

## Méthodes de dosage du zinc dans le lait humain

J Arnaud<sup>1</sup>, A Favier<sup>1</sup>, J Alary<sup>2</sup>

<sup>1</sup> CHRUG, Laboratoire de biochimie C, BP 217X, 38043 Grenoble Cedex;

<sup>2</sup> Université Joseph Fourier, Faculté de pharmacie, laboratoire de chimie analytique, Domaine de la Merci, 38700 La Tronche, France

(Reçu le 26 août 1990; accepté le 16 novembre 1990)

**Résumé** — Les auteurs ont optimisé et comparé 3 méthodes de dosage du zinc dans le lait humain par spectrométrie d'absorption atomique électrothermique. La première méthode est une méthode directe utilisant une simple dilution du lait humain dans une solution de Triton x 100 à 0,1% (p/v). La seconde utilise une minéralisation par voie humide en présence d'acide nitrique concentré, le minéralisant étant dilué dans la solution de Triton x 100 avant injection dans le four graphite. La troisième technique fait appel à une minéralisation par voie sèche à 400 °C, les cendres étant reprises par de l'acide nitrique 0,1 mol.l<sup>-1</sup>. Ces 3 méthodes conduisent à des résultats comparables. La méthode directe, de praticabilité supérieure, est recommandée par les auteurs.

**zinc / spectrométrie d'absorption atomique en flamme / spectrométrie d'absorption atomique électrothermique / lait / dosage**

**Summary** — Zinc determination in human milk: comparison of different methods. Three flameless atomic absorption spectrometric methods for zinc determination in human milk, have been examined. Optimum analytical conditions were selected. The first was a direct method, using 1:99 milk dilution in Triton X 100 0.1% (w/v). Within-run and between-run precision were found to be 4.5% and 6%, respectively. Recovery of standard addition was found to be 103 ± 9%. Linear range was between 0.052 and 3 µmol.l<sup>-1</sup>. In the second method, milk was submitted to wet ashing with concentrated nitric acid at 180 °C, prior to dilution in Triton X 100 0.1% (final dilution: 1:199, final nitric acid concentration: 0.3 mol.l<sup>-1</sup>). Within-run and between-run precision were found to be 6%. Recovery of standard addition was 111 ± 5%. Linear range was between 0.017 and 1.5 µmol.l<sup>-1</sup>. In the third method, milk was submitted to dry ashing at 400 °C; then ash was dissolved in nitric acid 0.1 mol.l<sup>-1</sup> (final dilution 1:99). Within-run and between-run precision were found to be 8 and 5%, respectively. Recovery of standard addition was 104.5 ± 5%. Linear range was found to be between 0.122 and 2 µmol.l<sup>-1</sup>. Zinc content in different milks was determined by these 3 methods. Correlation coefficients were found to be 0.98 (methods 1 and 2) and 0.96 (methods 1 and 3). Linear regressions were  $Y = 0.93 X + 17$  ( $Y = \text{method 2}, X = \text{method 1}$ ) and  $Z = 0.79 X + 4$  ( $Z = \text{method 3}, X = \text{method 1}$ ) (figs 5 and 6). Differences in milk zinc concentrations obtained with the 3 methods were not statistically significant (match Student's t-test). In conclusion, the authors found that the direct method was the most efficient for zinc determination in milk.

**zinc / flame atomic absorption spectrometry / flameless atomic absorption spectrometry / milk / determination**

## INTRODUCTION

La détermination du zinc dans les milieux biologiques et plus particulièrement dans le lait, fait en général appel à la spectrométrie d'absorption atomique bien que la colorimétrie (Chauhan *et al*, 1981), la fluorimétrie (Moreno *et al*, 1983), la polarographie impulsionnelle (Sann *et al*, 1981), la spectrométrie d'émission atomique (Feeley *et al*, 1983; Schramel *et al*, 1988), la fluorescence X (Palma *et al*, 1983) et l'activation neutronique (Dang *et al*, 1982; Kosta *et al*, 1983; Lavi et Alfassi, 1990) soient également utilisées. Un grand nombre de travaux font appel à la minéralisation du lait, préalablement à la détermination du zinc par spectrométrie d'absorption atomique en flamme ou en four graphite. Celle-ci peut être effectuée par voie sèche, à des températures allant de 360 °C (Costantini *et al*, 1981) à 550 °C (Rajalaskmi et Srikantia, 1980) ou par voie humide (Picciano et Guthrie, 1976; Costantini *et al*, 1981; Lonnerdal *et al*, 1981 et 1983). Certains auteurs ont cependant montré que la minéralisation n'était pas une étape nécessaire (Rajalaskmi et Srikantia, 1980; Arpadjan et Nakova, 1981) et que les méthodes directes et indirectes conduisaient à des résultats identiques.

Nous avons optimisé les conditions de dosage par ces trois types de méthodes puis avons comparé les résultats obtenus.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Réactifs

Solution de Triton X 100 (Prolabo) de 0,05% à 1% (p/v). Solution de lauryl sulfate de sodium (Sigma) à 1% (p/v). Solution de chlorhydrate de benzyl diméthyl hexadécyl ammonium (Fluka) à 1% (p/v). Solution d'histidine (Sigma) à 0,1% (p/

v). Acides nitrique (Merck,  $d = 1,40-70\%$ ), sulfurique (Prolabo,  $d = 1,84 - 96\%$ ), perchlorique (Merck,  $d = 1,67 - 70\%$ ), chlorhydrique (Prolabo,  $d = 1,15 - 30\%$ ) de qualité ultrapure.

Acides nitrique et chlorhydrique 1 mol.l<sup>-1</sup> et 0,1 mol.l<sup>-1</sup> préparés par dilution des acides correspondants concentrés. Peroxyde d'hydrogène à 30% (Merck). Solution mère de zinc à 75 µmol/l: après dissolution de 4,9 mg de zinc métal (Merck) dans 5 ml d'acide chlorhydrique ultrapur, la solution est ajustée à 1 l à l'aide d'eau désionisée puis stockée sous faible volume (5 ml) dans des tubes en polystyrène et à -20 °C. Les solutions de travail sont préparées à l'aide de cette solution mère. Les concentrations de ces solutions sont équivalentes à celles des ajouts, qui, exprimées en µmol.l<sup>-1</sup> de lait, sont de 37,5, 75 et 150 µmol.l<sup>-1</sup>. Le traitement des solutions étalons est identique à celui du lait (simple dilution, minéralisation par voie humide ou voie sèche). Les dilutions sont également identiques à celles effectuées lors de la détermination du zinc dans le lait (1:99 pour la méthode directe et la méthode utilisant une minéralisation par voie sèche, 1:199 pour la méthode utilisant une minéralisation par voie humide).

Tout le matériel utilisé est décontaminé à l'aide d'acide nitrique 30% (v/v) puis d'acide chlorhydrique 15% (v/v). Les tubes et coupelles en quartz sont stockés dans cet acide jusqu'à utilisation. Ils sont rincés abondamment à l'eau désionisée et égouttés avant emploi.

### Méthodes

Les conditions opératoires sont les suivantes : appareil Perkin Elmer, modèle 560, équipé d'un four HGA 500 et d'un autosampler AS 40. Lampe à cathode creuse monoélément dont l'intensité est réglée à 15 mA. La longueur d'onde est de 213,9 nm. La bande passante est de 0,7 nm. Le gaz inerte est l'azote. Son débit en phase d'atomisation est de 250 ml/min. Les températures, rampes et durées des 3 étapes du programme thermique sont les suivantes : séchage : 110 °C/20s/20s, minéralisation : 650 °C/1s/30s, atomisation : 2 200 °C/1 ou 2s/5s (rampe de 1s pour les méthodes indirectes, rampe de 2s pour la méthode directe). Le four graphite est un tube standard. Le volume injecté dans ce four graphite est de 10 µl. Aucun correcteur de bruit de fond n'est utilisé.

La répétabilité est évaluée en réalisant 30 (méthode directe) ou 10 (méthodes indirectes) mesures d'un même pool de laits dans une même série, les ajouts n'étant réalisés que sur un seul échantillon. La reproductibilité est calculée en mesurant la concentration d'un même pool de laits, 20 j différents; en utilisant la méthode des ajouts. La récupération des ajouts est calculée en mesurant un même pool de laits surchargé de quantités connues de zinc, 20 j différents. Les résultats obtenus pour le lait sont comparés à ceux obtenus avec des solutions étalons de même concentration, traitées dans les mêmes conditions. La formule utilisée est la suivante :

$$[(CL_s - CL)/S] \times 100$$

où  $CL_s$  est la concentration obtenue dans le lait surchargé,  $CL$  la concentration du lait sans surcharge et  $S$  la concentration théorique de la surcharge. La limite de détection est évaluée par la formule  $m + 3 ET$  avec  $m$  = moyenne de 30 (méthode directe) ou 10 (méthodes indirectes) blancs réactifs mesurés dans une même série et  $ET$  = écart type correspondant. Les blancs réactifs sont constitués des réactifs inclus dans la préparation du lait, et ont subi le même traitement (simple dilution, minéralisation par voie humide ou sèche). La linéarité correspond à l'infléchissement de la courbe de calibration.

### Détermination du zinc par méthode directe

Le lait est dilué au 1:99 dans le Triton X 100 0,1% (p/v) et le zinc est déterminé par spectrométrie d'absorption atomique électrothermique. La détermination des concentrations est effectuée en utilisant la méthode des ajouts.

### Détermination du zinc après minéralisation par voie humide

Dans des tubes en quartz à bouchon en téflon sont placés 200  $\mu$ l de lait et 800  $\mu$ l d'acide nitrique concentré suprapur. Les tubes sont portés à 180 °C durant 3 h.

Le minéralisat est dilué dans le Triton X 100 0,1% (p/v) (concentration finale en acide nitrique de 0,3 mol.l<sup>-1</sup>; dilution finale au 1:199) et dosé par spectrométrie d'absorption atomique électro-

thermique. La concentration de zinc est calculée à l'aide de la méthode des ajouts.

### Détermination du zinc après minéralisation par voie sèche

Deux cents microlitres de lait sont placés dans des coupelles en quartz. Celles-ci sont placées dans un four à moufle et portées à 100 °C jusqu'à siccité (environ 1 h), puis à 400 °C durant une nuit. Les cendres sont reprises par l'acide nitrique 0,1 mol.l<sup>-1</sup> (dilution finale au 1:99). Le zinc est alors déterminé par spectrométrie d'absorption atomique électrothermique. La concentration en zinc est déterminée à l'aide de la méthode des ajouts.

### Echantillons

Le lait (colostral ou de transition) est recueilli après lavage du sein à l'eau désionisée, par expression manuelle, avant l'une des tétées du matin (9h–11h). Le lait est recueilli directement dans des flacons en polystyrène de 30 ml et est acheminé au laboratoire dans la glace. Il est réparti dans des tubes en polystyrène de 5 ml par fractions de 1 ml. Ces tubes sont congelés à -20 °C jusqu'à analyse.

### Statistiques

Les droites de régression et les coefficients de corrélation obtenus entre les méthodes indirectes et la méthode directe ont été calculés. Des tests  $t$  de Student appariés ont été utilisés pour comparer les 3 méthodes.

## RÉSULTATS

### Optimisation des 3 méthodes

#### Méthode directe

Nous avons testé différents diluants (eau désionisée, acide chlorhydrique

0,1 mol.l<sup>-1</sup>, acide nitrique 0,1 mol.l<sup>-1</sup>, Triton X 100 0,05 à 1% (p/v), lauryl sulfate de sodium à 1% (p/v), chlorhydrate de benzyl diméthyl hexadécyl ammonium à 1% (p/v) et histidine 0,1% (p/v). Différentes dilutions ont également été examinées (1:19, 1:49, 1:99, 1:199, 1:499 et 1:999). La dilution nécessaire pour obtenir une exactitude convenable (récupération des ajouts comprise entre 90 et 110%), associée à une répétabilité, exprimée par le coefficient de variation, inférieur à 10%, varie en fonction du diluant utilisé (tableaux I et II). Elle est de 1:99 pour le Triton X 100, de 1:199 pour l'eau désionisée et l'acide chlorhydrique 0,1 mol.l<sup>-1</sup>, de 1:499 pour l'acide nitrique 0,1 mol.l<sup>-1</sup> le laurylsulfate de sodium à 1% (p/v) et le chlorhydrate de benzyl diméthyl hexadécyl ammonium à 1% (p/v). Avec l'histidine à 0,1% (p/v) aucune des dilutions testées ne permet l'obtention d'une bonne exactitude et d'une bonne répétabilité. Dans ces conditions, un rapport signal sur bruit de fond supérieur à 10 n'est obtenu qu'avec l'eau désionisée et le Triton X 100. L'utilisation de Triton X 100 permet cependant d'employer une dilution moindre. La concentration minimale de Triton X 100 nécessaire à l'obtention d'une bonne exactitude et d'une bonne répétabilité pour une dilution au 1:99 est de 0,1% (p/v). Entre 0,1 et 1% de Triton X 100, les performances analytiques sont identiques (fig 1). Une dilution au 1:99 du lait dans le Triton X 100 0,1% (p/v) a donc été retenue comme le meilleur compromis.

## Minéralisation préalable du lait

### Minéralisation par voie humide

La concentration d'acide nitrique utilisée a une influence sur l'exactitude. La récupération des ajouts augmente quand la quantité d'acide nitrique augmente (fig 2). Cette concentration est par contre sans effet sur la répétabilité (fig 2).

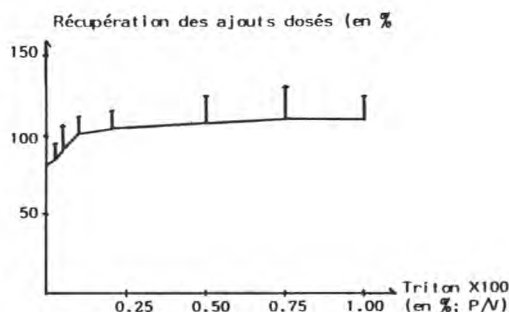


Fig 1. Influence de la concentration en Triton sur l'exactitude (méthode directe).  
Effect of Triton X-100 level on accuracy (direct method).

Différents types de mélange de minéralisation ont été testés (acide nitrique (0,8 ml), acide nitrique – acide sulfurique (0,8–0,2 ml), acide nitrique – acide perchlorique (0,8–0,2 ml), acide nitrique – peroxyde d'hydrogène 30% (0,8–0,2 ml)). Compte tenu de la dilution ultérieure du minéralisant, les concentrations finales sont de 0,3 mol.l<sup>-1</sup> (acide nitrique), de 0,09 mol.l<sup>-1</sup> (acide sulfurique), de 0,06 mol.l<sup>-1</sup> (acide perchlorique) et de 0,15% (peroxyde d'hydrogène). La récupération des ajouts de zinc, la répétabilité (fig 3) et la minéralisation ne sont pas améliorées par la pré-

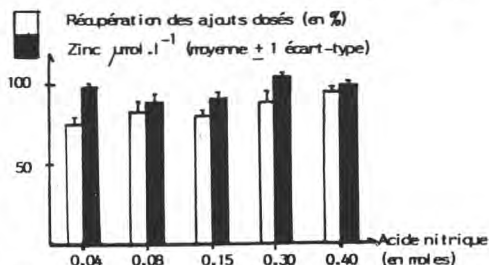


Fig 2. Influence de la concentration en acide nitrique sur la précision et l'exactitude (minéralisation par voie humide).  
Effect of nitric acid concentration on precision and accuracy (wet ashing procedure).

**Tableau I.** Influence du diluant et de la dilution sur la répétabilité exprimée par le coefficient de variation  $CV = [ET / m (n = 30)] \times 100$  (Méthode directe).*Influence of diluent and dilution rate on within-run precision, expressed as coefficient of variation  $CV = [SD / m] \times 100$ ,  $n = 30$  determinations of different dilutions of the same milk sample (Direct method).*

Dilution	1:49	1:99	1:199	1:499	1:999
<i>Diluant</i>					
Eau désionisée	<b>5</b>	10	10	14	39
HCl 0,1 mol.l <sup>-1</sup>	<b>1.5</b>	5	9	14	30
HNO <sub>3</sub> 0,1 mol.l <sup>-1</sup>	<b>4</b>	4	6	8	24
Triton X 100 1% (p/v)	<b>2.5</b>	5	7	34	36
Lauryl sulfate de sodium 1% (p/v)	<b>3</b>	3	4	5	5
Chlorhydrate de benzyl diméthyl hexadecyl ammonium 1% (p/v)	<b>2</b>	4	4	7	8
Histidine 0,1% (p/v)	<b>3</b>	3	4	5	7
Triton X 100 0,1% (p/v)	<b>3</b>	<b>4.5</b>			

En caractères gras figurent les valeurs acceptables.

*Acceptable values have been indicated in bold letters*

sence d'un adjuvant de minéralisation. Une minéralisation du lait dans l'acide nitrique concentré (1 volume de lait, 4 volumes d'acide nitrique) a été retenue.

Nous avons également testé l'eau désionisée et le Triton X 100 0,1% (p/v) comme diluant du minéralisat. L'addition de Triton X 100 0,1% (p/v) permet, comme avec la méthode directe, une meilleure récupération des ajouts de zinc (pour une dilution finale au 1:199, celle-ci est de  $111 \pm 5\%$  avec le Triton X 100 0,1% (p/v) et de

$90,5 \pm 6,5\%$  avec l'eau désionisée). Par contre, la reproductibilité est plus mauvaise (6% contre 2% avec l'eau désionisée).

Le pourcentage de récupération augmente avec la dilution. Il passe de  $69 \pm 4\%$  (dilution finale au 1:99) à  $111 \pm 5\%$  pour une dilution finale au 1:199. Nous avons donc retenu une dilution finale au 1:199. La concentration finale en acide nitrique est de 0,3 mol.l<sup>-1</sup> et celle de Triton X 100 de 0,1% (p/v).

**Tableau II.** Récupération des ajouts de zinc en % (méthode directe) : influence du diluant et de la dilution ( $n = 10$  déterminations d'un même pool de laits).  
*Influence of diluent and dilution rate on recovery of standard additions (direct method), ( $n = 10$  replicate determinations of the same sample, analysed on different days).*

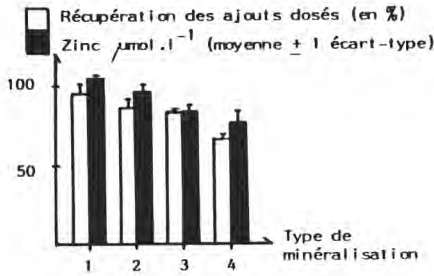
<i>Dilution Diluant</i>	<i>1:49</i>	<i>1:99</i>	<i>1:199</i>	<i>1:499</i>	<i>1:999</i>
Eau désionisée	65 ± 5	82 ± 6	<b>98 ± 13</b>	144 ± 37	85 ± 6
HCl 0,1 mol.l <sup>-1</sup>	50 ± 1	74 ± 7	<b>97 ± 8</b>	112 ± 10	65 ± 19
HNO <sub>3</sub> 0,1 mol.l <sup>-1</sup>	37 ± 4	57 ± 1	69 ± 5	<b>100 ± 10</b>	64 ± 4
Triton X 100 1% (p/v)	84 ± 8	<b>111 ± 7</b>	122 ± 12	154 ± 9	200 ± 49
Chlorhydrate de benzyl diméthyl hexadecyl ammonium 1% (p/v)	37 ± 1	69 ± 1	71 ± 7	95 ± 3	<b>107 ± 18</b>
Lauryl sulfate de sodium 1% (p/v)	42 ± 2	66 ± 3	77 ± 7	<b>90 ± 2</b>	143 ± 10
Histidine 0,1% (p/v)	66 ± 3	70 ± 4	74 ± 9	82 ± 2	126 ± 15
Triton X 100 0,1% (p/v)	87 ± 6	<b>103 ± 9</b>	128 ± 6	<b>103 ± 9</b>	

En caractères gras figurent les valeurs acceptables.  
*Acceptable values have been indicated in bold face.*

### *Minéralisation par voie sèche*

Nous avons testé l'influence de la température de minéralisation sur les pertes de zinc, l'exactitude et la précision. La température de 400 °C a été retenue du fait de pertes encore peu importantes ( $7 \pm 6\%$ , non significatives,  $n = 20$  déterminations d'un même pool de laits, 20 j différents), pour une praticabilité supérieure. En effet, le passage de 350 °C à 400 °C permet de réduire de moitié (32 à 16 h) la durée nécessaire à l'obtention de cendres blanches. La durée nécessaire pour obtenir

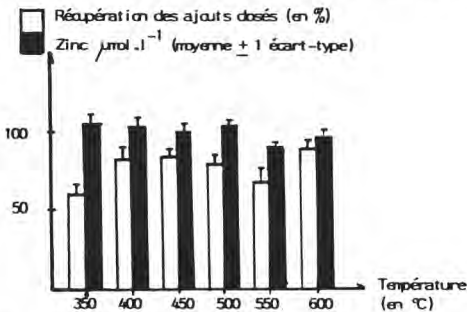
des cendres blanches diminue régulièrement lorsque la température du four à moufle augmente. A 450 °C, elle est de 4 h, à 500 °C, de 2 h et pour des températures de 550 °C ou 650 °C, de 1 h. À partir de 450 °C, les pertes sont significatives ( $17 \pm 4\%$ ,  $P < 0,01$ ). La récupération des ajouts, pour une dilution finale au 1:199 dans de l'acide chlorhydrique 0,1 mol.l<sup>-1</sup> est mauvaise et varie de façon désordonnée avec la température (fig 4). La reproductibilité n'est pas influencée par la température. Elle varie de 3% (à 500 °C) à 6% (à 350 °C).



**Fig 3.** Influence de l'agent de minéralisation sur la précision, l'exactitude et la concentration de zinc obtenues. 1 = HNO<sub>3</sub> 0,3 mol.l<sup>-1</sup>, 2 = HNO<sub>3</sub> 0,3 mol.l<sup>-1</sup> + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,09 mol.l<sup>-1</sup>, 3 = HNO<sub>3</sub> 0,3 mol.l<sup>-1</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,15%, 4 = HNO<sub>3</sub> 0,3 mol.l<sup>-1</sup> + HClO<sub>4</sub> 0,06 mol.l<sup>-1</sup>.

*Effect of wet ashing procedure on precision, accuracy and zinc concentration.*

Le choix de l'acide utilisé pour la dissolution des cendres a ensuite été étudié. L'acide nitrique 0,1 mol.l<sup>-1</sup> nous a conduit à une meilleure récupération des ajouts que l'acide chlorhydrique 0,1 mol.l<sup>-1</sup>. Pour une dilution finale au 1:99, le pourcentage de récupération des ajouts est de 104,5  $\pm$  5% avec l'acide nitrique et de 72  $\pm$  5% avec l'acide chlorhydrique. Par contre,



**Fig 4.** Influence de la température de minéralisation (minéralisation par voie sèche) sur la précision, l'exactitude et la concentration de zinc obtenues.

*Effect of dry ashing temperature on precision, accuracy and zinc concentration.*

la répétabilité n'est pas excellente avec l'acide nitrique (CV = 8%; 5% avec l'acide chlorhydrique pour une dilution finale au 1:99) et la zone de linéarité plus réduite (0,122 à 2  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  avec l'acide nitrique, 0,040 à 3  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  avec l'acide chlorhydrique).

La dilution finale a une influence sur l'exactitude. La récupération des ajouts est de 89  $\pm$  6% pour une dilution finale au 1:49, de 104,5%  $\pm$  5% pour une dilution finale au 1:99 et 133  $\pm$  5% pour une dilution finale au 1:199. La reproductibilité est peu fonction de la dilution. Elle est de 4% pour une dilution finale au 1:49 et de 5% pour des dilutions finales au 1:99 ou 1:199.

### Critères analytiques des 3 méthodes

La répétabilité, exprimée par le coefficient de variation est de 4,5% pour la méthode directe, de 6% pour la méthode utilisant une minéralisation par voie humide et de 8% pour la méthode utilisant une minéralisation par voie sèche.

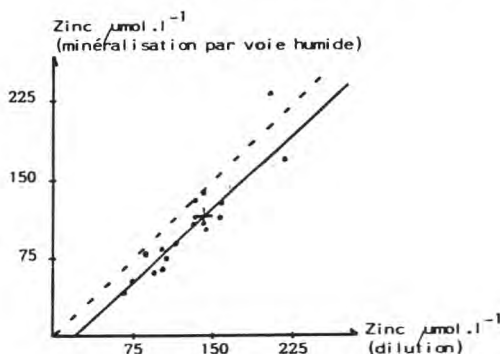
La reproductibilité, exprimée par le coefficient de variation est de 6% pour la méthode directe et la méthode utilisant une minéralisation par voie humide et de 5% avec la méthode utilisant une minéralisation par voie sèche.

L'exactitude, estimée par la récupération des ajouts est de 103  $\pm$  9% avec la méthode directe, de 111  $\pm$  5% lorsque la minéralisation est effectuée par voie humide et de 104,5  $\pm$  5% lorsque la minéralisation est réalisée par voie sèche.

Les zones de linéarité sont de 0,052–3,000  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  pour la méthode directe, de 0,017–1,500  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  pour la méthode indirecte utilisant une minéralisation du lait par voie humide et de 0,122–2,000  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  pour la méthode utilisant une minéralisation par voie sèche.

### Comparaison des 3 méthodes

Le zinc a été déterminé dans des laits colostraux ou de transition par les 3 méthodes. Les résultats sont bien corrélés mais les valeurs obtenues après minéralisation sont légèrement inférieures à celles obtenues avec la méthode directe (figs 5 et 6). La comparaison entre la méthode directe et celle utilisant une minéralisation préalable par voie humide a été effectuée sur 19 laits. Le coefficient de corrélation est de 0,98; la pente de la droite de régression de 0,93 et l'ordonnée à l'origine de  $17 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Les valeurs moyennes des laits analysés sont de  $143 \pm 64 \mu\text{mol/l}$  (extrêmes :  $64\text{--}214 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ) par méthode directe et de  $117 \pm 60 \mu\text{mol.l}^{-1}$  (extrêmes :  $39\text{--}229$ ) avec une minéralisation préalable par voie humide. Cette différence n'est pas significative. La corrélation entre les valeurs obtenues par méthode directe et après minéralisation par voie sèche a été portée sur 16 laits. Le coefficient de corrélation est de 0,79 et l'ordonnée à l'origine de  $4 \mu\text{mol/l}$ . Les valeurs moyennes de ces 16 laits sont de  $146 \pm 76 \mu\text{mol.l}^{-1}$



**Fig 5.** Dosage du zinc dans le lait. Comparaison de la méthode directe et de la technique utilisant une minéralisation par voie humide.  
*Zinc determination in human milk: comparison of the direct method and the wet ashing technique.*

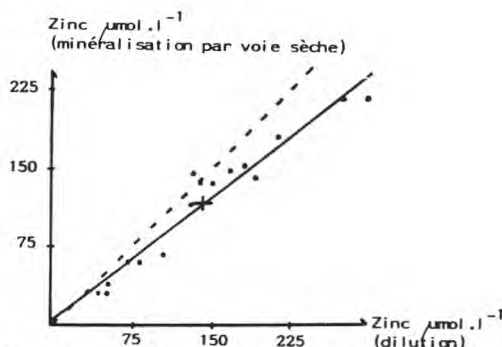
(extrêmes :  $43\text{--}306 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ) à l'aide de la méthode directe et de  $120 \pm 62 \mu\text{mol.l}^{-1}$  (extrêmes :  $29\text{--}214$ ) avec une minéralisation préalable par voie sèche. Cette différence n'est pas significative.

## DISCUSSION ET CONCLUSIONS

### Optimisation des méthodes

#### Méthode directe

Les paramètres les plus importants lors de l'optimisation de la méthode directe consistent en un choix judicieux du diluant et de la dilution. Le solvant ne doit pas apporter de contamination, ni de perturbation lors de l'analyse, et doit permettre une bonne homogénéisation du lait, riche en matières grasses. La dilution retenue doit conduire, pour la zone des concentrations usuelles, à une exactitude et une précision acceptables. De trop faibles dilutions sont responsables d'une mauvaise exactitude, en lien avec la limite supérieure de linéarité de la technique. De trop fortes dilutions



**Fig 6.** Dosage du zinc dans le lait. Comparaison de la méthode directe et de la technique utilisant une minéralisation par voie sèche.  
*Zinc determination in human milk: comparison of the direct method and the dry ashing technique.*

conduisent également à une mauvaise exactitude, doublée d'une mauvaise précision, en raison des contaminations et du faible rapport signal sur bruit de fond. Parmi les diluants et dilutions testées, nous avons retenu une dilution au 1:99 dans le Triton X 100 0,1% (p/v). Un autre choix possible était une dilution dans l'eau désionisée au 1:199. L'addition de Triton X 100 permet, contrairement à l'eau désionisée, une bonne homogénéisation du lait et un bon étalement du dépôt dans le four graphite. Il permet aussi de réduire la dilution (1:99 au lieu de 1:199 avec l'eau désionisée). Ce choix rejoint celui de Arpadjan et Nakova (1981) qui préconisent une dilution dans le Triton X 100 0,05% ou le Meriten 0,1% avant aspiration dans la flamme.

En conclusion, une dilution du lait entier au 1:99 dans du Triton X 100 0,1% (p/v), nous a paru le meilleur choix pour une méthode directe de dosage du zinc dans le lait maternel.

### Minéralisation préalable du lait

Le matériel utilisé pour la minéralisation est en quartz et téflon dans le but de limiter le risque d'adsorption du zinc sur les parois (Schramel *et al.*, 1980).

#### *Minéralisation voie humide*

Les paramètres les plus importants pour l'optimisation de cette technique sont la concentration d'acide nitrique utilisée pour la minéralisation, le diluant et la dilution finale. Des concentrations d'acide nitrique initiales importantes permettent une meilleure simplification de la matrice et conduisent à une meilleure exactitude (meilleure récupération des ajouts). Cependant, des concentrations élevées en acide nitrique peuvent être gênantes lors de l'étape analytique (réduction de la

durée de vie des tubes graphites). L'utilisation d'adjuvant de minéralisation (acide sulfurique, acide perchlorique ou peroxyde d'hydrogène) n'a pas apporté, dans cette étude, d'amélioration, tant que le plan de la minéralisation elle-même, que sur l'exactitude ou la précision. En outre, la multiplication des réactifs pose le problème de l'augmentation du risque de contaminations. La minéralisation en présence d'acide nitrique nous semble le meilleur compromis, comme l'avaient déjà indiqué Lonnerdal *et al.* (1980). Le choix du diluant, dans le cas du lait, milieu biologique riche en lipides, difficiles à minéraliser, doit être judicieux. Nous avons pu améliorer l'exactitude, comme avec la méthode directe, en diluant le minéralisant dans du Triton X 100 0,1% (p/v). La dilution, comme lors de l'optimisation de la méthode directe, a une influence sur l'exactitude. Une dilution au 1:199 permet d'obtenir une récupération des ajouts acceptable.

En conclusion, la méthode retenue est une minéralisation du lait au 1:4 dans l'acide nitrique concentré, à 180 °C et durant 3 h; le minéralisant étant ensuite dilué au 1:39 dans le Triton 0,1% (p/v) (concentration finale en acide nitrique : 0,3 mol.l<sup>-1</sup>).

#### *Minéralisation par voie sèche*

Les paramètres ayant une influence sur l'exactitude et la précision sont ici, la température de minéralisation, la nature de l'acide utilisé pour la reprise des cendres et la dilution. Nous avons observé des pertes de zinc dès la température 450 °C. Ces résultats sont un peu différents de ceux de l'étude de Sandell et Onishi (1978) qui montrait des pertes de zinc notables pour des températures supérieures à 500 °C. Ces pertes peuvent s'expliquer par une volatilisation du zinc ou par une adsorption sur la paroi des coupelles. La récupération des ajouts varie de façon désordonnée avec la température. Cependant,

le mode de calibration (ajouts dosés) permet d'atténuer les variations d'exactitude observées en fonction de la température de minéralisation. L'acide utilisé pour la reprise des cendres s'est avéré avoir une influence; l'acide nitrique 0,1 mol.l<sup>-1</sup> conduisant à une meilleure récupération des ajouts que l'acide chlorhydrique 0,1 mol.l<sup>-1</sup>; sans que nous puissions en expliquer les raisons. La dilution, comme pour les 2 techniques précédentes, joue un rôle important au niveau de l'exactitude. Une dilution finale au 1:99 s'est montré être le meilleur compromis.

En conclusion, la méthode retenue consiste en une minéralisation du lait par voie sèche à 400 °C, durant une nuit. Les cendres sont reprises par l'acide nitrique 0,1 mol.l<sup>-1</sup> (dilution finale 1:99).

### **Comparaison des 3 méthodes**

Les 3 méthodes conduisent à des résultats comparables. Ceci est en accord avec d'autres études (Rajalaskmi et Srikantia, 1980; Arpadjan et Nakova, 1981). Les concentrations obtenues à l'aide des méthodes indirectes sont toutefois inférieures à celles observées avec la méthode directe. Ces concentrations inférieures sont probablement dues à la simplication de la matrice lors de la minéralisation de l'échantillon. En outre, il est possible que le Triton X 100 induise une perturbation positive. Les méthodes utilisant une minéralisation préalable de l'échantillon sont plus longues et ont une zone de linéarité plus réduite. La précision est voisine. La récupération d'ajouts dosés de zinc, calculée sur l'ensemble des laits ayant servi à la comparaison est acceptable avec les 3 méthodes. Elle est de 102 ± 13% avec la méthode directe, de 91 ± 33% avec la

technique utilisant une minéralisation par voie sèche et de 104 ± 23% avec la technique utilisant une minéralisation par voie humide. Nous pensons que la minéralisation par voie sèche est à proscrire en raison, d'une part, des pertes importantes de zinc, qui nécessitent de traiter les standards strictement dans les mêmes conditions que le lait, d'autre part de la longueur de la manipulation, de son coût élevé et enfin du faible nombre de déterminations réalisables dans une même série. La méthode directe est celle à retenir, dès que cela est possible, pour des raisons de praticabilité. Elle présente un certain nombre d'avantages : la facilité de mise en œuvre, la réalisation possible de grandes séries de dosages, l'utilisation d'un nombre d'étapes et de réactifs réduit ce qui permet de limiter au mieux les risques de contamination. L'absence d'emploi d'acide concentré permet, de plus, d'améliorer la durée de vie des tubes graphites et d'éviter certaines perturbations au niveau de l'analyse. Nous pensons que la détermination des oligoéléments dans les milieux biologiques ou les aliments liquides peut être avantageusement effectuée par une méthode directe. Lorsque la minéralisation s'avère nécessaire (milieu solide), la voie humide nous semble la seule utilisable. La minéralisation par voie humide a toutefois un coût élevé, est longue et pose le problème de l'utilisation d'acide concentré. Cet acide, lorsque la dilution ultérieure est faible, induit une réduction importante de la durée de vie des tubes graphites. Lors de l'utilisation de la spectrométrie d'absorption atomique en flamme, les acides concentrés peuvent entraîner un délitement des revêtements du nébulisateur et du brûleur. Dans le cas du lait humain, la concentration de zinc est suffisamment importante pour utiliser des acides dilués.

## RÉFÉRENCES

- Arpadjan S, Nakova D (1981) Direkte Bestimmung von Eisen, Zink, Kupfer und Mangan in Milchpulver durch Atomabsorption. *Nahrung* 25, 359-363
- Chauhan OS, Garg BS, Singh RP (1981) A rapid spectrophotometric method for determination of zinc in milk. *Talanta* 28, 399-401
- Costantini S, Macri A, Vernillo I (1981) Sulla determinazione di elementi minerali in mangini a base di latte per uso zootecnico mediante spettrofotometria di assorbimento atomico. *Riv Soc Ital Sci Aliment* 10, 231-238
- Dang HS, Jaiswal DD, Wadhawani CN, Da Costa H, Somasundaram S (1982) Determination of trace elements in human milk and commercial milk formulas using neutron activation and radiochemical separation. *J Radioanal Chem* 70, 163-174
- Feeley RM, Eitenmiller RR, Jones JB, Barnhart H (1983) Copper, iron and zinc contents of human milk in early stages of lactation. *Am J Clin Nutr* 37, 443-448
- Kosta L, Byrne AR, Dermelj M (1983) Trace elements in some human milk samples by radiochemical neutron activation analysis. *Sci Total Environ* 29, 261-268
- Lavi N, Alfassi ZB (1990) Determination of trace amounts of cadmium, cobalt, chromium, iron, molybdenum, nickel, selenium, titanium, vanadium and zinc in blood and milk by neutron activation analysis. *Analyst* 115, 817-822
- Lonnerdal B, Clegg M, Keen CL, Hurley LS (1980) Effects of wet ashing techniques on the determination of trace element concentrations in biological samples. In: *Trace element analytical chemistry in medicine and biology* (Bratner P, Schramel P, eds), 1, Walter de Gruyter, Berlin, 619-628
- Lonnerdal B, Keen CL, Hurley LS (1981) Iron, copper, zinc and manganese in milk. *Ann Rev Nutr* 1, 149-174
- Lonnerdal B, Keen CL, Ohtake M, Tamura T (1983) Iron, zinc, copper and manganese in infant formulas. *Am J Dis Child* 137, 433-437
- Moreno A, Silva M, Perez-Bendito D, Valcarcel M (1983) Application of a modified catalytic effect: determination of nanogram amounts of zinc in milk samples using a kinetic fluorimetric method. *Analyst* 108, 85-91
- Palma PA, Seifert WE, Caprioli RM, Howell RR (1983) X ray fluorescence spectrometry in the analysis of trace elements in human milk. *J Lab Clin Med* 102, 88-94
- Picciano MF, Guthrie HA (1976) Copper, iron and zinc contents of mature human milk. *Am J Clin Nutr* 29, 242-254
- Rajalaskmi K, Srikantia SG (1980) Copper, zinc and magnesium content of breast milk of indian women. *Am J Clin Nutr* 33, 664-669
- Sandell FB, Onishi H (1978) Photometric determination of traces of metals. General aspects. Wiley Intersci Publi, New York
- Sann L, Bienvenu F, Lahet C, Bienvenu J, Bethenot M (1981) Comparison of the composition of breast milk from mothers of term and preterm infants. *Acta Paediatr Scand* 70, 115-116
- Schramel P, Wolf A, Klose BJ (1980) Analytical pretreatment of biological material by wet ashing methods. In: *Trace element analytical chemistry in medicine and biology*, vol 1 (Bratner P, Schramel P, eds), Walter de Gruyter, Berlin, 612-617
- Schramel P, Lill G, Hasse S, Klose BJ (1988) Mineral and trace element concentrations in human breast milk, placenta, maternal blood and the blood of the newborn. *Biol Trace Element Res* 16, 67-75