

DETERMINAZIONE RAPIDA DELL'AMMONIACA SU LATTE INTERO E SCREMATO CON CDR FOODLAB

C Pinelli^{1*}, F Venè¹, E Dallaturca¹, B Tedeschi¹, F Bonicolini²

INTRODUZIONE

La ricerca del contenuto di NH_3 quale ultimo metabolita [1-3] dell'attività microbica sui componenti azotati del latte è stata confermata quale indice utile e rapido della qualità igienica del latte crudo di grande massa [2, 3].

Il parametro viene utilizzato come indice di attività proteolitica residua, utile alla selezione del latte per diversi trattamenti tecnologici, in particolare nella produzione di latte UHT con trattamento di tipo "diretto" e per determinate lavorazioni casearie.

I metodi sino ad ora utilizzati fanno riferimento per campioni singoli, a misure potenziometriche [4] mediante elettrodo specifico [5] con il metodo delle aggiunte (usato come riferimento interno), o ad un sistema automatizzato per l'analisi in grande serie di tipo a "flusso segmentato" che, previa dialisi del campione, si basa sulla clorazione dell'ammoniaca a monocloroammina, reazione con salicilato, in presenza di sodio nitroprussiato, e formazione di 5-amminosalicilato, ossidazione e determinazione del composto indofenolico risultante mediante lettura fotometrica a 650 nm [6, 7].

Il sistema oggetto del presente studio permette una rapida esecuzione (8 minuti) di misure estemporanee tale da esprimere giudizi di accettabilità del lotto in tempo reale con manualità analitica ridotta al minimo e lavorando sul latte tal quale senza ulteriori trattamenti.

MATERIALI E METODI

Il principio del metodo si basa sul fatto che in ambiente alcalino l'ammoniaca reagisce con ipoclorito formando le cloroammine, quindi queste reagiscono con un composto fenolico ed in presenza di sodionitroprussiato si forma l'indofenolo dal classico colore verde-blu (reazione di Berthelot; Fig. 1) [8] la cui intensità, misurata a 700 nm, è direttamente proporzionale alla concentrazione di ammoniaca nel campione. La reazione consiste in una prima fase di preriscaldamento del reagente R1 (derivato fenolico, tampone fosfato e sodio nitroprussiato) con il campione (50 μ l) della dura-

* *Corrispondenza ed estratti:* costante_pinelli@parmalat.net

¹ Parmalat S.p.A., Servizio Qualità Centrale. Via Milano 1, 43044 Collecchio, Parma.

² CDR Biochemical Division. Via F.Crispi 33, 52100 Arezzo.

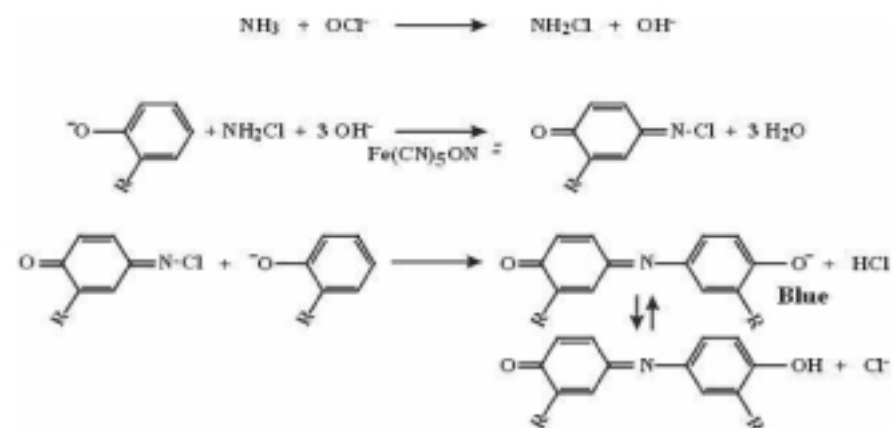


Figura1 – Reazione di Berthelot. I gruppi funzionali sono indicati con R in quanto i reattivi sono oggetto di brevetto industriale.

Figure 1 – Berthelot's reaction. Functional groups are listed with R because the reagents are a patented system.

ta di 5 minuti, e di una seconda fase dove la reazione va ad end-point in 3 minuti dall'aggiunta del reagente R2 (soluzione alcalina; 200µl). Si esegue la lettura spettrofotometrica (700 nm) del bianco al termine della prima fase: successivamente si effettua la lettura spettrofotometrica (700 nm) finale al termine della seconda fase.

Lo strumento viene tarato mediante analisi replicate su tre diversi livelli di concentrazione (per il latte intero da 2,9 ppm a 12,29 ppm, mentre per il latte scremato da 2,06 ppm a 11,29 ppm) (Fig. 2). Gli standard di riferimento sono stati ottenuti mediante aggiunte di una soluzione std di NH₄Cl a 1000 ppm ad un campione di latte a concentrazione nota di NH₃. Le misure di questi standard di riferimento vengono effettuate con elettrodo specifico Orion [4, 5].

Il sistema impiega campioni di latte non pretrattato, microcuvette usa e getta e reagenti pronti all'uso con vuoto a perdere. Il gruppo di lettura ed il gruppo di incubazione (massimo 14 campioni) sono termostatati a 37°C.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Sono stati eseguiti test funzionali sia su campioni di latte intero che su campioni di latte scremato e sono stati verificati i seguenti parametri:

- Omogeneità della varianza
- Linearità
- Analisi della varianza (ANOVA)
- Precisione (ripetibilità inter day e ripetibilità intermedia)

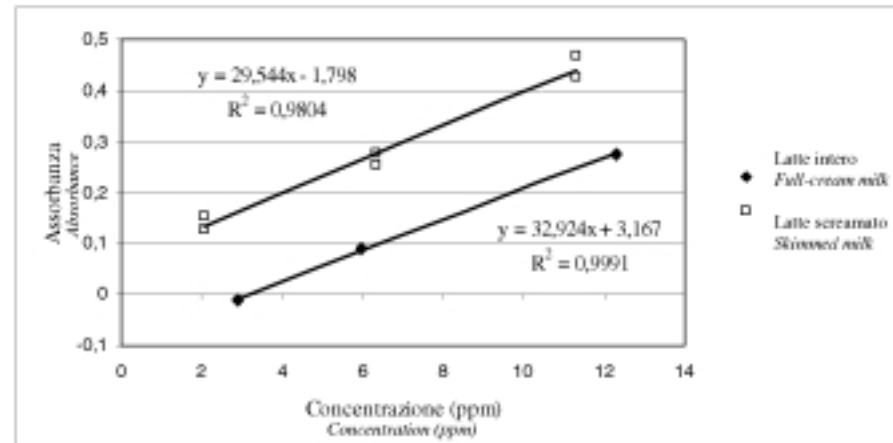


Figura 2 – Rette di calibrazione per il latte intero e scremato
 Figure 2 – Calibration curves of full-cream milk and skimmed milk.

– Andamento della concentrazione nel tempo

Nel figura 2 vengono riportate le rette di calibrazione per il latte intero e scremato. Le rette ottenute sono state valutate anche in relazione agli errori associati a ciascuno dei coefficienti, intercetta e pendenza, nonché alla significatività dell'intercetta (mediante un t-test). L'omogeneità della varianza è stata verificata mediante il test di Hartley. E' stato usato il test di Mandel per la verifica statistica della linearità.

Dai risultati ottenuti è possibile affermare che la funzione di calibrazione del primo ordine fornisce un modello significativamente adeguato a descrivere la relazione tra X e Y con un intervallo di confidenza del 99% per il latte intero e del 95% per il latte scremato.

L'analisi della varianza (ANOVA) sulla bontà di adattamento del modello lineare ai dati relativi al campione di latte intero ha rilevato come questo sia sufficientemente adeguato a descrivere la relazione tra X e Y con $\alpha=1\%$, mentre per il latte scremato $\alpha=5\%$. Tali risultati sono in accordo con quelli ottenuti dall'analisi dei residui e dalla verifica della linearità del modello (test di Mandel).

La precisione è stata valutata in termini di ripetibilità inter day su cinque livelli di concentrazione, eseguendo tre replicati per ogni livello. Sul latte intero è stato preso in considerazione l'intervallo di concentrazione 2,5 ppm - 8,93 ppm, mentre per il latte scremato il range selezionato è compreso tra 2,16 ppm e 12,29 ppm. I parametri valutati sono stati: varianza della ripetibilità, scarto tipo della ripetibilità, ripetibilità, coefficiente di variazione (CV%) ed intervallo di confidenza (IC).

Per l'analisi della ripetibilità intermedia è stata effettuata una serie di

misure, su soluzioni standard a concentrazione nota di ammoniaca, in tempi diversi e da differenti operatori ma all'interno di uno stesso laboratorio. Il range di concentrazione analizzato è compreso tra 2,59 ppm e 14,76 ppm per il latte intero, tra 2,61 ppm e 12,66 ppm per il latte scremato. All'interno di tale intervallo sono stati analizzati otto livelli di concentrazione e due replicati per ogni livello.

Infine è stata valutata la variazione della concentrazione di NH_3 in campioni di latte in funzione del tempo.

Per poter effettuare tale analisi gli standard a concentrazione nota di ammoniaca, preventivamente congelati, sono stati trattati con un blando riscaldamento termico per ottenerne un delicato e omogeneo scongelamento.

In particolare sono state replicate misure sullo stesso campione di latte intero a distanza di 24 (T_1) e 72 ore (T_2) dalla prima misurazione (T_0) (Fig.

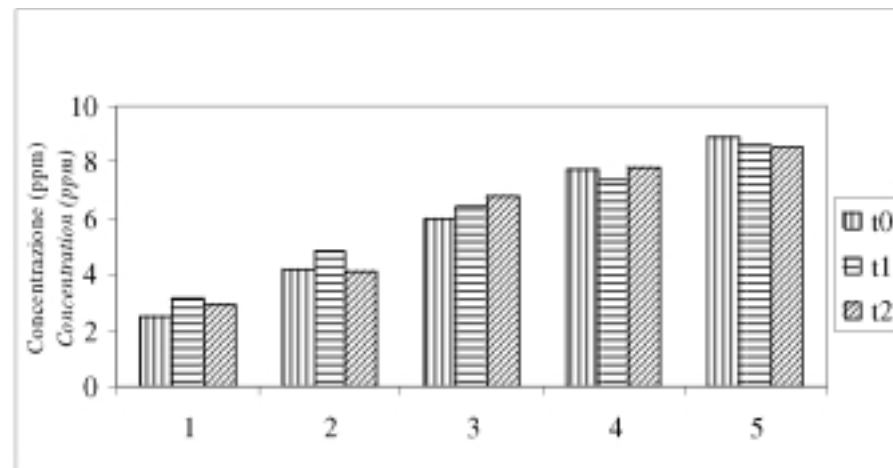


Figura 3 – Andamento in funzione del tempo di NH_3 in campioni di latte intero: $t_1=24$ ore; $t_2=72$ ore.

Figure 3 - Concentration of NH_3 over a period of time for samples of whole milk: $t_1=24$ hours; $t_2=72$ hours.

3), e dopo 24 (T_1) e 48 ore (T_2) per il latte scremato (Fig. 4).

CONCLUSIONI

E' stata osservata la variazione di concentrazione di NH_3 nel tempo in campioni di latte congelato, per confermare l'assenza di effetti sulle misure dovuti al congelamento, in accordo con le stesse osservazioni effettuate con il metodo potenziometrico: nel tempo il valore di NH_3 del latte congelato non cambia.

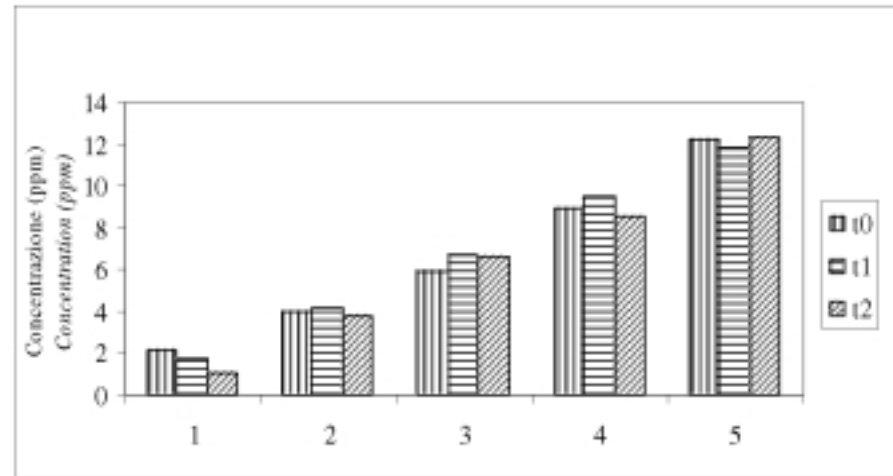


Figura 4 – Andamento in funzione del tempo di NH₃ in campioni di latte scremato: t1=24 ore; t2=48 ore.

Figure 4 – Concentration of NH₃ over a period of time for samples of skim milk: t1=24 hours; t2=48 hours.

A differenza dell'elettrodo specifico, dove è previsto un impiego maggiore di tempo, manualità, vetreria e reagenti oltre che ad una particolare attenzione durante la misura, il sistema CDR fornisce un risultato direttamente espresso in termini di concentrazione di ammoniaca presente nel campione di latte e non richiede né trattamenti preliminari del campione né l'impiego di vetreria e reagenti diversi da R2 (soluzione alcalina) in soli 8 minuti.

RIASSUNTO – Scopo del lavoro è stato quello di valutare la funzionalità dello spettrofotometro CDR Foodlab per l'analisi dell'ammoniaca nel latte. Come metodo di riferimento è stato utilizzato l'elettrodo specifico Orion. Ruolo di rilievo è stato riservato alla praticità, infatti, se da un lato lo strumento CDR richiede una ridotta manualità legata alla sola addizione del reattivo R2, l'analisi condotta mediante l'elettrodo specifico prevede un impiego più consistente di manodopera, vetreria e reagenti: in particolare, con l'elettrodo specifico, risulta necessaria la preparazione di uno standard a concentrazione nota di cloruro d'ammonio (1000 ppm) ed una soluzione di soda 0,1N da aggiungere al campione, con il conseguente utilizzo di apposita vetreria (beacker, pipette, agitatori magnetici...). Anche la lettura del dato non risulta immediata in quanto richiede un'attenta valutazione all'interno della scansione dei mV al fine di rilevare correttamente il raggiungimento del plateau e la conversione del risultato in ppm di

ammoniaca tramite l'impiego di una apposita tabella.

Parole chiave: ammoniaca, misure potenziometriche, reazione di Berthelot

ABSTRACT – *Quick determination of ammonia in whole milk and skim milk.*

– The content of NH_3 , as last metabolite of the microbial activity on the nitrogenous components of the milk, has been confirmed as useful and rapid index of the hygienic quality of the large mass raw milk. Ammonia amount, as index of proteolytic residual activity, is useful to the milk selection for different technological process, particularly for the “direct” UHT sterilization and some cheese production. The methods generally reported for single samples, a potentiometric measures [4] utilizing specific electrode with the additions method, or automated “segmented flow” system for the analysis in great series that needs dialysis of the samples before photometric determination of the resultant indophenolic derivative. The system object of the present study, based on Berthelot reaction followed by photometric measurement, allows a rapid execution (8 minutes) of extemporaneous measures such to express acceptability of the batch in real time with analytical skill reduced to the least and working on the raw milk without further treatments.

Keywords: ammonia, potentiometric measures, Berthelot's reaction

BIBLIOGRAFIA

- 1) Sato H, Kurosawa T, Oikawa S (2001). *Levels of ammonia and other nitrogenous metabolites in dairy cow milk*. Dairy Science Abstract, 63, 6.
- 2) Pinelli C (1990). *Ammonia content of milk, a quality index*. Posters and Brief Communications of the XXIII International Dairy Congress Montreal, October 8-12, 266.
- 3) Pinelli C (1990). *Ammonia in milk, a quality index*. Sci. Tecn. Latt.-Cas., 42, 7-28.
- 4) Orion Research (1981). Instruction manual Ammonia electrode.
- 5) Helaine E (1977). [*Dosage of ammonia by specific electrode*]. Industries Alimentaries et Agricoles, 581.
- 6) Krom M (1980). *Spectrophotometric determination of ammonia; A study of a modified Berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate*. The Analyst 105,305-316.
- 7) Verdouw H (1977). *Ammonia determination based on indophenol formation with sodiumsalicylate* Water research, 12, 399-402
- 8) Berthelot MPE (1859). Repertoire de Chimie Appliquee, 1, 284.