

Costante Pinelli*, Francesco Venè*, Evaristo Dallaturca*, Beatrice Tedeschi*, Francesco Bonicolini**

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

**CDR Food Diagnostics Division, Ginestra Fiorentina – Firenze, Italy

Introduzione:

Il contenuto di NH₃ quale ultimo metabolita (1) (2) 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).

Il parametro è utilizzato come indice di attività proteolitica residua, utile alla selezione del latte per diversi trattamenti tecnologici, in particolare per la sterilizzazione del latte U.H.T. con trattamento di tipo "diretto" e per particolari lavorazioni casearie.

I metodi sino ad ora utilizzati fanno riferimento per campioni singoli, a misure potenziometriche (3) mediante elettrodo specifico (4) 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 (5) (6).

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.

Principio del metodo:

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-bleu (reazione di Berthelot) (7) la cui intensità, misurata a 700 nm, è direttamente proporzionale alla concentrazione di ammoniaca nel campione.

Procedimento:

La reazione consiste in una prima fase di preriscaldamento del reagente **R1** (derivato fenolico, tampone fosfato e sodio nitroprussiato) con il campione (50µl) della durata 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.

Calibrazione e Test funzionali:

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) (Grafici 1-2).

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 std di riferimento vengono effettuate con elettrodo specifico (Orion).

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.

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)
- Andamento della concentrazione nel tempo

Conclusioni:

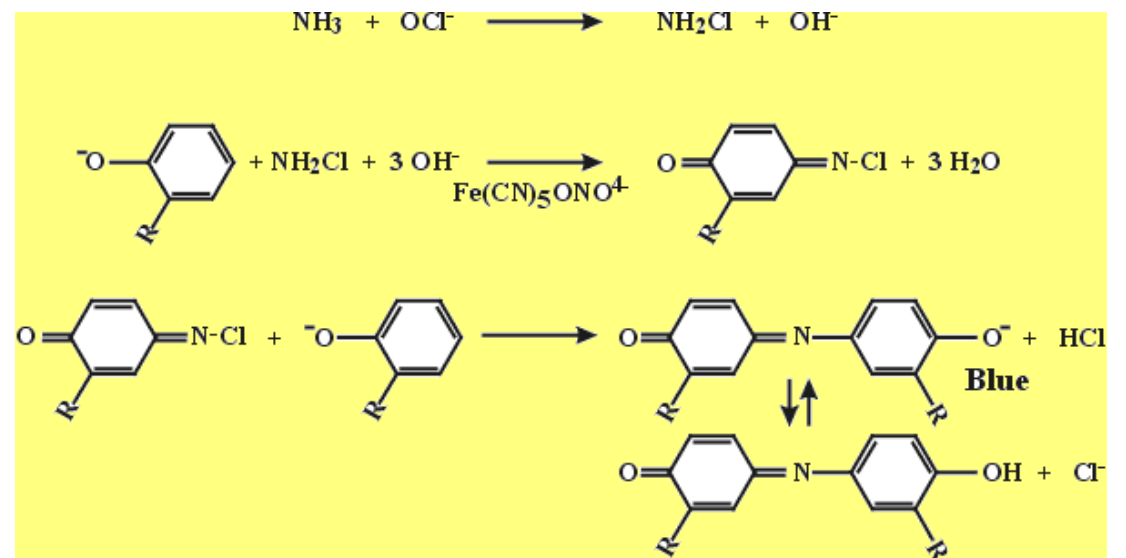
E' stata osservata la variazione di concentrazione di NH₃ nel tempo in campioni di latte congelato, per confermare l'assenza di effetti sulle misure dovuti al congelamento (Grafico 2), in accordo con le stesse osservazioni effettuate con il metodo potenziometrico: nel tempo il valore di NH₃ del latte congelato non cambia.

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.

Bibliografia:

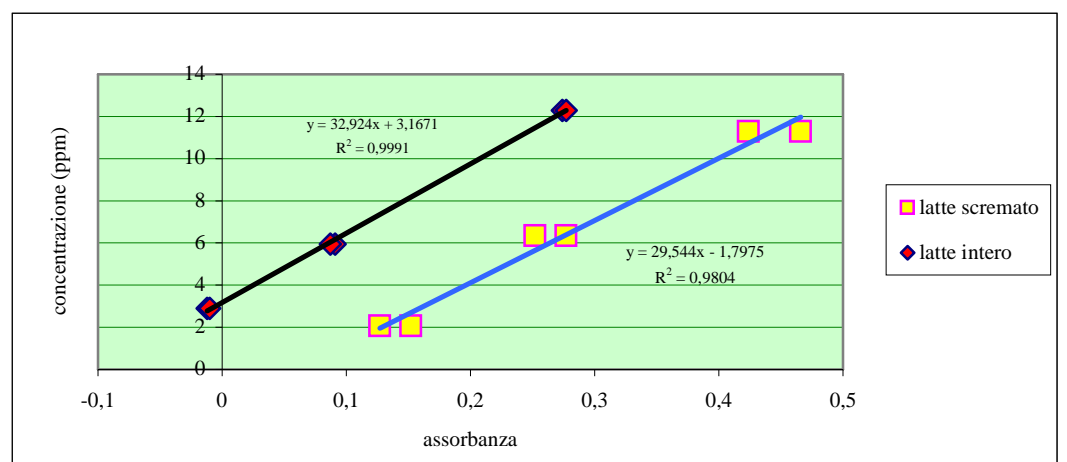
- 1) SATO, H.; KUROSAWA, T.; OIKAWA, S. *Levels of ammonia and other nitrogenous metabolites in dairy cow milk.* Dairy Science Abstract 2001 Vol. 63 No. 6
- 2) C. PINELLI, *Ammonia in milk, a quality index.* Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia 42, (1), 7-28 (1991)
- 3) Posters and Brief Communications of the XXIII International Dairy Congress Montreal, October 8-12, 1990
- 4) ORION RESEARCH, Instruction manual Ammonia electrode (1981)
- 5) E. HELAINE, *Dosage de l'ammoniaque dans le lait par électrode spécifique.* Industries Alimentaires et Agricoles, 581 (1977)
- 6) KROM, M., *Spectrophotometric determination of ammonia: A study of a modified Berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate.* The Analyst (1980) 105 p. 305-316
- 7) VERDOUW, H., *Ammonia determination based on indophenol formation with sodiumsalicylate.* Water research (1977) 12, p. 399-402
- 7) M.P.E. BERTHELOT, *Repertoire de Chimie Appliquée*, 1859, 1, 284, 1859

Reazione di Berthelot:

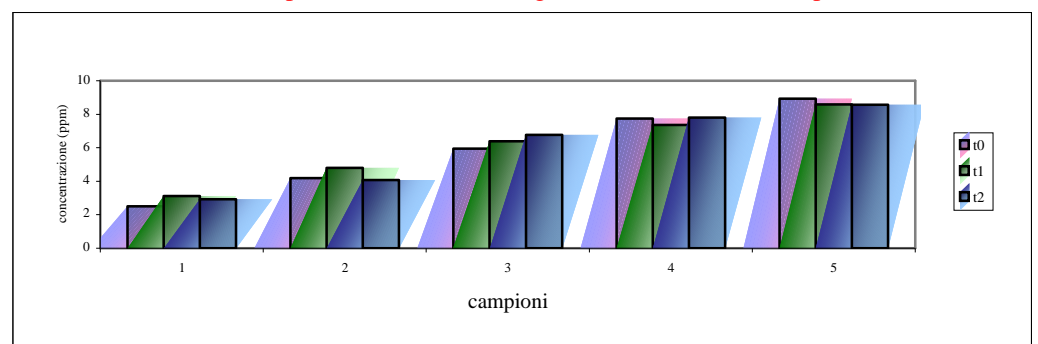


NB: i gruppi funzionali sono indicati con R in quanto i reattivi sono oggetto di brevetto industriale.

Rette di calibrazione (Grafico 1)



Andamento di NH₃ in campioni di latte intero congelato in funzione del tempo (Grafico 2)



Bibliografia: