

PRECISION DE LA METHODE DE DOSAGE DU LACTOSE DU LAIT PAR VOIE ENZYMATIQUE

Des difficultés dans l'utilisation de la méthode

La méthode enzymatique est, par principe, la méthode la plus appropriée pour doser la teneur réelle en lactose d'une solution, du fait de la spécificité des réactions enzymatiques.

Le dosage du lactose par méthode enzymatique a été normalisé par la Fédération International de Laiterie dans la norme FIL-IDF 79A:1989. (La version définitive de cette norme -79B:1991- vient d'être publiée en anglais, mais n'a pas encore été diffusée ; elle prévoit l'extension de la méthode au dosage du lactose dans le fromage fondu).

La norme 79A ne prend malheureusement en compte que le dosage du lactose dans les laits secs et l'on n'y trouve pas d'adaptation concernant le lait cru. Aussi doit-on généralement se référer au protocole proposé par la firme Boehringer Mannheim avec les kits enzymatiques qu'elle commercialise.

Si le principe des réactions reste le même, des variantes peuvent apparaître au niveau de la préparation des défécats de lait et/ou des volumes de prise d'essai.

Précision de la méthode

La norme FIL 79A:1989 fournit des valeurs de fidélité mesurées dans le cadre d'essais interlaboratoires de normalisation :

répétabilité : écart relatif maximal entre doubles :
 $r\% = 3\%$

reproductibilité : écart relatif maximal entre deux laboratoires : $R\% = 6\%$

Soit des écarts maximaux absolus de $r = 1,5 \text{ g/l}$ et $R = 3 \text{ g/l}$ à un niveau de 50 g/l .

En ce qui concerne le lait liquide, nous pouvons nous référer aux valeurs observées au cours d'essais interlaboratoires successifs organisés en 1990-1991 par CECALAIT et qui confirment les faibles performances de l'ensemble "méthodes-laboratoire" : écarts systématiques des laboratoires variant entre + et - 3 g/l par rapport à la valeur moyenne soit des écarts-type entre laboratoires d'environ $1,5 \text{ g/l}$.

La répétabilité observée, équivalente ou supérieure à celle de la norme FIL 79A:1989 ($r\% \geq 3,5\%$) dans les premiers essais, s'est améliorée pour atteindre une valeur de l'ordre de $1,5\%$; la reproductibilité est de l'ordre de $4,5 \text{ g/l}$ ($R\% = 9\%$) et ne montre pas d'amélioration sensible au cours du temps.

Vu l'absence de procédure générale uniforme (défécation + dosage) on peut s'attendre à ce que de tels résultats puissent être améliorés. De même, en reprenant point par point les différentes étapes de la procédure, il doit être possible de resserrer les valeurs fournies par la norme.

Causes d'imprécision

1) Les prises d'essai et les volumes de réactifs

La faiblesse des méthodes enzymatiques reste la petitesse des quantités mises en œuvre.

Si une prise d'essai de 1 ml peut être réalisée avec une erreur relative maximale de $\pm 0,1\%$ avec une seringue Cornwall, $\pm 0,6\%$ avec une pipette de classe A, $100\mu\text{l}$ ne pourront être prélevés qu'avec une erreur de ± 1 à $\pm 1,5\%$; soit $\pm 0,5$ à $\pm 0,75 \text{ g/l}$ au niveau de 50 g/l (au lieu de respectivement $\pm 0,05$ et $\pm 0,3 \text{ g/l}$ pour 1 ml de prise d'essai).

De même, la répétabilité d'une prise d'essai de 1 ml ne dépassera pas, respectivement $r\% = 0,014\%$ et $0,03\%$ ($r < 0,2 \text{ g/l}$), avec les mêmes instruments, alors qu'avec une micro-pipette l'écart de répétabilité relatif $r\%$ restera de l'ordre de 1 à 2% (soit $r = 0,5$ à 1 g/l à 50 g/l).

2) La sensibilité

Pour observer le maximum de variation de DO, on doit ajuster les préparations de manière à se trouver juste en deçà du maximum conseillé de $100 \mu\text{g}$ de lactose dans la cuve pour les plus fortes concentrations supposées.

Des améliorations sont possibles

Maîtriser la précision de la méthode

1) Maîtrise de la justesse

a) On utilisera des micropipettes réglables, réglées à la balance de précision avec de l'eau distillée à 20°C ($1 \text{ ml H}_2\text{O}$ à 20°C : $0,997 \text{ g}$).

En l'absence de réglage possible, on évaluera les volumes délivrés (étalonnage) afin d'en répercuter les valeurs dans les calculs finals (10 pesées par pipette).

b) On préparera une solution aqueuse de référence à 50 g/l de lactose (sécher le lactose selon la norme FIL 79A). Cette solution sera déféquée comme le lait et le filtrat et permettra de vérifier la justesse des résultats.

c) On déféquera au maximum 2 ml de lait ou légèrement moins ($1,8 \text{ ml}$) pour des laits enrichis en lactose (à des fins d'étalonnage d'appareil, par exemple), afin de rester dans les

limites de concentration recommandées (< 100µg) (utiliser une seringue réglable), et on pèsera la prise de lait.

2) Maîtrise de la répétabilité

Elle passe par la maîtrise des quantités mises en œuvre.

a) Prises d'essai

- Peser

- les cuves vides

- les cuves + la prise d'essai

- les cuves + le volume final

Après les mélanges intermédiaires, bien lisser les morceaux de parafilm contre les bords des cuvettes afin d'éviter les pertes de poids accidentelles.

- Calculer les masses des prises d'essai m_i et des volumes finals M_i pour les i échantillons analysés et les moyennes m et M des m_i et M_i .

- Modifier la formule de calcul finale du protocole de la firme Boehringer Mannheim comme suit :

Si

$$v_i = m_i / \rho_m \quad \rho_m = m/0,1$$

et

$$V_i = M_i / \rho_M \quad \rho_M = M/3,3$$

alors

$$V_i / v_i = (M_i \times m \times 3,3) / (m_i \times M \times 0,1)$$

et

$$C = [(M_i \times m) / (m_i \times M)] \times [(0,033 \times PM \times \Delta_{\text{Alactose}}) / \varepsilon]$$

C étant exprimé en g de lactose par litre de solution d'essai

avec

v_i : volume de filtrat ou de sa dilution ajouté dans la cellule du spectromètre

V_i : volume total de liquide contenu dans la cellule du spectromètre

ρ_m et ρ_M : masses volumiques des prises d'essai et des volumes finals

ε : coefficient d'absorption molaire du NADPH à 340nm

PM : masse moléculaire du lactose ou du lactose monohydraté

Δ_{Alactose} : différence des absorbances

Si les micro-pipettes ne sont pas justes, il convient de remplacer les volumes théoriques $V = 3,3$ ml et $v = 0,1$ ml par les volumes véritables établis sur la base de l'étalonnage

initial des micro-pipettes (moyenne de 10 pesées sur les différents volumes à délivrer).

b) Réactifs

Pour simplifier les manipulations et accroître la régularité, on procédera aux mélanges des réactifs (hors échantillon) avant la distribution dans les cuves ; les mélanges n'en seront que plus homogènes (cas des solutions 1 + suspension 2, de la solution 3 + eau)

Remarque

La norme FIL 79A prend bien en compte l'importance de la prise d'essai et la difficulté d'être bien répétable avec de faibles volumes. Aussi détermine-t-on à la défécation le niveau de dilution dans le filtrat à 1/10 de celui requis dans la procédure Boehringer Mannheim sur le lait liquide.

Cela permet d'effectuer une prise d'essai de 1 ml dans la cuve de mesure.

Le même procédé peut être envisagé en lait liquide en déféquant 200µl de lait au lieu de 3 ml (pesée précise à 10^{-4} g dans un bécher et transvasage avec rinçage) dans une fiole jaugée de 100 ml.

En maîtrisant tous ces points, nous sommes assurés de résultats fiables. Aussi, nous vous donnons rendez-vous pour la prochaine chaîne d'analyses lactose de CECALAIT qui aura lieu dans la semaine 26 (22-28 juin) !

NB : Dans la norme FIL 79A:1989, on lira :

- p. 3 et 7 : la quantité de lactose présente.... être comprise entre 50 et 100 µg.

- p. 4 et 7, paragraphe 8.5.3 (*à rajouter*). Une dilution au 1/10 doit être appliquée au filtrat après défécation dans le cas du lait sec (*renvoi au paragraphe 8.3.2 manquant*)