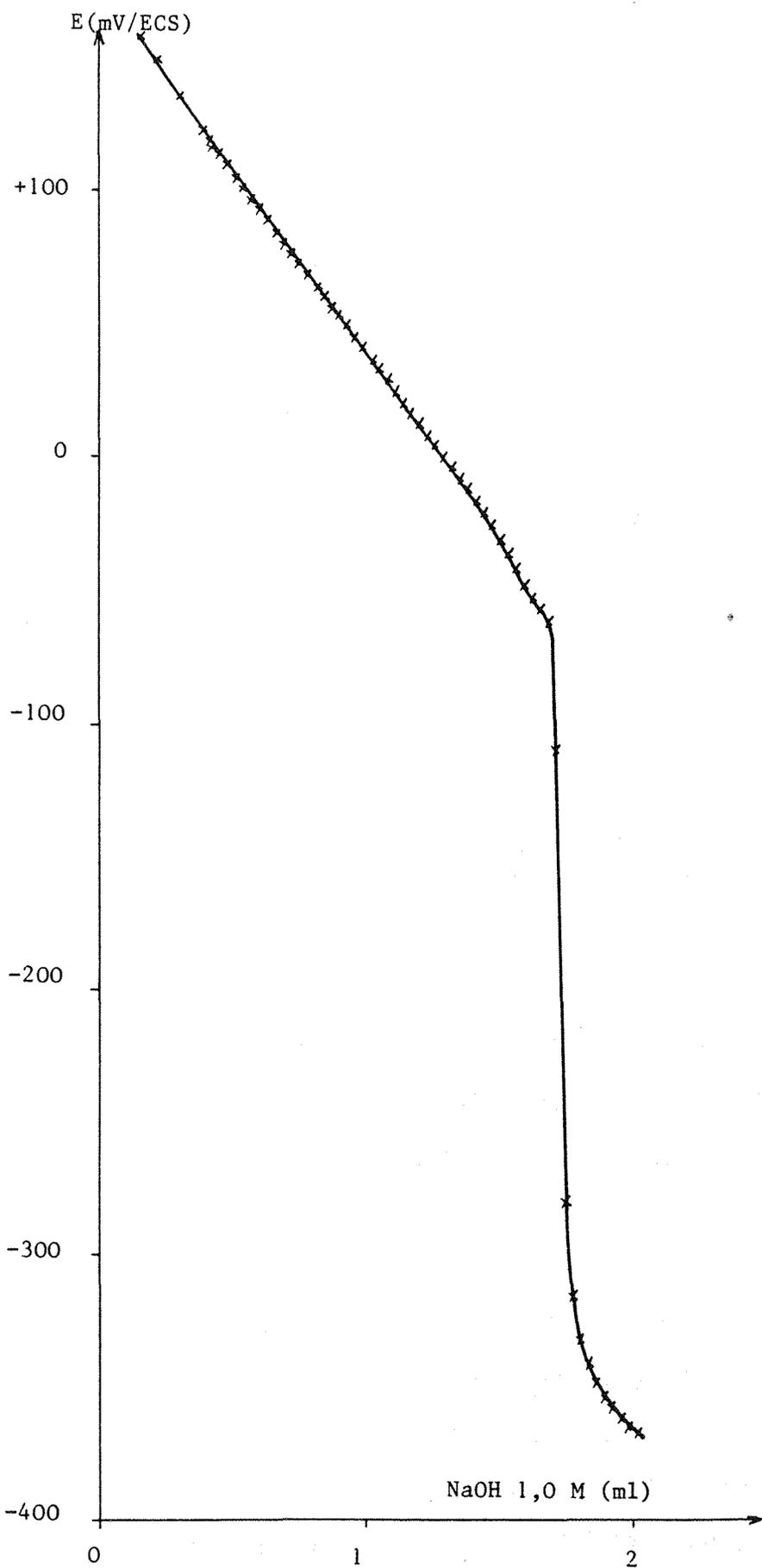


Figure 11: Courbe de titrage de l'acide citrique dans R62%  
(37°C; électrode de verre à remplissage aqueux)

par rapport à l'éthanolamine (type  $BH^+/B$ ), ce qui entraîne que dans R0%, contrairement aux autres milieux, la réaction de l'acide acétique sur l'éthanolamine n'est pas possible.

Ces résultats montrent que pour les milieux correspondant à la transparation de laits entiers ou demi-écrémés, les variations de  $pK_j$  et  $pK_a$  sont peu importantes par rapport aux valeurs connues dans l'eau. Pratiquement, l'utilisation d'un pHmètre classique ( avec une électrode de verre à remplissage de mercure) permet la mesure du pH avec une précision correcte ( pentes de  $-59$  à  $-61$  mV/unité de pH), suffisante pour les applications de l'industrie laitière.

L'allure de la courbe de titrage de l'acide citrique ( figure 11) dans le milieu R62% confirme que dans les milieux transparisés, c'est l'eau qui impose ses propriétés acido-basiques: la soude ne permet pas de distinguer entre les trois fonctions de l'acide citrique qui sont dosées simultanément, comme dans l'eau.

Il est intéressant de noter aussi, que l'électrode à remplissage de mercure prend le même potentiel dans l'eau et les milieux transparisés, ce qui autorise l'introduction de réactifs préparés en solution aqueuse, sans provoquer de modification du potentiel de fait de la modification de la teneur organique du milieu.

Ces divers résultats ont des conséquences très importantes au niveau pratique, puisqu'il sera possible d'utiliser dans les milieux transparisés, des pHmètres étalonnés dans l'eau, gradués pour travailler dans l'eau (14 unités de pH), et que l'on pourra introduire comme réactifs des solutions aqueuses sans qu'il soit nécessaire de maintenir constante la composition hydroorganique du milieu.

## 2. Détermination de la zone de virage d'indicateurs colorés

La détermination de la zone de virage a été effectuée à partir de l'étude des courbes de titrage réalisées en présence d'une quantité d'indicateur donné ( en solution à 0,1g pour 100 ml dans l'eau ou l'éthanol selon leur solubilité (33))( annexe V).

Le tableau 7 donne les zones de virage d'indicateurs colorés dans R62%,R44%, R40%, R0% et dans l'eau.

	Eau	R62%	R44%	R40%	R0%
Rouge bromophénol	5,2-6,8 J-R	6,2-8,1 J-R	6,2-8,0 J-R	6,5-8,0 J-R	13,5-14,2 J-R
Bleu thymol	8,0-9,6 J-B	9,8-11,3 J-B	10,0-11,4 J-B	0-5,3 In-J 10,0-11,5 J-B	0-10,5 In-J 16,0-18,0 J-B
o.Crésolsulfone phtaléine	7,2-8,8 J-M	8,6-9,2 J-M	8,4-9,4 J-M	8,1-9,8 J-M	0-10,6 In-J 14,1-15,3 J-M
PhénoI- phtaléine	8,0-9,9 In-r	10,0-11,1 In-r	8,6-10,5 In-r	8,5-10,7 In-r	16,0-17,8 In-r

Tableau 7: Zones et couleurs de virage d'indicateurs colorés acido-basiques dans l'eau (33) et les milieux R62%, R44%, R40% et R0% ( J : jaune; R : rouge; B : bleu; In : incolore; M : mauve; r : rose )

Le tableau 8 donne les zones de virage dans R62% et dans l'eau d'indicateurs colorés classiquement utilisés.

	Eau	R62%
Bleu bromophénoï	3,0-4,6	2,9-4,6
Vert bromocrésol	3,8-5,4	5,0-6,0
Rouge bromophénoï	5,2-6,8	6,2-8,1
Bleu bromothymol	6,0-7,6	7,8-9,0
Rouge neutre	6,8-8,0	5,8-7,8
o.crésolsulfone phtaléïne	7,2-8,8	8,6-9,2
Naphtolphtaléïne	7,3-8,7	7,2-9,0
Bleu Nil	10,1-11,1	7,7-8,8
Phénolphtaléïne	8,0-9,9	10,0-11,1
Bleu thymol	1,2-2,8 8,0-9,6	2,0-2,6 9,8-11,3

Tableau 8: Zones de virage de 10 indicateurs colorés acido-basiques dans l'eau (33) et le milieu R62%

Dans les milieux correspondant à la transparisation du lait, (R62% - R40%), on note peu de différences dans les zones et les couleurs de virage des indicateurs étudiés, les variations par rapport à l'eau correspondant le plus souvent à un décalage de l'ordre d'une unité vers les pH basiques (sauf pour le bleu de Nil).

Leur utilisation pratique peut être envisagée, et le tableau 8 montre que les indicateurs testés permettent de couvrir une zone de pH allant de 2,9 à 11,3.

### 3. Etude pH-métrique du lait transparisé

Cette étude a été réalisée en utilisant du lait demi-écrémé du commerce, transparisé selon la formule suivante:

Réactif R.....10 ml

Lait.....5 ml

Eau distillée.....5 ml

Le lait obtenu a donc une composition hydroorganique identique à celle du milieu R62% défini précédemment.

#### 3.1. Détermination de la limite de transparisation

La transparisation du lait nécessite un excès d'ions hydroxyde, ce qui confère au lait transparisé un pH basique. Il est intéressant de connaître la zone de pH dans laquelle la transparence est conservée : nous avons montré qu'en neutralisant les ions hydroxyde excédentaires à l'aide d'une solution d'acide perchlorique dilué, la transparence est conservée

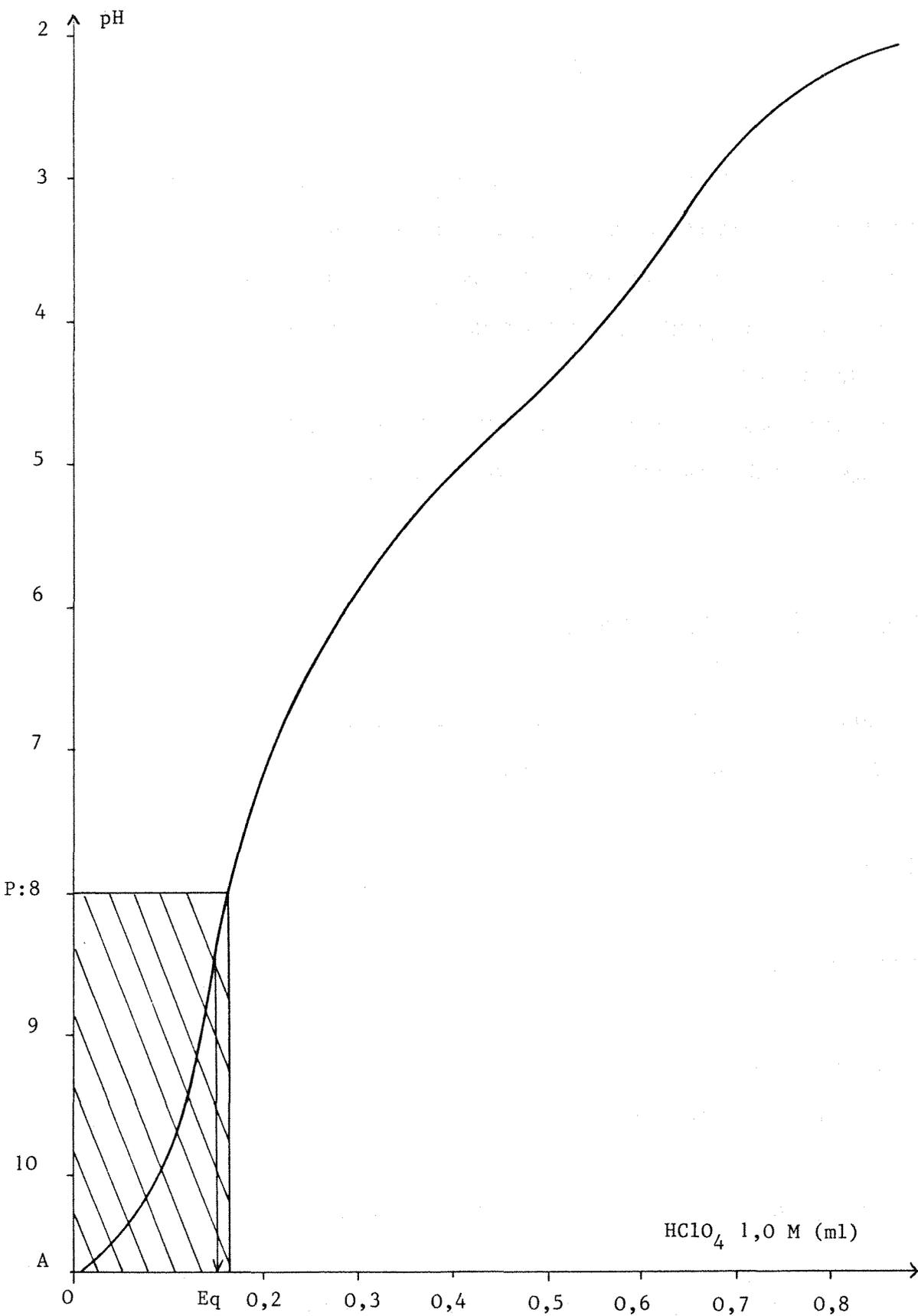


Figure 12: Courbe de titrage d'un lait demi-écrémé transpirisé par l'acide perchlorique (37°C; électrode à remplissage aqueux)

jusqu'à pH 8, alors qu'en utilisant une solution d'EDTA disodique 0,2 M, la limite est abaissée à pH 7,4 : ceci est certainement à relier à l'observation d'Owen selon laquelle il est possible de transparer du lait en utilisant l'EDTA qui agit sur la structure des caséines du lait, notamment au niveau des ions calcium (11).

### 3.2 Courbe de titrage d'un lait transparisé

La figure 12 montre l'allure de la courbe de titrage d'un lait transparisé par une solution d'acide perchlorique.

Cette courbe présente des points caractéristiques :

- le pH de départ, A, est caractéristique du lait étudié: on note par exemple une baisse de ce pH pour un lait conservé à l'air plusieurs jours après ouverture.

- le point équivalent du titrage des ions hydroxyde excédentaires, Eq, correspondant à un premier saut de pH marqué.

- le point d'opalescence, P, correspond à la "détransparisation" du lait par acidification: il se situe à un pH de 8.

- la dernière partie de la courbe représentant la neutralisation des différents constituants basiques du lait, effectuée dans un milieu hétérogène, mais pour laquelle les résultats obtenus sont cependant reproductibles.

La figure 13 présente la courbe de titrage d'un lait transparisé par une solution d'EDTA disodique 0,2 M. L'allure de la courbe est la même, cependant l'opalescence apparaît à un pH inférieur (7,4).

Cette étude pH-métrique a permis de définir la zone de transparence du lait ( pH 12 à 7,4 ). Elle montre que l'allure des courbes de titrage de

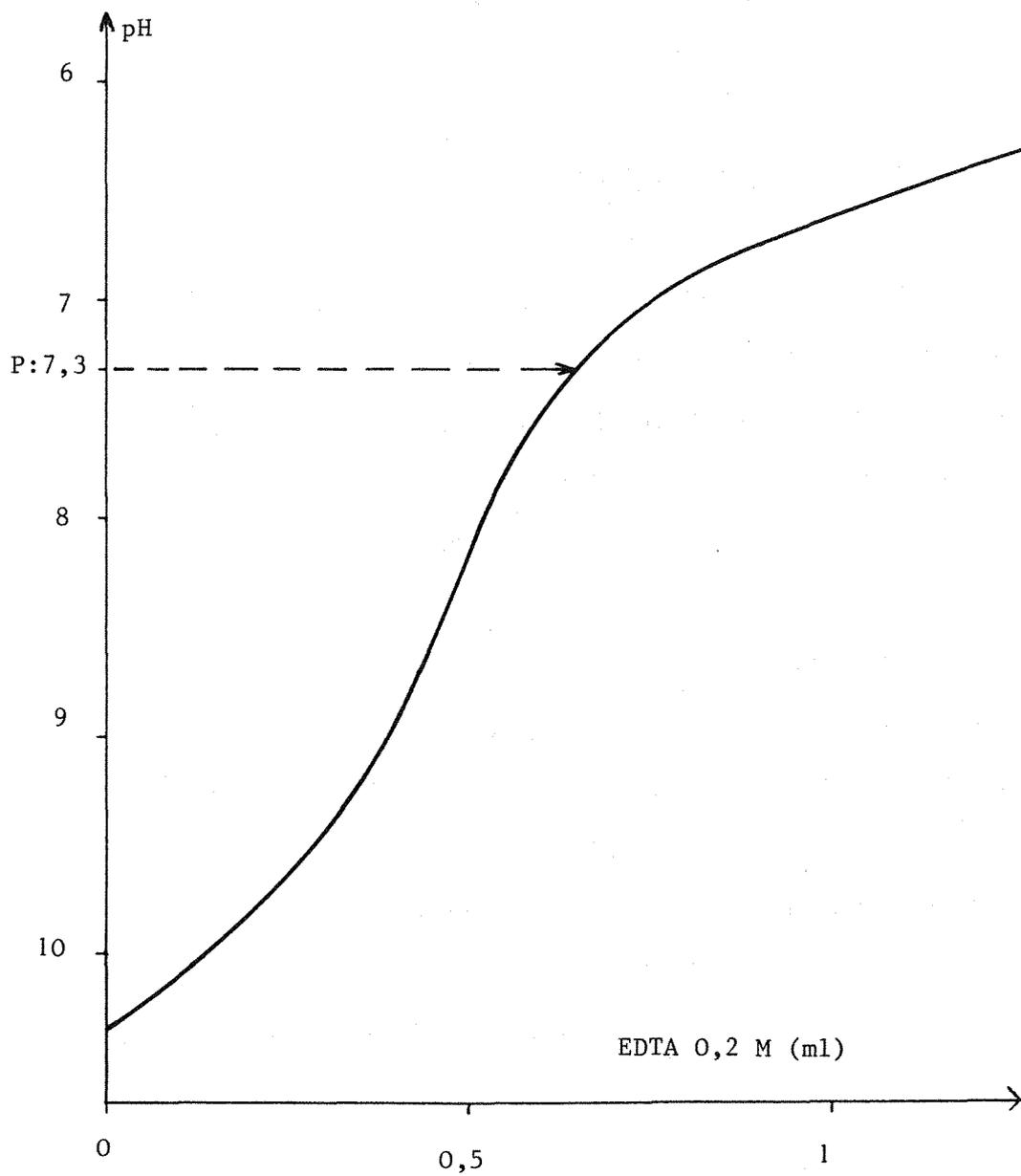


Figure 13: Courbe de titrage d'un lait demi-écrémé transparenté par une solution d'EDTA disodique (37°C; électrode à remplissage aqueux)

laits transparisés étant caractéristique, celles-ci pourraient être utilisées comme moyen d'identification de laits d'origine diverse ou ayant subi des traitements différents.

*Remarque:* on pourrait envisager de caractériser un lait par le volume de réactif R nécessaire à sa transparisation, (titrage par R, avec point d'équivalence correspondant à la transparence) : selon le lait, la consommation de réactif pour détruire les structures micellaires de ses caséines et devenir transparent sera variable; cependant, ceci dépasse le strict cadre pH-métrique car le pouvoir transparisant du réactif R n'est pas dû seulement à la présence d'ions hydroxyde actifs sur les protéines, mais également à celle de la butanone et des détergents actifs sur la matière grasse.

### Conclusion

Dans les milieux hydro-organiques correspondant à la transparisation du lait, les valeurs de  $pK_1$ ,  $pK_2$  et de pH sont pratiquement les mêmes quel que soit le pourcentage de transparisant, l'effet de constante diélectrique étant minimum du fait de la teneur importante de ces milieux en eau.

Un lait donné peut être caractérisé par sa courbe de titrage après transparisation (à une électrode à remplissage de mercure), ou par le volume de réactif R nécessaire à le transpariser.

Sur un plan pratique, il est important de constater que la proportion de transparisant n'a pas beaucoup d'effet sur la réponse de l'électrode de verre à remplissage de mercure, ni sur la zone de virage des indicateurs: ceci rend possible l'utilisation de réactifs en solution aqueuse sans qu'il

soit nécessaire de contrôler la composition du milieu. On peut également utiliser les pH-mètres prévus pour travailler dans l'eau sans réétalonnage lorsque l'on passe d'un milieu transpirisé à un autre.

### CHAPITRE 3: REACTIONS D'OXYDO-REDUCTION DANS LES MILIEUX TRANSPARISES

Certaines réactions colorées telles que la formation d'un dérivé trinitrophénylé par action de l'acide 2, 4, 6-trinitrobenzènesulfonique sur les groupements aminés (12), ne peuvent être réalisées après transparisation par suite de l'instabilité du complexe coloré formé.

Or, de nombreux précurseurs des complexes colorés, tels que les sels de diazonium (34) sont doués de propriétés redox: ils sont réductibles, tant par des moyens chimiques que des moyens électrochimiques (35). Ainsi la stabilité des complexes colorés dépend non seulement des propriétés redox du lait lui-même, mais encore de celles du solvant de transparisation.

Pour élargir les possibilités d'application du réactif R, il importe donc de connaître ses propriétés redox afin de prévoir les équilibres chimiques possibles dans les milieux transparisés: ceci permettra de développer des réactions colorées dans les milieux après transparisation et non plus seulement, comme cela est le cas actuellement, en considérant la transparisation comme une simple étape de révélation avant lecture au spectromètre.

Nous avons donc étudié dans les milieux équivalents hydroorganiques du lait transparisé, quelques systèmes simples pour savoir si les espèces minérales présentent des variations sensibles de leur potentiel normal par rapport à l'eau, mais aussi , comme nous l'avons fait pour l'étude

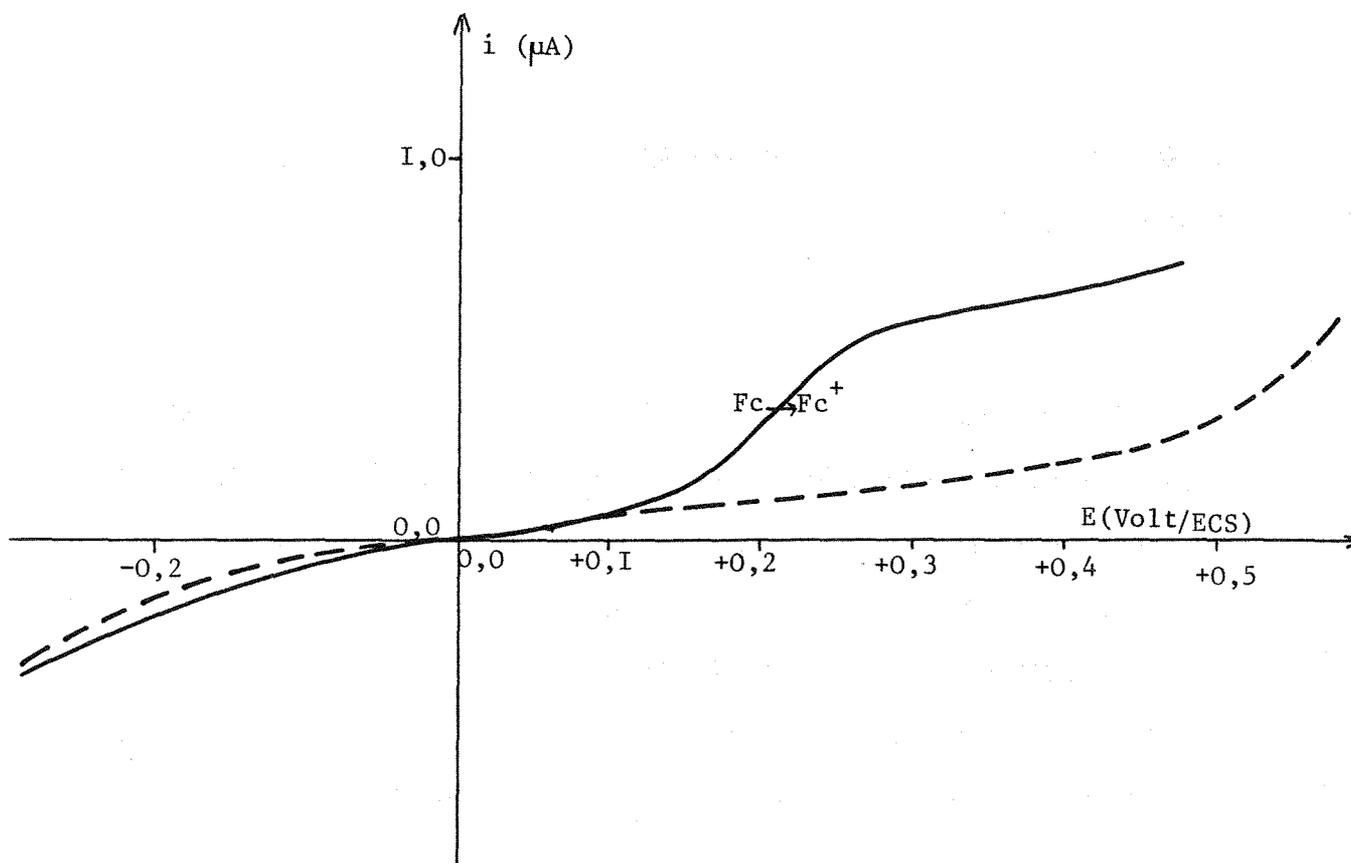


Figure I4: Courbe voltampérométrique du ferrocène dans le milieu R62%  
à l'électrode de Platine  
(37°C,  $\text{NaClO}_4$  0,5 M, Ferrocène:  $3,6 \cdot 10^{-4}$  M)

pHmétrique, par rapport à la composition hydroorganique du milieu. Les échelles de potentiel ainsi établies doivent permettre de caractériser les propriétés oxydo-réductrices du solvant.

Les systèmes étudiés sont choisis à la fois parmi les indicateurs redox, mais également parce qu'ils peuvent participer à des réactions habituellement utilisées dans l'analyse du lait. Ainsi, par exemple, nous avons considéré les systèmes du cuivre, de l'iode, et le permanganate de potassium, en nous référant au dosage des sucres réducteurs du lait selon la méthode de Bertrand (36) ou la méthode à l'iode.

Comme dans le cas des réactions acide-base où il est possible de caractériser globalement un lait transparisé par sa courbe de neutralisation, on peut se poser la question de savoir si, dans le cas des réactions redox, il est possible de titrer un lait transparisé par un oxydant, afin de mettre en évidence, après transparisation, des laits à caractères redox différents.

### 1. Etude des systèmes redox dans les milieux privés de soude

Pour éviter les inconvénients liés à la présence des ions hydroxyde (précipitation, caractère réducteur), nous avons étudié le comportement de quelques systèmes classiques en l'absence de soude.

Afin de mettre en évidence l'effet de la teneur en solvant organique sur la valeur des potentiels normaux, nous avons effectué cette étude sur des milieux contenant respectivement 62% et 40% d'eau (milieux R62% et R40% définis précédemment).

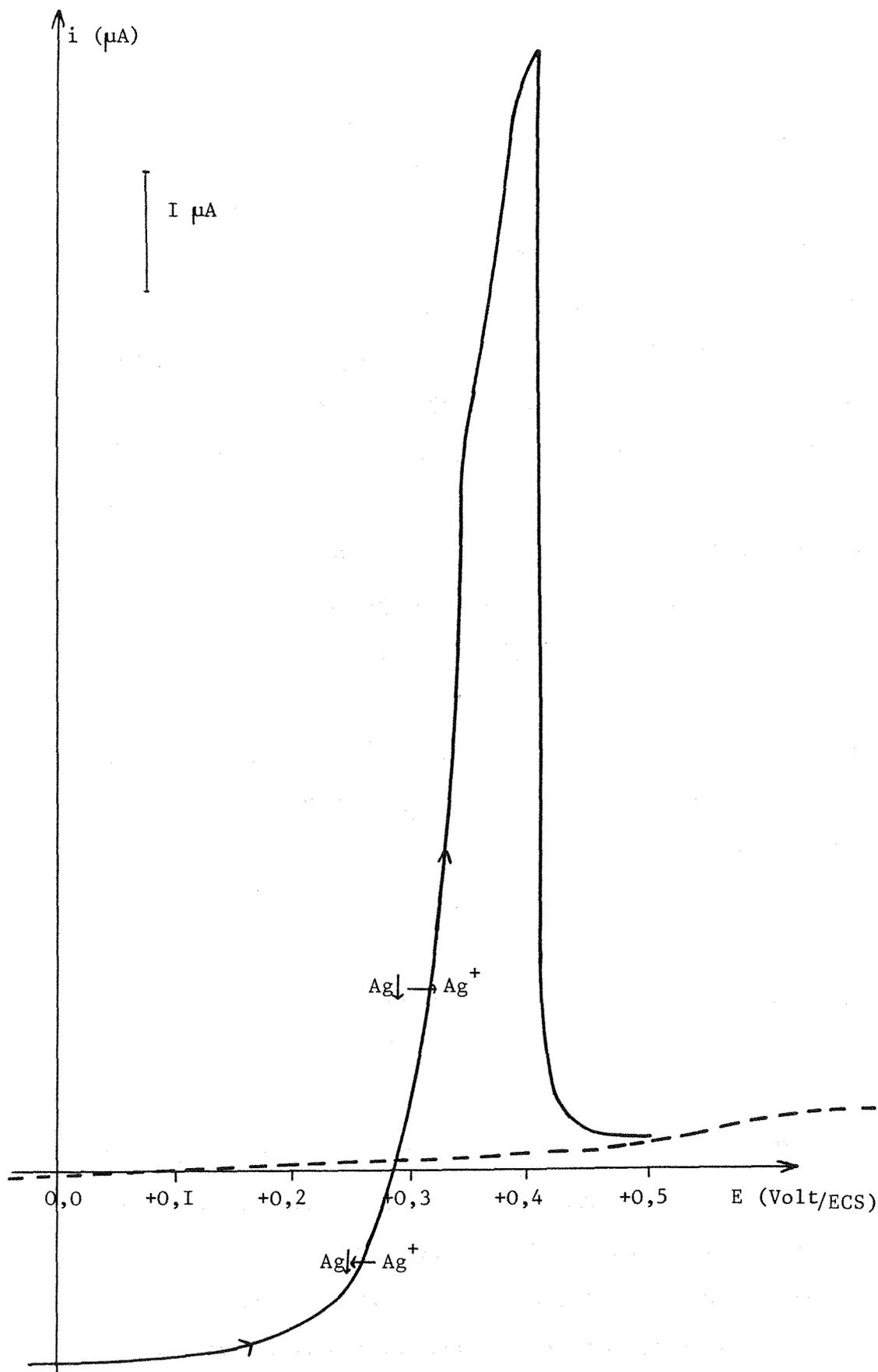


Figure I5: Courbe voltampérométrique à une électrode de Platine dans le milieu R40%  
 ( $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{NaClO}_4$  0,5 M,  $\text{AgNO}_3$ :  $4 \cdot 10^{-4}$  M)

### 1.1. Détermination des grandeurs thermodynamiques de systèmes rapides

Pour déterminer les potentiels normaux des systèmes envisagés, nous avons procédé au tracé de courbes voltampérométriques, qui permettent d'accéder aux valeurs de potentiels normaux et de potentiels de demi-vague (Annexe VI ).

Les systèmes envisagés sont des systèmes utiles pour effectuer des corrélations entre solvants, tel que le ferrocène et le couple hexacyanoferrate III- hexacyanoferrate II dont les formes oxydée et réduite sont de couleurs différentes, ce qui permet une appréciation visuelle des propriétés redox des milieux. L'argent a aussi été envisagé, (l'ion  $Ag^+$  est utilisé pour des dosages dans le lait), ainsi que ses complexes avec les ions chlorure et thiocyanate (eux-mêmes présents dans le lait).

Les courbes voltampérométriques de ces systèmes présentent des caractéristiques communes:

L'absence de soude a imposé l'utilisation de perchlorate de sodium comme électrolyte support, les ions apportés par le laurylsulfate de sodium étant en quantité insuffisante.

Dans les milieux transparisés, les courants de diffusion atteints pour une même concentration en espèce sont plus faibles que dans l'eau: dans R62%, le courant mesuré est la moitié de celui qui est observé dans l'eau; dans R40%, plus riche en phase organique, on constate une diminution du courant limite encore plus importante (60% par rapport à l'eau ), c'est à dire que les constantes de diffusion sont affectées par l'enrichissement du milieu en tensio-actif.

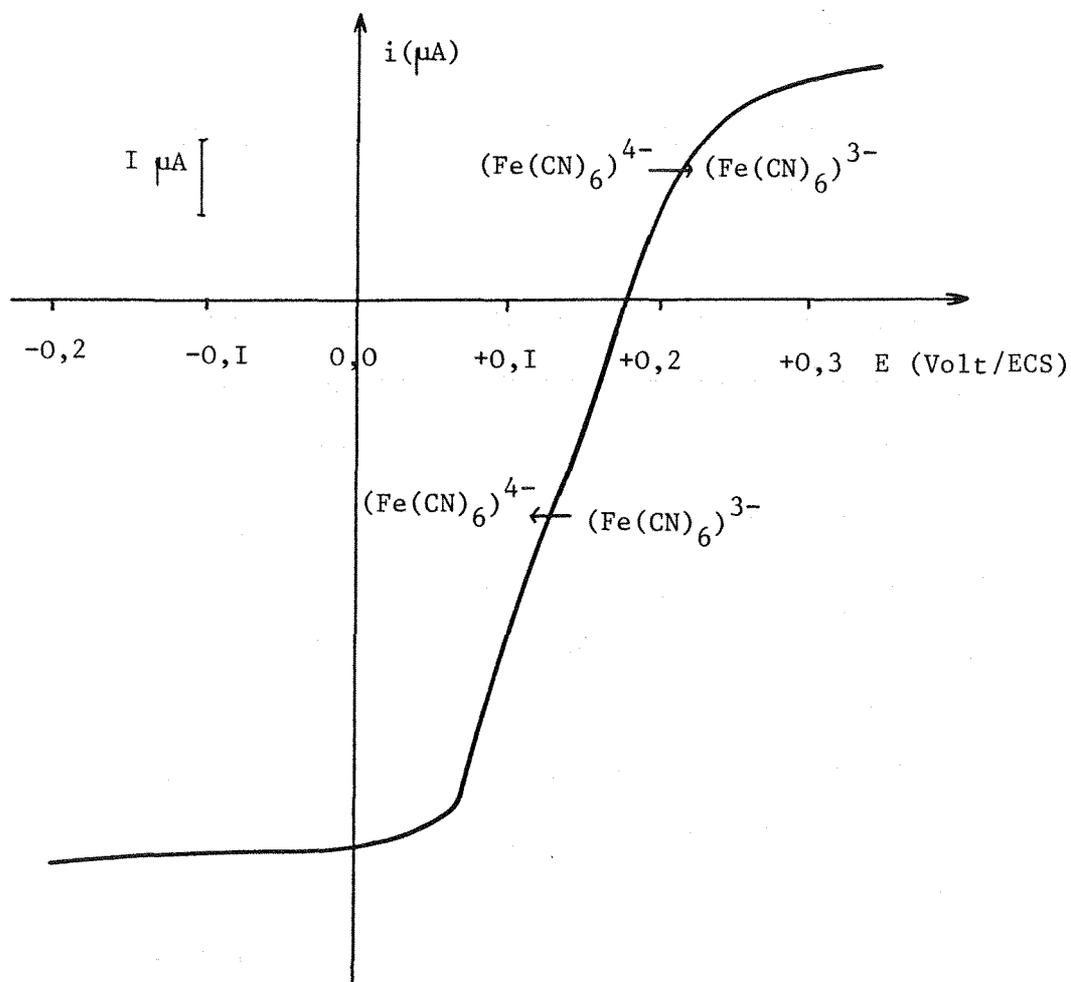


Figure I6: Courbe voltampérométrique à une électrode de Platine dans le milieu R40%  
 (37°C, NaClO<sub>4</sub> 0,5 M, hexacyanoferrate III: 1,9.10<sup>-3</sup> M  
hexacyanoferrate II: 0,8.10<sup>-3</sup> M )

Pour différentes espèces étudiées dans le même milieu, on observe peu de différences au niveau de leurs constantes de diffusion ( $1 \mu\text{A}$  correspond approximativement à une concentration de  $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  dans R60%, pour un électron échangé).

Ces observations peuvent être attribuées à une diminution de la constante de diffusion des espèces du fait de la viscosité du milieu: en effet, la relation de Stokes-Einstein prévoit que le coefficient de diffusion  $D$  varie de façon inversement proportionnelle au coefficient de viscosité du milieu (36). Rosset et Coll. l'ont vérifié dans le cas de mélanges acétone-eau (37).

Cela peut aussi s'expliquer par un phénomène d'adsorption des tensio-actifs contenus par les milieux transparisés à la surface de l'électrode, tendant ainsi à diminuer les courants limites de diffusion ainsi que la cinétique d'échange à l'électrode (38).

Les figures 14, 15, et 16 montrent les enregistrements obtenus dans les milieux R62% et R40% : les systèmes sont pseudo-rapides ( $E_{3/4} - E_{1/4}$  variant de 55 à 65 mV) et l'allure des courbes satisfaisante malgré la viscosité du réactif R.

La figure 17 réunit les valeurs de potentiels normaux déterminées par rapport à l'ECS dans des solvants de composition différente et dans l'eau (39).

Tout d'abord, on remarque que les potentiels déterminés par rapport à l'ECS dans les deux milieux envisagés sont en première approximation identiques à ceux que l'on connaît dans l'eau; l'ECS a pu être utilisée comme système de référence dans la mesure où la différence des potentiels du ferrocène (40) et de l'ECS est connue dans les milieux envisagés.

On retrouve les résultats obtenus dans le cas des réactions

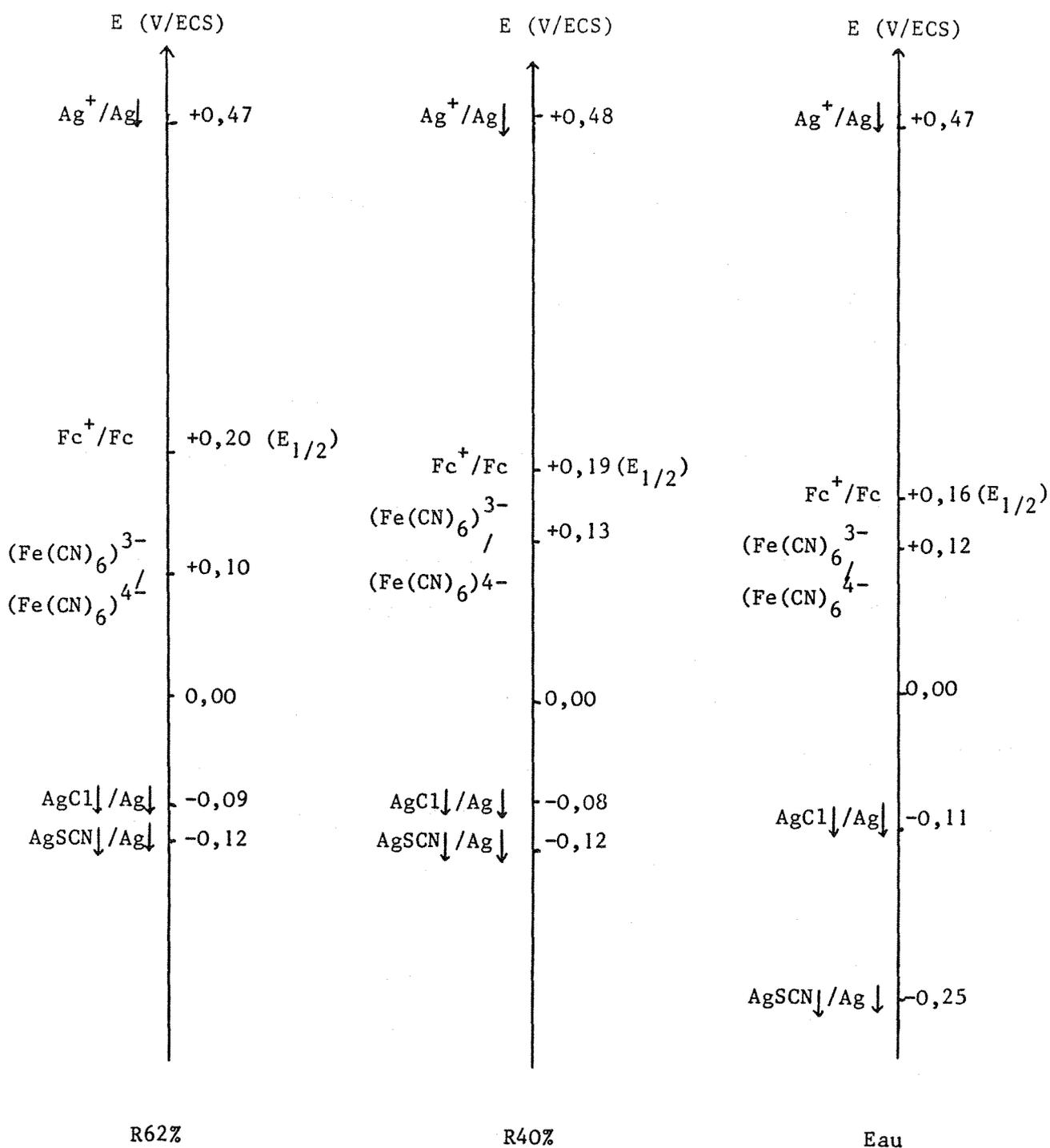


Figure 17: Valeurs de potentiels normaux déterminés par rapport à l'ECS dans les milieux R62%, R40% et comparaison avec des valeurs publiées dans l'eau (33)

acide-base, en particulier, le fait que la baisse de pouvoir dissociant des solvants étudiés est presque sans influence sur les valeurs des constantes thermodynamiques.

Enfin, on note que la solvatation des ions argent, chlorure, thiocyanate, hexacyanoferrate (II) et (III) et ferricinium, est à peu près indépendante de la teneur en solvant organique tant que celle-ci est inférieure à 60%.

## 1.2. Autres systèmes

Nous avons envisagé le cas de systèmes directement liés aux dosages chimiques dans le lait. En nous référant au titrage des sucres réducteurs, nous avons examiné les systèmes mettant en jeu le cuivre (II), l'iode et le permanganate de potassium. Nous avons également étudié l'ion thiocyanate.

### 1.2.1. Système du cuivre (II)

La courbe voltampérométrique relative à l'état d'oxydation +2 du cuivre est celle d'un système pseudo-rapide (figure 18).

La valeur de  $E_{1/2}$  déterminée à l'aide de cet enregistrement est de +0,15 V/ECS; elle est assez proche de  $E_0$  indiquée dans la littérature pour l'eau: +0,10V/ECS.

Dans le cas où l'on utilise une électrode à goutte de mercure (figure 19), la courbe intensité-potentiel met en évidence un maximum qui rend difficile la détermination du potentiel de demi-vague: en effet, les ions cuivriques font partie des espèces susceptibles de donner naissance à des maxima (41), et ce, malgré la teneur élevée des milieux transparisés en

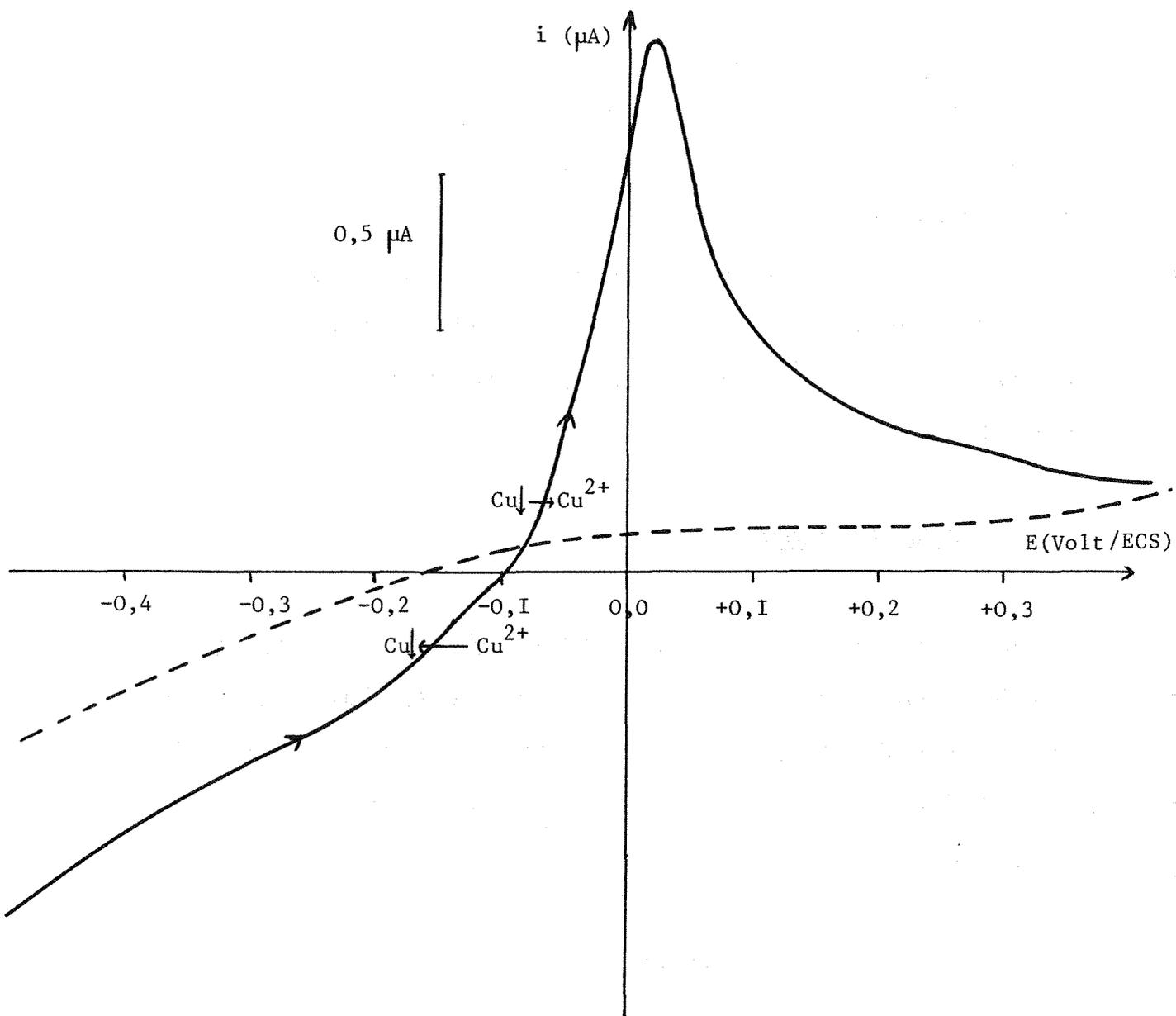


Figure I8: Courbe voltampérométrique à une électrode de Platine dans le milieu R62%

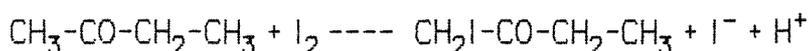
(37°C,  $\text{NaClO}_4$  0,5M,  $\text{CuSO}_4$   $1,2 \cdot 10^{-4}\text{M}$ )

tensio-actifs habituellement utilisés en vue d'éliminer les maxima.

### 1.2.2. Cas de l'iode

Que l'on soit en absence de soude (pH 6,5), ou en sa présence (pH 11,9), il est possible d'expliquer l'instabilité de l'iode en faisant intervenir, soit le phénomène de dismutation, soit la formation d'un dérivé iodé de la butanone.

Le diagramme potentiel-pH de l'iode montre que dans l'eau pour des pH supérieurs à 8, l'iode est dismuté en iodure et en iode à un degré supérieur ou égal à un (42). On sait également que la butanone peut réagir avec l'iode pour donner un dérivé de substitution selon l'équilibre suivant:



Cette réactivité peut s'expliquer par l'énolisation de la fonction cétone de la butanone (43)(44).

On voit que cet équilibre est favorisé en opérant en milieu basique.

On peut d'ailleurs considérer cette réaction comme une réaction de dismutation de l'iode aux degrés d'oxydation +1 et -1.

La vague d'oxydation de l'iodure libéré par l'une ou l'autre de ces deux réactions est bien mise en évidence par voltampérométrie ( figure 20 ).

Une étude plus précise du courant limite de diffusion des iodures devrait permettre de trancher entre les deux mécanismes: en effet, dans le cas de la dismutation avec formation d'iodate, la quantité d'iodure libéré est égale aux cinq tiers de la concentration initiale en iode, alors que dans le cas de la formation d'un dérivé iodé, elle est égale à la concentration initiale en iode.

Ces considérations impliquent une décomposition totale de l'iode, ce qui peut être contesté en raison du maintien d'un signal cathodique que

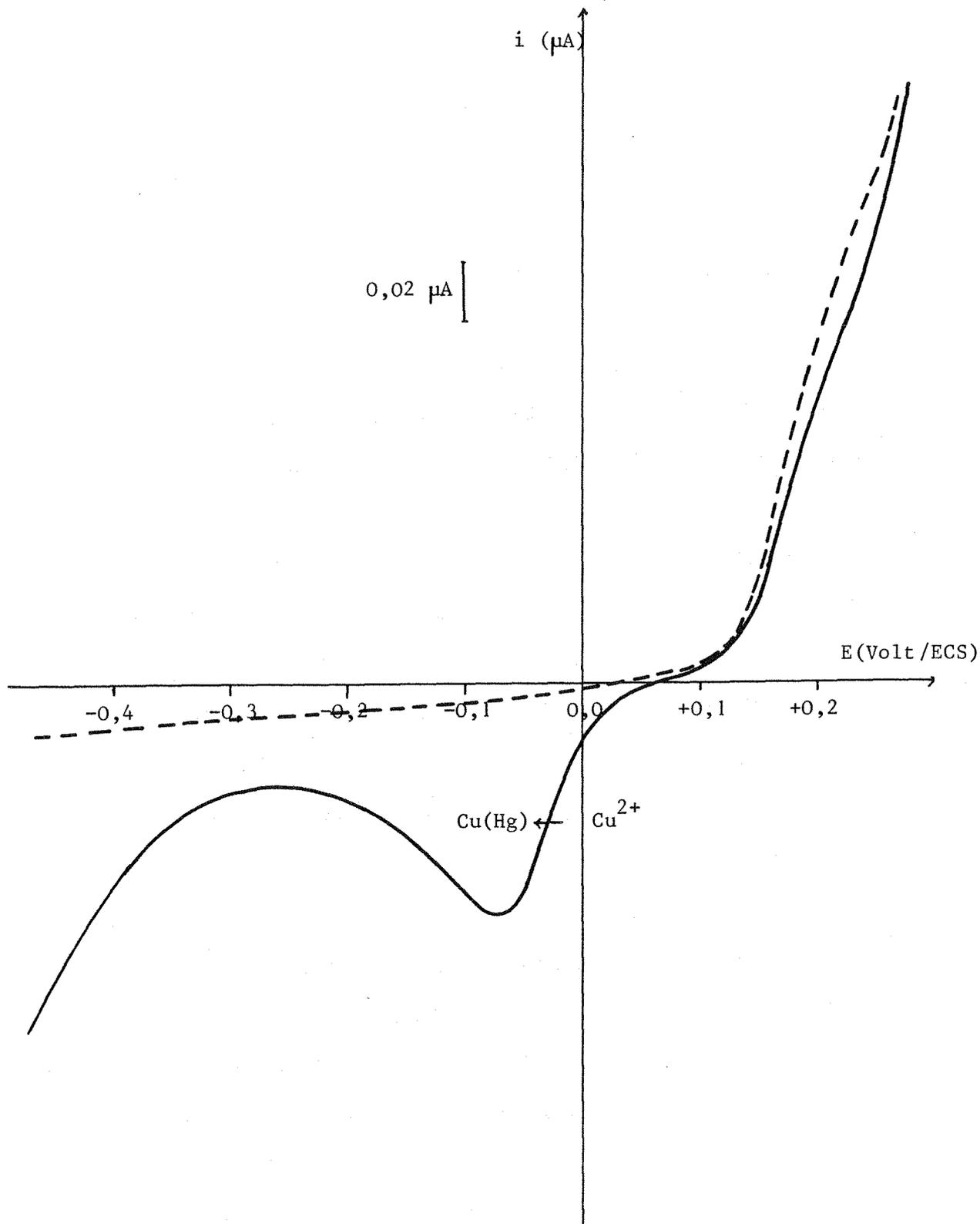


Figure 19: Polarogramme d'une solution de cuivre(II) dans le milieu R62%  
 (37°C,  $\text{NaClO}_4$  0,5 M,  $\text{CuSO}_4$   $2 \cdot 10^{-3}$  M)

l'on pourrait attribuer à de l'iode résiduel. Une étude spectrométrique dans le visible devrait confirmer ou infirmer cette hypothèse.

La formation du complexe  $I_3^-$  est peu probable dans la mesure où celui-ci est peu stable dans l'eau, et que les milieux envisagés présentent une grande similitude avec l'eau.

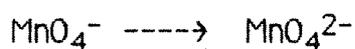
En conclusion, l'instabilité de l'iode dans le liquide de transparisation rend impossibles les dosages des sucres par la méthode iodométrique. Si l'on voulait quantifier la teneur en sucre après transparisation, il serait nécessaire de faire appel à une réaction d'une autre nature ou de modifier les constituants du réactif de transparisation.

### 1.2.3. Cas du permanganate de potassium

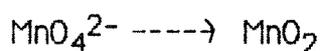
Le permanganate de potassium, théoriquement instable dans l'eau (45), est réduit dans les milieux transparisés, par la soude en milieu basique, et par le Triton X100 en l'absence de soude.

La réduction du permanganate peut se schématiser ainsi (46):

*En milieu basique:*



puis



*En milieu neutre:*



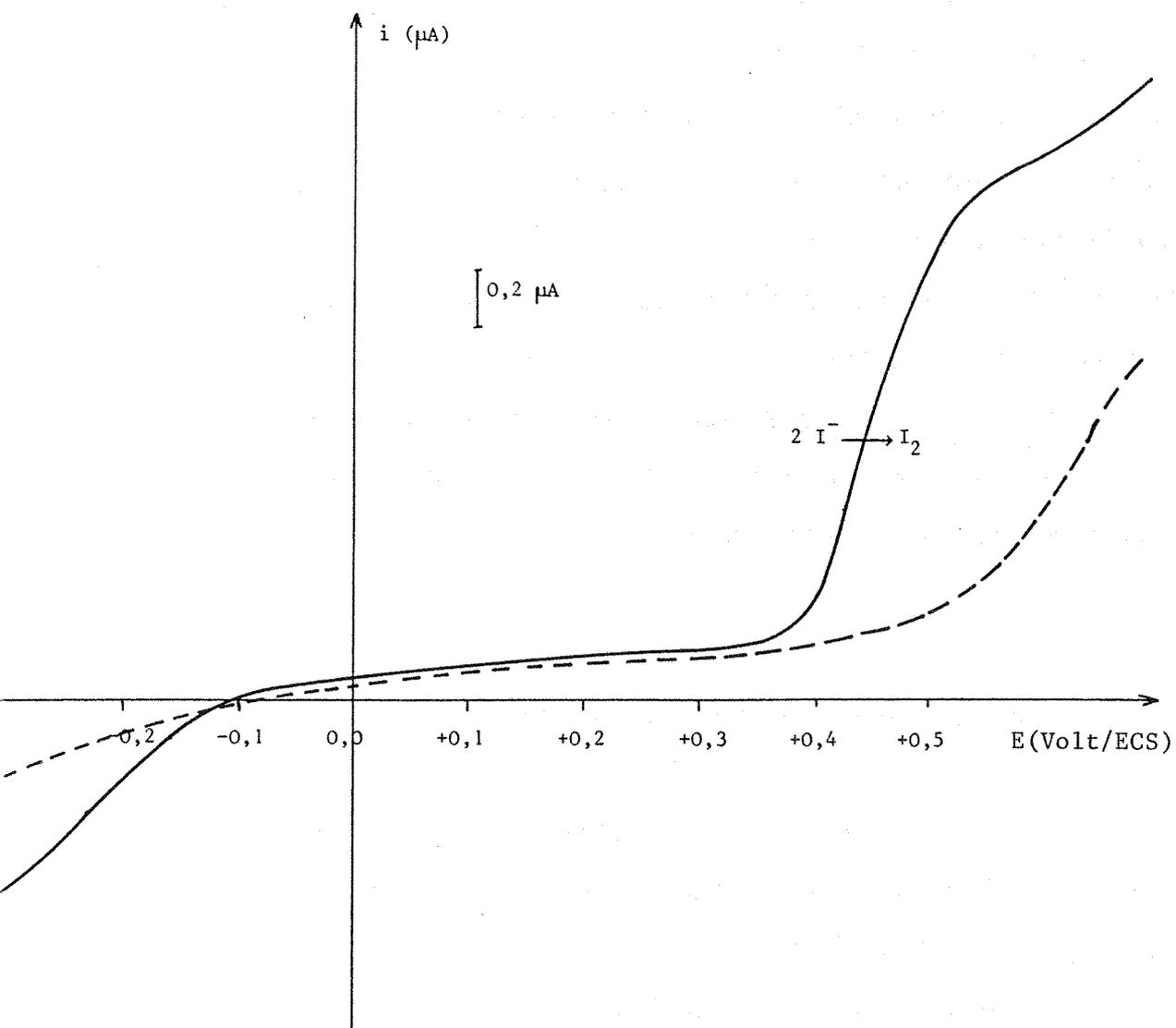


Figure 20: Courbe voltampérométrique à une électrode de Platine  
 dans le milieu R62%  
 ( $37^\circ\text{C}$ ;  $\text{NaClO}_4$  0,5 M;  $\underline{\text{I}_2}$   $10^{-4}$  M)

Dans les milieux transparisés contenant de la soude, la première étape de réduction du permanganate ( $5 \cdot 10^{-3}$  M) se traduit par un changement immédiat de couleur du rose au vert franc ( $\text{MnO}_4^{2-}$ ) puis par un virage progressif au jaune brun (trois minutes environ, espèce  $\text{MnO}_2$ ).

Dans les milieux transparisés exempts de soude, on note un changement de couleur progressif (dix minutes environ) du rose au jaune brun directement ( $\text{MnO}_2$ ).

En conclusion, le permanganate ne peut être utilisé dans la méthode de dosage des sucres par la méthode de Bertrand (qui nécessite de plus un chauffage incompatible avec la présence de butanone).

De surcroît, le permanganate, comme l'iode, ne peut être utilisé comme oxydant pour caractériser les propriétés réductrices des laits transparisés, le solvant de transparisation imposant ses propriétés réductrices.

#### 1.2.4. Cas du thiocyanate

Le comportement redox de cette espèce minérale a été envisagé parce que, bien qu'elle soit un constituant mineur du lait ( $0,015$  à  $0,15 \cdot 10^{-3}$  M), elle semble y jouer un rôle intéressant en tant que témoin de l'activité enzymatique du système de la peroxydase (47) (48).

Ont été examinés, d'une part son comportement à une électrode de platine où l'on observe son oxydation électrochimique, et d'autre part à une électrode d'argent, où l'oxydation du métal est facilitée par la présence de thiocyanate en tant que complexant.

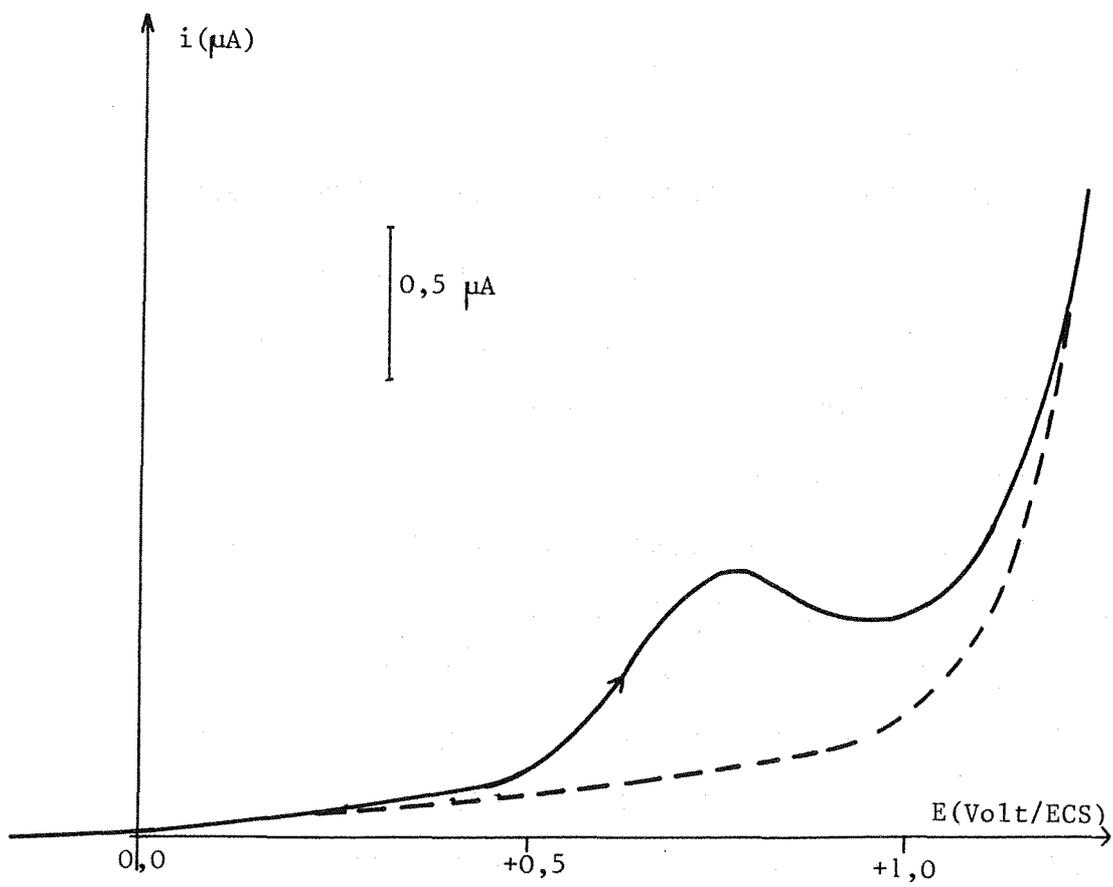
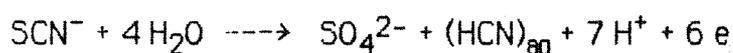


Figure 21: Courbe voltampérométrique à une électrode de Platine  
dans le milieu R62%  
( $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{NaClO}_4$  0,5 M, KSCN:  $2 \cdot 10^{-3}$  M)

### *a. Electrode de platine*

Dans le milieu R62%, à une électrode de platine, on obtient un signal irréversible en forme de pic à un potentiel voisin de + 0,6V/ECS (figure 21). Ce résultat est le même que celui obtenu dans l'eau dans les mêmes conditions (49) (50).

Ce pic d'oxydation correspondrait à la réaction suivante:

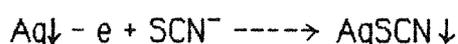


avec une étape intermédiaire qui serait la formation de thiocyanogène ((SCN)<sub>2</sub>) ensuite hydrolysé en sulfate et en cyanure. Ce processus est irréversible (51).

A l'électrode de platine, on note, et nous l'avons observé dans le milieu R62%, le dépôt d'une substance polymérique (51) qui passive l'électrode.

### *b. Electrode d'argent*

On a affaire au système Ag SCN ↓ / Ag ↓. La courbe intensité-potentiel (figure 22) met en évidence l'apparition d'un courant de diffusion en oxydation qui correspond à la réaction:



Le courant mesuré est proportionnel à la concentration en thiocyanate à condition de décaper l'électrode à chaque tracé. Il apparaît d'autre part un signal cathodique qui correspond à la réduction du thiocyanate d'argent formé au niveau de l'électrode d'argent.

Les valeurs de potentiel à intensité nulle ont été exploitées pour la détermination du pK du complexe (chapitre 4).

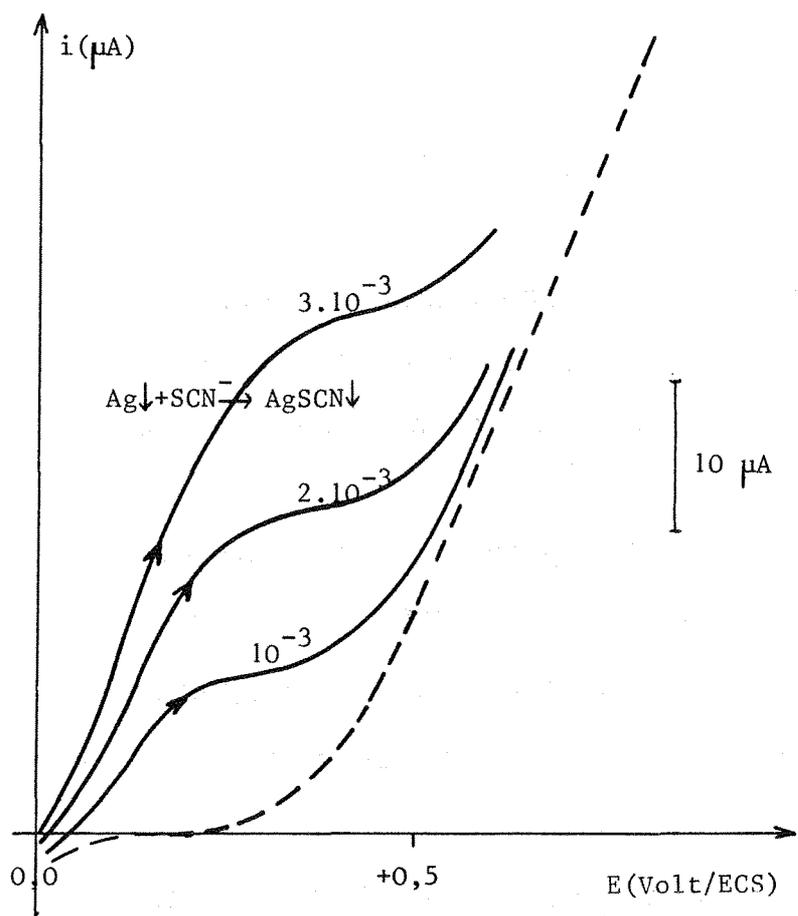


Figure 22: Détection ampérométrique de l'ion thiocyanate à une électrode d'argent dans le milieu R62% ( $37^\circ\text{C}$ , KSCN:  $10^{-3}$ ,  $2 \cdot 10^{-3}$  et  $3 \cdot 10^{-3}$  M)

Comme dans l'eau, il est donc possible de détecter et quantifier les ions thiocyanate soit par ampérométrie, soit par potentiométrie, à condition que le milieu soit dépourvu d'ions hydroxyde qui présentent un signal anodique à des potentiels voisins de + 0,1V/ECS.

Compte tenu des teneurs très faibles en thiocyanate présentes dans le lait, la détection ampérométrique à l'électrode d'argent peut paraître compromise en utilisant les moyens classiques de l'électrochimie. Par contre, l'utilisation des méthodes impulsionnelles sur électrode solide ou sur électrode de mercure, pourraient éventuellement conduire à un résultat satisfaisant dans la mesure où en principe le courant résiduel est fortement atténué (52).

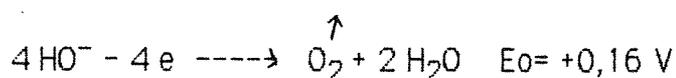
On sait par ailleurs que le dosage classique des ions thiocyanate se fait par colorimétrie par l'intermédiaire des ions ferriques (53), mais il ne peut être mené dans les milieux que nous étudions car il impose l'utilisation de solutions très acides dont le pH est incompatible avec la transparence des laits. Les dosages d'ions thiocyanate par potentiométrie à une électrode sélective à membrane liquide (54) ne peuvent être mis en oeuvre du fait de la composition des milieux qui destructureraient la membrane de l'électrode.

## 2. Caractère réducteur des ions hydroxyde

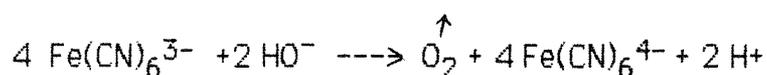
Dans l'eau, le pouvoir réducteur du solvant augmente de 0,84 volts lorsque l'on passe de pH 0 à pH 14 pour une même pression partielle en oxygène.

En milieu suffisamment basique, le caractère réducteur est dû aux

ions hydroxyde qui s'oxydent selon l'équilibre:



Compte tenu de la similitude des milieux R62% et R40% avec l'eau, on doit s'attendre à y observer le même type de comportement. Pour mettre en évidence ces propriétés, nous avons utilisé le couple hexacyanoferrate III- hexacyanoferrate II indépendant du pH pour des pH supérieurs à 4. L'ion hexacyanoferrate III réagit avec les ions hydroxyde selon l'équilibre:



On constate que cette réaction dans les milieux R62% et R40% à pH 12 est totale après dix minutes lorsque l'on opère en présence d'air: ceci se traduit par la décoloration des solutions.

Si l'on élimine l'oxygène des solutions par barbotage d'azote, la réaction est immédiate; ceci est dû au déplacement de l'équilibre vers la droite du fait de l'élimination continue de l'oxygène formé.

Ce résultat montre que le pouvoir réducteur des milieux R62% et R40% est directement lié à leur pH, donc en principe, le système hexacyanoferrate III- hexacyanoferrate II peut être considéré comme indicateur potentiométrique du caractère basique des solutions transparisées.

En maintenant le pH du lait transparisé dans la zone 7,4 à 8, on limite considérablement le caractère réducteur apporté par les ions hydroxyde.

### Conclusion

L'établissement des échelles de potentiel dans les milieux transparisés complète leur étude pHmétrique ; elle nous permet de tirer les conclusions suivantes:

. Les milieux transparisés présentent des propriétés réductrices à la fois par la présence de la butanone, du Triton X 100 et par celle des ions hydroxyde.

- Si l'on opère *en milieu neutre non tamponné* la butanone semble imposer son caractère réducteur vis à vis de systèmes comme l'iode, et le Triton X100 vis à vis de systèmes comme le permanganate. Mais il est possible de trouver des systèmes comme l'argent qui ne réagissent pas avec ces composés: dans ces conditions, c'est le couple  $O_2/H_2O$  qui impose ses propriétés réductrices: nous avons montré que la transparence du lait était conservée jusqu'à pH 7,4, la limite de potentiel correspondante est de 0,56V/ECS.

On constate que tous les systèmes électrochimiques simples tels que  $Ag^+/Ag\downarrow$ , hexacyanoferrate III/ hexacyanoferrate II... sont caractérisés par des valeurs de potentiel normal qui varient peu de celles définies en solution aqueuse, bien que le pourcentage en solvant organique puisse aller jusqu'à 60%: on retrouve donc ici un

résultat important mis en évidence en pHmétrie.

- Si l'on opère *en milieu basique*, le caractère réducteur du solvant est apporté par les ions hydroxyde, comme le confirment les tests effectués avec l'hexacyanoferrate III utilisé comme indicateur potentiométrique.

A pH 12, le système  $O_2/HO^-$  a un potentiel de + 0,28 V/ECS, en admettant, ce qui est probable, que le potentiel des systèmes  $O_2/H_2O$  dans les différents milieux est en première approximation constant.

Il en résulte donc que tout système redox dont le potentiel est supérieur à cette valeur verra sa forme oxydée réduite par le milieu transpirisé, si l'on admet une cinétique rapide. Cette réduction pourra être accentuée si l'on opère en absence d'oxygène (à  $pO_2 = 10^{-3}$  Atm, le potentiel du système  $O_2/HO^-$  baisse de 45 mV).

Ces considérations sont à prendre en compte pour interpréter les domaines de stabilité des indicateurs utilisés pour développer des réactions colorées ( par exemple, l'acide 2,4,6 trinitrobenzène sulfonique).

Dans l'état actuel des choses, il n'est pas possible d'évaluer le caractère réducteur des laits dû à la présence de sucres, en utilisant les dosages classiques par iodométrie ou par la méthode de Bertrand, du fait du caractère réducteur du transpirisant lui-même. Il est donc nécessaire de faire appel à d'autres réactions chimiques comme des réactions de complexation ou éventuellement des réactions redox qui seraient compatibles avec la présence de butanone et de Triton X100, et qui

pourraient être menées dans un domaine de pH compris entre 7,4 et 10 pour que le lait conserve sa transparence.

Le fait de pouvoir baisser le pH à une valeur de 7,4 permet de réduire sensiblement les inconvénients apportés par les propriétés réductrices du solvant, la limite de potentiel étant déplacée vers les potentiels oxydants de 300mV. Cette propriété peut être mise à profit pour définir les conditions d'utilisation d'indicateurs colorés, en particulier pour la détermination des groupements fonctionnels de la chimie organique.

## CHAPITRE 4: ANALYSE DES REACTIONS DE COMPLEXATION DANS LES MILIEUX TRANSPARISES

L'étude des réactions de complexation constitue le troisième volet de l'étude générale d'un nouveau solvant, au même titre que celles des réactions acido-basiques et redox.

Le système de l'argent, (établissement d'une échelle pAg), est classiquement utilisé pour avoir une idée de la solvatation des anions. Il présente également un intérêt dans le cas du lait puisqu'il peut réagir avec ses constituants, tant minéraux (ions chlorure ou thiocyanate), qu'organiques (groupements sulfhydryle de la cystéine et des protéines du lait): ce sont donc ces espèces qui seront étudiées dans la partie concernant la complexation.

Si l'on se reporte aux résultats précédents (chapitres 2, 3), on devrait observer peu de variations entre les constantes de complexation dans l'eau et dans les milieux transparisés. Pour le vérifier, l'évolution de la réactivité d'espèces complexantes dans les milieux transparisés dont la teneur en solvant organique varie a été envisagée.

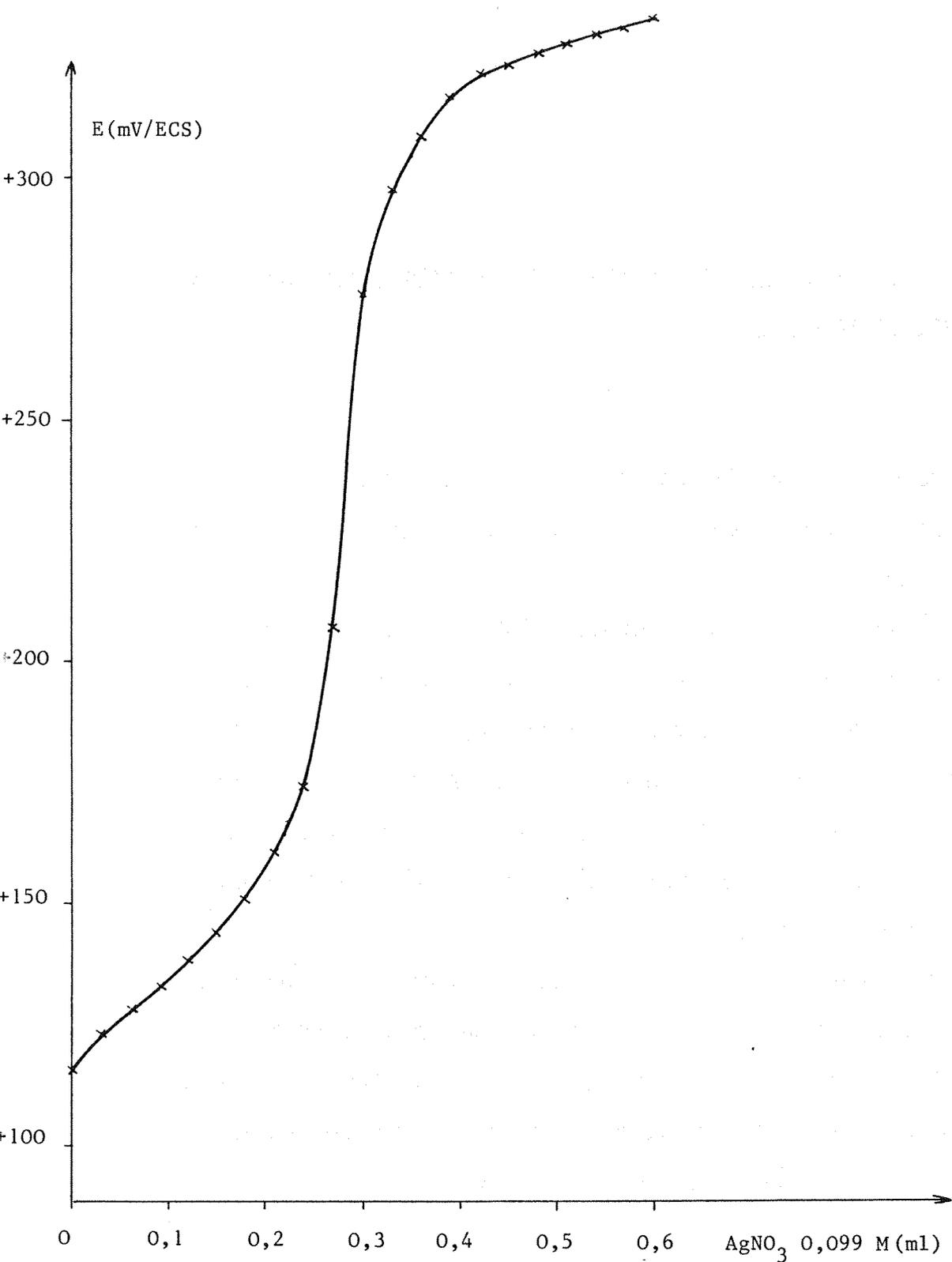


Figure 23: Courbe de titrage d'une solution de chlorure de potassium  $10^{-3}$  M par une solution de nitrate d'argent  $10^{-1}$  M dans le milieu R62% (Potentiométrie à l'électrode d'argent)

## 1. Etude de réactions de complexation d'espèces minérales

### 1.1. Les ions chlorure

#### 1.1.1. Réaction de l'ion chlorure avec l'ion argent

La réaction:



a été envisagée puisque l'ion chlorure est l'espèce minérale la plus importante (en concentration) des sels ionisés du lait, son rôle étant d'y assurer l'équilibre osmotique (55).

Cette réaction a été étudiée dans les milieux R62% et R40% exempts de soude afin d'éviter la précipitation des ions argent avec les ions hydroxyde.

La réaction est suivie par potentiométrie à intensité nulle à une électrode d'argent dans des milieux contenant les ions chlorure en concentration initiale de l'ordre de  $10^{-3}$  M, et progressivement additionnés d'une solution de nitrate d'argent (annexe VII).

Le précipité de chlorure d'argent formé adhère à l'électrode, ce qui permet une bonne stabilisation des potentiels dès les premiers ajouts de solution d'ions argent.

Les figures 23 et 24 montrent les courbes obtenues respectivement dans les milieux R62% et R40%. Le pourcentage de solvant organique étant trop faible, on n'observe pas la formation de complexes supérieurs du type  $\text{AgCl}_2^-$  (56)(57).

Comme dans le cas des titrages acidimétriques, on observe une

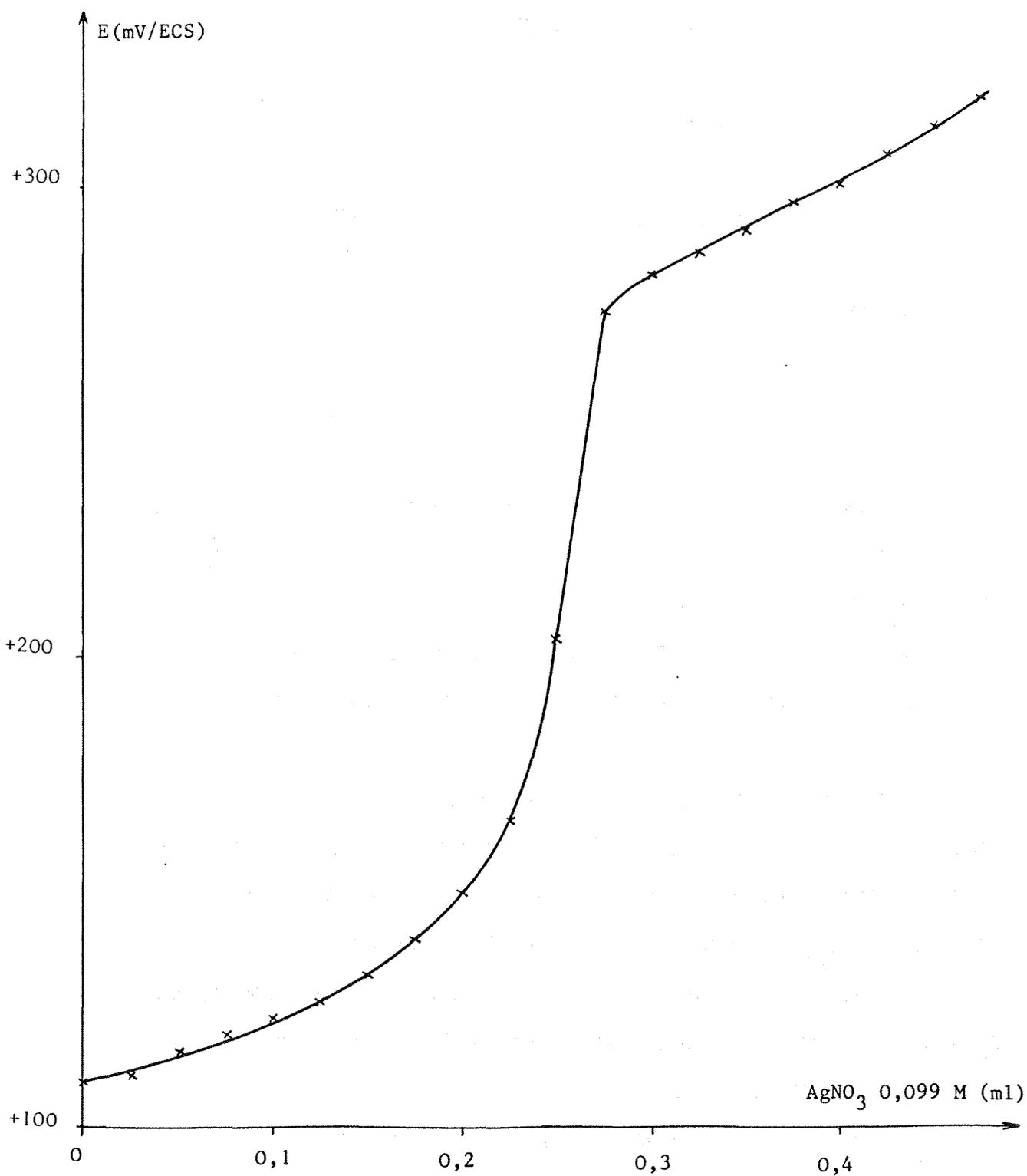


Figure 24: Courbe de titrage d'une solution de chlorure de potassium  $10^{-3}$  M par une solution de nitrate d'argent  $10^{-1}$  M dans le milieu R40% (Potentiométrie à l'électrode d'argent)

anomalie du potentiel de l'électrode d'argent au delà du point équivalent quand elle est en présence d'un excès d'ions argent. Ceci peut être attribué à la présence des impuretés apportées par le Triton X100 qui peuvent , soit être complexées par les ions argent, soit s'adsorber partiellement à la surface de l'électrode indicatrice.

Comme dans le cas des réactions acide-base, l'analyse des courbes est correcte dans leur première partie et montre que l'électrode d'argent fonctionne correctement dans cette zone de potentiel.

Dans le milieu R62%, l'analyse des courbes de titrage permet la détermination de la valeur de pK de AgClI alors que dans le milieu R40%, la détermination précise du potentiel du système  $Ag^+/AgI$  nécessiterait un traitement préalable du Triton X100 utilisé pour préparer le réactif R.

Aussi, pour calculer les valeurs des constantes de complexation, avons nous utilisé le potentiel du système  $Ag^+/AgI$  déterminé par voltampérométrie à un électrode de platine (chapitre 3).

Le tableau 9 montre que les variations observées entre les grandeurs thermodynamiques mesurées dans les milieux R62% et R40% sont minimales. Le pourcentage de solvant organique ne modifie donc pas l'affinité des ions argent pour les ions chlorure. Comme le potentiel du système de l'argent ne varie pas par rapport à celui du ferrocène dans les milieux envisagés, on peut en conclure que sa solvatation dans les milieux transparisés varie peu de celle qu'il présente dans l'eau, et par conséquent, il en est de même pour celle de l'ion chlorure.

Milieu	R62%	R40%	Eau
$E_0$ AgCl↓/Ag↓ (V/ECS) potentiométrie	-0,09	-0,06	-0,11
$E_0$ Ag <sup>+</sup> /Ag↓ (V/ECS) potentiométrie	+0,48	+0,46	+0,47
voltampérométrie	+0,47	+0,48	+0,47
pK AgCl↓	9,3	9,0	9,7

Tableau 9: valeurs des potentiels normaux de AgCl↓/Ag↓ et Ag<sup>+</sup>/Ag↓, et des constantes de complexation dans les milieux R62%, R40% et dans l'eau (39)

### 1.1.2. Dosage des ions chlorure dans le lait transparisé

Les résultats présentés ci-dessus permettent d'envisager le titrage des ions chlorure par les ions argent dans les milieux transparisés. Aussi, avons nous titré un lait transparisé à l'aide d'une solution de nitrate d'argent (0,1 M), en suivant l'évolution du potentiel de la solution à l'aide d'une électrode d'argent.

La figure 25 montre l'allure de la courbe obtenue. Comme dans le cas

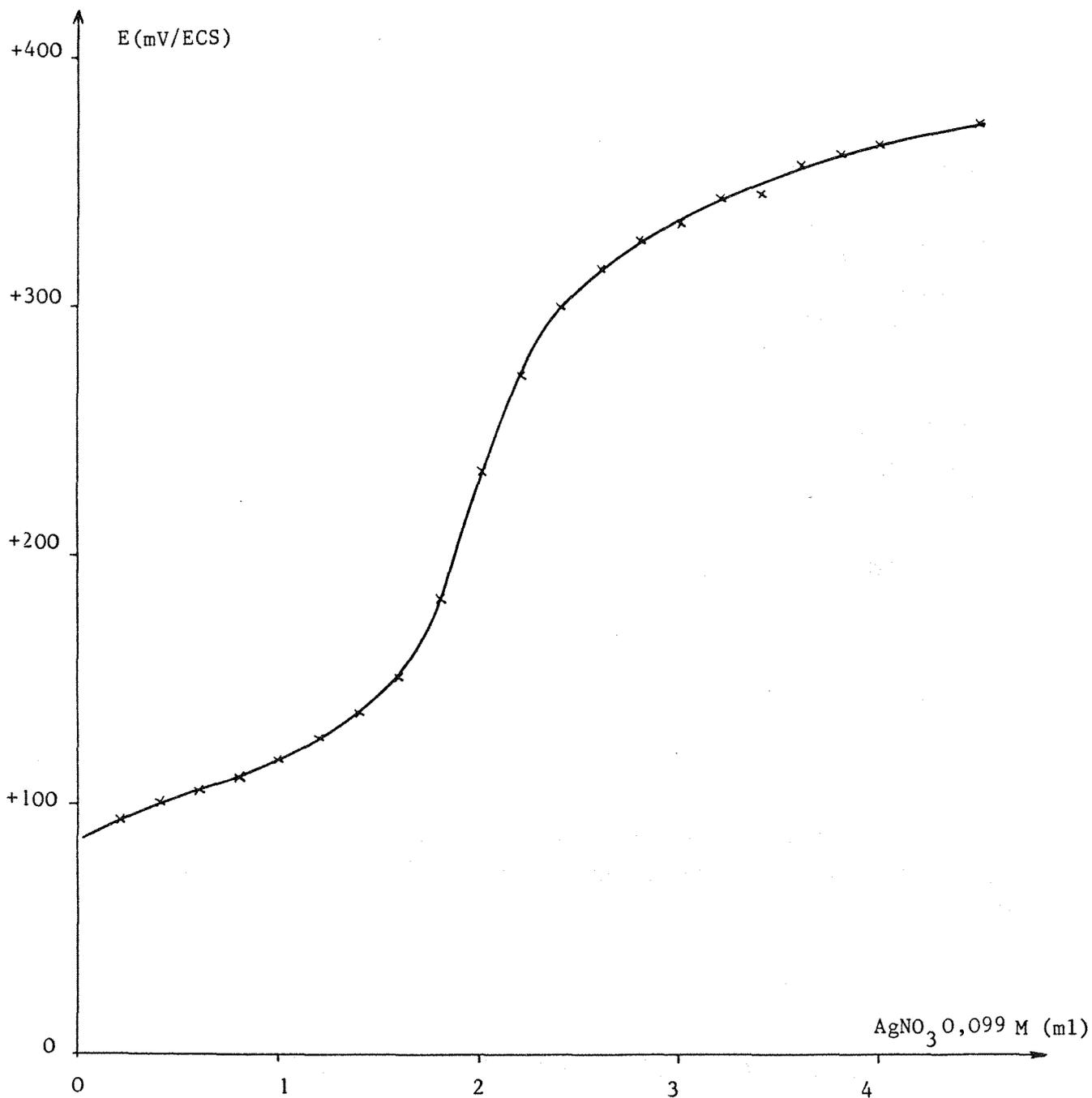


Figure 25: Courbe de titrage d'un lait demi-écrémé transparisé par une solution titrée de nitrate d'argent (Potentiométrie à l'électrode d'argent)

des titrages acide-base, le saut de potentiel est moins brusque dans le lait transpirisé que dans les milieux hydroorganiques correspondants.

Cependant, l'allure de la courbe est satisfaisante et permet de déterminer le point équivalent avec une bonne précision.

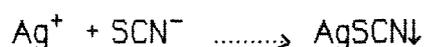
Ceci permet de déterminer une concentration en ions chlorure de 0,038 M pour le lait considéré, avec l'approximation habituelle du fait que l'on dose également les éléments mineurs du lait susceptibles de consommer des ions argent. Cette valeur de 0,038 M est comparable à la valeur de 0,032 M indiquée comme étant la composition de la partie hydrominérale du lait (58).

Le dosage des ions chlorure se pratique dans l'industrie laitière, mais il nécessite une étape préalable de défécation dont la transpirisation permet de s'affranchir.

Cette réaction simple constitue un des premiers exemples d'une réaction chimique effectuée dans un milieu transpirisé. On pourrait envisager cette réaction sous forme d'un titrage colorimétrique ou potentiométrique afin de doser dans les laits transpirisés les ions chlorure comme témoins d'un mouillage éventuel.

### 1.2. Les ions thiocyanate

La réaction:



a été envisagée, parce que, comme nous l'avons dit dans le chapitre concernant l'analyse des processus redox, les ions thiocyanate sont des témoins intéressants de l'activité peroxydasique du lait.

Cette réaction a été étudiée dans les mêmes conditions que pour les

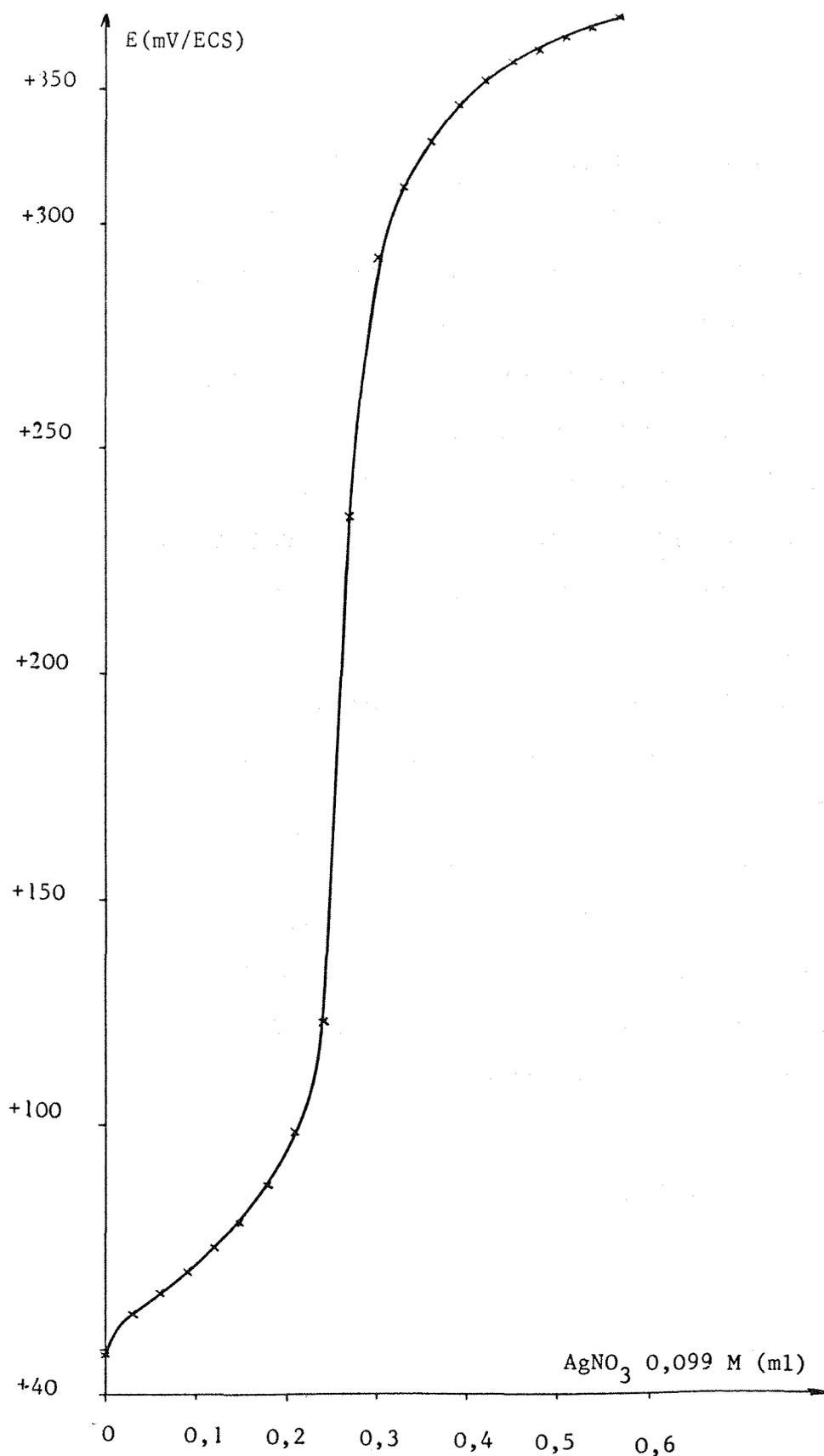


Figure 26: Courbe de titrage d'une solution de thiocyanate de potassium  $10^{-3}$  M par le nitrate d'argent dans le milieu R62% (37°C; potentiométrie à l'électrode d'argent)

ions chlorure, dans les milieux R62% et R40% exempts de soude.

Le précipité blanc de  $\text{AgSCN}\downarrow$  est moins adhérent que celui de  $\text{AgCl}\downarrow$  d'où la nécessité d'un préconditionnement de l'électrode d'argent utilisée en potentiométrie par dépôt de  $\text{AgSCN}\downarrow$  à la surface de l'électrode par coulométrie (annexe VIII).

Les figures 26 et 27 montrent les courbes obtenues respectivement dans les milieux R62% et R40%. Comme dans le cas des ions chlorure, on n'observe pas la formation de complexes supérieurs type  $\text{Ag}(\text{SCN})_2^-$  (56) (57).

Comme dans le cas de la formation de  $\text{AgCl}\downarrow$ , on note dans le milieu R40% surtout, que la réponse en potentiel n'est pas satisfaisante dans la seconde partie de la courbe: ceci peut être lié à la présence d'impuretés complexant les ions argent, ou diminuant la cinétique d'échange à l'électrode.

C'est pourquoi, pour calculer les valeurs des constantes de complexation, avons nous utilisé le potentiel du système  $\text{Ag}^+/\text{Ag}\downarrow$  déterminé par voltampérométrie à un électrode de platine (chapitre 3).

Si l'on admet que la solvation des espèces minérales est identique dans l'eau et les milieux transparisés (chapitre 2), la valeur de 10 obtenue pour le pK de  $\text{AgSCN}\downarrow$  au lieu de 12 dans l'eau (tableau 10), peut être liée à l'effet spécifique des impuretés apportées par le transparisant.

Il est possible qu'en l'absence d'impuretés, on retrouve une valeur de 12. Cet aspect devra être analysé en détail si l'on veut doser par argentimétrie des espèces dont la teneur est inférieure à celle des impuretés, et comme dans le cas des réactions acide-base, il pourrait être nécessaire de débarrasser le réactif R des impuretés douées de propriétés complexantes vis à vis de l'argent.

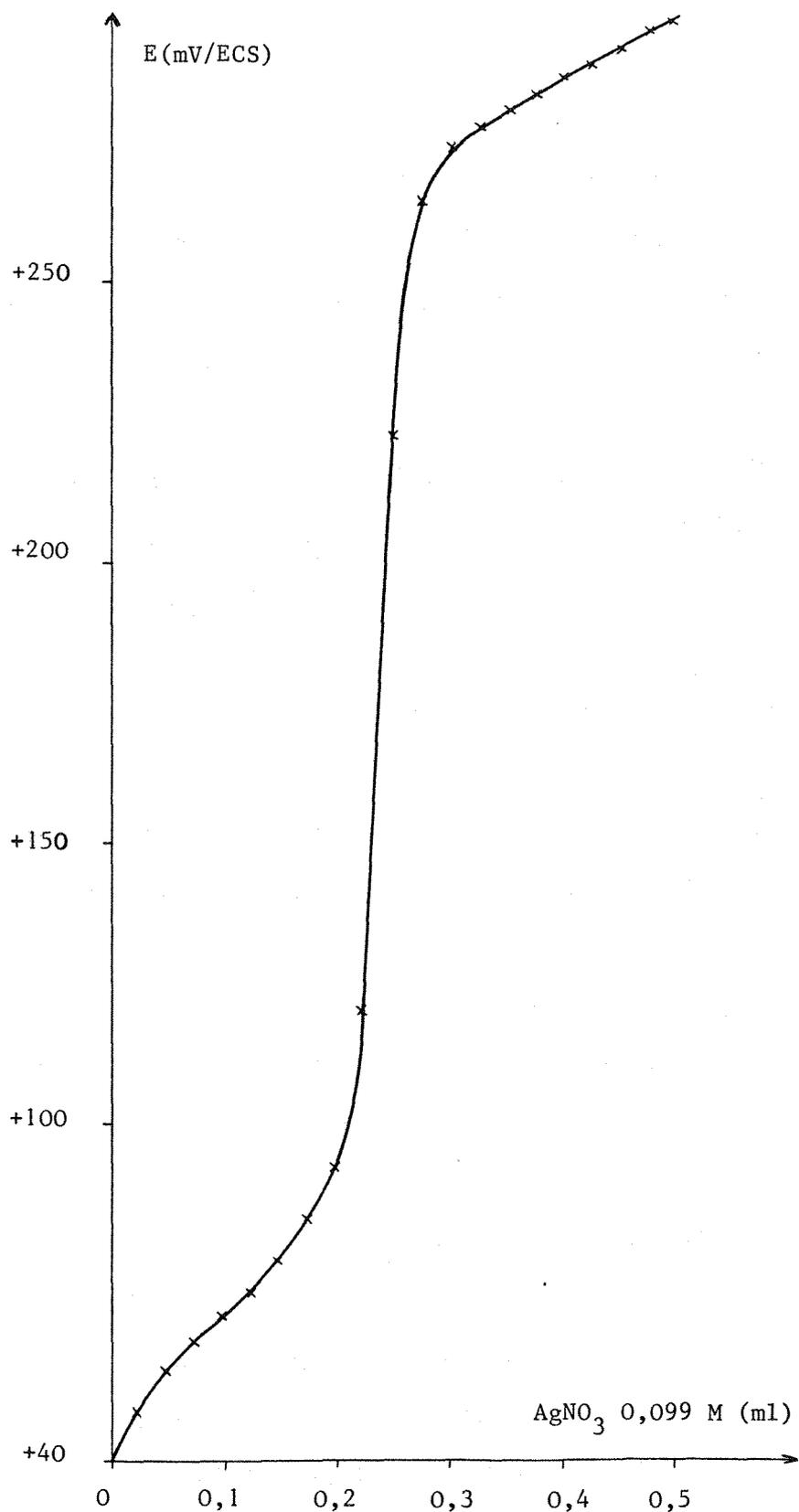


Figure 27: Courbe de titrage d'une solution de thiocyanate de potassium  $10^{-3}$  M par le nitrate d'argent dans le milieu R40% (37°C; potentiométrie à l'électrode d'argent)

Milieu	R62%	R40%	Eau
$E_0$ AgSCN↓/Ag↓ (V/ECS) potentiométrie	-0,12	-0,12	-0,25
$E_0$ Ag <sup>+</sup> /Ag↓ (V/ECS) potentiométrie	+0,54	+0,46	+0,47
voltampérométrie	+0,47	+0,48	+0,47
pK AgSCN↓	10,0	10,0	12,0

Tableau 10: valeurs des potentiels normaux de AgSCN↓/Ag↓ et Ag<sup>+</sup>/Ag↓, et des constantes de complexation dans les milieux R62%, R40% et dans l'eau (39)

Ces résultats confirment que les réactions des espèces minérales comme les ions chlorure et thiocyanate, et par analogie les ions iodure et bromure, avec l'ion argent dans les milieux transparisés présentent beaucoup de similitudes avec celles qui se déroulent dans l'eau, autant au niveau de la nature (précipité blanc), que de la stabilité des complexes

obtenus, et ce malgré une variation notable de la teneur en solvant organique.

La solvataion des espèces chlorure et thiocyanate varie peu entre l'eau et les milieux R62% et R40%.

Le dosage des ions chlorure et thiocyanate peut être envisagé en effectuant la détection du point d'équivalence par potentiométrie.

Sur le plan pratique, ces conclusions permettent d'effectuer des réactions chimiques dans les milieux transparisés sans qu'il soit nécessaire de maintenir constante leur teneur hydroorganique, sans nécessité de réétalonnage lorsque l'on passe de l'un à l'autre, et en pouvant utiliser des réactifs préparés en solution aqueuse.

## 2. Réaction de complexation des groupements sulfhydryle par l'ion argent

Nous avons choisi comme espèce organique la cystéine, du fait de son intérêt en pratique laitière: en effet, cet acide aminé présente dans sa structure un groupement sulfhydryle. Or, dans le lait, ces groupements, présents essentiellement sur la  $\beta$ -lactoglobuline, sont des témoins des traitements thermiques subis par le lait à condition d'être titrés rapidement après chauffage; de plus, c'est leur présence qui serait à l'origine du "goût de cuit" de certains laits (59)(60).

Les méthodes utilisées pour doser ces groupements dans le domaine laitier sont essentiellement colorimétriques et argentimétriques avec détection ampérométrique du point d'équivalence.

Les méthodes colorimétriques sont, soit des tests semi-quantitatifs tels que la méthode au nitroprussiate permettant d'estimer la quantité de

substances réductrices présentes dans le lait chauffé (61)(62), soit des déterminations de ces groupements par formation de complexes colorés avec des réactifs spécifiques. Les réactifs employés sont le para-chloromercuribenzoate (63)(64), le disulfure de thiamine (65), l'acétate de fluorescéine mercurique (66)(67) et enfin le 5-5 dithiobis-(2-nitrobenzoate) ou DTNB (68).

La méthode au DTNB (68) plus ou moins modifiée est la plus aisée à mettre en oeuvre, et a une bonne sensibilité (69)(70)(71)(72)(73).

Cependant, l'application de ces méthodes au lait impose l'élimination de la turbidité du milieu. Aussi, une méthode colorimétrique au DTNB utilisant le réactif de transparation R a-t-elle été proposée: en effet, après avoir formé les dérivés para-thionitrophénylés résultant de l'action du DTNB sur les groupements sulfhydryle du lait, une incubation de deux minutes à 37°C en présence du réactif R juste avant lecture de l'absorbance permet de s'affranchir des étapes habituellement nécessaires pour obtenir un échantillon limpide (12)(13).

Dans leur travail, Linden et coll. ont comparé leurs résultats à ceux obtenus par la titration ampérométrique utilisée comme référence.

En effet, un autre groupe de méthodes de titration des groupements sulfhydryle dans le lait consiste à les titrer par argentimétrie en mettant en évidence le point équivalence par ampérométrie (59)(60)(74). Ce sont des améliorations de la méthodes de Benesh (75) et elles dérivent toutes en fait de la méthode proposée par Kolthoff (76).

C'est cette méthode que nous avons adaptée en vue d'étudier le comportement des groupements sulfhydryle dans les milieux transparisés. Elle permet de titrer les groupements sulfhydryle par les ions argent en présence d'un large excès de chlorure ( ce qui est le cas du lait) en opérant en présence d'un tampon ammoniacal. Le milieu est constitué d'un mélange

eau-éthanol à 95° (50:50,V/V). Le point équivalent est mis en évidence par ampérométrie à une électrode de platine, en mesurant le courant dû à l'apparition de l'excès d'ions argent dans le milieu (annexe IX).

### 2.1. Choix du milieu réactionnel

Dans le milieu transparisé R62%, le complexe argent-cystéine est soluble, contrairement à ce que l'on observe dans le milieu eau-éthanol, c'est pourquoi il était intéressant de demeurer en phase homogène tout au long du titrage dans le lait transparisé. Or, lorsque celui-ci est additionné de tampon ammoniacal, on observe une reprécipitation des éléments du lait, due à une diminution trop importante de pH. Aussi avons nous modifié la composition du milieu afin de conserver sa transparence tout au long du dosage.

Il est cependant indispensable d'opérer en présence d'ammoniac afin d'éliminer toute réaction possible entre les ions argent et les ions chlorure du lait. Aussi proposons-nous le milieu réactionnel de composition suivante:

Réactif R.....: 50% en volume

NH<sub>3</sub>.....: 0,35 M

Cystéine témoin (ou -SH du lait): 10<sup>-6</sup> à 10<sup>-4</sup> M

Le tampon à base de sel d'ammonium a été remplacé par de l'ammoniac seul, car la présence de sel d'ammonium provoquait la reprécipitation du lait transparisé.

L'ajout d'ammoniac au milieu présente également l'avantage d'éviter la précipitation des ions argent avec les ions hydroxyde présents dans le

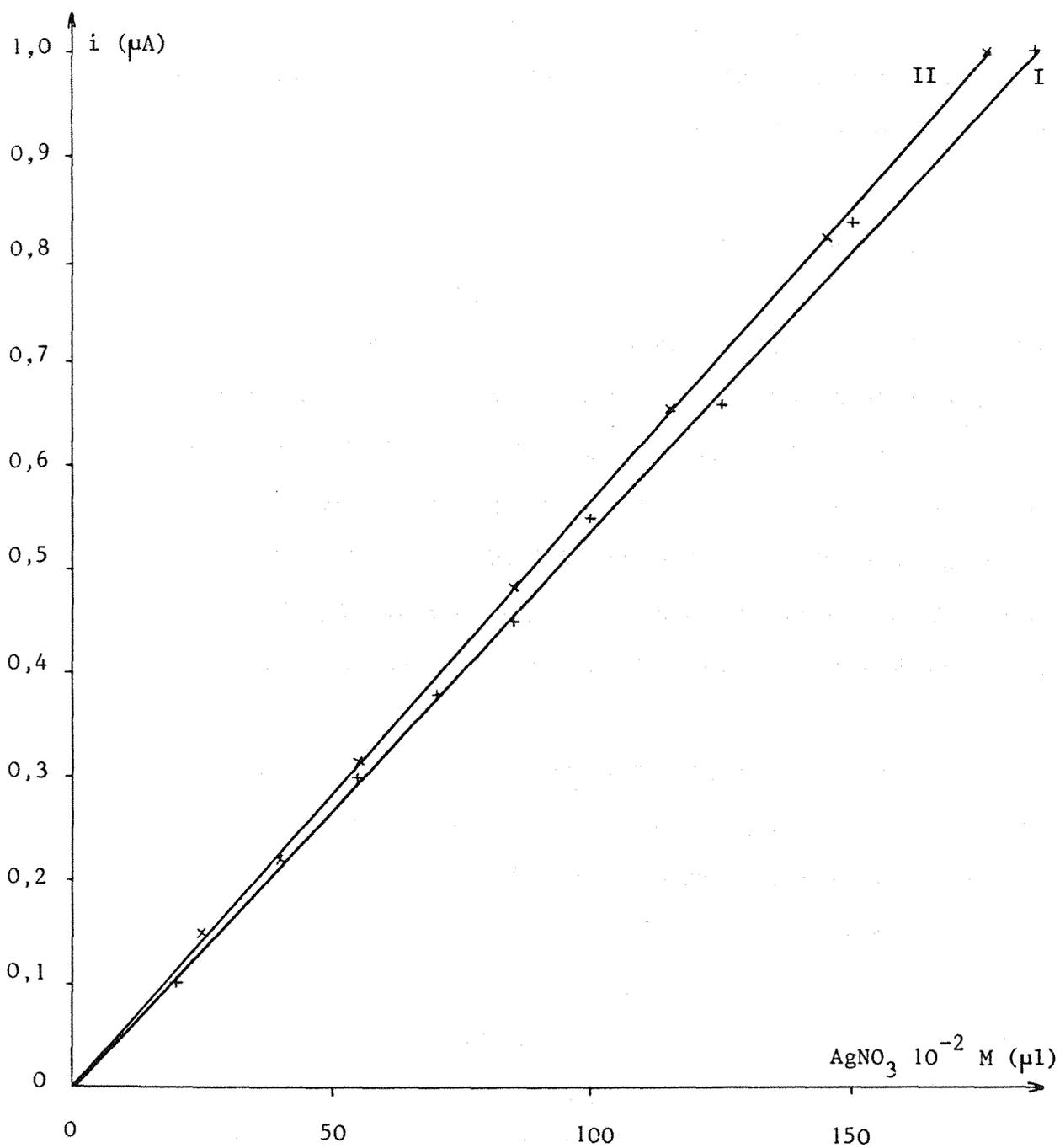


Figure 28: Réponse de l'électrode de platine à l'ajout d'ions argent  
 I: dans le milieu eau-éthanol  
 II: dans le milieu transparisé  
 (37°C;  $E = -0,30 \text{ V/ECS}$ )

lait transparisé.

Les manipulations ont été réalisées sous atmosphère d'argon, afin d'éviter l'apparition du courant de réduction lié à la présence d'oxygène, mais aussi afin de protéger la cystéine de l'oxydation à l'air à laquelle elle est très sensible (77).

## 2.2. Conditions de la détection ampérométrique

La détection a été réalisée à une électrode de platine. Contrairement à Kolthoff (76) qui travaillait à potentiel nul par rapport à une électrode de référence judicieusement choisie, nous avons opéré en imposant une valeur de  $-0,30$  volt par rapport à l'ECS.

## 2.3. Réponse de l'électrode à l'ajout d'argent

Dans le milieu nouveau étudié, nous avons vérifié que le courant mesuré était bien proportionnel à la concentration en ions argent, donc que le potentiel de  $-0,30V/ECS$  déterminé par voltampérométrie est satisfaisant.

Nous avons comparé cette réponse à celle obtenue dans le milieu eau-éthanol classiquement étudié: la figure 28 montre les deux segments de droite ainsi obtenus.

L'analogie entre ces deux réponses confirme la validité des conditions choisies (présence de  $NH_3$  seul, potentiel imposé de  $-0,30V/ECS$ ).

Bien que dans le cas du mélange eau-éthanol, le dosage s'effectue en milieu hétérogène, alors que dans le cas des milieux transparisés, le

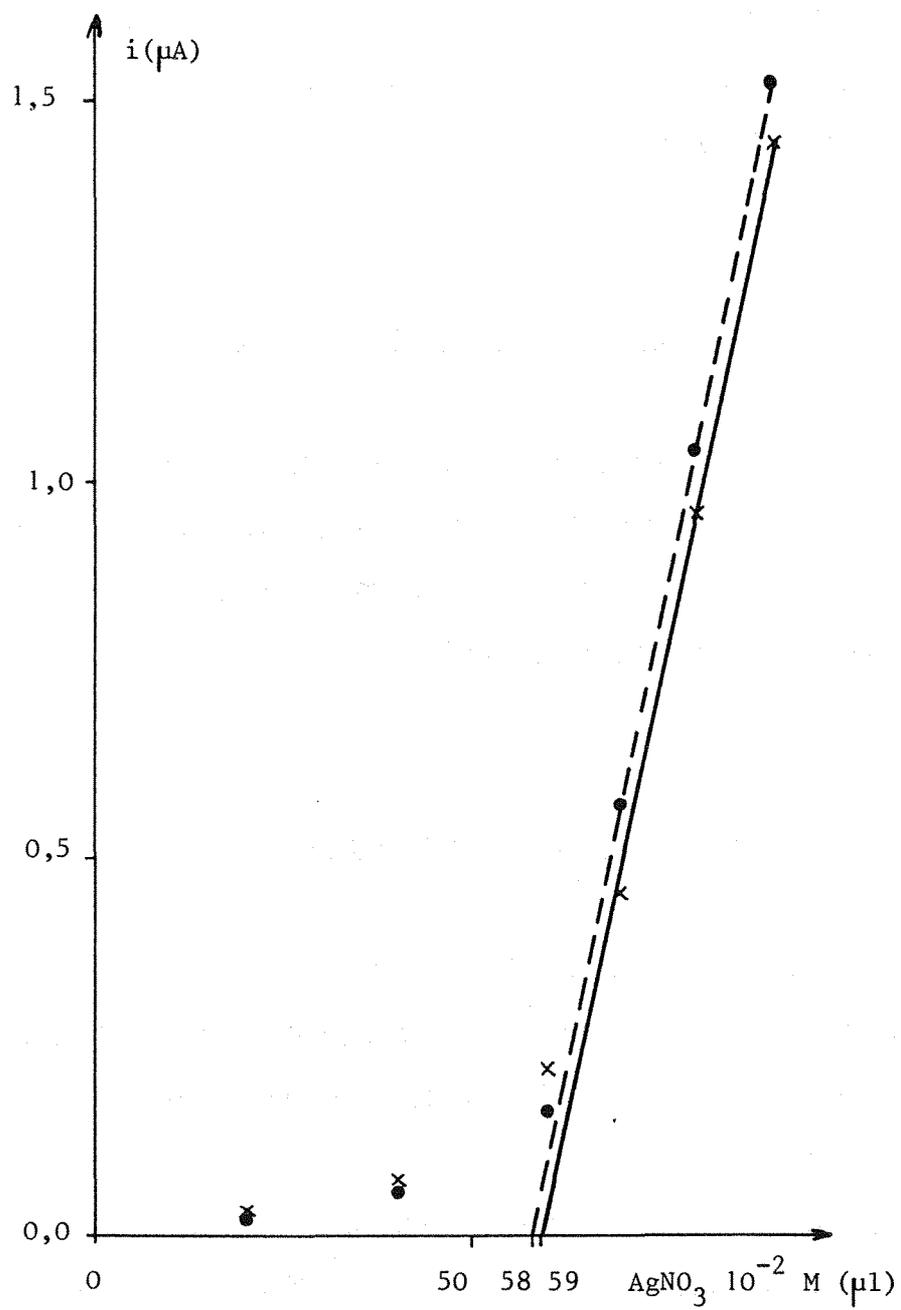


Figure 29: Comparaison de la courbe de titrage de la cystéine (6,3 micromoles) dans:  
 x x : le mélange eau-éthanol  
 • • : le milieu transpirisé

milieu reste homogène pendant tout le titrage, l'allure des courbes est très voisine.

#### 2.4. Comparaison du dosage de la cystéine dans deux milieux

Nous avons vérifié que pour une même quantité de cystéine témoin, les dosages effectués dans le milieu R62% et dans le mélange eau-éthanol donnaient un résultat identique.

La figure 29 montre l'allure très proche des courbes obtenues: la valeur des volumes équivalents de nitrate d'argent est pratiquement la même (58 et 59  $\mu$ l). On constate également que les coefficients de diffusion de l'ion argent dans les deux milieux sont voisins puisque les courants de diffusion sont à peu près identiques à concentration égale en  $\text{Ag}^+$ . Cependant, il est délicat d'interpréter cette observation puisqu'en milieu transpirisé, le titrage donne lieu à un produit soluble, contrairement au cas du mélange eau-éthanol, et que les constantes de diffusion ne sont donc pas directement comparables.

#### 2.5. Allure de la courbe de titrage de la cystéine-Détermination de la constante de complexation cystéine-argent

La figure 30 montre les courbes de titrage obtenues dans le milieu transpirisé pour différentes concentrations en cystéine.

L'allure incurvée au niveau du point équivalent montre que le complexe cystéine-argent, tout en étant suffisamment stable pour permettre un titrage, libère des ions argent et cystéine au point équivalent en quantité mesurable. C'est en principe à partir de l'écart existant au point

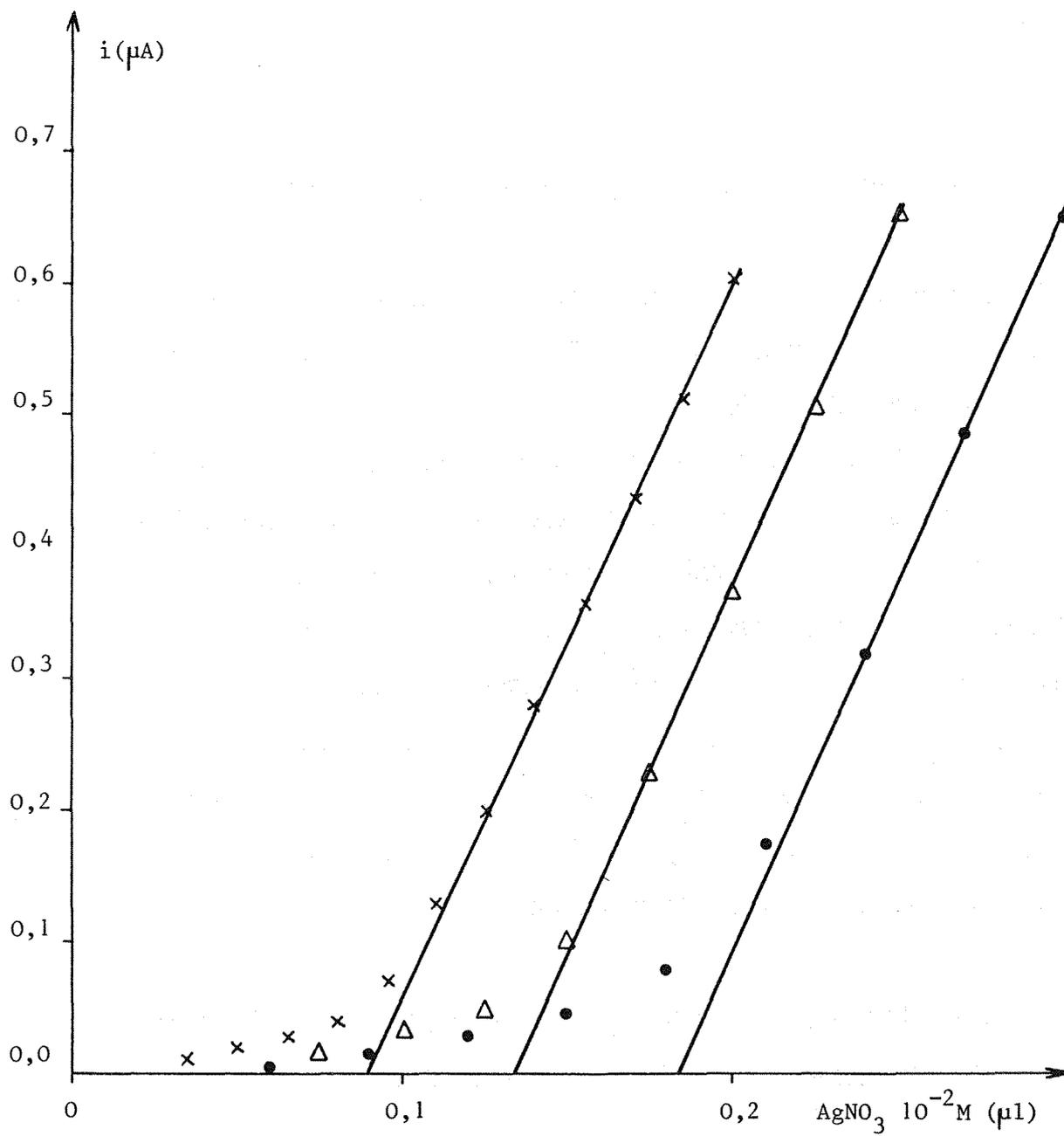


Figure 30: Courbes de titrage en milieu transpirisé de cystéine  
 ( $\times$  1,08 micromoles;  $\Delta$  1,86 micromoles;  $\bullet$  2,32 micromoles)  
 ( $37^\circ\text{C}$ ,  $E = -0,30\text{V/ECS}$ ; Electrode de Platine)

équivalent entre la courbe de titrage et l'intersection des deux segments de droite, que l'on peut évaluer la constante de dissociation du complexe (31); on trouve un valeur voisine de 6,2.

Pour déterminer cette constante avec plus de précision, il serait nécessaire d'opérer avec des solutions plus concentrées; pour augmenter la stabilité du complexe, il serait possible de diminuer la concentration en ammoniac du milieu.

Un dosage potentiométrique serait difficile. En effet, la constante de stabilité est peu élevée, alors que les concentrations des espèces en solution sont très faibles, ce qui rend donc préférable l'utilisation de méthodes dont la réponse est linéaire par rapport à la concentration de l'espèce à doser, comme l'ampérométrie ou la colorimétrie.

## 2.6. Droite d'étalonnage

Les dosages de cystéine à différentes concentrations dans le milieu transpirisé ont permis d'établir la droite d'étalonnage présentée figure 31. La valeur du coefficient de corrélation est de 0,998, ce qui montre que dans la zone de concentrations envisagée, la consommation d'ions argent est proportionnelle au nombre de moles de cystéine présentes dans le milieu.

Ceci donne pour la stoechiométrie du complexe argent-cystéine une valeur de 1-1,2. La différence à la stoechiométrie 1-1 tient sans doute au fait que les groupements sulfhydryle de la cystéine sont très réactifs et ont tendance à réagir entre eux pour créer des ponts disulfure par oxydation. De ce fait, le nombre de groupements réellement libres pour

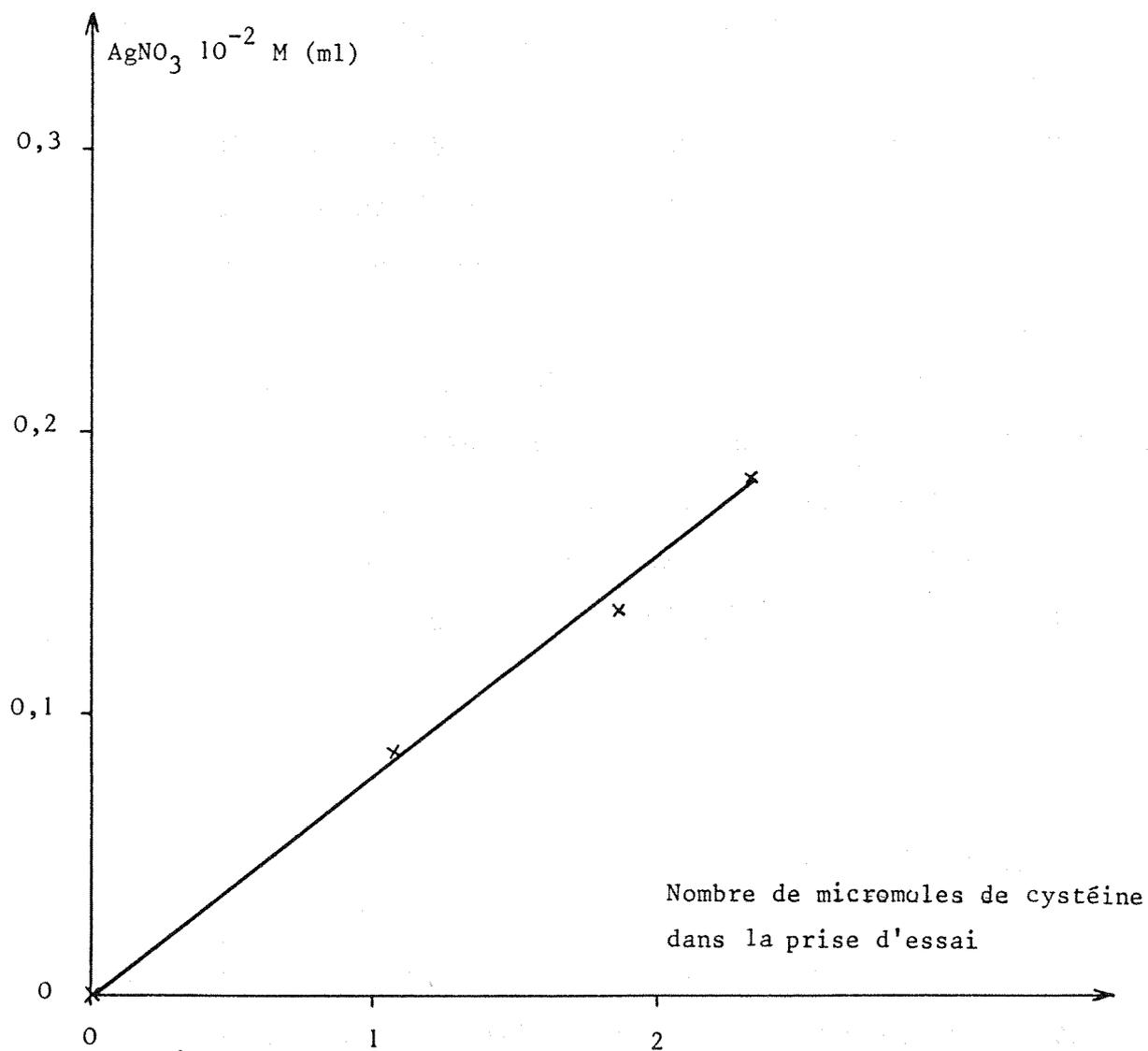


Figure 31: Droite d'étalonnage du dosage de la cystéine dans le milieu transpiré

réagir avec l'ion argent est plus faible que celui attendu en théorie. En effet, pour assurer une totale stabilité de la cystéine, autant sous forme de produit pur qu'en solution, il serait nécessaire d'effectuer toutes les opérations (conservation, pesée, dosage.. ) sous atmosphère d'argon. (77)

### 2.7. Dosage des groupements sulfhydryle du lait

La méthode décrite ci-dessus a été appliquée à la détermination des groupements sulfhydryle du lait. La figure 32 permet de comparer les courbes ampérométriques obtenues en titrant 5 ml de lait demi-écrémé dans le milieu eau-éthanol et en milieu transparisé.

Le point d'équivalence est le même, mais on constate que le coefficient de diffusion de l'ion argent est plus faible dans le lait transparisé que dans le mélange eau-éthanol. Cependant une fois encore, il est délicat de comparer un milieu homogène dont la teneur en tensioactif est importante, avec un milieu hétérogène comme le lait dans le mélange eau-éthanol.

Les dosages d'échantillons de lait demi-écrémé transparisé ont été effectués par étalonnage externe à l'aide de la droite d'étalonnage présentée figure 31.

La similitude des résultats obtenus pour le point équivalent dans les deux milieux permet de conclure que, par rapport au milieu eau-éthanol, le milieu transparisé ne démasque aucun groupement sulfhydryle supplémentaire, malgré l'action notoire du réactif R sur la structure des protéines.

Comme le milieu transparisé contenant l'étalon cystéine est différent du lait transparisé contenant des groupements sulfhydryle, du fait des

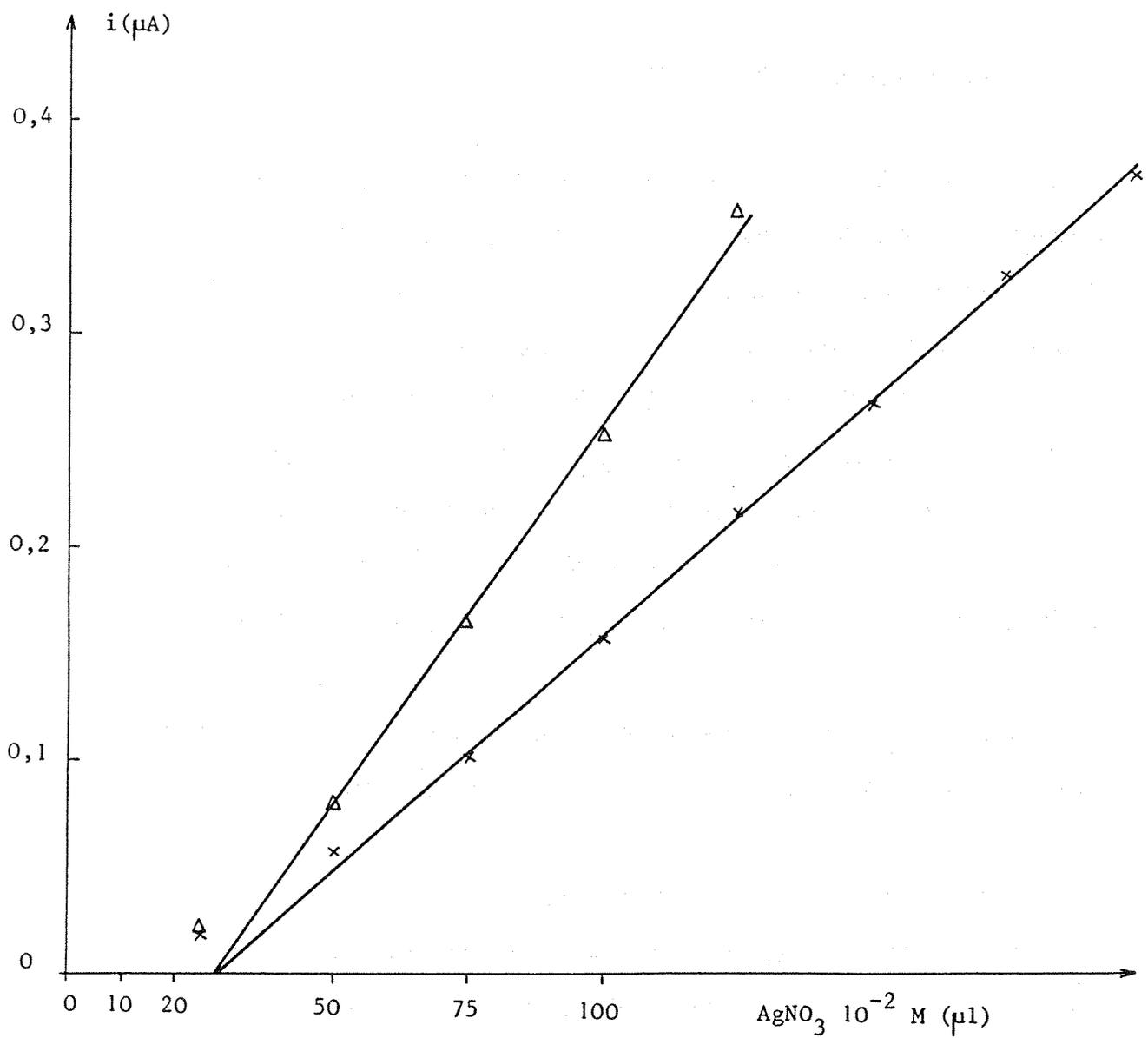


Figure 32: Dosage de lait demi-écrémé transparenté (xx) et de lait demi-écrémé en milieu eau-éthanol ( $\Delta\Delta$ )  
( $37^\circ\text{C}$ ; ampérométrie à une électrode de Platine)

autres éléments apportés en quantité importante par le lait, un dosage par ajouts dosés a été réalisé: dans un premier temps, le lait transparisé seul a été titré, puis, le même lait transparisé additionné d'une quantité connue de cystéine (figure 33).

Pour un même lait, en opérant par étalonnage externe, la concentration en groupements sulfhydryle est de  $5.10^{-5}$  M, alors que par la méthode des ajouts dosés, elle est de  $4,2.10^{-5}$  M (concentrations exprimées en moles de cystéine par litre de lait).

Pour déterminer le meilleur protocole pour une détermination quantitative, il serait nécessaire de vérifier la répétabilité à l'aide de tests statistiques. Il faudrait également optimiser la concentration en ammoniac: suffisamment élevée pour empêcher les interférences avec les ions chlorure du lait, et la plus basse possible afin que la stabilité du complexe soit maximale.

L'étude de la complexation des groupements sulfhydryle par les ions argent permet donc d'envisager le dosage des groupements sulfhydryle libres des protéines du lait après transparisation. Les résultats de ce dosage concordent avec ceux obtenus dans le milieu eau-éthanol. Linden et coll. ont montré que leur méthode de détermination des groupements sulfhydryle par colorimétrie avec le DTNB donne des résultats compatibles avec ceux de la méthode ampérométrique en milieu eau-éthanol. Or, ils réalisent la réaction colorée dans le lait, la transparisation n'intervenant que comme étape de révélation avant lecture de la densité optique. Ceci montre que la transparisation du lait dès le départ, comme nous l'avons réalisée, ne fait apparaître aucun groupement sulfhydryle nouveau, ni par rapport au milieu eau-éthanol, ni par rapport au lait seul.

La méthode de titrage ampérométrique dans le lait transparisé

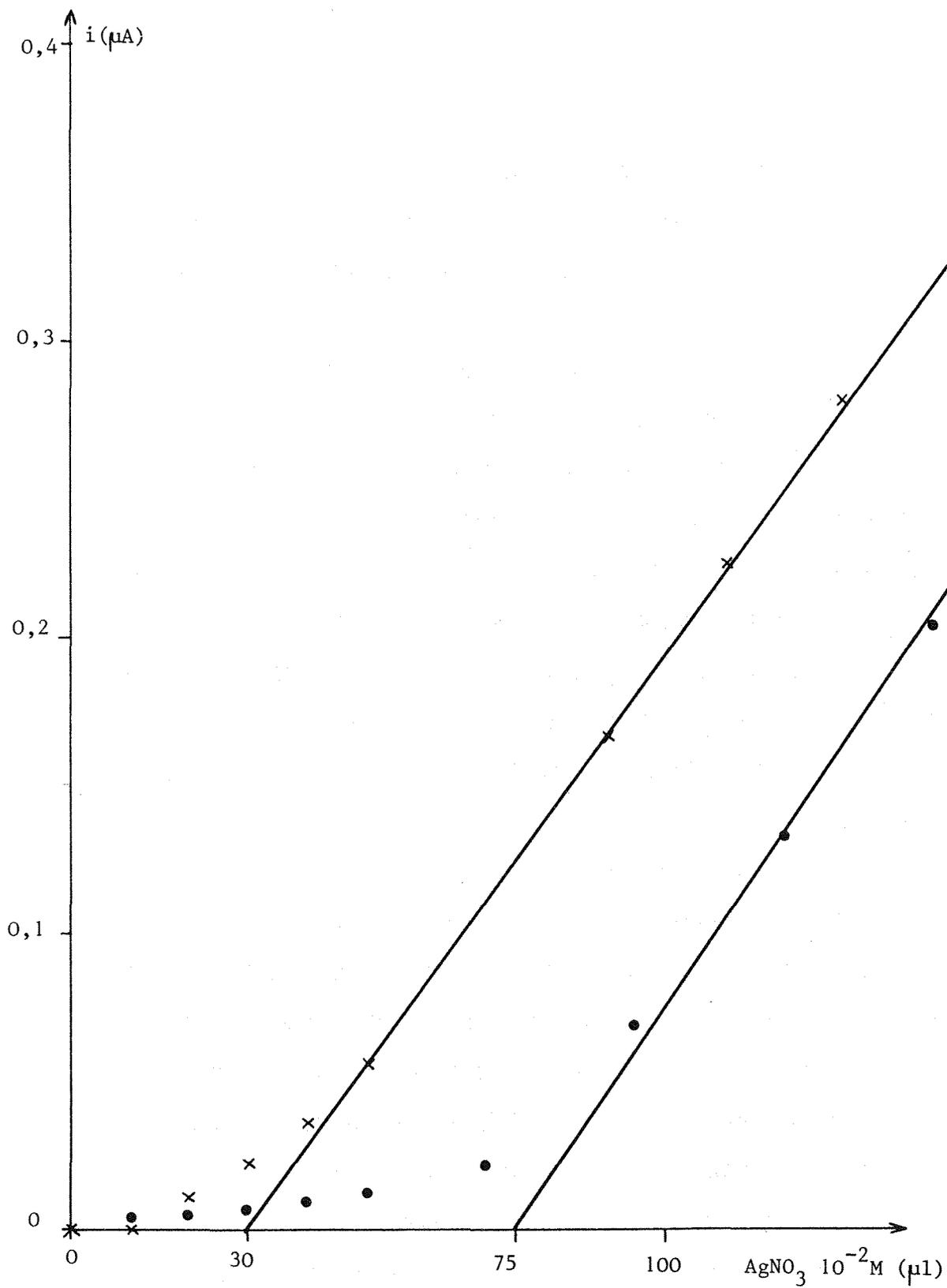


Figure 33: Courbes de titrage ampérométrique de lait transparent (x) et de lait transparent additionné d'une quantité connue de cystéine (•) (0,52 micromoles)

pourrait donc être envisagée comme nouveau moyen d'étude de l'effet du chauffage sur les laits.

Cette méthode utilise un milieu transparisé additionné d'ammoniac, et permet d'opérer en milieu homogène tout au long du dosage. Le pK de la constante de dissociation du complexe formé est suffisant, bien que peu élevé (6,2) du fait de l'action de l'ammoniac dans le sens de la dissociation du complexe.

### Conclusion

Comme pouvaient le laisser prévoir les résultats des études concernant les réactions acide-base et redox, l'étude des réactions de complexation nous montre que les constantes thermodynamiques déterminées dans les milieux transparisés diffèrent peu de celles qui sont connues dans l'eau, et sont pratiquement insensibles à des variations importantes de la teneur en solvant organique (0 à 60%).

Ceci permet de conclure que la solvation des espèces minérales envisagées ( $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SCN}^-$ ) dans les milieux transparisés varie peu par rapport à l'eau.

Sur un plan pratique, il n'est donc pas nécessaire de maintenir constante la composition hydroorganique des milieux pour y effectuer des réactions de complexation: l'introduction de réactifs en solution aqueuse est possible, et les réétalonnages ne sont pas nécessaires d'un milieu à l'autre.

Le dosage d'espèces minérales telles que l'ion chlorure, par argentimétrie, est possible dans le lait transparisé et permet d'éviter l'étape de défécation préalable du lait.

Dans le cas d'espèces organiques, notamment la cystéine, acide aminé

soufré, le complexe formé avec l'argent est soluble dans les milieux transparisés, contrairement à ce que l'on observe en milieu eau-éthanol.

Les conditions requises pour un dosage quantitatif des groupements sulfhydryle dans le lait transparisé semblent réunies. Il conviendrait cependant de faire une étude beaucoup plus approfondie avant d'utiliser cette méthode dans la pratique, notamment en ce qui concerne les points suivants:

. La concentration en ammoniac du milieu doit être optimisée, afin d'accroître au maximum la constante de stabilité du complexe formé.

. Il serait peut-être intéressant de remplacer le témoin actuellement utilisé, la cystéine, par une molécule sulfurée de plus grande stabilité (xanthate par exemple).

. Les critères de sensibilité et de reproductibilité de la méthode doivent être soigneusement étudiés.

La transparisation ne conduit pas à l'apparition de nouveaux sites sulfhydryle libres au niveau des protéines du lait, ce qui permet d'envisager la caractérisation de l'effet de température sur des laits après transparisation.

## CONCLUSION – DEVELOPPEMENTS

Les milieux transparisés sont des milieux dissociants, et malgré leur complexité, il est possible d'analyser les phénomènes comme en solution aqueuse, c'est-à-dire à partir des constantes thermodynamiques. Il faut cependant noter que le pouvoir solubilisant de ces milieux vis à vis de différentes espèces est plus important que celui de l'eau (par exemple l'iode, le tétraphényborate d'argent, les protéines...).

Les méthodes d'investigation employées dans l'eau sont transposables à ces milieux:

. Les mesures conductimétriques sont possibles et obéissent aux mêmes règles que dans l'eau.

. Les électrodes de verre, en particulier à remplissage de mercure, sont utilisables pour contrôler le pH.

. Les techniques électrochimiques d'analyse sont utilisables pour suivre les réactions chimiques.

Au niveau des *réactions acide-base*, on constate que les constantes varient peu avec la teneur en agent transparisant, tant que la teneur organique est inférieure à 60%.

Les indicateurs colorés ont des zones de virage assez voisines de celles qu'ils ont dans l'eau.

Ces résultats sur un plan analytique sont intéressants car ils impliquent qu'un étalonnage unique suffit pour contrôler les milieux transparisés de composition variée.

Les échelles de pH sont, comme dans l'eau, de l'ordre de 14 unités à 37°C.

Nous avons montré l'importance que pouvaient présenter les impuretés acides ou basiques du réactif: en effet, elles peuvent limiter les possibilités de titrage acide-base dans ces milieux et entraîner la nécessité de purifier le Triton X 100 entrant dans la composition du réactif R.

Bien qu'il soit nécessaire d'atteindre des pH basiques pour effectuer la transparisation, on peut ensuite abaisser le pH d'un lait transparisé à pH 8 (avec de l'acide perchlorique) et même pH 7,4 (avec une solution d'EDTA disodique): ceci est important, car permet de s'affranchir de la limitation imposée par le pH basique des laits transparisés.

La pH-métrie sur un lait transparisé est réalisable, et comme développement, on pourrait envisager la caractérisation d'un lait transparisé en fonction de sa courbe de titrage par un acide: cependant, à pH acide, on se trouve à nouveau en milieu hétérogène, et il serait préférable de pouvoir effectuer toute la titration en milieu homogène, peut-être en modifiant la formule de transparisation.

Comme dans le cas des réactions acide-base, l'établissement des échelles de *potentiel* dans les milieux transparisés montre peu de modifications des potentiels normaux des systèmes redox engageant des espèces simples.

Sur un lait transparisé, ce sont les propriétés redox du transparisant qui prédominent par rapport à celles du lait, avec intervention de trois de ses composants:

- les ions hydroxyde (mise en évidence par leur réaction sur les ions hexaferrocyanate III)

- la butanone ( mise en évidence par réaction sur l'iode)
- le Triton X 100 (mise en évidence par réaction sur les ions permanganate).

Ce sont ces composants qui sont les principaux agents de destabilisation des espèces colorées indicatrices de fin de réaction. Leur contrôle, en particulier au niveau du pH, permettrait de reculer les limitations imposées par le réactif R : ceci justifie l'intérêt de la transparisation préalable.

La mise en évidence du caractère réducteur du lait lui-même, imposerait le remplacement des deux agents butanone et Triton X 100.

Dans la mesure où les échelles de pH et de potentiel sont voisines de celles déterminées dans l'eau, les diagrammes potentiel-pH doivent rester en première approximation les mêmes. Les seules différences pourraient provenir de la solubilité accrue de certaines espèces par rapport à l'eau; cela mis à part, on peut dire que, dans les milieux transparisés, seul le pH du milieu apportera une limite à l'utilisation des indicateurs connus dans l'eau.

Au niveau *complexation*, on note une identité de comportement dans le cas des espèces minérales; par contre, il apparaît des différences de solubilité pour certains complexes organiques ( par exemple le complexe cystéine-argent).

Pour ce qui concerne les espèces minérales, ceci signifie que la solvatation des ions varie peu avec la teneur en solvant organique.

Bien que notre but n'ait pas été de définir des protocoles de dosage, les points suivants peuvent être soulignés:

Il est possible de doser in situ les ions chlorure par argentimétrie, ce qui évite l'étape de défécation et constitue un gain de

temps. Pour ce dosage, on pourrait envisager une détection colorimétrique.

L'ion thiocyanate est électrooxydable et donne des complexes avec l'argent, mais sa détermination dans le lait transparisé risque d'être compliquée par la présence d'ions hydroxyde ou chlorure à très forte concentration: ceci implique la recherche de conditions de sélectivité, qui peuvent s'appuyer sur la connaissance des constantes thermodynamiques établies dans l'eau, ou par la mise au point d'un autre réactif de transparisation permettant de mettre en jeu d'autres équilibres.

Le principe du dosage in situ des groupements sulfhydryle, de grande importance pour le lait, a été vérifié. Sans faire d'études systématiques, on a recherché les conditions optimales pour le dosage de ces groupements dans le lait transparisé, afin d'opérer en milieu homogène pendant toute la durée du titrage; cela a été réalisé en modifiant la composition des tampons habituellement utilisés pour éviter l'interférence des ions chlorure.

Le dosage argentimétrique des groupements sulfhydryle suivi par ampérométrie a conduit à des résultats identiques à ceux obtenus par les méthodes proposées en milieu eau-éthanol. De plus, la bonne corrélation, notée par Linden et coll., qui existe entre les dosages ampérométriques en milieu eau-éthanol et leur méthode de dosage spectrométrique montre que la transparisation ne révèle aucun groupement -SH libre nouveau. Ce résultat important confirme l'intérêt de réaliser, dans certains cas, la transparisation avant la réaction de dosage.

L'étude théorique du milieu et les premiers essais de réaction de dosage in situ, nous conduisent à penser que l'utilisation du réactif tel quel ou modifié, peut être considérablement élargie si l'opération de transparisation s'effectue en amont de la réaction chimique.

Dans le cas de dosages enzymatiques, deux cas sont à distinguer:

. Le premier est celui où le produit de la réaction enzymatique est coloré: dans ce cas, la transparisation ne peut intervenir qu'après, afin de ne pas inactiver l'enzyme: l'optimisation du réactif de transparisation consisterait à pouvoir transpariser directement à des pH inférieurs à 11 pour assurer la stabilité des composés formés.

. Dans le second cas où le produit de la réaction enzymatique est incolore, il faut le révéler en le faisant participer à une réaction colorée: cette réaction devrait pouvoir être réalisée après transparisation, ce qui permettrait d'optimiser le pH de déroulement de la réaction.

L'étude analytique des milieux transparisés a permis de définir leurs propriétés acido-basiques et redox, ce qui devrait permettre une optimisation de l'utilisation du réactif R, en envisageant en particulier la transparisation préalable.

Sur un plan plus fondamental, l'aptitude du réactif à solubiliser les combinaisons protéino-lipidiques pourrait en faire un milieu réactionnel privilégié pour l'analyse des réactions engageant ces espèces, et en particulier des mécanismes de solubilisation des macromolécules biologiques.

A la lumière de ces connaissances, il serait sans doute possible de préciser les conditions de l'extension de l'utilisation du réactif R par exemple aux domaines de l'analyse biomédicale ou cosmétologique.

**ANNEXES**

## ANNEXE I: TRANSPARISATION DU LAIT

.Après dilution éventuelle à l'aide d'eau distillée, le lait est additionné du réactif R. Le mélange est agité, puis incubé pendant 2 à 3 minutes à 37°C dans une cellule thermostatée Metrohm reliée à un thermostat à circulation Haake FE-2.

.Les laits utilisés sont des laits demi-écrémés ou entiers UHT du commerce.

.Le tableau 1 résume les formules de transparisation adoptées pour les laits demi-écrémés et entiers.

	R	eau distillée	lait
demi-écrémé	2	1	1
entier	4	0	1

Tableau 1 : Volumes de R, d'eau et de lait nécessaires à la transparisation.

## ANNEXE II: TRACE DES SPECTRES UV-VISIBLES

*Appareillage:* spectromètre d'absorption UV-Visible: DU-7 Spectrophotometer Beckman.

Les *spectres* ont été tracés en plaçant les solutions dans des cuves de quartz de 1 cm de trajet optique, la référence étant l'air, et pour des longueurs d'onde allant de 190 à 800 nm. Le réactif R a été dilué au demi avec de l'eau distillée, la butanone et le Triton X100 ont été étudiés purs.

### *Réactifs*

- Butanone: Fluka, puriss.
- Triton X100: Merck, pour analyse

## ANNEXE III: MESURE DE LA CONSTANTE DIELECTRIQUE

Les mesures d'impédance ont été réalisées à l'aide d'un impédancemètre Hewlett Packard 4193A, à des fréquences de 1 et 20Mz, et à une température de 20°C. Les résultats ainsi obtenus ont été retraités par calcul informatique afin d'accéder aux valeurs de la constante diélectrique  $\epsilon'$ .

## ANNEXE IV: MESURE DE LA CONDUCTANCE

Elle a été réalisée à l'aide d'un conductimètre type CD6N (Tacussel) relié à une cellule conductimétrique CM 02155 N° 157959,  $K = 0,93$  (Tacussel).

La température est maintenue à 37°C dans une cellule thermostatée Metrohm reliée à un thermostat à circulation Haake FE-2.

Les solutions de NaCl, NaOH, et HCl de concentration 1,0 M sont introduites à l'aide d'une micropipette munie de capillaires de verre (Micropettor de volume variable - 5 à 30  $\mu\text{l}$  - Polylabo) ou de pipettes graduées de précision pour les plus grands volumes.

### *Réactifs*

- Soude: Fluka, Puriss.
- Acide chlorhydrique, chlorure de sodium: Prolabo, Normapur

## ANNEXE V: REALISATION DE COURBES DE TITRAGE POTENTIOMETRIQUES A L'ELECTRODE DE pH

### V.1. Electrodes

#### **. Electrodes de pH:**

- électrode de verre à remplissage aqueux (Ingold haute alcalinité) dans le milieu R62%.
- électrode de verre à remplissage de mercure (Tacussel HG B 10/HS) dans les milieux R44% et R40%.

#### **.Electrode de référence:**

- électrode au calomel saturée en chlorure de potassium (Métrohm), placée dans un pont salin de nitrate de potassium en solution aqueuse 0,1M.

### V.2. Mode opératoire

- Tous les titrages acide-base ont été réalisés à 37°C (thermostat à circulation Haake FE-2).
- Les réactifs titrants ont été introduits à l'aide d'une micropipette munie de capillaires de verre (Micropettor de volume variable - 5 à 30  $\mu$ l-Polylabo) afin de modifier au minimum la composition hydroorganique des milieux.

### V.3. Réactifs

- Soude, éthanolamine: Fluka, puriss.
- Acides perchlorique, acétique, monochloracétique, citrique, nitrate de potassium, EDTA disodique: Prolabo, Normapur
- Indicateurs colorés: R.A.L. Kuhlmann, préparés en solutions aqueuses ou éthanoliques à 0,1g/100 ml, selon leur solubilité, et introduits à raison de 5 gouttes pour 20 ml de solution.

## ANNEXE VI: TRACE DES COURBES VOLTAMPEROMETRIQUES

Elles ont été tracées en utilisant un montage à trois électrodes:

- \_ électrode de travail
- électrode de référence
- électrode auxiliaire

### VI.1: Courbes tracées à une électrode solide

#### VI.1.1. Electrodes

**L'électrode de travail** est une électrode tournante à disque ( EDI Tacussel) munie d'un embout de platine ou d'argent. Les voltampérogrammes sont tracés pour des vitesses de rotation de l'électrode de 600 tours par minute.

- L'embout de platine est constitué par un fil de platine serti dans du téflon ( Embout Tacussel, diamètre du fil: 2 mm)

- L'embout d'argent a été réalisé sur le modèle de l'électrode de platine, avec un fil d'argent de diamètre de 1 mm.

- Le moteur de l'électrode tournante est de type Controvit (Tacussel).

**L'électrode de référence** est une électrode au calomel saturée en chlorure de potassium (Métrohm), placée dans un pont salin de nitrate de potassium en solution aqueuse 0,1 M.

**L'électrode auxiliaire** est une électrode de platine (Métrohm).

### VI.1.2. Appareillage

- Thermostat Haake FE-2.
- Tiroir Tipol Tacussel-Enregistreur EPL2 Tacussel.

### VI.1.3. Mode opératoire

. Les solutions sont thermostatées à 37°C.

. Elles sont additionnées de perchlorate de sodium en concentration finale de 0,5 M utilisé comme électrolyte support.

. Le balayage en potentiel est de 150 mV/min.

## VI.2. Courbes tracées à l'électrode à goutte de mercure

### VI.2.1. Electrodes

L'électrode de travail est une électrode à goutte de mercure tombante. Le temps de goutte est de 1 seconde. Les deux autres électrodes sont les mêmes qu'en VI.1.1.

### VI.2.2. Appareillage

- Potentiostat PRT 30 01
- Tiroir TV 11GD Tacussel-Enregistreur EPL2 Tacussel.

### VI. 2.3. Conditions opératoires

- Défilement des potentiels:  $2\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$
- Solutions thermostatées à  $37^\circ\text{C}$
- Electrolyte support:  $\text{NaClO}_4$  0,5M

### VI.3. Réactifs

- Ferrocène, thiocyanate de potassium: Fluka, puriss.
- Hexacyanoferrate II et III de potassium, chlorure de potassium, sulfate de cuivre, iode sublimé, iodure de potassium: Prolabo, R.P.
- Nitrate d'argent, permanganate de potassium: Merck, pour analyse

## ANNEXE VII: TRACE DES COURBES DE TITRAGE A L'ELECTRODE D'ARGENT

### VII.1. Electrodes

. **Electrode de travail:** électrode tournante à disque ( EDI Tacussel) munie d'un embout d'argent de diamètre de 1 mm.

. **Electrode de référence:** électrode au calomel saturée au chlorure de potassium (Métrohm), placée dans un pont salin de nitrate de potassium en solution aqueuse 0,1M.

### VII.2. Appareillage

Millivoltmètre Aries 10000 Tacussel

### VII.3. Mode opératoire

Dans une cellule Metrohm thermostatée à 37°C, une solution de nitrate d'argent de titre 0,099N est additionnée en microquantités (Micropettor 5-30  $\mu$ l) à 20 ou 25 ml de la solution du composé à titrer.

### VII.4. Réactifs

- Chlorure de potassium: R.P. Prolabo
- Thiocyanate de potassium: Puriss. Fluka
- Nitrate d'argent: pour analyse Merck
- Lait demi écrémé UHT du commerce

## **ANNEXE VIII: PRECONDITIONNEMENT DE L'ELECTRODE D'ARGENT EN VUE DU TITRAGE DES IONS THIOCYANATE**

Le précipité de thiocyanate d'argent a été déposé à la surface de l'électrode par coulométrie, en imposant à l'aide d'un ampérostatis type Chronoampérostatis Tacussel, pendant 100 secondes, un courant de 10 mA, au sein d'une solution de thiocyanate de potassium  $10^{-1}$  M.

## ANNEXE IX: DETERMINATION AMPEROMETRIQUE DES GROUPEMENTS SULFHYDRYLE

### IX.1. Electrodes

. **L'électrode de travail** (EDI Tacussel) munie d'un embout de platine de 2 mm de diamètre est portée à un potentiel de - 0,30V/ECS; sa vitesse de rotation est de 600 tours par minute.

. Le moteur de l'électrode tournante est de type Controvit (Tacussel).

. **L'électrode de référence** est une électrode au calomel saturée en chlorure de potassium (Métrohm), placée dans un pont salin de nitrate de potassium en solution aqueuse 0,1M.

. **L'électrode auxiliaire** est une électrode de platine (Métrohm).

### IX.2. Appareillage

Tiroir Tipol Tacussel-Enregistreur EPL2 Tacussel.

### IX.3. Mode opératoire

- Sensibilité: 0,5  $\mu$ A

- Température: 37°C

- 20 ml de solution contenant la cystéine témoin ou le lait à doser sont additionnés de microquantités d'une solution aqueuse de nitrate d'argent de titre  $10^{-2}$  M.

- La solution est dégazée pendant 10 minutes avant le titrage par barbotage d'argon, puis maintenue sous atmosphère d'argon pendant le titrage.

#### IX.4. Réactifs

- L-Cystéine base: Fluka, Microselect
- Nitrate d'argent: Merck, pour analyse
- Ammoniaque 33%: Prolabo, Rectapur

Les solutions titrées de cystéine et de nitrate d'argent sont préparées chaque jour.

ANNEXE X: COURBE VOLTAMPEROMETRIQUE D'UN LAIT  
TRANSPARISE

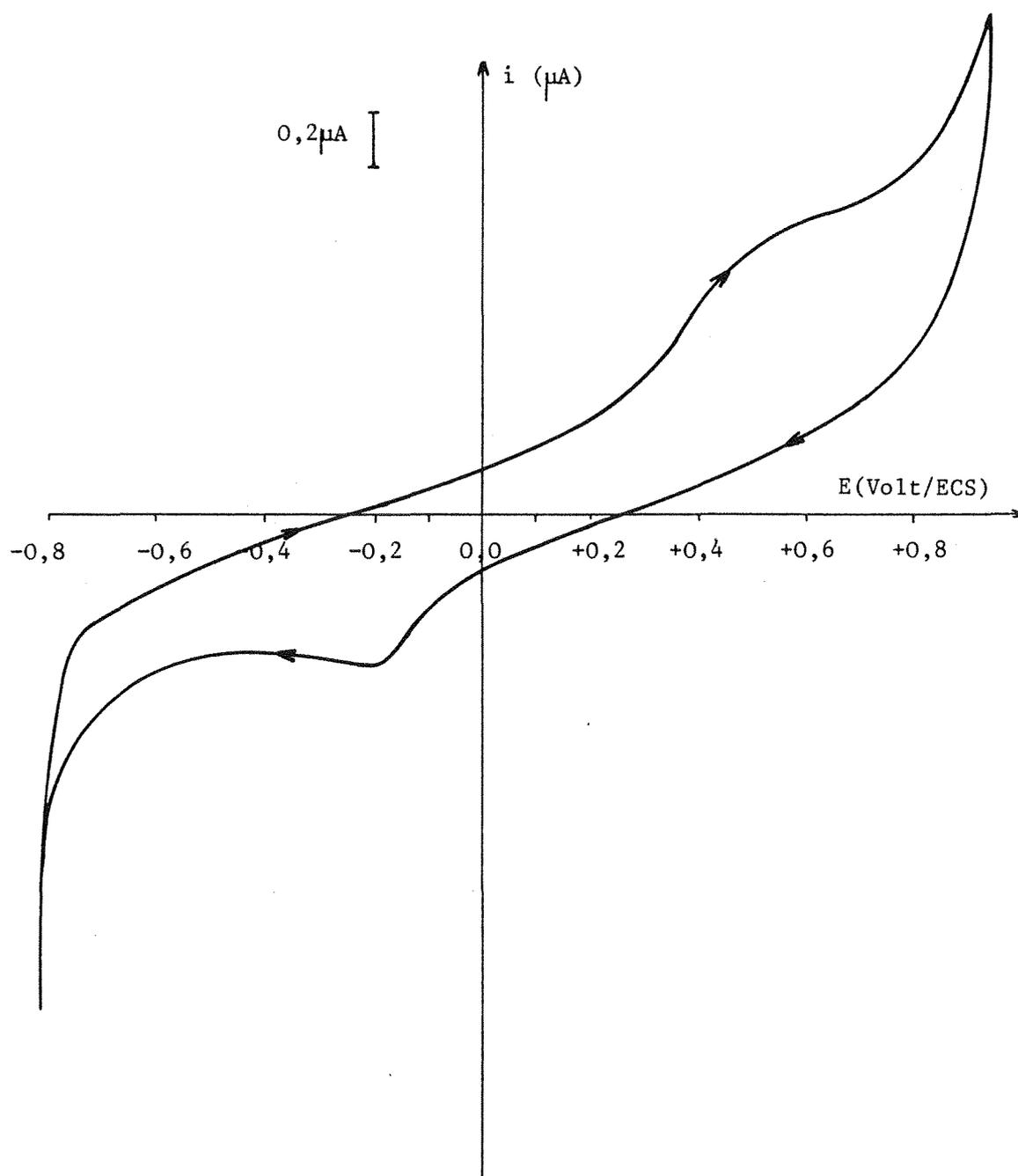


Figure 34: Courbe voltampérométrique d'un lait demi-écrémé transparent  
à une électrode de Platine ( $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{NaClO}_4$  0,5 M)

## **BIBLIOGRAPHIE**

- (1) S. Nakai, Anh Chi Le, *J. Dairy Sci.*, 1970, 53, 276-278  
Spectrophotometric determination of protein and fat in milk simultaneously.
- (2) J.O. Bosset, B. Blanc, *Anal. Chim. Acta*, 1974 a, 70, 327-339  
Nouvelle méthode de dosage photométrique automatique des protéines dans le lait entier. Partie I: Bases théoriques et optimisation des principaux paramètres de la réaction.
- (3) J.O. Bosset, B. Blanc, *Anal. Chim. Acta*, 1974 b, 71, 97-105  
Nouvelle méthode de dosage photométrique automatique des protéines dans le lait entier. Partie II: Linéarité, sélectivité, spécificité.
- (4) J.O. Bosset, B. Blanc, *Anal. Chim. Acta*, 1975, 75, 343-354  
Nouvelle méthode de dosage photométrique automatique des protéines dans le lait entier. Partie III: Application à l'analyse en flux continu.
- (5) J.O. Bosset, B. Blanc, E. Plattner, *Trav. Chim. Aliment. Hyg.*, 1977 a, 68, 225-239  
La dissolution intégrale du lait entier au moyen de solvants mixtes. I. Etude du mélange dissolvant: eau-hydroxyde de sodium - n-butylamine.
- (6) J.O. Bosset, B. Blanc, E. Plattner, *Trav. Chim. Aliment. Hyg.*, 1977 b, 68, 504-512  
La dissolution intégrale du lait entier au moyen de solvants mixtes. I. Etude du mélange dissolvant: eau-hydroxyde de sodium-tétrahydrofurane.
- (7) G. Linden, D. Paquet, *J. Dairy Sci.*, 1981, 64, 568-571  
Alkaline phosphatase activity in transparent milk and cream.
- (8) G. Linden, G. Humbert, R. Desnouveaux, J. Picard, *Lait*, 1982, 62, 209-219  
Application de la dissolution complète du lait à la détermination de quelques activités enzymatiques.

- (9) G. Humbert, R. Desnouveaux, G. Linden, *Lait*, 1982, 62, 427-434  
Application de la dissolution totale des éléments colloïdaux du lait à la détermination de son activité protéinasique.
- (10) R. Kouomegne, P. Bracquart, G. Linden, *Lait*, 1984, 64, 418-435  
Application d'un réactif de transparisation du lait au dénombrement de bactéries.
- (11) A. J. Owen, A. T. Andrews, *J. Dairy Res.*, 1984, 51, 307-315  
A procedure for the complete clarification of milk of various species and its suitability for use with colorimetric measurements.
- (12) R. Kouomegne, *thèse de Doctorat d'Université*, Nancy I, 1986  
La dissolution complète de constituants colloïdaux du lait: Mise au point d'un nouveau réactif et applications aux analyses de routine des produits laitiers.
- (13) M. F. Guingamp, G. Humbert, A. Choukri, G. Linden, *Technique laitière*, 1989, 1036, 35-38  
La transparisation du lait et des produits laitiers.
- (14) Brevet: Réactif pour la transparisation de milieux biologiques et ses applications analytiques, F-8607236- EP-874011497 CA-537693- NZ-220398- USA-052390.
- (15) A. Helenius, K. Simons, *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, 415, 29-79  
Solubilisation of membranes by detergents.
- (16) C. Tanford, Y. Nozaki, A. J. Reynolds, S. Makino, *Biochem.*, 1974, 13, 2369-2376  
Molecular characterization of proteins in detergent solutions.
- (17) M. A. Mc Kenzie, G. M. Carman, *J. Food Biochem.*, 1982, 6, 77-86  
Solubilisation of membrane associated Phosphatidylinositol kinase from *Saccharomyces cerevisiae*.
- (18) G. Humbert, M. F. Guingamp, R. Kouomegne, G. Linden, *soumis pour publication*, 1988  
Proteolysis measurement in milk and cheese using TNBS acid and a new dissolving mixture.

- (19) M. F. Guingamp, G. Humbert, R. Kouomegne, G. Linden, *manuscrit en préparation*, 1989  
Determination of sulphhydryls groups in milk using Elman 's reagent and a new dissolving mixture.
- (20) O. Popovych, R. P. T. Tomkins, *Non-aqueous solution chemistry*, John Wiley and Sons, New-York 1981, pages 32-38.
- (21) G. Charlot, B. Tremillon, *Les réactions chimiques dans les solvants et les sels fondus*, Gauthier-Villars Editeurs, Paris 1963, pages 3-9.
- (22) G. Charlot, *Chimie Analytique générale- Solutions aqueuses et non aqueuses*, Tome 1, Masson Editeurs, Paris 1967, page 208.
- (23) K. Chlihi, *thèse d'Etat*, Nancy I 1986  
Etude diélectrique des interfaces solide-solution. Application à la flottation des minéraux sulfurés.
- (24) G. Charlot, *Méthodes électrochimiques et absorptiométriques-Chromatographie*, Masson Editeurs, Paris 1971, pages 122-167.
- (25) G. Charlot, J. Badoz-Lambling, B. Tremillon, *Les réactions électrochimiques*, Masson Editeur, Paris 1959, page 345.
- (26) G. Charlot, *Méthodes électrochimiques et absorptiométriques-Chromatographie*, Masson Editeurs, Paris 1971, pages 51-66.
- (27) G. Charlot, *Méthodes électrochimiques et absorptiométriques-Chromatographie*, Masson Editeurs, Paris 1971, pages 67-94.
- (28) G. Charlot, *Chimie Analytique générale- Solutions aqueuses et non aqueuses*, Tome 1, Masson Editeurs, Paris 1967, pages 217-218.
- (29) F. Coussebant, M. Hellin, B. Torck, *Les fonctions d'acidité et leurs utilisations en catalyse acido-basique*, Gordon et Breach, Paris Londres New-York 1963.

- (30) L. P. Hammett, *Chem. Revs*, 1935,16, 67-69  
Reaction rates and indicator acidities.
- (31) G. Charlot, R. Gauguin, *Les méthodes d'analyse des réactions en solution*, Masson Editeurs, Paris 1951, pages 130-134.
- (32) G. Charlot, B. Tremillon, *Les réactions chimiques dans les solvants et les sels fondus*, Gauthier-Villars Editeurs, Paris 1963, pages 82-91.
- (33) G. Charlot, *Chimie Analytique quantitative*, Tome 1, Masson Editeurs, Paris 1974, page 165.
- (34) D. Monget, *Thèse de Docteur Ingénieur*, Lyon I, 1978  
Mise au point d'une microméthode de détection et de mesure d'activités enzymatiques (Api-Zym)- Résultats obtenus dans différents domaines d'application.
- (35) S. Siggia, *Instrumental methods of organic functional group analysis*, Wiley-Interscience Editeur, New-York 1972,  
pages 306-309
- (36) J. A. Gautier, J. Renault, F. Pellerin, *Fiches techniques d'analyse bromatologique*, SEDES, Paris 5ème 1961.
- (37) R. Rosset, B. Tremillon, *Bull. Soc. Chim. France*, 1959, 135-139  
Réduction électrochimique de l'eau, des ions hydrogène, des acides faibles et des mélanges tampons dans les mélanges eau-acétone.
- (38) R. Pointeau, J. Bonastre, *Eléments de polarographie- Théorie, technique instrumentale- Applications analytiques*.  
Masson Editeurs, Paris 1969, pages 110-123.
- (39) G. Charlot, *Les réactions chimiques en solution aqueuse et caractérisation des ions*. 7ème édition, Masson Editeurs, Paris 1983.
- (40) Y. Marcus, *Ion solvation*, John Wiley and Sons Limited, Chichester New-York Brisbane Toronto Singapore, pages 161-162.

- (41) R. Pointeau, J. Bonastre, *Éléments de polarographie- Théorie, technique instrumentale- Applications analytiques*. Masson Editeurs, Paris 1969, pages 45-50.
- (42) M. Pourbaix, *Atlas d'équilibres électrochimiques à 25°C*, Gauthier-Villars Editeurs, Paris 1963, page 621.
- (43) J. Cardwell, *J. Chem. Soc.*, 1951, 2430-2442  
Elimination reactions- Part 1: Acid-catalysed enolisation and substitution reactions of ketones.
- (44) R. P. Bell, Y. Kates, *J. Chem. Soc.*, 1962, 1927-33  
Kinetics of the chlorination of acetone in aqueous solution.
- (45) M. Pourbaix, *Atlas d'équilibres électrochimiques à 25°C*, Gauthier-Villars Editeurs, Paris 1963, page 290.
- (46) P. Pascal, *Nouveau traité de Chimie Minérale*, Tome XVI, Masson Editeur, Paris 1960, page 1049.
- (47) T. M. Aune, E. L. Thomas, *Biochem.*, 1978, 17, 6, 1005-1010  
Oxidation of protein sulfhydryls by products of peroxidase catalyzed oxidation of thiocyanate ion.
- (48) E. L. Thomas, " Peroxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate".  
In: *Medizinische und biologische Bedeutung der Thiocyanate*, sous la direction de W. Weuffen, VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 1982, pages 89-102.
- (49) R. Gauguin, *Anal. Chim. Acta*, 1951, 5, 200-214  
Oxydation électrochimique de l'ion thiocyanate- Application aux dosages et à l'étude des réactions.
- (50) M. M. Nicholson, *Anal. Chem.*, 1959, 31, 1, 128-132  
Voltametry of the thiocyanate ion at the stationary platinum electrode.
- (51) D. A. Holtzen, A. S. Allen, *Anal. Chim. Acta*, 1974, 69, 153-160  
Kinetics parameters for the oxidation of thiocyanate at the glassy carbon electrode.

- (52) R. Pointeau, J. Bonastre, *Éléments de polarographie- Théorie, technique instrumentale- Applications analytiques*. Masson Editeurs, Paris 1969, pages 59-67.
- (53) R. G. Bowler, *Biochem. J.*, 1944, 38, 385-388  
Determination of thiocyanate in blood serum.
- (54) N. Ishibashi, K. Kina, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1973, 46, 2454-2456  
The liquid membranes of the thiocyanate ion-sensitive electrode.
- (55) C. Alais, *Sciences du lait- principes des techniques laitières*, Sepaic Edition, Paris 1984.
- (56) A. J. Bard, *Electroanalytical chemistry*, Volume 8, Marcel Dekker, Inc, New-York 1975, page 330.
- (57) J. C. Bardin, *thèse de 3ème cycle*, Paris 1968,  
Etude de quelques complexes de l'argent dans le nitrométhane.
- (58) R. Jenness, J. Koops, *Netherland Milk and Dairy J.*, 1962, 16, 153-164  
Preparation and properties of a salt solution which simulates milk ultrafiltrate.
- (59) J. T. Hutton, S. Patton, *J. Dairy Sci.*, 1952, 35, 399-705  
The origin of sulfhydryl groups in milk proteins and their contributions to "cooked" flavor.
- (60) G. Zweig, R. J. Block, *J. Dairy Sci.*, 1953, 36, 427-436  
The effect of heat treatment on the sulfhydryl groups in skim milk and non fat dry milk.
- (61) S. Patton, D. V. Josephson, *J. Dairy Sci.*, 1949, 32, 398-405.  
Observations on the application of the nitroprusside test to heated milk.
- (62) B. L. Larson, R. Jenness, *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, 74, 3090-3093  
Characterization of the sulfhydryl groups and the kinetics of the heat denaturation of crystalline  $\beta$ -lactoglobulin.

- (63) K. Fridovich, P. Handler, *Anal. Chem.*, 1957, 29, 1219-23.  
Colorimetric assay for reaction of -SH groups with organic mercurials.
- (64) J. L. B. Lyster, *J. Dairy Res.*, 1964, 31, 41-51  
The free and masked sulfhydryl groups of heat milk and milk powder and a new method for their determination.
- (65) H. A. Harland, U. S. Ashworth, *J. Dairy Sci.*, 1945, 28, 15-23  
The use of thiamin disulfide for the estimation of reducing substances in processed milk.
- (66) T. R. Pofahl, D. G. Vakaleris, *J. Dairy Sci.*, 1968, 51, 1345-1348  
Effect on heat on sulfhydryl and disulfide groups of milk proteins as measured by the spectrofluorimetric method.
- (67) D. H. Senter, W. K. Stone, W. C. Thomas, *J. Dairy Sci.*, 1973, 56, 1331-1336  
Fluorimetric determination of sulfhydryl and disulfide groups in whey from milk processed by turbulent flow ultra-high temperature processes.
- (68) G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* 1958, 74, 443-450  
A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans.
- (69) G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* 1959, 82, 70-77  
Tissue sulfhydryl groups.
- (70) M. Koka, E. M. Mikolajcik, I. A. Gould, *J. Dairy Sci.*, 1968, 51, 217-219  
Spectrophotometric method for determination of heat activated sulfhydryl groups of skim milk.
- (71) M. J. Taylor, T. Richardson, *J. Dairy Sci.*, 1980, 63, 1783-1795  
Antioxidant activity of skim milk: effect of heat and resultant sulfhydryl groups.
- (72) O. Kirchmeier, M. El Shobery, N. M. Kamal, *Milchwissenschaft*, 1984, 39, 715-717  
Heat treatment of milk and development of -SH groups.

- (73) P. W. Riddles, R. L. Blakeley, B. Zerner, *Anal. Biochem*, 1979, 94, 75-81  
Ellman 's reagent: 5-5' dithiobis(2-nitrobenzoic acid): a reexamination.
- (74) U. Yoshino, H. K. Wilson, E. O. Herreid, *J. Dairy Sci*, 1962, 45, 1459-1464  
Amperometric titration of sulfhydryl and disulfide groups in milk proteins.
- (75) R. E. Benesh, R. Benesh, *Arch. Biochem*, 1948, 19, 35-45  
Amperometric titration of sulfhydryl groups in amino-acids and proteins.
- (76) I. M. Kolthoff, W. E. Harris, *Industrial and Engineering Chem*, 1946, 18, 3, 161-162  
Amperometric titration of mercaptans with silver nitrate using the rotating platinum electrode.
- (77) Indications du fabricant (Fluka)

NOM DE L'ETUDIANT : BENOIT Emmanuelle

NATURE DE LA THESE : Doctorat de l'Université de NANCY I en Chimie analytique



VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

NANCY, le - 5 JUL. 1989 n° 1168

LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I



## RESUME

La turbidité du lait rendant impossible les dosages spectrophotométriques, certains auteurs ont mis au point des réactifs de transparation du lait et des produits laitiers. Ce travail concerne l'étude analytique (diélectrique, pHmétrique, redox et complexométrique) d'un de ces réactifs, constitué essentiellement de butanone, de Triton X100 et d'eau. La transparation rend impossible la formation de certains composés colorés réalisable dans le lait. C'est pourquoi nous précisons les propriétés analytiques des milieux transparés afin d'être à même d'adapter les réactions chimiques classiques à ces milieux nouveaux, ou de modifier la composition du réactif de transparation pour en élargir les applications.

**MOTS- CLES :** étude de milieu- réactif de transparation - lait -analyse alimentaire