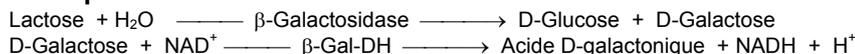


Méthode UV pour env. 16 déterminations de chaque / env. 32 déterm. du lactose

Usage *in vitro*  
Conservé entre +2 et +8°C

La méthode est décrite dans les textes officiels allemands, suisses, autrichiens et néerlandais. Elle est recommandée par l'IDV et le VDLUFA. Elle est standardisée selon les normes DIN, GOST et NBN. Elle est approuvée par l'AOAC.

## Principe



Ref.: Beutler, H.O. (1984) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., ed.) 3 rd ed., vol. VI, pp. 104-112; Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel.

## Spécifications

Longueur d'onde:	340 nm (NADH) $\varepsilon = 6,3 \text{ (l x mmol}^{-1} \text{ x cm}^{-1}\text{)}$
Cuvettes de mesure:	1,00 cm (verre; plastique)
Température:	+20 à +25°C
Volume réactionnel:	3,300 ml
Mesure:	contre l'air ou l'eau
Echantillons:	4 à 200 µg de lactose + D-galactose dans 0,1 à 0,5 ml d'échantillon.

## Réactifs

- # 1: Lyophilisat composé de tampon citrate, pH environ 6,6, env. 35 mg de NAD (voir préemption sur l'étiquette). *Diluer le contenu du flacon # 1 avec 7 ml d'eau distillée.* La solution de travail est stable 3 mois entre +2 et +8°C.
- # 2: Environ 1,7 ml d'une suspension enzymatique composée de β-galactosidase (environ 100 U) dans du sulfate d'ammonium (voir préemption sur l'étiquette). *La suspension est prête à l'emploi.* Agiter délicatement la suspension avant utilisation.
- # 3: Environ 34 ml de tampon diphosphate de potassium, pH 8,6 (voir préemption sur l'étiquette). *La solution est prête à l'emploi.*
- # 4: Environ 1,7 ml d'une suspension enzymatique composée de β-galactose-déshydrogénase (environ 40 U) dans du sulfate d'ammonium (voir préemption sur l'étiquette). *La suspension est prête à l'emploi.* Agiter délicatement la suspension avant utilisation.

### Réactifs supplémentaires (non contenus dans le coffret):

Standard monohydrate de lactose, ultra pur, 1 g/l, uniquement pour les contrôles.

Standard D-galactose, ultra pur, 0,5 g/l, uniquement pour les contrôles.

Les réactifs pour le dosage du lactose/D-galactose ne sont pas dangereux pour la santé. Appliquer les précautions habituelles en vigueur dans le laboratoire. Après usage, les réactifs doivent être éliminés comme déchets de laboratoire. Les emballages peuvent être recyclés.

## Préparation des échantillons

Si les échantillons présentent l'une ou l'autre des caractéristiques détaillées ci-dessous, lesquelles perturbent le test, suivre les instructions correspondantes.

- Diluer les échantillons liquides transparents, clairs et pratiquement neutres pour obtenir une solution contenant 0,1 à 1 g de lactose + D-galactose par litre.
- Filtrer ou centrifuger les solutions troubles. Diluer le surnageant (voir point 1).
- Éliminer le gaz carbonique des échantillons gazeux par agitation et filtration ou en ajoutant du NaHCO<sub>3</sub> jusqu'à obtenir une solution légèrement alcaline. Diluer (voir point 1).
- Broyer et homogénéiser les aliments solides (taille des grains < 0,3 mm), homogénéiser les aliments pâteux. Après extraction à l'eau ou dissolution dans l'eau, filtrer et diluer (voir point 1) si nécessaire.
- Extraire les échantillons riches en matières grasses avec de l'eau chaude à une température inférieure au point de fusion des graisses, par exemple dans une fiole jaugée de 100 ml. Ajuster à +20°C, compléter avec de l'eau jusqu'à la marque. Conserver le flacon sur de la glace ou au réfrigérateur de 15 à 30 minutes, filtrer. On peut aussi clarifier ces échantillons avec les réactifs de Carrez.
- Pour clarifier les échantillons contenant des protéines avec les réactifs de Carrez.
- Déprotéiniser les échantillons avec de l'acide perchlorique.

## Procédure pour Lactose / D-galactose (env. 16 tests de chaque)

Pipeter dans la cuvette	Blanc lactose	Standard lactose <sup>1</sup>	Echant. lactose <sup>2,3</sup>	Blanc D-galactose	Echantillon D-galactose	Test avec standard interne <sup>4</sup>
Tampon citrate et NAD, flacon # 1	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml
β-Galactosidase, flacon # 2	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml	-	-	0,050 ml
Echantillon <sup>6</sup> (de 0,1 à 1 g lactose/l)	-	-	<b>0,100 ml</b>	-	<b>0,100 ml</b>	<b>0,100 ml</b>
Standard <sup>6</sup> (ex 1 g lactose/l)	-	0,100 ml	-	-	-	0,100 ml
<b>Mélanger le contenu de la cuvette. Incuber à +20 à +25°C pendant au moins 30 min. Rajouter ensuite:</b>						
Tampon diphosphate de potassium, flacon # 3	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
Eau bi-distillée	2,000 ml	1,900 ml	1,900 ml	2,050 ml	1,950 ml	1,800 ml
<b>Mélanger<sup>7</sup>, après environ 3 min, mesurer l'absorbance (A<sub>1</sub>). Rajouter ensuite:</b>						
β-Gal-DH, flacon # 4	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml
<b>Mélanger<sup>7</sup>, après environ 30 min, mesurer l'absorbance (A<sub>2</sub>). Répéter la mesure après 5 min<sup>8</sup>.</b>						

Voir notes page suivante

**Procédure pour Lactose via Galactose (env. 32 tests)**

Lorsque l'échantillon ne contient pas de D-galactose, le lactose est dosé seul (voir note n° 9):

Pipeter dans la cuvette	Blanc lactose <sup>9</sup>	Standard lactose <sup>1,9</sup>	Echant. lactose <sup>2,9</sup>	Essai en double <sup>3,9</sup>	Test avec standard interne <sup>4,9</sup>	Test haute sensibilité <sup>5,9</sup>
Tampon citrate et NAD, flacon # 1	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml
β-Galactosidase, flacon # 2	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml
<b>Échantillon<sup>6</sup> (de 0,1 à 1 g lactose/l)</b>	-	-	<b>0,100 ml</b>	<b>0,200 ml</b>	<b>0,100 ml</b>	<b>0,500 ml</b>
Standard <sup>6</sup> (ex 1 g lactose/l)	-	0,100 ml	-	-	0,100 ml	-
<b>Mélanger le contenu de la cuvette. Incuber à +20 à +25°C pendant au moins 30 min. Rajouter ensuite:</b>						
Tampon diphosphate de potassium, flacon # 3	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
Eau bi-distillée	2,000 ml	1,900 ml	1,900 ml	1,800 ml	1,800 ml	1,500 ml
<b>Mélanger<sup>7</sup>, après environ 3 min, mesurer l'absorbance (A<sub>1</sub>). Rajouter ensuite:</b>						
β-Gal-DH, flacon # 4	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml
<b>Mélanger<sup>7</sup>, après environ 30 min, mesurer l'absorbance (A<sub>2</sub>). Répéter la mesure après 5 min<sup>8</sup>.</b>						

**Calcul des résultats**

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{échantillon resp. standard}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanc}}$$

$$C_{\text{lactose/D-galactose}} = (V \times MW \times \Delta A) / (\epsilon \times d \times v \times 1000) \text{ [g/l de D-galactose, resp. lactose]}$$

**Test Lactose/galactose**

Pour le lactose, la teneur est calculée à partir de la différence entre les deux réactions (essai lactose et essai galactose):

$$\Delta A_{\text{lactose}} = [(A_2 - A_1)_{\text{test lactose}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanc lactose}}] - [(A_2 - A_1)_{\text{test D-galactose}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanc D-galactose}}]$$

$$c = (3,300 \times 342,3 \text{ (resp. } 360,32) \times \Delta A) / (6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = \mathbf{1,793 \text{ (resp. } 1,887) \times \Delta A \text{ [g/l lactose (resp. lactose monohydrate)]}}$$

$$\text{Pour le D-galactose: } c = (3,300 \times 180,16 \times \Delta A) / (6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = \mathbf{0,9437 \times \Delta A \quad \text{[g/l D-galactose]}}$$

**Test Lactose via galactose<sup>9</sup>**

Si l'échantillon ne contient pas de D-galactose libre, le test D-galactose peut être omis. Si du D-galactose est malgré tout présent dans l'échantillon, il sera calculé comme lactose.

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{sample resp. standard}} - (A_2 - A_1)_{\text{blank}}$$

$$c = (V \times MW \times \Delta A) / (\epsilon \times d \times v \times 1000) \text{ [g lactose /l sample solution]}$$

$$c = (3,300 \times 342,3 \text{ (resp. } 360,32) \times \Delta A) / (6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = \mathbf{1,793 \text{ (resp. } 1,887) \times \Delta A \text{ [g/l lactose (resp. lactose monohydrate)]}}$$

Les résultats peuvent être calculés à partir du lactose anhydre (recommandé), ou à partir du monohydrate de lactose comme dans les analyses traditionnelles. Si l'échantillon a été dilué lors de la préparation, multiplier le résultat par le facteur de dilution F. Dans le cas d'échantillons solides ou semi-solides, pesés lors de la préparation d'échantillons, le résultat est calculé à partir de la quantité pesée.

**Performances du test**

- Spécificité** Test spécifique du lactose. Relativement spécifique du D-galactose, en l'absence de L-arabinose. Lors de l'analyse de monohydrate de lactose et de D-galactose vendus dans le commerce, des résultats inférieurs à 100 % peuvent être obtenus car ce matériau absorbe l'humidité.
- Sensibilité:** 2 mg lactose/l ( $\Delta A=0,005$ ;  $v=0,500$  ml ;  $V=3,300$  ml)  
1 mg D-galactose/l ( $\Delta A=0,005$ ;  $v=0,500$  ml ;  $V=3,300$  ml)
- Limite de détection** 7 mg lactose/l ( $\Delta A=0,020$ ;  $v=0,500$  ml;  $V=3,300$  ml)  
4 mg D-galactose/l ( $\Delta A=0,020$ ;  $v=0,500$  ml;  $V=3,300$  ml)
- Linéarité:** 4 µg lactose+ D-galactose/test ( $v = 0,500$  ml;  $V = 3,300$  ml)  
à 200 µg lactose + D-galactose/test ( $v = 0,100$  ml;  $V = 3,300$  ml)
- Précision:**  $\Delta A = 0,005 - 0,010$  absorbances (D-galactose),  
 $\Delta A = 0,010 - 0,015$  absorbances (lactose)  
CV = env. 1 à 2 % (lactose, D-galactose)

**Notes**

- Utiliser la solution standard pour mettre en évidence des erreurs de manipulation lors de la procédure. La présence du standard n'est pas nécessaire pour le calcul de la concentration.
- Ce test associé au blanc constitue une simple détermination.
- Dans le cas d'une double détermination, réaliser deux tests avec des volumes d'échantillon différents. Les différences d'absorbance mesurées doivent être proportionnelles aux volumes d'échantillons.
- Recouvrement =  $[(\Delta A_{\text{échantill.}} + \text{standard}} - \Delta A_{\text{échantill.}}) / \Delta A_{\text{standard}}] \times 100$  [%].
- Lorsque le test est réalisé sur des échantillons où l'analyte est à l'état de traces, augmenter le volume l'échantillon jusqu'à 0,500 ml (0,007 à 0,4 g lactose/l ou 0,004 à 0,2 g D-galactose/l).
- Rincer la pipette ou l'embout de la pipette avec l'échantillon ou le standard avant le pipetage.
- Par exemple avec une spatule en plastique ou en retournant la cuvette recouverte de Parafilm (marque déposée de American Can Co., Greenwich Ct., USA).
- La réaction est terminée lorsque l'absorbance est constante. Si la réaction n'est pas terminée, continuer à lire les absorbances jusqu'à ce que l'augmentation d'absorbance soit constante sur 5 min. Extrapoler les absorbances au temps de l'addition de β-Gal-DH (suspension # 4).
- De nombreux aliments ne contiennent pas de D-galactose libre, et le test D-galactose peut donc être omis. Si l'échantillon contient malgré tout du D-galactose, il sera calculé comme lactose.