

TC 34

NORME INTERNATIONALE ISO 4099

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION • МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ • ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION

● Fromages — Détermination des teneurs en nitrates et en nitrites — Méthode par réduction au cadmium et photométrie

Cheese — Determination of nitrate and nitrite contents — Method by cadmium reduction and photometry

Première édition — 1978-11-15

Aligner sur
ISO 6736
ISO 6739
ISO 6740

CDU 637.3 : 543.846 : 546.173/.175

Réf. n° : ISO 4099-1978 (F)

Descripteurs : produit laitier, fromage, analyse chimique, dosage, nitrate, nitrite.

Prix basé sur 6 pages

ISO 4099-1978 (F)

AVANT-PROPOS

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique correspondant. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO, participent également aux travaux.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour approbation, avant leur acceptation comme Normes internationales par le Conseil de l'ISO.

La Norme internationale ISO 4099 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, et a été soumise aux comités membres en mars 1977.

Les comités membres des pays suivants l'ont approuvée :

Afrique du Sud, Rép. d'	Éthiopie	Pays-Bas
Allemagne, R. F.	France	Pologne
Australie	Ghana	Portugal
Autriche	Hongrie	Roumanie
Belgique	Inde	Royaume-Uni
Bulgarie	Iran	Suisse
Canada	Irlande	Tchécoslovaquie
Corée, Rép. de	Israël	Thaïlande
Égypte, Rép. arabe d'	Mexique	Turquie
Espagne	Nouvelle-Zélande	Yougoslavie

Aucun comité membre ne l'a désapprouvée.

NOTE — La méthode spécifiée dans la présente Norme internationale a été élaborée conjointement avec la FIL (Fédération internationale de laiterie) et l'AOAC (Association des chimistes analytiques officiels, U.S.A.). Le texte, approuvé par les organisations susmentionnées, sera également publié par la FAO/OMS (Code de principes concernant le lait et les produits laitiers et les normes connexes), par la FIL et par l'AOAC (Official Methods of Analysis).



Publié 1981-07-15

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION · МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ · ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION

Fromages — Détermination des teneurs en nitrates et en nitrites — Méthode par réduction au cadmium et photométrie

ERRATUM

Page 4

Paragraphe 8.7.2

2^e ligne : Remplacer «de la solution tampon (5.3)» par «d'eau».

4^e ligne : Remplacer «de solution tampon» par «d'eau».

7^e ligne : Remplacer «la solution tampon» par «l'eau».

Fromages — Détermination des teneurs en nitrates et en nitrites — Méthode par réduction au cadmium et photométrie

1 OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La présente Norme internationale spécifie une méthode par réduction au cadmium et photométrie, pour la détermination des teneurs en nitrates et en nitrites des fromages.

La méthode est applicable aux fromages à pâte ferme, demi-ferme et à pâte molle, de divers âges, ainsi qu'aux fromages fondus.

2 RÉFÉRENCE

ISO/R 707, *Lait et produits laitiers — Méthode d'échantillonnage.*

3 DÉFINITION

nitrates et nitrites des fromages: Teneurs en substances déterminées selon la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale et exprimées respectivement en milligrammes d'ion nitrate (NO_3^-) et d'ion nitrite (NO_2^-) par kilogramme (parties par million).

4 PRINCIPE

Extraction du fromage avec de l'eau chaude, précipitation de la matière grasse et des protéines, et filtration.

Sur une portion du filtrat, réduction, à l'état de nitrites, des nitrates extraits, au moyen de cadmium cuivré.

Développement d'une coloration rouge à partir de portions de filtrat non réduit et à partir de portions de filtrat réduit, par addition de sulfanilamide et de dichlorhydrate de *N*-(naphtyl-1) éthylène diamine, puis mesurage photométrique à une longueur d'onde de 538 nm.

Calcul de la teneur en nitrites de l'échantillon et de la teneur totale en nitrites après réduction des nitrates, par comparaison des absorbances mesurées avec celles d'une série de solutions étalons de nitrite de sodium; calcul de la teneur en nitrates à partir de la différence entre ces deux teneurs.

5 RÉACTIFS

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique. L'eau

utilisée doit être ^{de l'eau si} distillée ou déionisée, exempte de nitrites et de nitrates.

NOTE — Dans le but d'éviter l'inclusion de petites bulles de gaz dans la colonne de cadmium cuivré (6.10), l'eau distillée ou déionisée, utilisée pour la préparation de la colonne (8.1), pour la vérification du pouvoir réducteur de la colonne (8.2) et pour la régénération de la colonne (8.3), doit être de préférence récemment bouillie puis refroidie à la température ambiante.

5.1 Cadmium, sous forme de granules, diamètre des particules 0,3 à 0,8 mm.

S'il n'est pas possible de se procurer dans le commerce des granules de cadmium, ceux-ci peuvent être préparés de la manière suivante :

Octohydrate ($\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$)

Placer, dans un bécher, un nombre convenable de baguettes de zinc et les recouvrir avec une solution de sulfate de cadmium à 40 g/l. Gratter de temps en temps le cadmium spongieux déposé sur les baguettes et cela durant une période de 24 h. Retirer les baguettes de zinc et décanter le liquide jusqu'à ce qu'il en reste seulement une quantité suffisante pour recouvrir le cadmium. Laver deux ou trois fois le cadmium spongieux avec de l'eau. Transférer le cadmium dans un broyeur de laboratoire avec 400 ml de solution d'acide chlorhydrique ^{20,1 R} et broyer durant quelques secondes afin d'obtenir des granules de la dimension requise. Replacer le contenu du broyeur dans le bécher et l'y maintenir durant plusieurs heures en agitant de temps en temps pour chasser les bulles. Décanter la majeure partie du liquide et procéder immédiatement au cuivrage comme décrit de 8.1.1 à 8.1.5.

5.2 Sulfate de cuivre(II), solution.

Dissoudre 20 g de sulfate de cuivre(II) pentahydraté ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) dans de l'eau et compléter à 1 000 ml.

5.3 Solution tampon, de pH 9,6 à 9,7.

Diluer 50 ml ^{solution 2} d'acide chlorhydrique concentré [ρ_{20} 1,19 g/ml; environ 38 % (m/m) ~~HCl~~] avec 600 ml d'eau. Après mélange, ajouter 100 ml de solution d'hydroxyde d'ammonium concentrée [ρ_{20} 0,88 g/ml; environ 35 % (m/m) NH_3]. Compléter à 1 000 ml avec ^{de l'eau} et homogénéiser.

Ajuster le pH de 9,6 à 9,7 si nécessaire. ^{solution 2}

5.4 Acide chlorhydrique, solution environ 2 N.

Diluer 160 ml d'acide chlorhydrique concentré (ρ_{20} 1,19 g/ml) à 1 000 ml avec de l'eau.

5.5 Acide chlorhydrique, solution environ 0,1 N.

Diluer 50 ml de la solution d'acide chlorhydrique (5.4) à 1 000 ml avec de l'eau.

5.6 Solutions pour la précipitation des protéines et de la matière grasse.

5.6.1 Sulfate de zinc, solution.

Dissoudre 53,5 g de sulfate de zinc heptahydraté ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) dans de l'eau et compléter à 100 ml.

5.6.2 Hexacyanoferrate(II) de potassium, solution.

Dissoudre 17,2 g d'hexacyanoferrate(II) de potassium trihydraté [$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$] dans de l'eau et compléter à 100 ml.

5.7 EDTA, solution.

Dissoudre 33,5 g d'éthylène diamine ^{2 mine} ~~diacétyl~~ (~~«éthylène diamine»~~ tétraacétate ~~base~~ disodique dihydraté ($Na_2C_{10}H_{14}N_2O_8 \cdot 2H_2O$) dans de l'eau et compléter à 1 000 ml.

5.8 Solutions pour le développement de la coloration.

5.8.1 Solution I.

Dissoudre, en chauffant au bain d'eau, 0,5 g de sulfanilamide ($NH_2C_6H_4SO_2NH_2$) dans un mélange constitué par 75 ml d'eau et 5 ml d'acide chlorhydrique concentré (ρ_{20} 1,19 g/ml). Refroidir à la température ambiante et compléter à 100 ml avec de l'eau. Filtrer si nécessaire.

5.8.2 Solution II.

Diluer 450 ml d'acide chlorhydrique concentré (ρ_{20} 1,19 g/ml) à 1 000 ml avec de l'eau.

5.8.3 Solution III.

Dissoudre 0,1 g de dichlorhydrate de *N*-(naphtyl-1) éthylène diamine ($C_{10}H_7NHCH_2CH_2NH_2 \cdot 2HCl$) dans de l'eau. Compléter à 100 ml avec de l'eau. Filtrer si nécessaire.

La solution peut être conservée jusqu'à 1 semaine au réfrigérateur, dans un récipient en verre brun bien bouché.

5.9 Nitrite de sodium, solution étalon ^{correspondant à} 0,001 g d'ion nitrite par litre.

Dissoudre 0,150 g de nitrite de sodium ($NaNO_2$), préalablement séché de 110 à 120 °C jusqu'à masse constante, dans de l'eau; compléter à 1 000 ml avec de l'eau dans une fiole jaugée et homogénéiser.

Le jour de l'utilisation, diluer 10 ml de cette solution avec 20 ml de la solution tampon (5.3), compléter ensuite à

1 000 ml avec de l'eau dans une fiole jaugée et homogénéiser.

1 ml de cette ^{solution étalon} dilution finale contient 1,00 µg de NO_2^- .

5.10 Nitrate de potassium, solution étalon ^{correspondant à} 0,0045 g d'ion nitrate par litre.
Dissoudre 1,468 g de nitrate de potassium (KNO_3), préalablement séché de 110 à 120 °C jusqu'à masse constante, dans de l'eau; compléter à 1 000 ml avec de l'eau dans une fiole jaugée et homogénéiser.

Le jour de l'utilisation, diluer 5 ml de cette solution avec 20 ml de la solution tampon (5.3), compléter ensuite à 1 000 ml avec de l'eau dans une fiole jaugée et homogénéiser.

1 ml de cette ^{solution étalon} dilution finale contient 4,50 µg de NO_3^- .

6 APPAREILLAGE

Toute la verrerie doit être soigneusement lavée et rincée avec de l'eau distillée pour être certain qu'elle est exempte de nitrates et de nitrites.

Matériel courant de laboratoire, et notamment:

6.1 Balance analytique.

6.2 Dispositif de broyage approprié.

6.3 Mixeur-homogénéiseur de laboratoire, avec récipients en verre de 250 ou 400 ml de capacité.

6.4 Fioles coniques, de 250 ml de capacité.

6.5 Fioles jaugées à un trait, de 100, 500 et 1 000 ml de capacité, conformes à l'ISO 1042, classe B.

6.6 Pipettes, permettant de délivrer 2 - 4 - 5 - 6 - 8 - 10 - 12 - 20 - 25 et 50 ml, conformes à l'ISO 648, classe A, ou ^{de} l'ISO/R 835. ^{aux spécifications de}

NOTE - Le cas échéant, des burettes peuvent être utilisées à la place des pipettes.

6.7 Éprouvettes graduées, de 5 - 10 - 25 - 100 - 250 - 500 et 1 000 ml de capacités.

6.8 Entonnoirs en verre, d'environ 7 cm de diamètre, à tige courte.

6.9 Papier filtre, pour filtration moyenne, d'environ 15 cm de diamètre, exempt de nitrates et de nitrites.

6.10 Appareil pour la réduction des nitrates (par exemple celui qui est représenté par la figure).

6.11 Colorimètre photoélectrique, ou spectrophotomètre, permettant d'effectuer des mesurages à une longueur d'onde de 538 nm, avec cellules de 1 à 2 cm de parcours optique.

7 ÉCHANTILLONNAGE

7.1 Voir ISO/R 707.

7.2 Conserver l'échantillon de manière qu'il ne se produise aucune détérioration, ni aucune modification de sa composition.

8 MODE OPÉRATOIRE

8.1 Préparation de la colonne de cadmium cuivré

8.1.1 Introduire les granulés de cadmium (5.1) (environ 40 à 60 g pour chaque colonne) dans une fiole conique (6.4).

8.1.2 Ajouter une quantité suffisante de la solution d'acide chlorhydrique 2 M (5.4) pour couvrir le cadmium. Agiter durant quelques minutes.

8.1.3 Décanter la solution, puis laver à fond le cadmium dans la fiole avec de l'eau jusqu'à ce qu'il soit exempt de chlorures.

8.1.4 Cuivrer les granulés de cadmium par addition de la solution de sulfate de cuivre(II) (5.2) (environ 2,5 ml par gramme de cadmium) et agitation durant 1 min.

8.1.5 Aussitôt après, décanter la solution, puis laver le cadmium cuivré avec de l'eau, en prenant soin que le cadmium soit continuellement couvert d'eau. Arrêter le lavage lorsque l'eau de lavage est exempte de cuivre précipité.

8.1.6 Placer un tampon de laine de verre à la base de la colonne en verre destinée à contenir le cadmium cuivré (voir la figure). Remplir la colonne en verre avec de l'eau.

8.1.7 Transférer le cadmium cuivré dans la colonne en verre, en réduisant à un minimum l'exposition à l'air. La hauteur de cadmium cuivré devrait être de 15 à 20 cm.

NOTES

1 Éviter d'enfermer des bulles d'air entre les granulés de cadmium cuivré.

2 Éviter de laisser le liquide descendre en dessous du niveau du cadmium cuivré.

8.1.8 Conditionner la colonne qui vient d'être préparée en y faisant circuler un mélange constitué par 750 ml d'eau, 225 ml de la solution étalon de nitrate de potassium (5.10), 20 ml de la solution tampon (5.3) et 20 ml de la solution d'EDTA (5.7), à un débit ne dépassant pas 6 ml/min. Laver ensuite la colonne avec 50 ml d'eau.

8.2 Contrôle du pouvoir réducteur de la colonne

Procéder à ce contrôle au moins deux fois par jour, au début et à la fin d'une série de déterminations.

8.2.1 Prélever, à la pipette, 20 ml de la solution étalon de nitrate de potassium (5.10) et les introduire dans le réservoir situé à la partie supérieure de la colonne. Ajouter immédiatement 5 ml de la solution tampon (5.3) au contenu du réservoir. Recueillir l'éluat dans une fiole jaugée de 100 ml. Le débit ne doit pas dépasser 6 ml/min.

8.2.2 Lorsque le réservoir est presque vide, laver les parois avec environ 15 ml d'eau et, lorsque celle-ci s'est écoulée, répéter le même traitement avec une autre portion de 15 ml d'eau. Lorsque cette deuxième portion est complètement passée dans la colonne, remplir complètement le réservoir avec de l'eau et la laisser s'écouler à travers la colonne en opérant au débit maximal.

8.2.3 Après avoir recueilli près de 100 ml d'éluat, enlever la fiole jaugée, compléter au trait repère avec de l'eau et homogénéiser.

8.2.4 Prélever, à la pipette, 10 ml de l'éluat et les introduire dans une fiole jaugée de 100 ml. Ajouter de l'eau pour obtenir un volume d'environ 60 ml. Procéder comme il est spécifié en 8.9.2, 8.9.3 et 8.9.4.

8.2.5 Si la concentration en nitrite de l'éluat dilué (8.2.4), déterminée d'après la courbe d'étalonnage (8.10), est inférieure à $0,063 \mu\text{g}$ de NO_2^- par millilitre (c'est-à-dire 95 % de la valeur théorique), la colonne doit être régénérée.

8.3 Régénération de la colonne

Régénérer la colonne, comme suit, après l'emploi, à la fin de chaque journée, ou plus fréquemment si le contrôle (8.2) démontre une perte de l'efficacité.

8.3.1 Ajouter environ 5 ml de la solution d'EDTA (5.7) et 2 ml de la solution d'acide chlorhydrique 0,1 N (5.5) à 100 ml d'eau. Faire passer ce mélange à travers la colonne, à un débit d'environ 10 ml/min.

8.3.2 Lorsque le réservoir est vide, laver la colonne successivement avec de l'eau, avec de la solution d'acide chlorhydrique 0,1 N (5.5), puis avec de l'eau.

8.3.3 Si la colonne montre encore une efficacité insuffisante, répéter les opérations spécifiées en 8.1.8.

8.4 Préparation de l'échantillon pour essai

Avant l'analyse, enlever la croûte du fromage ou la partie superficielle moisie, de façon à obtenir un échantillon représentatif du fromage tel qu'il est consommé. Broyer l'échantillon au moyen d'un appareil approprié; mélanger rapidement la masse broyée et, si possible, broyer de nouveau et mélanger soigneusement. Si l'échantillon ne peut pas être broyé, le mélanger soigneusement en pétrissant et agitant fortement.

Transférer l'échantillon pour essai dans un récipient étanche, en attendant l'analyse qui doit être effectuée aussitôt que possible après le broyage. Si un délai est inévitable, prendre

toutes les précautions en vue d'assurer une conservation convenable de l'échantillon et d'éviter la condensation d'eau à la surface interne du récipient. Les fromages présentant, après broyage, une croissance de moisissures indésirables ou un débit d'altération, ne doivent pas être analysés.

Nettoyer l'appareil après le broyage de chaque échantillon.

8.5 Prise d'essai

Peser 10 g de l'échantillon pour essai à 1 mg près, et les transférer quantitativement dans le récipient en verre du mixeur-homogénéiseur (6.3).

0,001 g

1 mg

8.6 Extraction et déprotéination

8.6.1 Ajouter 164 ml d'eau tiède (50 à 55 °C) à la prise d'essai. Mélanger dans le mixeur-homogénéiseur jusqu'à ce que le fromage soit bien dispersé.

8.6.2 Ajouter, dans l'ordre suivant, 6 ml de la solution de sulfate de zinc (5.6.1), 6 ml de la solution d'hexacyanoferrate(II) de potassium (5.6.2) et 20 ml de la solution tampon (5.3), à la suspension de fromage, en agitant soigneusement après chaque ajout.

8.6.3 Après 3 min, filtrer la solution sur papier filtre (6.9), en recueillant le filtrat dans une fiole conique de 250 ml.

NOTE — Il est nécessaire d'avoir un filtrat limpide. Dans ce but, si l'on analyse des fromages à forte maturation, il peut être nécessaire d'utiliser des quantités plus importantes de réactifs défécants. Si c'est le cas, le volume d'eau tiède ajouté en 8.6.1 doit alors être diminué de la même quantité.

8.7 Réduction des nitrates en nitrites

8.7.1 Prélever, à la pipette, 20 ml du filtrat (8.6.3) et les introduire dans le réservoir situé à la partie supérieure de la colonne. Ajouter 5 ml de la solution tampon (5.3) au contenu du réservoir. Recueillir l'éluat dans une fiole jaugée de 100 ml. Le débit ne doit pas dépasser 6 ml/min.

8.7.2 Lorsque le réservoir est presque vide, laver les parois avec environ 15 ml ^{d'eau} ~~de la solution tampon (5.3)~~ et, lorsque celle-ci s'est écoulée, répéter le même traitement avec une autre portion de 15 ml ~~de la solution tampon~~. Lorsque cette deuxième portion est complètement passée dans la colonne, remplir complètement le réservoir avec de ~~la solution tampon~~ et la laisser s'écouler à travers la colonne en opérant au débit maximal.

8.7.3 Après avoir recueilli près de 100 ml d'éluat, enlever la fiole jaugée, compléter au trait repère avec de l'eau et homogénéiser.

8.8 Préparation de la solution pour la détermination des nitrites dans l'échantillon

Prélever, à la pipette, 20 ml du filtrat (8.6.3) et les intro-

duire dans une fiole jaugée de 100 ml, compléter au trait repère avec de l'eau et homogénéiser.

8.9 Détermination

8.9.1 Introduire respectivement, dans des fioles jaugées de 100 ml distinctes, des ~~parties aliquotes~~ ^{parties aliquotes} égales prélevées à la pipette (par exemple 25 ml) du filtrat dilué (8.8) et de l'éluat (8.7.3). Ajouter de l'eau dans chacune des fioles afin d'obtenir des volumes d'environ 60 ml. Traiter ensuite le contenu de chaque fiole comme il est spécifié en 8.9.2, 8.9.3 et 8.9.4.

8.9.2 Ajouter 6 ml de la solution II (5.8.2) et ensuite 5 ml de la solution I (5.8.1). Mélanger avec soin et abandonner la solution durant 5 min à la température ambiante et à l'abri de la lumière solaire directe.

8.9.3 Ajouter 2 ml de la solution III (5.8.3). Mélanger avec soin et abandonner la solution durant 5 min à la température ambiante et à l'abri de la lumière solaire directe. Compléter au trait repère avec de l'eau et homogénéiser.

8.9.4 Mesurer, dans les 15 min qui suivent, l'absorbance de la solution par rapport à celle d'un essai à blanc des réactifs (8.10) à une longueur d'onde de 538 nm.

8.9.5 Effectuer deux déterminations sur ^{des volumes égaux du} même filtrat dilué (8.8) et deux déterminations sur ^{des volumes égaux du} même éluat (8.7.3).

8.10 Essai à blanc

Effectuer un essai à blanc des réactifs en utilisant tous les réactifs et en employant 4 ml d'eau au lieu de la prise d'essai.

8.11 Courbe d'étalonnage

8.11.1 Prélever, à la pipette, 0 — 2 — 4 — 6 — 8 — 10 — 12 — 16 et 20 ml de la solution étalon de nitrite de sodium (5.9) et les introduire dans des fioles jaugées de 100 ml distinctes. Ajouter de l'eau dans chacune des fioles afin d'obtenir des volumes d'environ 60 ml.

8.11.2 Appliquer le mode opératoire décrit en 8.9.2 et 8.9.3.

8.11.3 Mesurer, dans les 15 min qui suivent, les absorbances des solutions par rapport à celle de la première solution (ne contenant pas de nitrites) à une longueur d'onde de 538 nm.

8.11.4 Tracer la courbe des absorbances obtenues en 8.11.3 en fonction des concentrations en nitrite, en microgrammes par millilitre, calculées à partir des volumes de solution étalon de nitrite de sodium ajoutés (voir 8.11.1).