

Dosage du calcium ionique dans les produits laitiers liquides par une électrode spécifique

¹Eric Beaucher, Pauline Bourmault, Omar Mekmene et Frédéric Gaucheron

Résumé : *Le calcium est présent en grande quantité dans les produits laitiers et sa concentration est d'environ 30 mM dans le lait. Il est en partie associé aux protéines et notamment aux caséines et à d'autres ions comme le phosphate et le citrate. Une autre part de ce calcium (environ 2 mM) appelée calcium ionique (Ca^{2+}) est libre. La concentration de ce Ca^{2+} évolue en fonction des traitements technologiques (traitement thermique, refroidissement, acidification, addition de sels ou de chélatants du calcium) et il est intéressant d'évaluer cette concentration dans une démarche de recherche, de développement ou de fabrication de produits laitiers.*

L'objectif de ce travail était de mettre au point le dosage du Ca^{2+} par une électrode à membrane spécifique sur différents produits laitiers liquides (différents laits et filtrats de laits). La mise au point de la méthode a consisté à réaliser différentes gammes d'étalonnage (entre 0 et 50 mM calcium) dans différentes conditions (agitation, température, présence de magnésium) puis de valider cette méthode sur différents produits laitiers en réalisant des profils d'exactitude.

L'étude des paramètres d'étalonnage a permis l'obtention d'une gamme d'étalonnage linéaire, répétable, robuste et spécifique. L'établissement de profils d'exactitude a montré que la méthode était valide sur les produits laitiers testés. Les résultats obtenus étaient conformes à la littérature avec des concentrations en Ca^{2+} comprises entre 1,3 et 2,3 mM et une incertitude de mesure évaluée à environ 15%.

Cette méthode relativement simple à mettre en œuvre est actuellement utilisée dans notre laboratoire.

Mots clés : Lait, produits laitiers liquides, calcium ionique, électrode spécifique, étalonnage, profils d'exactitude, validation de méthode.

Introduction

Le lait est un liquide complexe constitué de 90 % d'eau. Il est composé, pour les 10 % restant, de glucides dont le plus abondant est le lactose, de matières grasses, de protéines, mais aussi de constituants mineurs tels que des oligoéléments, des acides aminés, des vitamines, des enzymes. Outre ces composants, des sels minéraux et organiques sont également présents dans les produits laitiers (Mathieu, 1998). Les principaux minéraux se répartissent en cations (potassium, sodium, calcium, magnésium) et anions (phosphate inorganique, sulfate, chlorure et le citrate). Ils sont distribués entre les phases aqueuse et micellaire du lait qui sont en équilibre dynamique. Les ions sodium, potassium et chlorure se trouvent en quasi-totalité dans la phase aqueuse, tandis que les ions calcium, magnésium, phosphate inorganique et citrate sont répartis entre les phases aqueuse et micellaire (**tableau 1**).

¹ UMR 1253 STLO -Science et Technologie du Lait et de l'Œuf - INRA- F-35042 Rennes
☎ 02 23 48 53 50 ✉: eric.beaucher@rennes.inra.fr et frederic.gaucheron@rennes.inra.fr

Tableau 1 : concentrations totales et dans la phase aqueuse du lait des ions du lait.
Les concentrations sont exprimées en mM

Ions	Concentration totale	Concentration dans la phase aqueuse
Ca	30,0	9,0
Pi	21,0	11,0
Mg	5,0	3,5
Citrate	9,0	8,1
Na	22,0	0,5
K	35,0	0,7
Cl	30,0	0,0

Dans la phase aqueuse d'un lait, une partie de l'ion calcium forme des sels avec les ions citrate et phosphate inorganique. Par ailleurs, une autre partie de ce calcium est libre et constitue le calcium ionique (Ca^{2+}). Dans un lait cru de vache (pH 6,70 à 25°C), la concentration de Ca^{2+} est d'environ 2 mM, ce qui représente moins de 10 % du calcium total (30 mM) (Gaucheron, 2004 et 2005).

Le dosage de ce Ca^{2+} par une électrode à membrane spécifique dans le lait est décrit dans la littérature par plusieurs auteurs (Demott, 1968 ; Allen et Neville, 1983 ; Zoon *et al*, 1998 ; Silanokove *et al*, 2003 ; Lin *et al*, 2006) mais aucune caractéristique en termes de conditions de mesure, de validation n'est indiquée de façon précise. Notre objectif a été de mettre au point le dosage du Ca^{2+} dans des produits laitiers liquides par cette méthode. La première partie du travail a consisté à tester différents paramètres tels que répétabilité, robustesse, spécificité et linéarité sur l'étalonnage. Dans un second temps, nous avons réalisé des profils d'exactitude sur différents produits laitiers (laits commerciaux et ultrafiltrats de lait) dans le but de valider cette méthode.

1. Matériels et méthodes

1.1 Solutions et liquides laitiers utilisés

Les solutions et liquides laitiers suivants ont été utilisés :

- Une solution de chlorure de calcium 400 mM ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Normapur, VWR Prolabo, Leuven, Belgique) ;
- une solution de chlorure de sodium 100 mM (NaCl, Panreac, Castellar del Vallès, Espagne) et 15 mM de tampon MES (acide 2-(N-morpholino)ethanesulfonic, de pKa 6,10 à 25°C, Sigma, Saint-Louis, USA) ;
- une solution d'hydroxyde de potassium 1 M (KOH, Carlo Erba Reagenti, Val de Reuil, France) ;
- du chlorure de magnésium ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Carlo Erba Reagenti, Val de Reuil, France) ;
- de l'azide de sodium (NaN_3 , Riedel-de-Haën, Sigma-Aldrich, Seelze, Allemagne) pour la conservation des produits laitiers ;
- de l'eau ultrapure était utilisée pour préparer les différentes solutions ;
- laits (entier microfiltré, entier pasteurisé, entier et écrémé UHT) ;
- perméat d'ultrafiltration de lait.

1.2 Mesure du Ca^{2+}

1.2.1 Les électrodes utilisées

La détermination du Ca^{2+} a été réalisée par un système composé de 2 électrodes (**figure 1**) (manuel d'instruction et guide Mettler Toledo) :

- une électrode de référence InLab 302 (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Suisse) à double jonction Ag/AgCl ; elle délivre un potentiel constant indépendamment de la composition de l'échantillon.
- une électrode de mesure, modèle DX240- Ca^{2+} (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Suisse), constituée d'une membrane amovible, en polychlorure de vinyle, sélective aux ions calcium. Cette électrode de mesure est en contact avec un électrolyte interne contenant des ions Ca^{2+} à concentration constante, mais aussi avec la solution à analyser.

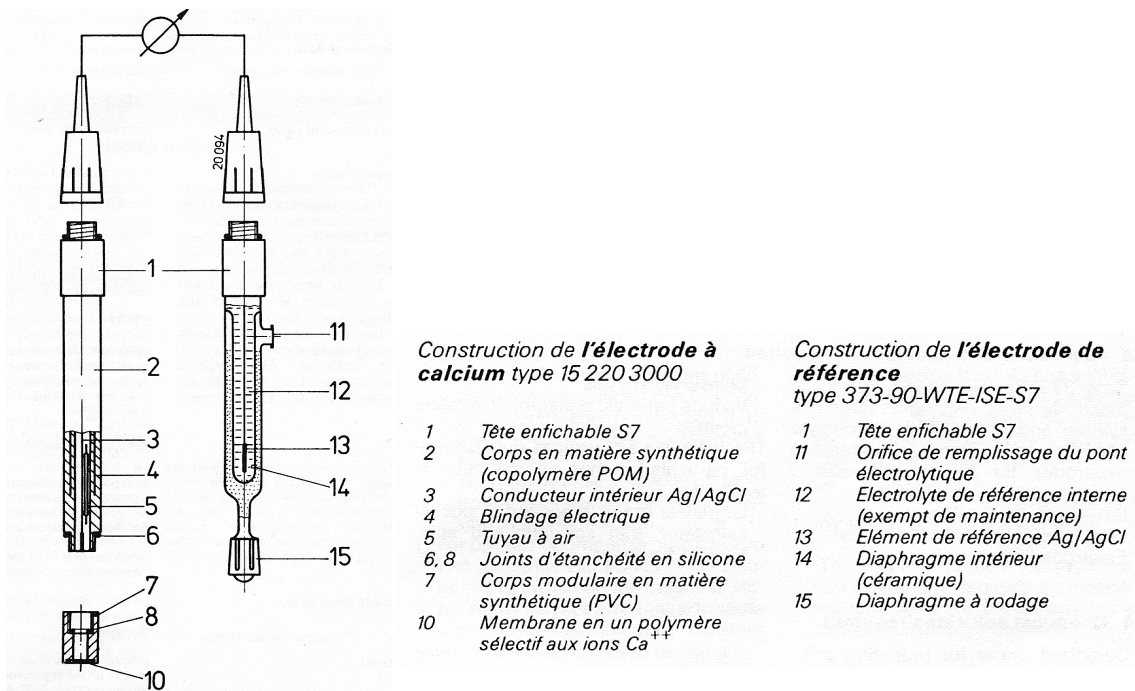


Figure 1 : électrode spécifique au Ca^{2+} et électrode de référence utilisées (Mettler Toledo)

Chaque électrode était reliée à un ionomètre SevenMulti S50 (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Suisse), permettant de convertir la différence de potentiel électrique, développée entre les 2 électrodes en une valeur de concentration (manuel d'instruction et guide Mettler Toledo, Rouessac, 2009). En fait, un équilibre se crée avec les ions Ca^{2+} de part et d'autre de la membrane de l'électrode de mesure et la différence de concentration des ions Ca^{2+} crée une différence de potentiel mesurable. Cette différence entre l'électrode spécifique et l'électrode de référence est liée à l'activité de l'ion Ca^{2+} et se traduit par l'équation de Nernst suivante :

$$E = E_0 + \frac{2,3 RT}{nF} \log a_{i,\text{solution}}$$

E correspond au potentiel de l'électrode spécifique et E_0 à la constante caractéristique du potentiel de l'électrode de référence. F est la constante de Faraday (96490 Coulombs) et R la constante des gaz parfaits. T symbolise la température (K) et n correspond à la charge de

l'ion. Le terme RT/nF est appelé facteur de pente. Dans le cas d'ions bivalents, le facteur de pente idéal est de 29,6 mV. La concentration (C_i) de l'ion considéré est reliée à l'activité (a_i) par un coefficient d'activité (γ_i), selon l'équation suivante :

$$C_i = a_i / \gamma_i$$

1.2.2 Les solutions d'étalonnage

Les concentrations des solutions d'étalonnage étaient de 0,1 – 1 – 5 – 10 – 20 – 30 – 50 mM de CaCl_2 . Elles étaient préparées à partir d'une solution mère contenant 400 mM de CaCl_2 . Elles contenaient toutes 100 mM KCl (force ionique voisine du lait) et 15 mM de tampon MES à pH 6,5. Des gammes d'étalonnage à différents pH et contenant des ions magnésium ont également été réalisées (§ 1.3. et 1.4).

1.2.3 Dispositif et conditions de détermination de Ca^{2+} de référence (figure 2)

Pour l'étalonnage et l'analyse des échantillons, les conditions suivantes ont été fixées :

- utilisation de flacons identiques contenant 120 g de solution ;
- hauteur d'immersion constante pour les électrodes ;
- mesure à température constante de 25°C dans un bain thermostaté. Chaque solution était portée à cette température 2 heures avant le début des mesures ;
- vitesse d'agitation constante et utilisation des mêmes barreaux agitateurs.
- durée d'étalonnage définie à 2 mn et durée d'analyse des produits laitiers définie à 3 mn ;
- étalonnage en mode segmenté (une régression linéaire est effectuée sur chaque segment reliant les différents points d'étalonnage).

- Electrode à membrane spécifique aux ions calcium
- Electrode de référence
- Electrode pH

Agitateur avec régulation de la vitesse

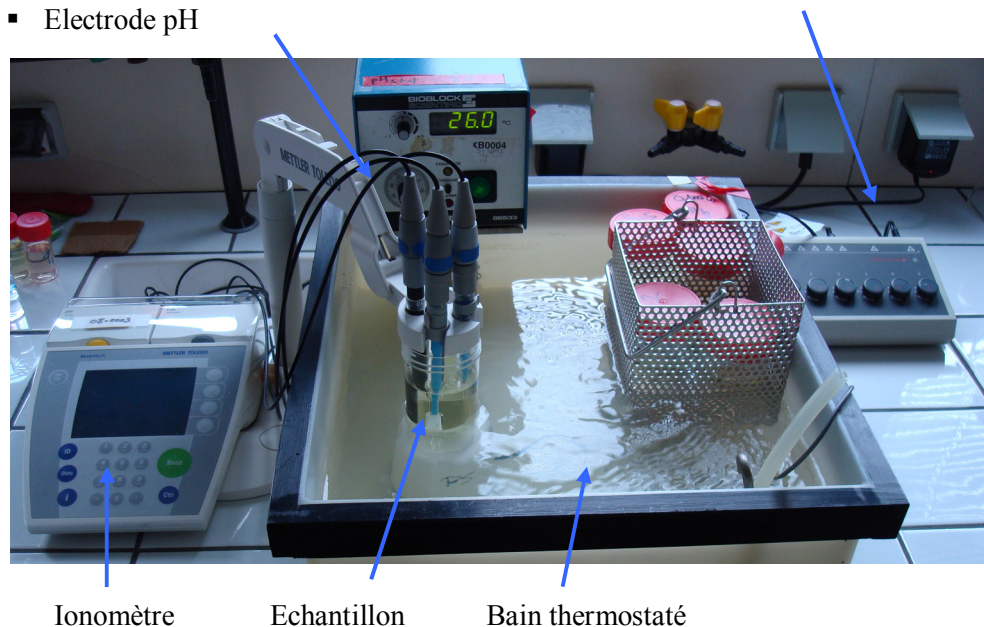


Figure 2 : dispositif de détermination du Ca^{2+}

1.3. Étude de la répétabilité de la détermination de Ca^{2+} sur l'étalonnage

La répétabilité était établie avec la même procédure opératoire, le même système de mesure, les mêmes conditions de fonctionnement, les mêmes opérateurs et le même lieu. Elle était effectuée en réalisant des mesurages répétés (Feinberg, 2008). La répétabilité de la réponse de l'électrode sur l'étalonnage a été évaluée en observant notamment l'influence du pH et du remplacement de l'électrolyte dans l'électrode de mesure. Pour cette étude, la répétabilité était testée avec 5 gammes étalons de pH 3,9 et 4 gammes de pH 6,5. L'étalonnage, avec les 2 dernières gammes de pH 6,5, a été effectué après le remplacement de l'électrolyte dans l'électrode de référence. L'étalonnage avec chacune de ces gammes était réalisé en double.

1.4. Étude de la robustesse, de la limite de linéarité et de la spécificité de la détermination de Ca^{2+} sur l'étalonnage

La robustesse de la méthode correspond à l'importance des effets observés lorsqu'on fait subir de légères variations contrôlées aux conditions opératoires (Feinberg, 2008). Les paramètres suivants ont été testés :

- Vitesse nulle à maximale de l'agitation des solutions étalons
- Durée d'analyse définie à 30 secondes et réglée sur le mode automatique.
- En mode automatique avec le critère de stabilité strict, la fin de la mesure était déterminée automatiquement lorsque le signal d'entrée ne variait pas de plus de 0,03 mV pendant 12 secondes
- Conditions de température de l'étalonnage : 4, 25 (référence) et 49°C
- L'étalonnage a été effectué avec l'une des gammes utilisée pour établir les critères de répétabilité à pH 6,5. De plus, la droite d'étalonnage de cette gamme, établie dans les conditions présentées précédemment, a été utilisée comme référence.

La limite de linéarité de la réponse, limites expérimentales entre lesquelles un modèle d'étalonnage linéaire peut être appliqué avec un niveau de confiance connu, était vérifiée pour des concentrations allant jusqu'à 500 mM de CaCl_2 . Pour cela, nous avons préparé selon le même mode opératoire que les autres solutions de la gamme, des solutions étalons à 100, 200 et 500 mM de CaCl_2 .

La spécificité de la réponse de l'électrode (qui garantit que le signal instrumental ne provient que de l'analyte) a également été testée en présence de MgCl_2 . Le magnésium est l'ion divalent le plus présent dans le lait (environ 5 mM) après le calcium. Deux gammes de CaCl_2 ont été préparées selon le même protocole en ajoutant 1 et 5 mM MgCl_2 à la solution de KCl et MES.

1.5. Répétabilité et stabilité dans le temps de la mesure du Ca^{2+} d'un lait cru entier

La répétabilité d'analyse du Ca^{2+} d'un lait cru a été établie en effectuant 10 mesures successives. Entre chaque mesure, l'électrode a été rincée. La stabilité de la réponse dans le temps était testée en réalisant une mesure du Ca^{2+} d'un lait cru toutes les 10 minutes pendant une heure. Entre les mesures, l'électrode était conservée dans la solution de conditionnement.

1.6. Validation de la mesure de Ca^{2+} par ajout dosé et établissement de profils d'exactitude sur des liquides laitiers

La validation de la méthode a été effectuée sur quatre laits commerciaux et un perméat d'ultrafiltration de lait. Des ajouts dosés de 2,5, 5,0 et 7,5 mM de CaCl_2 ont été réalisés sur chacun de ces liquides dans le but de vérifier un effet matrice en déterminant la linéarité des résultats et en établissant des profils d'exactitude. Ces échantillons étaient analysés en triple.

Les profils d'exactitude ont été réalisés avec le logiciel statistique *Profil Exactitude Template ver 2-1*. Ce logiciel calculait la concentration moyenne et l'écart-type sur les 9 valeurs ainsi obtenues, la corrélation entre les valeurs expérimentales de Ca^{2+} et les valeurs de référence ainsi qu'une incertitude (Feinberg, 2008). Les valeurs de Ca^{2+} de référence ont été obtenues à partir de calcul théorique en utilisant le modèle Milk Salts GLM (Mekmene *et al*, 2009 et 2010).

Les profils d'exactitude ont été construits sur trois niveaux de concentration. Chaque niveau a été établi en fonction des concentrations des échantillons enrichis en CaCl_2 , auxquelles était soustraite la concentration de l'échantillon sans ajout. Cela était appliqué aux concentrations expérimentales et théoriques (valeurs cibles). Les concentrations moyennes et les écart-types de fidélité étaient déterminés par rapport aux valeurs expérimentales obtenues au cours des analyses. L'incertitude relative calculée englobait l'écart-type de fidélité sur les mesures et l'écart par rapport à la valeur cible. Le biais (ou justesse), correspondant à la corrélation entre les concentrations moyennes expérimentales et les valeurs cibles, était représenté sur chacun des profils d'exactitude en fonction des niveaux de concentrations. Il était calculé par division des valeurs moyennes par les valeurs cibles. Les limites haute et basse tolérance déterminaient l'intervalle dans lequel se situaient les valeurs expérimentales.

2. Résultats et discussion

2.1. Étude des conditions d'étalonnage

2.1.1. Étude de la répétabilité de la détermination de Ca^{2+} sur l'étalonnage

La **figure 3** montre l'influence du pH et du remplacement de l'électrolyte de mesure sur la réponse de l'électrode.

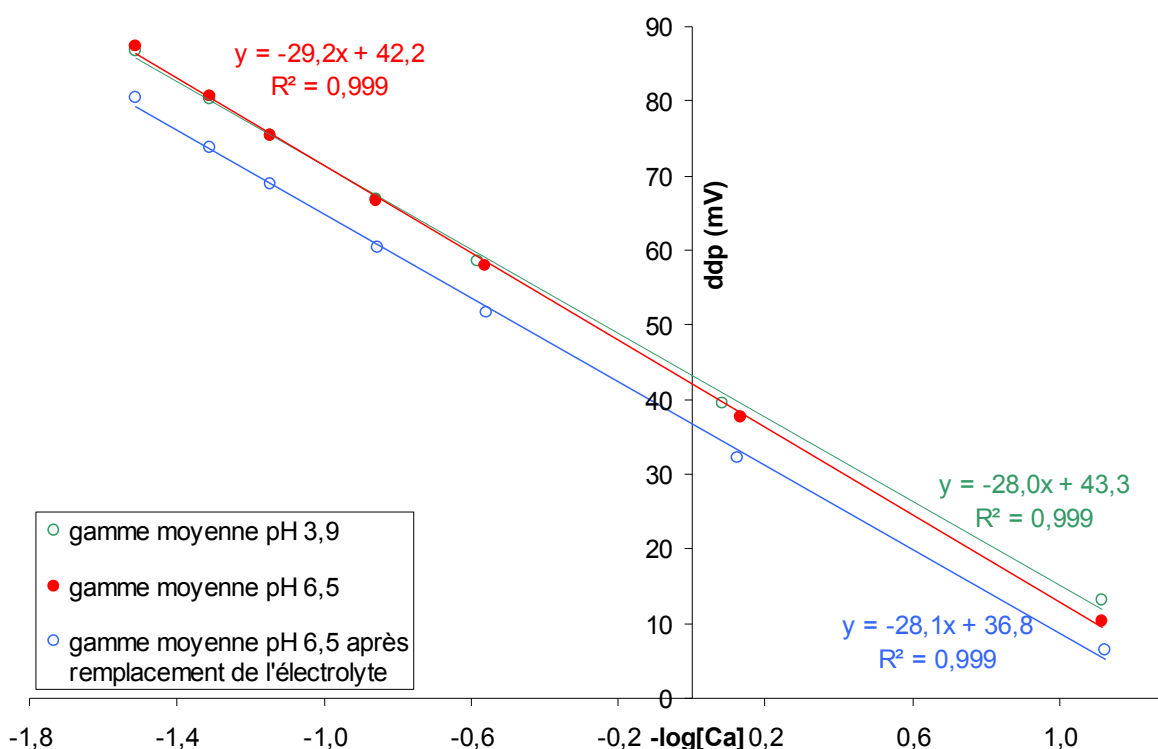


Figure 3 : influence du pH et du remplacement de l'électrolyte de l'électrode de mesure sur l'étalonnage de la méthode

Les droites moyennes des gammes de pH 3,9 et 6,5, mesurées avec le même électrolyte, étaient linéaires avec un coefficient de corrélation voisin de 1. Elles avaient respectivement des coefficients de pente de -28,1 et -29,2 mV et des ordonnées à l'origine de 43,3 et 42,2 mV. Le pH avait peu d'influence sur l'étalonnage de la méthode. En revanche, le remplacement de l'électrolyte de l'électrode de mesure entraînait un abaissement de la droite moyenne d'étalonnage. En effet, sur l'étalonnage des gammes à pH 6,5, l'ordonnée à l'origine diminuait à 36,8 mV. Au cours du temps, un échange des ions Ca^{2+} peut avoir lieu au niveau de la membrane et provoquait une augmentation de la concentration de ces ions dans l'électrolyte.

À l'aide des trois droites moyennes obtenues, un critère de pente moyen de $-28,7 \pm 0,9$ mV et une ordonnée à l'origine moyenne de $40,0 \pm 4,0$ mV ont été déterminés. Ces pentes étaient conformes aux recommandations du constructeur de la membrane (pente de 29,6 mV) (manuel d'instruction et Guide Mettler Toledo).

En fonction des conditions d'étalonnage, nous avons observé une forte variation sur l'ordonnée à l'origine des droites mais peu sur le coefficient de pente, de ce fait, l'analyse d'échantillons n'était pas perturbée.

2.1.2 Étude de la robustesse, de la limite de linéarité et de la spécificité de détermination de Ca^{2+} sur l'étalonnage

Les résultats concernant les paramètres de robustesse testés sur l'étalonnage de la méthode sont présentés **figure 4**. La gamme de référence est celle qui a été déterminée dans les conditions précédemment décrites.

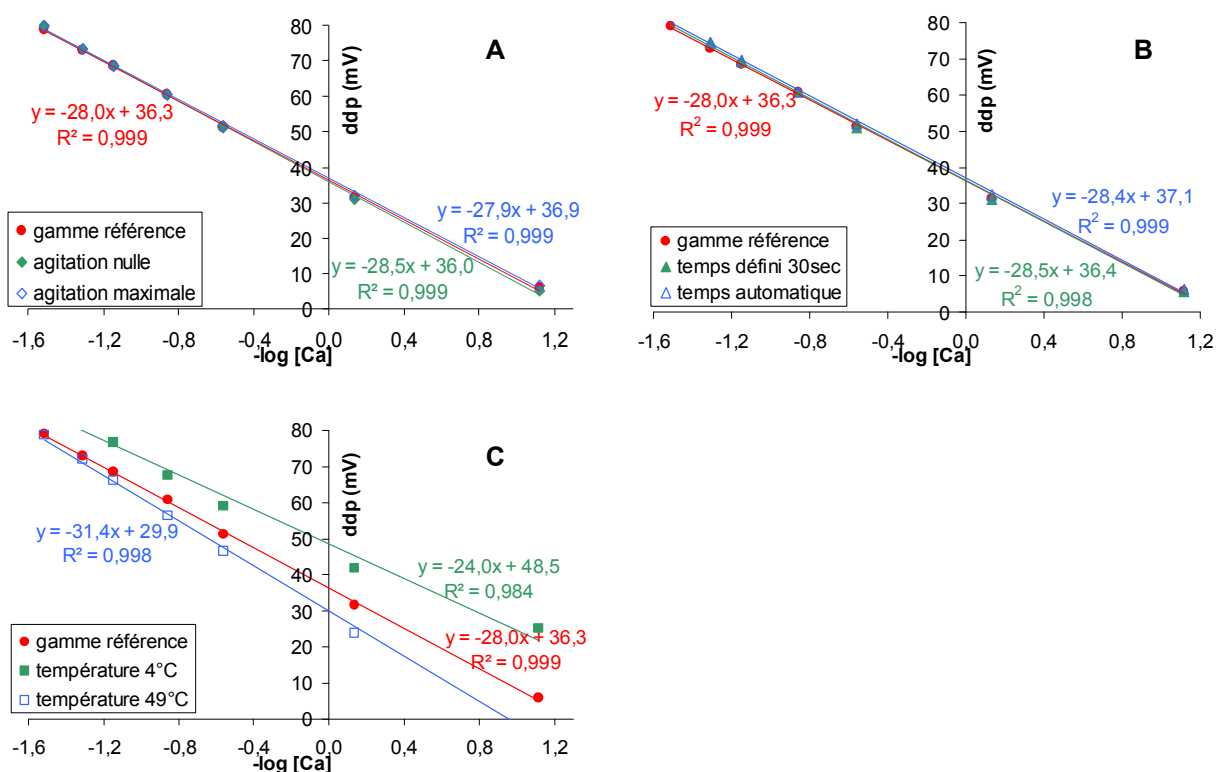


Figure 4 : influence de la vitesse d'agitation (A), la durée de l'analyse (B) et la température (C) sur l'étalonnage. La droite de référence (●) établie dans les conditions initiales est la même pour chaque paramètre

Les trois droites d'étalonnage obtenues à différentes vitesse d'agitation (**figure 4A**) étaient linéaires avec des coefficients de corrélation proches de 1. Elles respectaient le facteur de pente établi précédemment et elles étaient confondues avec la droite de référence. Le même résultat était obtenu en changeant la durée de mesure (**figure 4B**). La vitesse d'agitation et la durée de mesure n'étaient donc pas des facteurs perturbant l'étalonnage de la méthode.

À l'opposé, la différence de potentiel augmentait lorsque la température d'étalonnage diminuait et inversement, elle diminuait lorsque la température augmentait (**figure 4C**). L'électrode déterminait une concentration de Ca^{2+} plus importante à 4°C qu'à 25°C, elle-même plus importante qu'à 49°C. Ainsi, la valeur de la pente était différente de la valeur établie lors de l'étude de répétabilité à 25°C. Il est admis que la température a une influence sur la constante de dissociation du CaCl_2 . La dissociation du CaCl_2 augmente lorsque la température diminue (sens 1 de l'équation) et diminue quand la température augmente (sens 2 de l'équation).



En conclusion, la température était un paramètre à maîtriser et il était important de réaliser l'étalonnage et la mesure du Ca^{2+} dans les échantillons à la même température.

Les **figures 5 et 6** présentent respectivement les résultats concernant la spécificité de la réponse de la membrane en présence d'ions magnésium et la limite de linéarité.

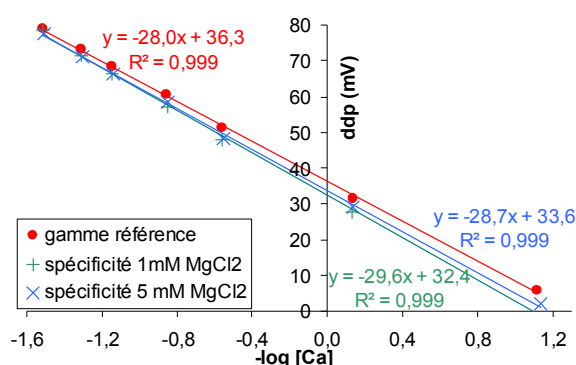


Figure 5 : influence des ions Mg^{2+} sur la réponse de la membrane.

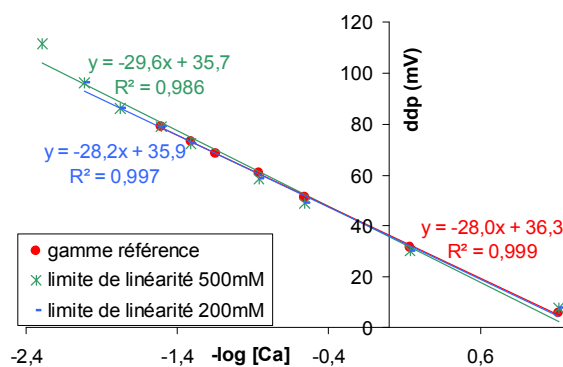


Figure 6 : limite de linéarité de la méthode d'étalonnage.

L'ajout d'ions magnésium (**figure 5**) entraînait un léger décalage des droites d'étalonnage par rapport à celle de référence. La gamme restait néanmoins linéaire avec un coefficient de corrélation correct et un facteur de pente compris dans l'intervalle fixé précédemment. Nous pouvons donc considérer que la méthode de dosage était spécifique aux ions Ca^{2+} .

En ce qui concerne la limite de linéarité testée jusqu'à 500 mM de CaCl_2 (**figure 6**), les droites étaient relativement linéaires mais avec un coefficient de corrélation faible (0,986 en considérant une gamme allant jusqu'à 500 mM contre 0,999 pour la gamme de référence allant jusqu'à 200 mM).

2.2. Répétabilité et stabilité dans le temps de la détermination de Ca^{2+} d'un lait cru entier

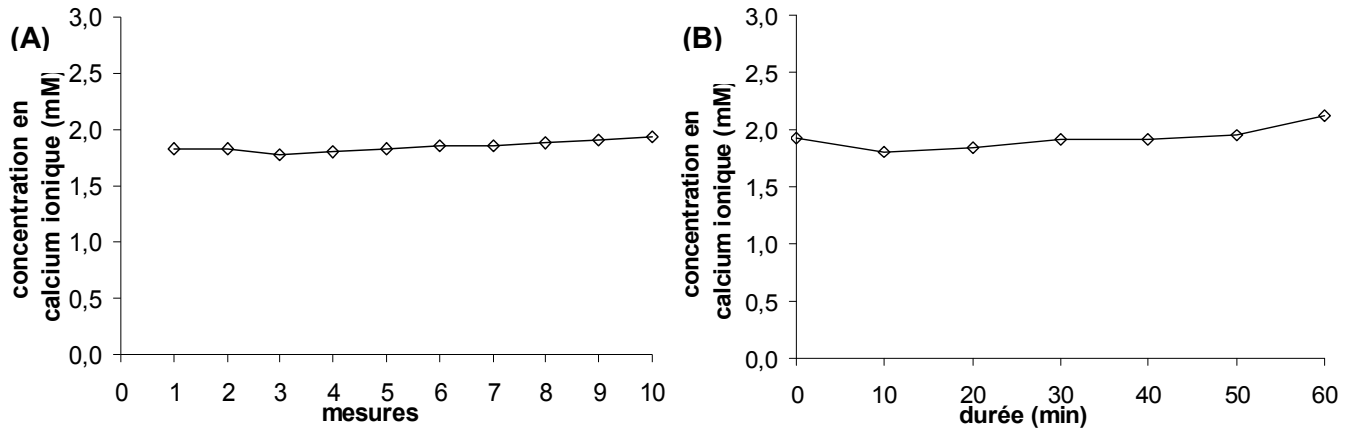


Figure 7 : répétabilité (A) et stabilité dans le temps (B) des mesures de Ca^{2+} dans un lait cru

Les résultats présentés dans la **figure 7** montrent que les valeurs de Ca^{2+} déterminées sur un même lait cru (moyenne à 1,9 mM) déterminées étaient constantes en fonction du nombre de mesure (figure 7A) et du temps (figure 7B). Ces valeurs étaient en accord avec la littérature. En effet, il est admis que la concentration moyenne en Ca^{2+} dans un lait cru est de l'ordre de 2 mM (Holt *et al*, 1981 ; Gaucheron, 2004 ; Mekmene *et al*, 2010). Tsioulpas *et al*, (2007) ont montré que la concentration en Ca^{2+} , de 75% des laits analysés, était comprise entre 1,5 et 2,1 mM, avec une moyenne de 1,88 mM.

2.3 Validation de la méthode et profils d'exactitude sur des liquides laitiers

2.3.1 Détermination de l'effet matrice par ajouts dosés

Les concentrations moyennes de Ca^{2+} déterminées dans quatre laits différents et un perméat d'ultrafiltration sont présentées dans la **figure 8**.

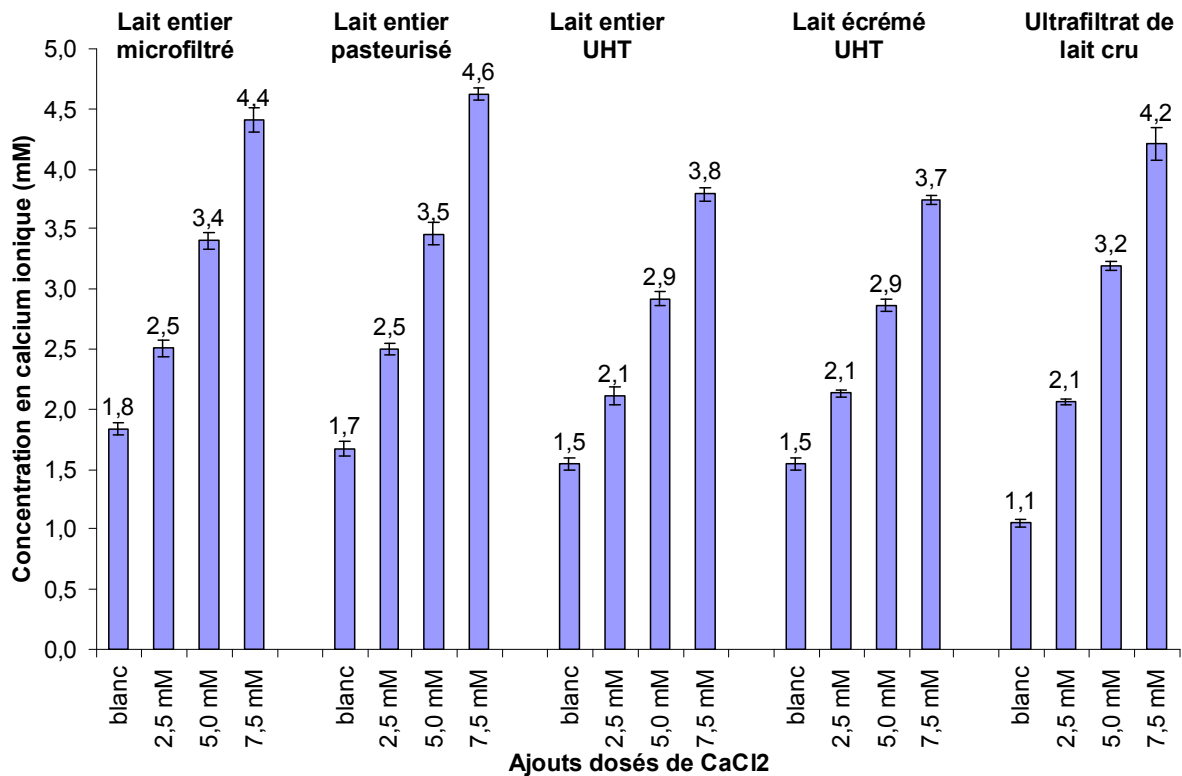
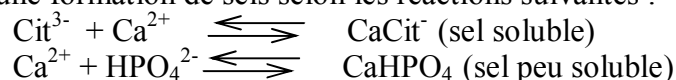


Figure 8 : mesure du Ca^{2+} sur quatre laits commerciaux et un ultrafiltrat de lait témoins (blanc) et enrichis en calcium

Les valeurs de Ca^{2+} déterminées pour les différents liquides laitiers sans ajout (laits entier microfiltré, entier pasteurisé, entier et écrémé UHT) étaient conformes à ceux décrits dans la littérature à savoir $2,0 \pm 0,5$ mM. La valeur de Ca^{2+} déterminée dans l'ultrafiltrat de lait était quant à elle considérée comme faible. Sachant que l'ultrafiltrat de lait correspond à la phase aqueuse du lait, il était attendu une valeur comprise entre 1,5 et 2,5 mM.

Les valeurs de Ca^{2+} déterminées sur ces mêmes liquides laitiers enrichis avec 2,5, 5,0 et 7,5 mM augmentaient de façon proportionnelle. On peut noter que les concentrations ajoutées ne correspondaient pas aux valeurs déterminées. Les valeurs déterminées étaient globalement plus faibles que celles attendues théoriquement. Ces résultats s'expliquent par une association de l'ion Ca^{2+} ajouté au phosphate inorganique, au citrate de la phase soluble avec comme conséquence une formation de sels selon les réactions suivantes :



Une autre partie de ce Ca^{2+} ajouté s'associe également avec la micelle de caséine. Ces associations induisaient une diminution du Ca^{2+} mesurable.

La fidélité des mesures (étroitesse de l'accord entre les valeurs mesurées obtenues par des mesurages répétés) était bonne et les analyses sur les 3 jours étaient répétables. Sur l'ensemble des analyses, les écart-types obtenus sur les 9 mesures étaient de l'ordre de 0,1 mM pour des concentrations de 1,4 à 4,6 mM.

Cependant, de manière générale, la concentration en Ca^{2+} obtenue expérimentalement était inférieure à la concentration théorique déterminée à l'aide du modèle Milk Salts GLM. La justesse était mauvaise (étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence).

2.3.2 Profils d'exactitude

Le profil d'exactitude du lait entier microfiltré et ses caractéristiques sont présentés respectivement dans la **figure 9** et le **tableau 2**.

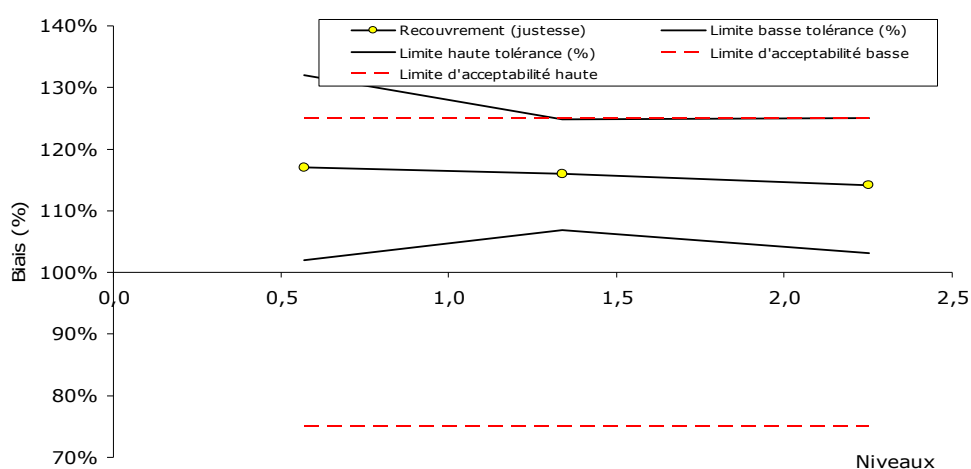


Figure 9 : profil d'exactitude du lait entier microfiltré.

Tableau 2 : caractéristiques du profil d'exactitude obtenues sur un lait microfiltré

Valeur cible (mM)	0,57	1,34	2,25
Moyenne niveau (mM)	0,67	1,55	2,55
Ecart-type de fidélité	0,05	0,07	0,12
Incertitude relative (%)	18	12	12

Le profil du lait microfiltré (**figure 9**) était linéaire et présentait un biais positif. Les valeurs théoriques obtenus par le modèle Milk Salts GLM étaient calculées à partir de concentrations totales moyennes en minéraux (qui diffèrent légèrement d'un lait à l'autre) et présentaient donc des incertitudes. Il était normal d'observer un écart entre les concentrations théoriques et expérimentales (les premières étant supérieures aux secondes) et donc un biais positif.

L'incertitude sur la mesure du lait microfiltré était de 12 % pour des concentrations comprises entre 1,55 et 2,55 mM de Ca^{2+} .

Nous avons ainsi fixé la limite d'acceptabilité à 15 %. Les limites d'acceptabilité représentées sur la figure en pointillés étaient prédéfinies pour des concentrations expérimentales et théoriques proches (profil centré).

Les profils d'exactitude obtenus sur les autres liquides laitiers (résultats non montrés) étaient linéaires avec un biais positif. Nous avons pu valider la méthode pour l'analyse de ces matrices et déterminer globalement une limite d'acceptabilité de $\pm 15 \%$ pour des concentrations comprise entre 1,0 et 2,4 mM de Ca^{2+} . Elle était fixée en considérant l'incertitude déterminée à l'aide des profils d'exactitude et en fonction de notre expérience. Pour des concentrations plus faibles, l'incertitude était généralement plus forte.

Conclusion

Les résultats majeurs de cette étude concernent l'étalonnage et la mesure du Ca^{2+} dans quelques liquides laitiers :

1. Pour l'étalonnage, il est montré que la réponse de l'électrode est :

- proportionnelle et linéaire entre 0 et 200 mM de CaCl_2
- robuste vis à vis de la vitesse d'agitation et à la durée d'analyse
- sensible à la température entre 4 et 50°C
- spécifique aux ions Ca^{2+} en présence d'ions Mg^{2+}

Des critères de pentes ont été établis ($- 28,7 \pm 0,9$ mV) et d'ordonnée à l'origine ($40,0 \pm 4,0$ mV) doivent être respectés pour que l'étalonnage soit considéré comme correct.

2. Pour l'analyse des produits laitiers liquides, les déterminations de Ca^{2+} étaient répétables et stables sur une heure. Cette détermination de Ca^{2+} dans le lait a été validée et l'incertitude de mesure a été établie à 15 % pour des concentrations comprises entre 1,0 et 2,4 mM.

À partir de ces critères, nous montrons que cette mesure de Ca^{2+} par une électrode à membrane spécifique était réalisable. Cependant, peu de produits laitiers ont été analysés et il serait intéressant de poursuivre les mesures sur différents laits expérimentaux et industriels ainsi que sur d'autres matrices liquides telles que des perméats, des rétentats, des lactosérums doux et acides et des laits fermentés. Par ailleurs, la validation de cette méthode a été établie pour des concentrations en Ca^{2+} comprise entre 0,5 et 2 mM, faibles par rapport aux concentrations en Ca^{2+} qui pourraient être rencontrées (lait enrichi en calcium ou lait fermenté). Les profils d'exactitude ne sont pas extrapolables. Il est envisagé d'établir des profils sur une gamme de concentration plus large.

Bibliographie

Allen JC, Neville MC (1983) Ionized calcium in human milk determined with a calcium-selective electrode, *Clinical Chemistry* 29, 858-861.

Demott BJ (1968) Ionic calcium in milk and whey, *Journal of Dairy Science* 51, 1008-1012.

Feinberg M (2008) Validation et profil d'exactitude, accessible par le site intranet https://intranet.inra.fr/mission_qualite/acces_thematiques/formations_et_ecoles/ecole_des_tech_niques_validation_methodes_2008/recueil_presentations_edt_validation_methodes_2008

Gaucheron F (2004) Minéraux et produits laitiers, 219-267, Tec & Doc, Lavoisier (Paris)

Gaucheron F (2005) The minerals of milk, *Reproduction Nutrition Development* 45, 473-483

Holt C, Dalgleish D, Jenness R (1981) Calculation of the ion equilibria in milk diffusate and comparison with experiment, *Analytical Biochemistry* 113, 154-163

- Lin MJ, Lewis MJ, Grandison AS (2006) Measurement of ionic calcium in milk, *International Journal of Dairy Technology* 59, 192-199
- Mathieu J (1998) Initiation à la physicochimie du lait, Tec & Doc, Lavoisier (Paris)
- Mekmene O, Le Graët Y, Gaucheron F (2009) A model for predicting salt equilibria in milk and mineral-enriched milks, *Food Chemistry* 116, 233-239
- Mekmene O, Le Graët Y, Gaucheron F (2010) Theoretical model for calculating ionic equilibria in milk as a function of pH : Comparison to experiment, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 4440-4447
- Mettler Toledo, Manuel d'instruction pour l'électrode sélective aux ions Ca^{2+} , 9-13
- Mettler Toledo, Guide pour les mesures ionométriques
- Rouessac, Rouessac (2009) Analyse chimique 438-449, Dunod (Paris)
- Silanikove, Shapiro, Shamay (2003) Use of an ion-selective electrode to determine free Ca ion concentration in the milk of various mammals, *Journal of Dairy Research* 70, 241-243
- Tsioulpas A, Lewis MJ, Grandison AS (2007) Effect of minerals on casein micelle stability of cows' milk, *Journal of Dairy Research* 74, 167-173
- Zoon P, Van Vliet T, Walstra P (1998) Rheological properties of rennet-induced skim milk gels: the effect of calcium and phosphate, *Netherlands Milk Dairy Journal* 42, 295-312