

Evaluation : le ChemSpec 150

Le CHEMSPEC 150 de la société Bentley est un analyseur automatique d'urée dans le lait. En fait, il dose, par une réaction colorimétrique, l'ammoniaque formé à la suite de l'hydrolyse enzymatique de l'urée par l'uréase, ainsi que l'ammoniaque initialement présent, pour donner finalement un résultat par différence des deux valeurs. Les caractéristiques analytiques et instrumentales de cet appareil ont été évaluées par CECALAIT. Sa stabilité, son traçage, sa linéarité, sa répétabilité et sa justesse sont apparues satisfaisantes, permettant une utilisation en routine, à une cadence élevée. En revanche, comme pour la plupart des méthodes automatisées, il est important de calibrer l'appareil avec des témoins munis du même conservateur que les échantillons dosés.

Environ 95% de l'azote présent dans le lait est protéique. Les variations de la teneur de l'azote non protéique s'expliquent, en grande partie, par celles de son composant majoritaire : l'urée, qui peut en représenter près de la moitié. Sa teneur dépend étroitement de l'équilibre alimentaire des animaux. Ainsi, des teneurs anormalement basses ou élevées (< 18 mg/l ou > 27 mg/l) indiquent un déséquilibre de la nutrition azotée (cf Lettre de CECALAIT n°15). De même, un taux d'urée élevé peut être associé à des troubles de la qualité fromagère des laits. C'est dire que doser l'urée du lait intéresse à la fois les producteurs et les transformateurs...Or, parmi les méthodes de dosage disponibles, à savoir des méthodes colorimétriques, la méthode enzymatique (méthode de référence française), la spectroscopie infra-rouge et la pH-métrie, seules quelques unes sont automatisées ou automatisables (cf Lettre de CECALAIT n° 19) et susceptibles, donc, de convenir à une utilisation en routine, à grande cadence.

Il y a quelques années, les premiers appareils automatiques de dosage de l'urée -par pH-métrie différentielle, cf La Lettre de CECALAIT n° 23- sont apparus sur le marché. Leurs potentialités semblaient intéressantes, à la fois pour éviter les difficultés pratiques des méthodes enzymatiques - préparation des échantillons, nombre de réactifs, absence d'automatisation...- et pour proposer une alternative acceptable à la détection par spectrophotométrie. Depuis sont apparus d'autres appareils poursuivant les mêmes objectifs, dont le CHEMSPEC 150, fabriqué par la société Bentley Instruments (Etats-Unis) et commercialisé en France par la société Tripette & Renaud. CECALAIT en a récemment évalué les caractéristiques analytiques.

L'APPAREIL

Le CHEMSPEC 150 est un analyseur automatique d'urée dans le lait. Il est entièrement piloté par un micro-ordinateur qui gère les analyses et le calibrage. Sa cadence analytique est de 150 échantillons par heure.

Son fonctionnement repose sur la succession de réactions suivante :

- urée $\xrightarrow{\text{uréase}}$ ammoniaque + gaz carbonique
- hydrolyse enzymatique : urée $\xrightarrow{\text{uréase}}$ ammoniaque + gaz carbonique
 - formation d'un complexe coloré « ammoniaque – colorant » en présence d'un activateur (méthode de BERTHELOT modifiée)
 - détection colorimétrique de l'intensité du complexe vert formé.

Pour chaque échantillon, l'instrument détermine également la teneur en ammoniaque initialement présente dans le lait en procédant aux mêmes analyses, mais en l'absence d'uréase. Cette valeur est ensuite soustraite du résultat, obtenu en présence d'uréase. La valeur obtenue alors correspond uniquement à la teneur en urée du lait.

LES ESSAIS

Les essais d'évaluation ont été menés au laboratoire de physico-chimie de CECALAIT de février à avril 1999, avec utilisation du même lot de réactifs.

Ils ont porté sur les points suivants:

- Evaluation de la stabilité de l'appareil
- Evaluation de la contamination entre échantillons
- Evaluation de la linéarité
- Evaluation de l'influence du conservateur
- Evaluation de la répétabilité
- Evaluation de la justesse

Les critères d'appréciation de ces différents paramètres se réfèrent aux normes FIL 141 B "Guide pour l'utilisation des appareils de dosage par absorption dans le moyen infra - rouge", et NF V 04 217 (AFNOR): « Détermination de la teneur en urée du lait ».

● STABILITE

Ce point a été étudié par l'analyse en mode automatique et en double, de 3 laits, couvrant la gamme de mesure normale en urée, toutes les 15 minutes au cours d'une demi-journée de travail, soient 18 cycles de mesure au total. La répétabilité et la reproductibilité

(écart type, absolu et relatif, et écart maximal dans 95 % des cas) ont alors été calculées pour chaque échantillon.

Les résultats montrent que les valeurs moyennes journalières d'écart type de reproductibilité relatif (SR %) observées, ie de **1,69%** à **3,53%** suivant le taux, sont inférieures à la valeur de reproductibilité de la méthode de référence (NF V 04 217), soit **SR % = 6,2 %**.

En outre, les valeurs de reproductibilité ainsi obtenues sont du même ordre que celles de la répétabilité sur cet essai. Cela indique une variance entre tests limitée, donc une stabilité analytique satisfaisante : l'intervalle de confiance relatif moyen est de l'ordre de **± 2%**.

② CONTAMINATION ENTRE ECHANTILLONS

Ce critère a été évalué en mode d'analyse automatique, par l'analyse d'un même lait individuel de vache et d'eau distillée selon la séquence : LAIT - LAIT - EAU – EAU, répétée vingt fois.

Le taux de contamination (Tc%) a été estimé par la formule:

$$Tc\% = [(S(Eau 1) - S (Eau 2)) / (S (Lait 2) - S (Eau 2))] \times 100$$

Dans les conditions de réglage du système fluidique préconisées par le constructeur, le système CHEMSPEC 150 donne lieu à des contaminations entre échantillons successifs de l'ordre de **0,28 %** à **0,52 %**.

Ce taux satisfait la limite d'acceptabilité de 1 % appliquée par ailleurs aux méthodes rapides de détermination de la richesse du lait pour le paiement et le contrôle laitier.

③ INFLUENCE DU CONSERVATEUR

L'essai, réalisé sur 38 laits individuels de vache, provenant de 2 élevages différents, a comparé les réponses obtenues :

- d'une part sur du lait cru,
- d'autre part sur du lait additionné de Bronopol à 0,02 %.

Les laits ont été répartis en flacons après 4 heures passés entre 10 et 15 °C, en l'absence de conservateur, puis stockés à 4°C pendant 24 heures avant d'être analysés sur l'instrument. Pour chaque lait, les échantillons avec ou sans conservateur, ont été analysés à la suite, afin d'éviter d'inclure une éventuelle dérive dans les différences constatées.

Les résultats obtenus montrent une différence statistiquement significative au seuil de 1 % entre le lait conservé avec du bronopol et le lait sans conservateur. Toutefois, celle-ci reste faible de l'ordre de -0,5 mg / dl (-1,4 % relatif).

En fait, comme pour toute autre méthode de routine, pour éliminer l'influence du conservateur, il faudra prendre ce facteur en compte dès le départ, pour le calibrage. Les échantillons servant au

calibrage devront ainsi être traités avec le même conservateur et selon les mêmes modalités que les échantillons de routine.

④ LINEARITE

Ce paramètre a été évalué par l'analyse en mode manuel, sans agitateur, en triple dans l'ordre croissant des taux d'urée, d'une gamme de 11 solutions aux taux régulièrement répartis de 0 à 100 mg urée/ dl.

La linéarité a été étudiée par régression linéaire. Sur l'ensemble de la gamme testée, on observe une distribution aléatoire des écarts autour de la droite de régression. Les résultats de la régression entre 0 et 100 mg / dl donnent un écart type résiduel de régression de l'ordre de 0,6 mg urée / dl qui correspond à la somme des erreurs aléatoires théoriquement escomptée de la méthode. L'appareil est donc linéaire dans une plage englobant la plage de calibrage 0-100 mg urée/dl.

⑤ REPETABILITE

Elle a été évaluée :

- d'une part à partir de 150 laits individuels de vache, dont 15 supplémentés avec de l'urée en solution de manière à augmenter leur teneur de 30 mg / dl environ,
- d'autre part, à partir de 50 laits de troupeau.

L'ensemble de ces laits, conservés avec du bronopol à la concentration finale de 0,02 %, a ainsi couvert une plage de taux allant de 1,2 à 61,2 mg d'urée / dl.

Les dosages ont été effectués en mode automatique, sur rampes comme lors d'analyses de routine, en doublant chaque série d'environ 20 échantillons.

La stabilité de la réponse instrumentale a été contrôlée par l'analyse d'un lait témoin entre chaque répétition de série.

Les résultats sont consignés dans le tableau 1 ci-dessous

tableau 1 : répétabilité du ChemSpec 150

Table 1: repeatability of the ChemSpec 150

avec / with

n : nombre d'échantillons / number of samples

Sx : écart type de série / standard deviation among sets of about 20 samples – each set is analyzed twice -

Sr : écart type de répétabilité / standard deviation of repeatability

Sr% : écart type de répétabilité relatif / relative standard deviation of repeatability

r : écart maximum entre doubles / maximum deviation between doubles

Entre () les résultats obtenus après élimination de deux valeurs aberrantes / between () results got after elimination of outliers

	Laits individuels (mg urée/dl)	Laits individuels + laits supplémentés (mg urée/dl)	Laits de troupeaux (mg urée/dl)
n	135	150 (148)	50
Moyenne	16.16	19.44 (19.05)	22.16
Sx	8.39	12.83 (12.46)	7.04
Sr	0.457	0.686 (0.580)	0.642
Sr %	2.82 %	3.52 % (3.04 %)	2.90 %
r	1.27	1.90 (1.61)	1.78

Les écarts types de répétabilité varient ainsi de 0,457 à 0,580 mg / dl, de 2,82 à 3,04 % en écart relatif, suivant les types de laits testés. Ils sont très largement dans les spécifications du constructeur (Sr < 1 mg / dl).

⑥ JUSTESSE

La justesse a été évaluée :

- d'une part, à l'aide de 102 laits individuels de vache,
- d'autre part, à l'aide de 50 laits de troupeaux ,

dans les mêmes conditions de conservation qu'au point ⑤ et avec des taux similaires.

Les dosages ont été effectués en mode automatique, sur rampes comme lors d'analyses de routine, en doublant chaque série d'environ 20 échantillons.

L'instrument a été calibré à l'aide d'un lait « étalon » fourni par la société BENTLEY, dont la valeur de référence (31,75 mg/dl de lait) avait été obtenue selon la méthode de pH-métrie différentielle. Une régression linéaire simple forcée par zéro a permis de calculer la pente de régression qui a été introduite manuellement dans le programme de calibrage de l'instrument (pente obtenue = 2,76889).

Les analyses de référence ont été réalisées conformément à la norme NF V 04 217. L'ammoniaque, puis l'ammoniaque et l'urée ont été dosées ainsi en double, pour chaque échantillon. La valeur de référence utilisée a été donnée par soustraction des moyennes des ces deux valeurs. Deux solutions aqueuses de valeurs nominales 20 et 60 mg/dl ont permis de contrôler et d'ajuster la méthode.

La justesse a été appréciée au moyen des :

- moyennes des écarts,
- écarts types des écarts,
- écarts types résiduels,
- équations des régressions linéaires estimées,

en prenant en variable expliquée Y, la méthode de référence et en variable explicative X, le CHEMSPEC.

Les figures 1 et 2, ci-dessous, montrent les résultats obtenus sur laits individuels et sur laits de troupeaux.

Figure 1 : justesse du ChemSpec sur laits individuels

Figure 1 : accuracy of the ChemSpec on individual milk

X-axis : urea values determined with the ChemSpec (mg urea/dl)

Y-axis : urea values determined with the reference enzymatic method (mg urea/dl)

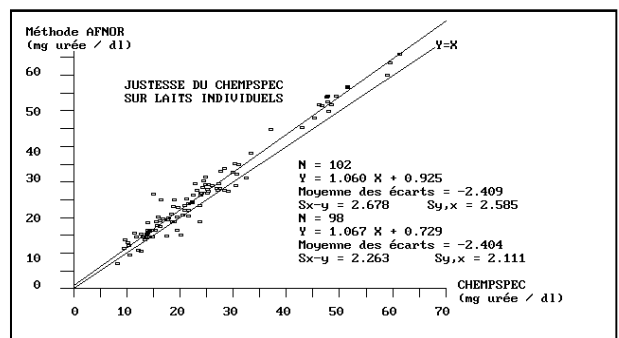
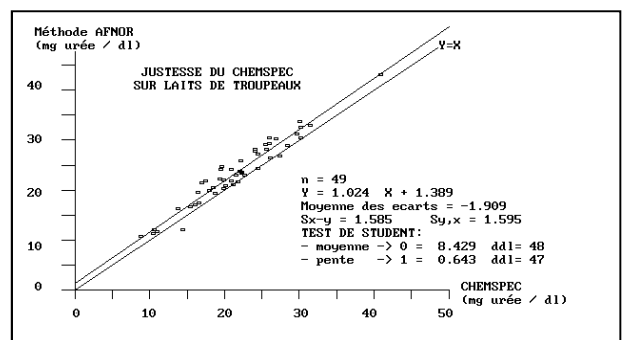


Figure 2 : justesse du ChemSpec sur laits de troupeaux

Figure 2 : accuracy of the ChemSpec on herd milks



X-axis see fig. 1

Y-axis

↳ Les biais moyens à la référence sont respectivement de :

- -2,4 mg/dl pour les laits individuels,
- -1,9 mg/dl pour les laits de troupeaux.

↳ Les écarts types résiduels de régression sont respectivement de:

- 2,59 mg / dl, soit une précision d'estimation d'environ ± 4.220 mg/dl, pour les laits individuels,

- 1,60 mg/dl pour les laits de troupeaux.

L'écart observé, par rapport à la méthode, enzymatique, V 04-217, est sans doute lié au calibrage du ChemSpec 150 avec un lait étalon dont la valeur a été obtenue par la méthode de pH-métrie différentielle (lait étalon BENTLEY).

CONCLUSION

Le CHEMSPEC 150 a été soumis à l'évaluation de la conformité de ses performances par rapport :

- d'une part, aux valeurs annoncées par le fabricant BENTLEY Instruments,
- d'autre part, aux valeurs limites d'acceptabilité appliquées aux méthodes rapides de détermination de la richesse du lait pour le paiement et le contrôle laitier.

Il a donné satisfaction sur les différents points testés : stabilité instrumentale, traçage, linéarité, répétabilité et justesse. Les caractéristiques de linéarité, préalable indispensable au calibrage,

sont notamment apparues satisfaisantes sur les plages de taux usuellement rencontrées en lait de troupeaux ou en lait individuel de vache.

BIBLIOGRAPHIE

- ♦ **TROSSAT Ph.** Rapport d'évaluation du CHEMSPEC 150. CECALAIT, 1999, 8 pages.
- ♦ **FIL 141B :1996** : Lait entier. Détermination des teneurs en matière grasse laitière, protéines et lactose. Guide pour l'utilisation des appareils de dosage par absorption dans le moyen infra – rouge
- ♦ **NF V 04 217, décembre 1992** : Lait et produits laitiers. Détermination de la teneur en ammoniac et en urée. Méthode enzymatique.
- ♦ Intérêt des dosages d'urée dans le lait pour l'élevage et la transformation. La Lettre de CECALAIT, 1995, n° 15
- ♦ Méthodes de détermination de la teneur en urée dans le lait. La Lettre de CECALAIT, 1996, n° 19
- ♦ Détermination de la teneur en urée par pHmétrie différentielle à l'aide du CL 10. La Lettre de CECALAIT, 1997, n° 23

