



RELAZIONE DEI TEST FUNZIONALI ESEGUITI SULLO STRUMENTO **FOOD LAB**

Nel periodo di luglio-ottobre 2001 sono state eseguite 2500 prove per verificare il funzionamento dello strumento **FoodLab**, fornito da **CDR S.r.l.** (Via degli Artigiani, 6 – 50020 Ginestra F.na – FIRENZE Tel. +39 055871431 Fax. +39 0558714322) per la determinazione dell'urea nel latte.

Lo strumento è realizzato con tecnologia spettrofotometrica e microelettronica, con lettura tramite dispositivi a stato solido e filtri interferenziali. Lo strumento è portatile (lunghezza 315mm, larghezza 190mm, altezza 165mm, peso 2500gr) e necessita di una normale presa di alimentazione da 12 Vcc. Il gruppo di lettura ed il gruppo di incubazione (massimo 14 pozzetti) sono termostatati a 37°C. Il sistema impiega campioni di latte non pretrattato e microcuvette dedicate, pronte all'uso, con reagenti predispensati e vuoto a perdere.

La reazione si basa sulla trasformazione dell'urea in ammoniaca da parte dell'ureasi. Gli ioni ammonio reagiscono quindi con un derivato fenolico e formano un complesso colorato verde-blu la cui intensità, misurata a 700nm, è direttamente proporzionale alla concentrazione di urea nel campione. La reazione consiste in una prima fase di preriscaldamento del reagente R1 con il campione (5µl) della durata di 5 minuti, e di una seconda fase dove la reazione va in end point dopo 3 minuti dall'aggiunta del reagente R2. Il sistema può essere standardizzato mediante l'utilizzo di tre o più campioni di standard latte.

Le prove sono state realizzate nel Laboratorio Standard Latte (LSL) dell'Associazione Italiana Allevatori (A.I.A.). Il laboratorio, dal 1997, è accreditato dal Sinal con n° 0138 per sei prove nel settore lattiero-caseario, tra cui la determinazione dell'urea con lo strumento a pH-metria differenziale EFA Instrument, Hamilton-Eurochem. Inoltre il sistema qualità del laboratorio è certificato UNI EN ISO 9001: 94 per la preparazione e commercializzazione di materiale di riferimento, materiale di riferimento certificati nel settore lattiero caseario e progettazione, organizzazione e realizzazione di prove valutative interlaboratorio (1999).



Presso il Laboratorio Standard Latte è stato stilato un Piano di Progetto (PdP) in cui viene riportata la descrizione del protocollo operativo.

I test inizialmente sono stati eseguiti per il latte vaccino e successivamente estesi al latte ovino e bufalino.

Al latte utilizzato, fornito dal Laboratorio Standard Latte, è stato aggiunto Bronopol Tecnico alla concentrazione dello 0,02%. Non è possibile analizzare campioni di latte trattati con Blu di Metilene perché lo strumento misura nello spettro del blu-verde.

Il latte, proveniente sia da capi singoli che da campioni di massa, è stato solo riscaldato per rendere omogenea la matrice e non ha subito ulteriori trattamenti preventivi.

I test funzionali eseguiti sono:

1. Determinazione della velocità di analisi
2. Controllo della temperatura di ogni singolo pozzetto
3. Prove di ripetibilità
4. Controllo della taratura dello strumento
5. Controllo della linearità dello strumento
6. Prove di recupero e di sensibilità
7. Controllo della variazione dei lotti
8. Prove di controllo per l'interferenza del grasso

I test, dal n°3 al n°8, sono stati ripetuti più volte nell'arco del tempo per il latte vaccino e bufalino. Per il latte ovino, considerato intermedio tra il bufalino ed il vaccino per i macrocomponenti, i test sono stati ripetuti una sola volta.

1. DETERMINAZIONE DELLA VELOCITA' REALE DI ANALISI

La velocità reale dello strumento è di 48 analisi/h. Questo valore è stato ottenuto analizzando 14 campioni per volta (quantità massima di cuvette per lo strumento) tenendo in considerazione la velocità dell'operatore e i tempi di reazione prestabiliti dallo strumento (5 minuti per la reazione mediata dall'ureasi che trasforma l'urea in ammoniaca, e 3 minuti per la reazione colorimetrica).

Le misurazioni sono state effettuate al termine del riscaldamento dello strumento che arriva alla temperatura standard dopo 10 minuti.

La velocità nominale dello strumento è di 60 analisi/h.



2. CONTROLLO DELLA TEMPERATURA DI OGNI SINGOLO POZZETTO

Utilizzando delle cuvette vuote si è potuta determinare la temperatura di ogni singolo pozzetto impiegando un termometro di seconda linea tarato per confronto con un campione di riferimento termometro digitale Delta Ohm con sonda PT100 tarato presso il centro Sit n° 20/M/E certificato n° 1341.

Le cuvette sono state riempite con uguali volumi di acqua (approssimativamente 1ml). Sono state eseguite 10 misurazioni di ogni singolo pozzetto al termine del riscaldamento dello strumento, dopo 30 minuti, un'ora ed al termine della giornata lavorativa (dieci letture in tutto).

Come si può osservare dalla tabella 1, lo strumento mantiene, in ogni singolo pozzetto, una temperatura di $37^{\circ}\text{C} \pm 0,4^{\circ}\text{C}$. Il limite di accettabilità dello strumento è di $37^{\circ}\text{C} \pm 1$.

Tabella 1: Controllo della temperatura dei pozzetti. Per ogni singolo pozzetto sono state effettuate 10 misurazioni.

DS: deviazione standard dalla media

cv: (coefficiente di variazione) è il rapporto tra deviazione standard e la media delle misurazioni.

POZZETTI	VALORI MEDI (n = 10)	DS	cv	MAX	MIN
1	37,4	0.3	0,9	37,9	36,8
2	37,3	0.4	1,2	37,8	36,4
3	37,5	0.3	0,9	38,0	36,9
4	37,5	0.2	0,6	37,8	37,1
5	37,5	0.3	0,9	37,9	36,9
6	37,4	0.6	1,6	36,3	37,9
7	37,4	0.4	1,1	37,9	36,8
8	37,6	0.3	0,9	38,0	37,1
9	37,6	0.2	0,6	37,9	37,2
10	37,4	0.2	0,7	37,8	37,1
11	37,4	0.6	1,6	37,9	36,6
12	37,5	0.5	1,3	37,9	37,6
13	37,9	0.3	0,8	38,3	37,3
14	37,7	0.6	1,6	38,4	36,8
15	37,8	0.4	0,9	38,2	37,2

**3. PROVE DI RIPETIBILITA'****• 10 RIPETIZIONI SULLO STESSO CAMPIONE**

Analizzando cinque campioni di latte, sono state eseguite 10 analisi di ciascun campione in 10 cuvette diverse.

La deviazione standard totale (indice della ripetibilità), calcolata dagli scarti totali dalle medie di tutte le misurazioni ottenute è di 0,67mg/dl per il latte vaccino, di 0,74mg/dl per il latte bufalino e di 0,72mg/dl per il latte di pecora.

Tabella 2a: Prove di ripetibilità su cinque diversi campioni di latte vaccino. I valori riportati sono espressi in mg/dl.

Letture	Camp. 1	Camp. 2	Camp.3	Camp.4	Camp.5
1	27.3	26.0	39.7	36.0	32.0
2	27.3	27.8	39.8	35.3	32.5
3	28.6	26.6	40.0	36.7	32.0
4	28.0	25.4	39.1	37.0	32.0
5	28.7	25.9	37.8	36.6	32.3
6	27.4	25.3	40.0	36.4	32.4
7	27.8	26.0	39.1	36.6	32.5
8	28.2	25.8	39.7	36.6	32.8
9	27.4	25.9	39.5	35.6	32.2
10	27.6	26.2	38.5	36.0	32.4
MEDIA	27.83	26.09	39,32	36.28	32.31
DS ±	0.53	0.70	0,71	0.54	0.26
cv %	1,89	2,7	1.81	1,48	0,82
MIN	27,30	25,30	37.80	35,30	32,2
MAX	28,70	27,80	40,00	37,00	32,8



Tabella 2b: Prove di ripetibilità su cinque diversi campioni di latte di bufala. La deviazione standard, derivata dagli scarti dalla media di tutti i valori, risulta essere di 0,74 mg/dl

Letture	Camp. 1	Camp. 2	Camp.3	Camp.4	Camp.5
1	44,9	49,3	46,0	44,6	43,6
2	43,2	49,8	46,6	44,3	42,5
3	42,9	49,0	45,6	44,3	43,6
4	43,7	48,8	44,9	43,9	43,3
5	43,2	50,6	46,1	43,7	42,5
6	43,1	48,8	44,7	44,1	41,8
7	41,9	48,5	45,2	45,6	42,3
8	42,7	49,5	46,9	44,1	44,1
9	42,5	48,6	45,4	44,0	43,1
10	43,1	48,9	44,3	–	45,1
MEDIA	43,12	49,18	45,57	44,29	43,19
DS ±	0,79	0,64	0,84	0,56	0,97
cv %	1,83	1,31	1,83	1,25	2,25
MIN	41,90	48,50	44,30	43,70	41,80
MAX	44,90	50,60	46,90	45,60	45,10



Tabella 2c: Prove di ripetibilità su cinque diversi campioni di latte di pecora. Il campione 1 e 2 sono di massa, gli altri sono di singolo capo. La deviazione standard totale è di 0,72mg/dl, ottenuta dagli scarti di tutti i valori.

Letture	Camp. 1	Camp. 2	Camp.3	Camp.4	Camp.5
1	36,0	36,0	38,3	37,6	41,1
2	35,2	34,2	37,3	38,1	40,7
3	35,3	36,3	38,0	36,0	41,8
4	36,0	35,1	37,6	38,1	40,2
5	35,6	35,5	36,2	40,0	41,1
6	36,0	35,4	37,2	39,0	40,1
7	35,9	35,2	36,4	38,4	40,9
8	36,1	35,3	38,3	38,3	41,7
9	35,3	35,4	38,3	39,8	41,1
10	36,3	36,0	38,4	39,0	41,9
MEDIA	35,77	35,44	37,60	38,43	41,06
DS ±	0,39	0,59	0,81	1,15	0,62
cv %	1,09	1,66	2,16	2,98	1,52
MIN	35,20	34,20	36,20	36,00	40,10
MAX	36,30	36,30	38,40	40,00	41,90

- **10 RIPETIZIONI DI LETTURA DELLA STESSA CUVETTA**

Dopo aver aggiunto i 5µl di latte, e trascorsi i 5 minuti di reazione, sono state effettuate 10 letture del tampone R1 della stessa cuvetta; successivamente è stato aggiunto il secondo reattivo (R2) e, trascorsi i 3 minuti di reazione, sono state eseguite le 10 letture del campione. Si è così potuta verificare la stabilità di lettura dello strumento.

Le letture, realizzate in triplice analisi, mostrano come non ci sia variazione, da parte dello strumento, nella misurazione dei campioni. Infatti l'ottima ripetibilità dei dati è evidenziata da una deviazione standard degli scarti dalla media di tutti i valori di 0,1mg/dl per il latte vaccino, 0,4mg/dl per il latte bufalino e di 0,15mg/dl per il latte di pecora.



Tabella 3a: Prove di lettura sulla stessa cuvetta di un solo campione di latte vaccino, analizzato per tre volte (1° analisi, 2° analisi e 3° analisi) per verificare la stabilità dello strumento.

Letture	1°analisi	2°analisi	3°analisi
1	29,6	30,8	29,8
2	29,5	30,5	29,7
3	29,5	30,6	29,8
4	29,4	30,3	29,7
5	29,5	30,5	29,5
6	29,5	30,5	30,0
7	29,5	30,2	29,9
8	29,6	30,6	30,0
9	29,4	30,5	29,8
10	29,5	30,4	29,7
MEDIA	29,5	30,49	29,79
DS ±	0,067	0,166	0,152
cv %	0,225	0,545	0,511
MIN	29,40	30,20	29,50
MAX	29,60	30,80	30,00



Tabella 3b: Prove di lettura della stessa cuvetta di un solo campione di latte bufalino, analizzato per tre volte (analisi 1, 2, e 3)

Letture	1°analisi	2°analisi	3°analisi
1	43,3	45,2	44,4
2	43,4	45,3	44,9
3	43,5	44,9	44,7
4	43,2	44,8	44,8
5	43,4	44,8	44,8
6	43,2	44,8	45,0
7	43,3	44,9	44,9
8	43,3	44,6	44,7
9	43,0	45,0	44,6
10	43,1	45,1	44,8
MEDIA	43,27	44,94	44,76
DS ±	0,15	0,21	0,17
cv %	0,35	0,47	0,38
MIN	43,50	45,30	45,00
MAX	43,00	44,60	44,40



Tabella 3c: Prove di lettura della stessa cuvetta di un solo campione di latte di pecora, analizzato per tre volte (analisi 1, 2, e 3)

Letture	1°analisi	2°analisi	3°analisi
1	38,8	41,2	36,0
2	38,7	41,1	36,0
3	38,6	41,1	36,0
4	38,7	40,9	35,3
5	38,5	40,9	35,8
6	38,7	40,9	35,8
7	38,9	41,1	35,7
8	38,8	40,8	35,8
9	38,4	41,0	35,8
10	38,6	40,8	35,9
MEDIA	38,67	40,98	35,81
DS ±	0,15	0,14	0,21
cv %	0,39	0,34	0,58
MIN	38,40	40,80	35,30
MAX	38,90	41,20	36,00

- **VERIFICA DEL TEMPO DI STABILITA' DEL TAMPONE E DEL COLORE**

Sono state realizzate le letture dell'assorbanza del tampone R1 (derivato fenolico che trasforma l'urea in ammoniaca) dal momento in cui sono stati aggiunti i 5 µl di latte, e dopo 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 minuti.



Tabella 4: Sono riportati i valori medi dell'assorbanza derivati da 10 misurazioni ciascuno rispetto al tempo espresso in minuti.

MINUTI	ASSORBANZA n = 10
0	84,7
5	84,9
10	84,0
15	81,8
20	81,6
25	84,1
30	84,0
40	82,2

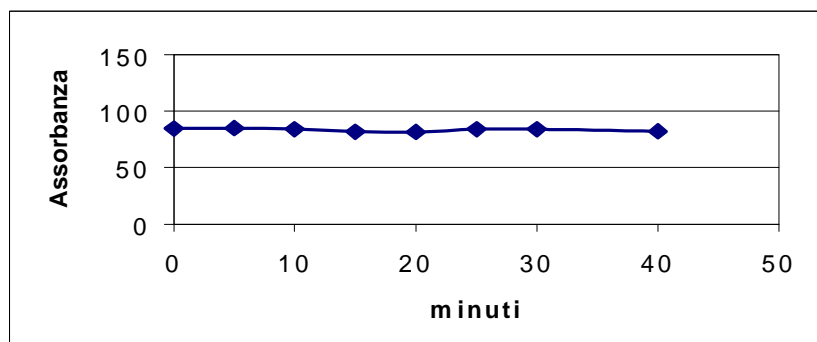


Grafico 1: Andamento della curva di stabilità del tampone. Sull'asse delle ascisse viene riportato il tempo espresso in minuti e sulle ordinate i valori medi dell'assorbanza.

Dal grafico si può notare come la curva si mantenga costante dall'aggiunta del campione di latte fino a dopo 15 minuti, trascorsi i quali, i valori dell'assorbanza iniziano lievemente a decrescere.

Dopo aver aggiunto i 5 µl di latte ed aver permesso la prima reazione di 5 minuti, si aggiunge il reattivo R2 (soluzione alcalina che determina la reazione colorimetrica), al campione e si procede direttamente alla lettura del colore secondo le modalità descritte precedentemente. Il tempo zero corrisponde ai 3 minuti successivi dall'aggiunta di R2



(tempo di reazione in cui l'ammoniaca reagisce con la soluzione alcalina formando un complesso verde).

Tabella 5: Sono riportati i valori medi dell'assorbanza derivati da 10 misurazioni ciascuno. Il tempo zero corrisponde al termine dei tre minuti della reazione colorimetrica

MINUTI	ASSORBANZA n = 10
0	770,1
5	775,9
10	771,0
15	767,2
20	767,2
25	763,8
30	760,0
40	755,7

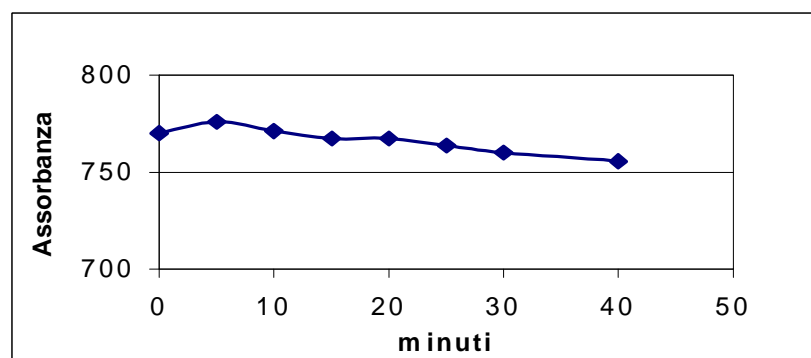


Grafico 2: Andamento della curva di stabilità del colore. Il tempo zero corrisponde al termine della reazione colorimetrica. Sulle ordinate sono riportati i valori medi dell'assorbanza e sulle ascisse il tempo espresso in minuti.

In questo caso la curva segue un andamento inizialmente ascendente e, trascorsi 20 minuti, la pendenza inizia a decrescere.



La variazione della curva, comunque, non influenza significativamente il risultato finale, in quanto il valore della concentrazione di urea è dato dalla differenza tra il colore ed il tampone, moltiplicata per il fattore K della retta e sommata al fattore q (secondo l'equazione $y = Kx + q$).

Questa prova, per il latte bufalino e di pecora, non ha presentato differenze dal latte vaccino nell'andamento della curva. Ovviamente i valori di assorbanza risultano essere più alti per entrambi, essendo il latte delle due specie, molto più grasso del vaccino.

- **INFLUENZA DELLO SMISTAMENTO**

E' stato aliquotato il campione di latte in 10 Eppendorf differenti (a, b, c, d, e, f, g, h, i, l) e sono state effettuate delle letture random in duplice analisi sulle aliquote, per controllare che un'eventuale disomogeneità del latte non influenzi la misurazione da parte dello strumento.

I risultati ottenuti hanno evidenziato una deviazione standard dalla media di $\pm 0,50$ $\mu\text{g/dl}$.

Nella tabella sono riportati i valori medi delle misurazioni e la media, con la relativa deviazione standard, delle letture totali.



Tabella 6: Letture random di un unico campione di latte smistato in 10 Eppendorf.

Di ciascuna aliquota sono riportati i valori medi. La media e la relativa deviazione standard sono riferite alle letture totali.

LETTURE RANDOM	VALORI MEDI (n = 2)
a	31,0
g	31,0
i	30,6
e	31,8
l	30,6
b	31,0
d	31,0
h	31,5
c	31,3
f	31,4
MEDIA	31.1
DS	0.5
cv	1.5
MIN	30.6
MAX	31.8

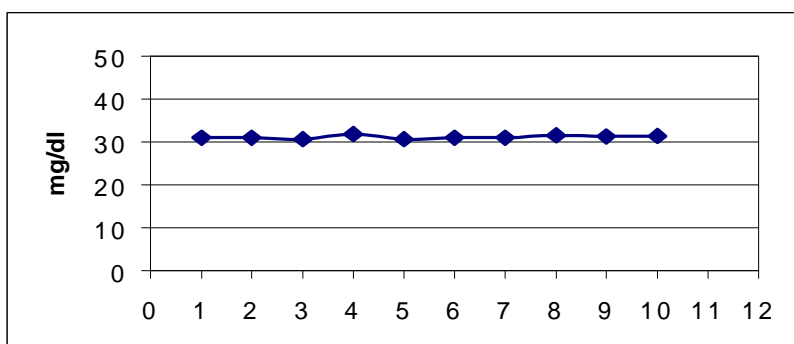


Grafico 3: Andamento dello smistamento di un campione di latte aliquotato in 10 Eppendorf. Sulle ordinate vengono riportati i valori della concentrazione di urea espressa in mg/dl, e sulle ascisse le 10 misurazioni.



Lo stesso campione di latte è stato aliquotato anche in 5 provette da 100ml (A, B, C, D ed E), sui quali sono state condotte delle misurazioni random in duplice analisi.

I risultati ottenuti hanno evidenziato una deviazione standard dalla media di 0.60 mg/dl.

Tabella 7: Letture random di un unico campione di latte smistato in 5 provette da 100ml.

Di ciascuna aliquota sono riportati i valori medi. La media e la relativa deviazione standard sono riferite alle letture totali.

LETTURE RANDOM	VALORI MEDI (n = 2)
A	30.5
E	30.9
C	30.3
D	29.9
B	30.1
C	30.9
B	30.9
C	31.2
E	30.9
D	30.6
MEDIA	30.6
DS	0.5
cv	1.7
MIN	29.9
MAX	31.2

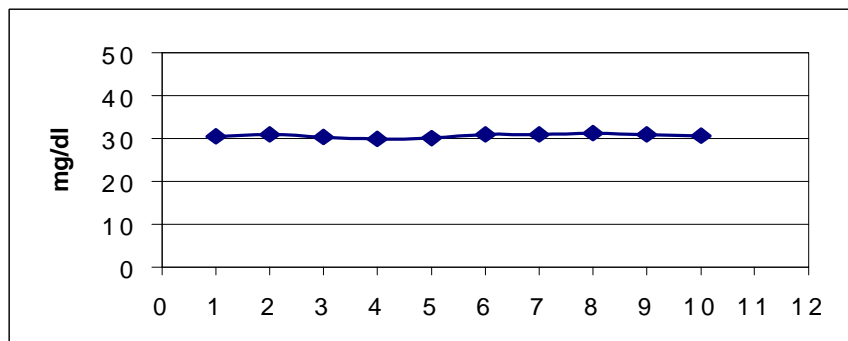


Grafico 4: Andamento dello smistamento di un campione di latte aliquotato in 5 provette da 100ml. Sulle ordinate i valori delle concentrazione di urea in mg/dl e sulle ascisse le 10 misurazioni.

- **LO STESSO CAMPIONE ANALIZZATO DA OPERATORI DIVERSI**

Lo stesso campione di latte è stato analizzato da due operatori per verificare l'influenza della manualità riportata dal singolo operatore.

Tabella 8: E' stato analizzato lo stesso campione di latte da due operatori diversi. Le concentrazioni sono espresse in mg/dl.

Letture	Operatore 1	Operatore 2	Differenze
1	21,6	20,9	0,7
2	20,6	21,4	0,8
3	21,0	21,0	0,0
4	20,9	21,0	0,1
5	21,1	21,9	0,8
Media	21,0	21,2	0,2
ds ±	0,4	0,4	--
cv %	1,7	2,0	--
Min	20,6	20,9	--
Max	21,6	21,9	--



- **DIFFERENZE TRA CAMPIONI CONGELATI E SCONGELATI**

CONGELAMENTO IN AZOTO LIQUIDO: il campione di latte è stato analizzato alla temperatura di 37°C e successivamente congelato in azoto liquido (il processo di congelamento è stato effettuato il più rapidamente possibile). Il campione è stato quindi scongelato in un bagnetto termostato a 40°C ed analizzato. Tutto il procedimento di congelamento e scongelamento, eseguito cinque volte nel corso della giornata, è stato realizzato su tre campioni, ciascuno letto in duplice analisi.

Nessun campione presenta delle variazioni rilevanti (la deviazione standard dalla media è confrontabile con la deviazione standard determinata dalle prove di ripetibilità).

Tabella 8a: In tabella vengono riportati i valori medi di ciascuna aliquota (1,2 e 3) di latte vaccino durante i 5 procedimenti di congelamento in azoto liquido e scongelamento a 40°C.

Cong.- scong.	Aliquota 1 (n = 2)	Aliquota 2 (n = 2)	Aliquota 3 (n = 2)
0	31.70	31.35	31.75
1	32.35	32.70	31.90
2	31.70	31.70	31.95
3	31.75	32.35	32.05
4	32.55	32.55	32.95
5	32.25	33.30	32.50
ds±	0,77	0,83	0,52
MIN	31.70	31.35	31.75
MAX	32.35	33.30	32.95

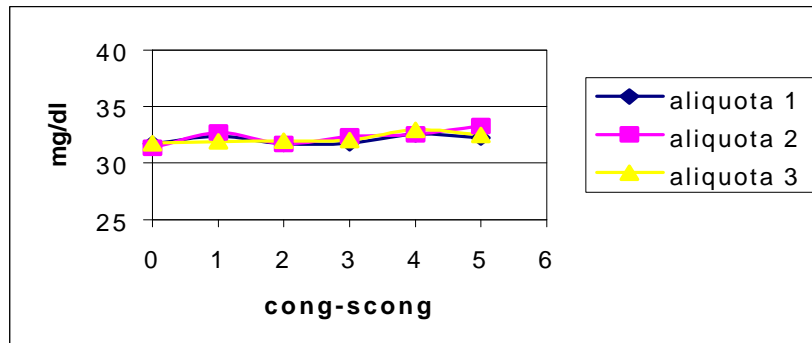


Grafico 5a: Dal grafico si può osservare come non ci sia variazione di concentrazione di urea espressa in mg/dl (riportata sulle ordinate) in seguito ai 5 processi di congelamento in azoto liquido e scongelamento a 40°C (sulle ascisse).

Tabella 8b: In tabella vengono riportati i valori medi di ciascuna aliquota (1,2 e 3) di latte bufalino durante i 5 procedimenti di congelamento in azoto liquido e scongelamento a 40°C.

cong.- scong.	Aliquota 1 (n = 2)	Aliquota 2 (n = 2)	Aliquota 3 (n = 2)
0	46,40	46,90	48,00
1	47,25	48,05	48,85
2	47,15	47,80	47,80
3	47,30	47,70	48,40
4	47,75	49,95	48,60
5	46,75	48,50	48,75
ds±	0.47	1.02	0.42
MIN	46.40	46.90	47.80
MAX	47.75	49.95	48.85

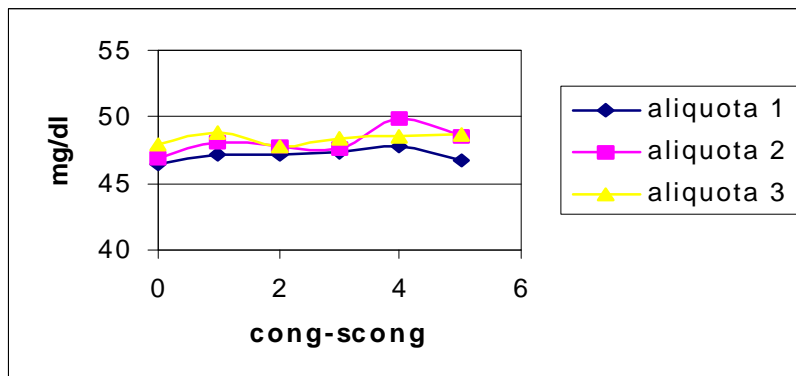


Grafico 5b: Anche per il latte bufalino non si rilevano variazioni in seguito a congelamenti e scongelamenti delle tre aliquote.

Tabella 8c: In tabella vengono riportati i valori medi di ciascuna aliquota (1,2 e 3) di latte di pecora durante i 5 procedimenti di congelamento in azoto liquido e scongelamento a 40°C.

cong.- scong.	Aliquota 1 (n = 2)	Aliquota 2 (n = 2)	Aliquota 3 (n = 2)
0	33,85	32,80	33,25
1	31,80	32,70	32,40
2	32,70	33,05	32,45
3	33,00	33,35	33,55
4	32,50	33,15	33,20
5	34,15	33,35	34,05
ds±	0,87	0,27	0,64
MIN	31,80	33,35	32,40
MAX	34,15	32,70	33,55

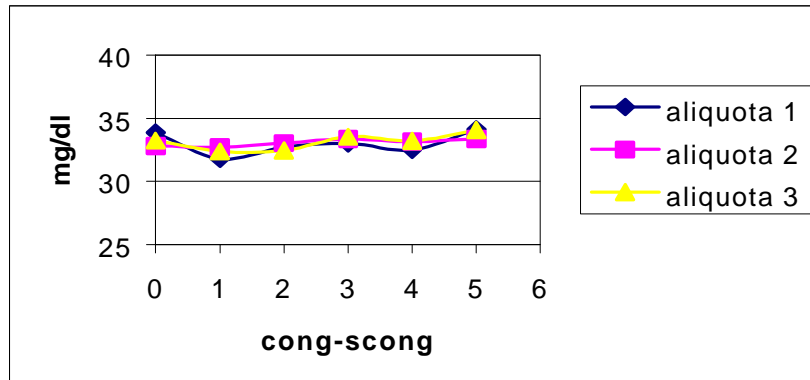


Grafico 5c: Il latte di pecora non subisce variazioni a causa dei congelamenti e scongelamenti delle tre aliquote

CONGELAMENTO IN UN FREEZER PER USO DOMESTICO: il processo di congelamento è stato realizzato anche in un normale freezer domestico, sempre su un campione di latte aliquotato in 3 Eppendorf analizzate in duplice lettura. Lo scongelamento è stato effettuato in un bagnetto termostato a 40°C.



Tabella 9a: In tabella vengono riportati i valori medi di ciascuna aliquota (1,2 e 3) di latte vaccino durante i 5 processi di congelamento in freezer per uso domestico

cong.- scong.	Aliquota 1 (n = 2)	Aliquota 2 (n = 2)	Aliquota 3 (n = 2)
0	30.20	30.70	30.85
1	30.30	29.40	30.60
2	32.00	32.00	31.00
3	30.60	31.35	30.65
4	31.10	31.60	31.00
5	31.25	29.85	30.00
ds±	0,80	1,03	0,47
MIN	30.20	29.40	30.00
MAX	32.00	32.00	31.00

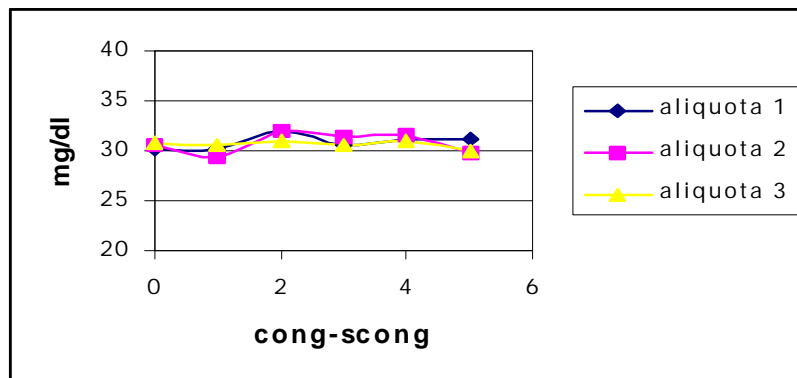


Grafico 6a: Anche i 5 processi di congelamento (sulle ascisse) effettuati in un freezer di uso domestico non comportano variazione della concentrazione di urea (sulle ordinate, espressa in mg/dl) sul latte vaccino.



Tabella 9b: In tabella vengono riportati i valori medi di ciascuna aliquota (1,2 e 3) di latte bufalino durante i 5 processi di congelamento in freezer per uso domestico

cong.- scong.	Aliquota 1 (n = 2)	Aliquota 2 (n = 2)	Aliquota 3 (n = 2)
0	46,70	47,80	47,10
1	47,85	50,90	48,25
2	45,70	46,35	47,70
3	47,95	48,00	47,30
4	48,50	48,40	48,85
5	48,00	49,10	48,65
ds±	1,04	1,51	0,72
MIN	45,70	46,35	47,10
MAX	48,50	50,90	48,85

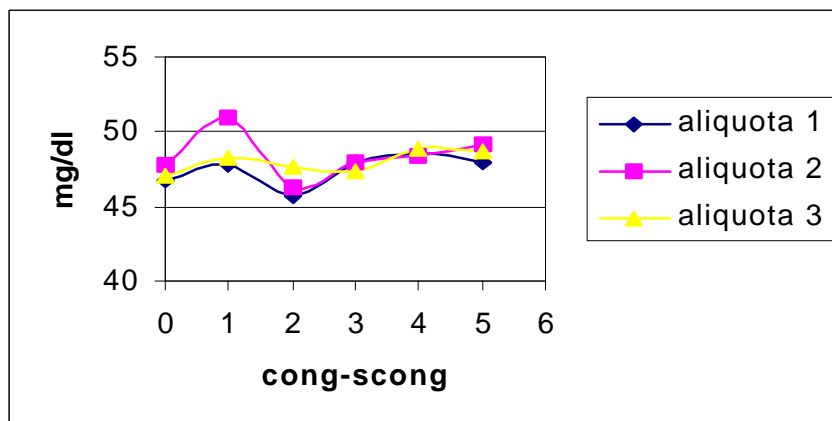


Grafico 6b: I 5 processi di congelamento (sulle ascisse) effettuati in un freezer di uso domestico non comportano variazione della concentrazione di urea (sulle ordinate, espressa in mg/dl) neanche sul latte bufalino.



Tabella 9c: In tabella vengono riportati i valori medi di ciascuna aliquota (1,2 e 3) di latte di pecora durante i 5 processi di congelamento in freezer per uso domestico

cong.- scong.	Aliquota 1 (n = 2)	Aliquota 2 (n = 2)	Aliquota 3 (n = 2)
0	33,05	32,95	33,60
1	33,45	33,25	32,45
2	32,90	32,65	32,75
3	33,15	32,35	33,10
4	33,15	32,95	32,35
5	33,00	33,00	33,95
ds±	0,19	0,31	0,64
MIN	32,90	32,35	32,35
MAX	33,45	33,25	33,95

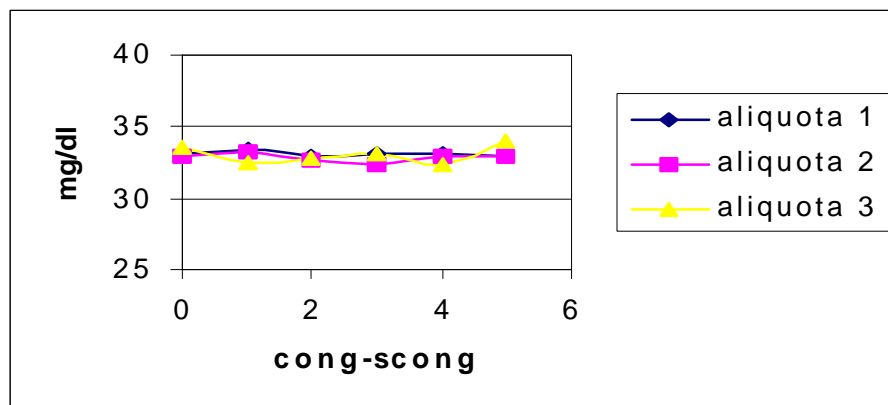


Grafico 6c: I 5 processi di congelamento (sulle ascisse) effettuati in un freezer di uso domestico non comportano variazione della concentrazione di urea (sulle ordinate, espressa in mg/dl) neanche sul latte di pecora.



- VERIFICA DI UN'EVENTUALE EVAPORAZIONE DELL'AMMONIACA IN CAMPIONI DI LATTE MANTENUTI APERTI (CON E SENZA BRNOPOL)

Per stabilire se dal latte può verificarsi un'eventuale evaporazione dell'ammoniaca (con conseguente sottostima della misurazione della concentrazione di urea) sono stati allestiti quattro campioni di latte: a due campioni (A e B) è stato aggiunto Bronopol allo 0,02%, mentre gli altri due (C e D) sono stati conservati senza Bronopol.

A e C sono stati mantenuti a 4°C, chiusi ed analizzati, in triplice lettura, ogni giorno nel corso della settimana.

B e D sono stati mantenuti aperti (coperti da una garza) a 4°C ed analizzati, in triplice lettura, ogni giorno nel corso della settimana.

Si può affermare che non si verifica alcuna evaporazione dell'ammoniaca nelle aliquote lasciate aperte, vista la notevole sovrapposibilità dei punti sulle rispettive curve.

Tabella10: A = campione di latte con Bronopol allo 0,02% mantenuto chiuso per 5 giorni a 4°C

B = campione di latte con Bronopol allo 0,02% mantenuto aperto per 5 giorni a 4°C

C = campione di latte senza Bronopol allo 0,02% mantenuto chiuso per 5 giorni a 4°C

D = campione di latte senza Bronopol allo 0,02% mantenuto aperto per 5 giorni a 4°C

	1° GIORNO	2° GIORNO	3° GIORNO	4° GIORNO	5° GIORNO	MIN	MAX
A(n=3)	29.20	27.83	28.43	27.73	28.40	27.73	29.20
DS_A	0.10	0.55	0.15	0.40	0.50		
B(n=3)	29.30	27.93	28.50	27.50	28.53	27.50	29.30
DS_B	0.45	0.57	0.53	0.75	0.25		
C(n=3)	29.73	28.67	28.10	28.33	27.27	27.27	29.73
DS_C	0.32	0.32	0.35	0.76	0.15		
D(n=3)	29.73	28.63	28.40	28.97	27.87	27.87	29.73
DS_D	0.32	0.06	0.46	0.15	0.25		

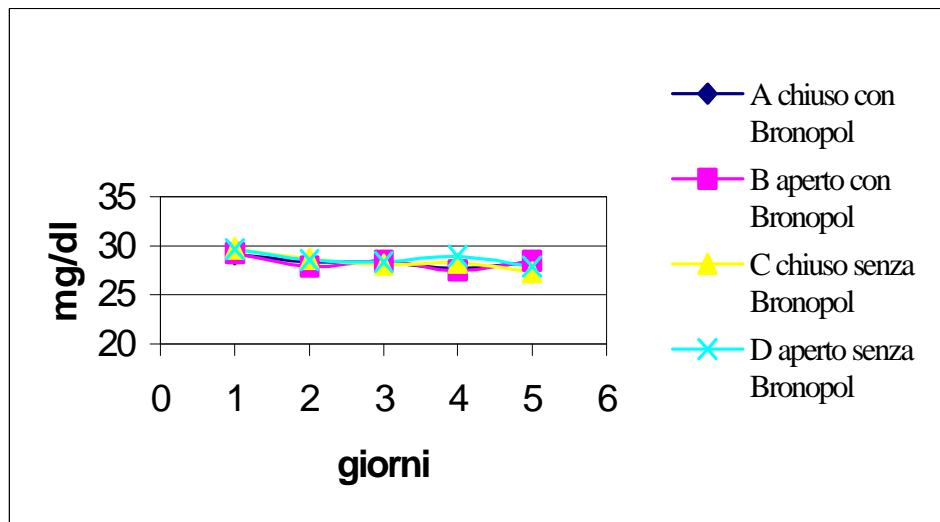


Grafico 7: Confronto tra il campione A (curva blu), B (curva in rosa), C (curva gialla) e D (curva azzurra).

- **RIPETIBILITA' INTERMEDIA**

Lo stesso campione smistato in aliquote diverse e mantenuto a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, è stato analizzato quotidianamente (questa prova è stata associata alla precedente "prova di evaporazione dell'ammoniaca").

Risulta evidente dalla tabella n.10 che non si riscontrano variazioni della concentrazione di urea nel corso della settimana

4. **TARATURA DELLO STRUMENTO**

Lo strumento viene tarato con tre diversi materiali di riferimento che cadono nel range di concentrazione di 15-27-40 mg/dl circa. Questi materiali di riferimento sono stati ottenuti analizzando per 10 volte campioni di latte con lo strumento a pH-metria differenziale EFA Instrument, Hamilton-Eurochem.

Lo strumento viene allineato su una retta di equazione $y = Kx + q$, (passante per i tre punti corrispondenti ai tre valori dei materiali di riferimento), dove K e q sono i coefficienti della retta, e nello specifico K = slope e il q = bias.



- Dopo che lo strumento ha memorizzato i coefficienti K e q in seguito alla standardizzazione, sono stati analizzati i 3 materiali di riferimento come semplici campioni, e i rispettivi valori sono stati confrontati con quelli noti, per verificare la linearità e la stabilità della curva.

Tabella 11: Variazione dei fattori K e q nelle sei tarature effettuate con i materiali di riferimento

r^2 coefficiente di correlazione lineare

STD materiale di riferimento a titolo noto

ANL materiale di riferimento analizzati dopo la taratura

Data taratura	K	q	r^2	STD	ANL	Diff	ds± degli scarti
24/07/01	44.36	-0.44	0.99	<ul style="list-style-type: none">• 19.6• 24.4• 40.8	<ul style="list-style-type: none">• 19.6• 24.8• 39.2	<ul style="list-style-type: none">• 0.0• 0.4• 1.6	0,83
25/07/01	44.31	-0.36	0.99	<ul style="list-style-type: none">• 19.6• 24.4• 40.8	<ul style="list-style-type: none">• 18.6• 24.7• 39.7	<ul style="list-style-type: none">• 1.0• 0.3• 1.1	0,43
27/07/01	44.76	-0.77	0.99	<ul style="list-style-type: none">• 19.6• 24.4• 40.8	<ul style="list-style-type: none">• 19.6• 25.6• 41.3	<ul style="list-style-type: none">• 0.0• 1.2• 0.5	0,60
30/07/01	47.85	-1.52	0.99	<ul style="list-style-type: none">• 19.8• 25.5• 44.5	<ul style="list-style-type: none">• 20.6• 26.0• 43.1	<ul style="list-style-type: none">• 0.8• 0.5• 1.4	0,46
06/08/01	50.13	-4.57	0.99	<ul style="list-style-type: none">• 19.8• 25.5• 44.5	<ul style="list-style-type: none">• 19.2• 25.9• 45.5	<ul style="list-style-type: none">• 0.6• 0.4• 1.0	0,30
20/08/01	43.24	-1.1	0.99	<ul style="list-style-type: none">• 19.8• 25.5• 44.5	<ul style="list-style-type: none">• 20.1• 26.3• 44.9	<ul style="list-style-type: none">• 0.3• 0.8• 0.4	0,26



- E' stato tarato lo strumento e la taratura non è stata modificata per tutta una settimana durante la quale, quotidianamente, sono stati analizzati i tre materiali di riferimento di concentrazione nota:

STD 1: 19,8 mg/dl

STD 2: 25,5 mg/dl

STD 3: 44,5 mg/dl

$K=41,27$; $q= -0,95$

Tabella 12 : Lettura dei 3 materiali di riferimento mantenendo fissi i fattori $K = 41,27$ e $q = -0,95$

STD 1: 19,8 mg/dl

STD 2: 25,5 mg/dl

STD 3: 44,5 mg/dl

Giorno	CAMP.1	CAMP.2	CAMP.3
I	19,5	25,1	43,5
II	20,3	25,2	43,1
III	20,6	24,4	43,8
IV	20,3	25,2	43,5
V	19,9	24,8	43,0

- Dopo aver memorizzato i coefficienti K e q , sono stati congelati i tre campioni di riferimento di concentrazione nota:

STD1:19,8 mg/dl;

STD2: 25,5 mg/dl;

STD3: 44,5 mg/dl.

Dopo un mese, circa, sono stati reimpostati i valori di K e q ottenuti precedentemente e sono stati analizzati i tre materiali di riferimento relativi alla corrispondente taratura, verificando, così, la stabilità della taratura dello strumento nel tempo.



Tabella 13: I tre materiali di riferimento sono stati analizzati nuovamente, inserendo i relativi fattori K e q.

Titolo noto campione 1: 19,8 mg/dl

Titolo noto campione 2: 25,5 mg/dl

Titolo noto campione 3: 44,5 mg/dl

K e q	Camp. 1	Camp. 2	Camp. 3
K 44.95 Q -1.42	20,75	26,55	48,00
K 49.32 Q -1.66	20,75	27,25	46,75
K 42.54 q 0.14	19,55	24,50	42,20
ds±	0,57	1,42	3,05

5. LINEARITA'

E' stato analizzato un campione di latte ed una volta stabilita la concentrazione di urea, è stato diluito con acqua distillata in modo da ottenere una concentrazione finale limite di urea. Successivamente è stato aggiunto del grasso in modo da ripristinare la matrice iniziale.

Quest'ultimo campione è stato considerato il "diluente". Ad una parte del "diluente" sono stati aggiunti, per pesata, mg di urea in modo da ottenere una concentrazione finale massima (approssimativamente 100mg/dl di urea).

Quindi sono state effettuate una serie di diluizioni tra il campione concentrato ed il diluente

I risultati ottenuti sono stati posti in grafico con quelli teorici ed è stata calcolata la retta di regressione, indice della linearità dello strumento.



Tabella 14a: Il campione di latte vaccino è stato diluito in modo da ottenere una concentrazione limite di 5mg/dl di urea. Il campione concentrato è stato ottenuto aggiungendo, per pesata, 100 mg/dl di urea.

Le diluizioni sono state effettuate secondo il seguente schema:

1. 3 parti del campione concentrato + 1 parte del campione diluente (concentrazione urea 80 mg/dl)
2. 1 parte del campione concentrato + 1 parte del campione diluente (concentrazione urea 55 mg/dl)
3. 1 parte del campione concentrato + 4 parti del campione diluente (concentrazione urea 25 mg/dl)
4. 1 parte del campione concentrato + 9 parti del campione diluente (concentrazione urea 15 mg/dl)

TEORICO mg/dl	REALE mg/dl (n=3)
5	6,13
15	16,37
25	26,6
55	56,33
80	78,37
105	101,67

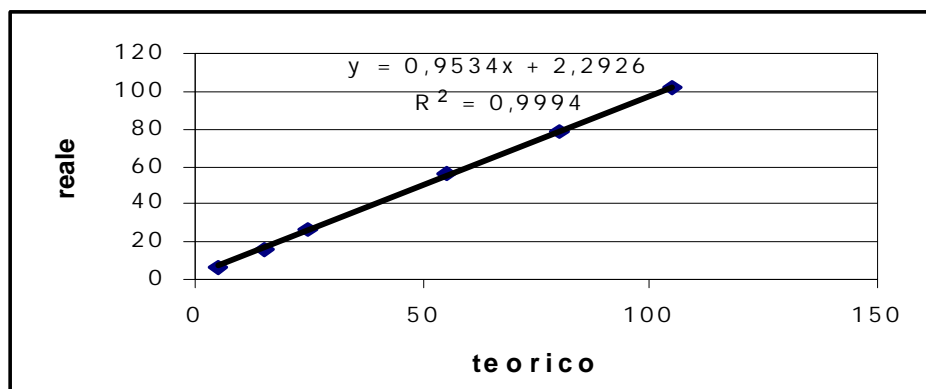


Grafico 8a: In ordinata sono riportati i valori teorici e sulle ascisse i valori reali ottenuti. L'equazione della retta di regressione che ne deriva è indicata sul grafico stesso



Tabella 14b: Il campione di latte bufalino è stato diluito in modo da ottenere una concentrazione limite di 22,15mg/dl di urea. Il campione concentrato è stato ottenuto aggiungendo, per pesata, 80 mg/dl di urea.

Le diluizioni sono state effettuate secondo il seguente schema:

5. 200µl del campione concentrato + 800µl parte del campione diluente (concentrazione urea 39 mg/dl)
6. 400µl del campione concentrato + 800µl del campione diluente (concentrazione urea 49 mg/dl)
7. 500µl del campione concentrato + 500µl del campione diluente (concentrazione urea 63 mg/dl)
8. 800µl del campione concentrato + 500µl del campione diluente (concentrazione urea 72 mg/dl)
9. 750µl del campione concentrato + 250µl del campione diluente (concentrazione urea 83 mg/dl)

TEORICO mg/dl	REALE mg/dl (n=3)
22,15	22,15
39	41,40
49	50,15
63	60,05
72	70,35
83	81,95
103	99,80

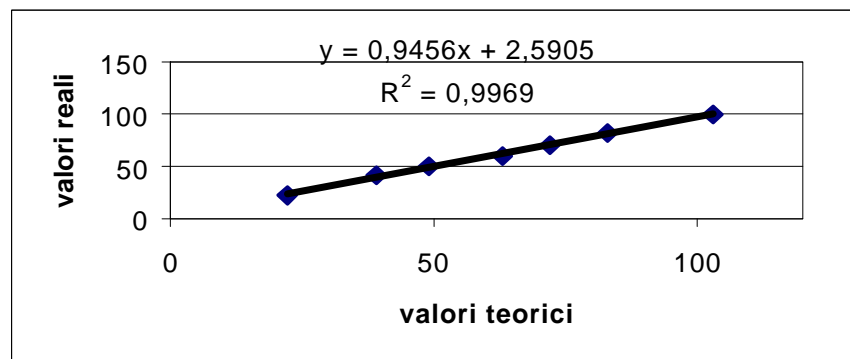


Grafico 8b: Linearità per il latte di bufala

Per il latte di pecora è stata eseguita una prova di recupero-linearità, in quanto sono state riscontrate difficoltà nelle diluizioni con la matrice del latte di questa specie.

Tabella 14c: La linearità, per il latte di pecora, si osserva dal confronto tra i valori teorici ottenuti per urea aggiunta per pesata ed i risultati realmente ottenuti.

mg/dl urea	Reale (n=2)	Teorico	Differenze
0	33,57	33,57	0,0
5	38,57	38,37	0,2
5	43,57	44,87	1,3
10	53,57	54,87	1,3
20	73,57	72,83	0,74

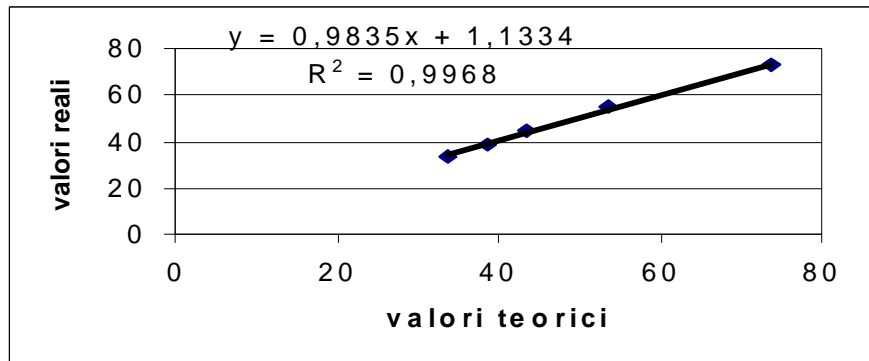


Grafico 8c: Prove di linearità per il latte di pecora ottenuta per aggiunta di urea (recupero)

6. SENSIBILITA' E RECUPERO

Il recupero è la capacità dello strumento di misurare esattamente la quantità di urea che viene aggiunta per pesata.

Lo strumento, oltre a registrare un recupero pressochè totale, è stato in grado di discriminare fino a 2,5 mg/dl di urea aggiunta (sensibilità) per il latte vaccino.

Tabella 15: Sono stati aggiunti, sequenzialmente, mg/dl di urea per pesata.

mg/dl urea	Reale (n=2)	Teorico	Differenze
	30,25	30,25	0,00
2,5	33,10	32,75	0,35
2,5	34,95	35,25	0,30
5	40,50	40,25	0,25
5	44,70	45,25	0,55
10	53,95	55,25	1,30

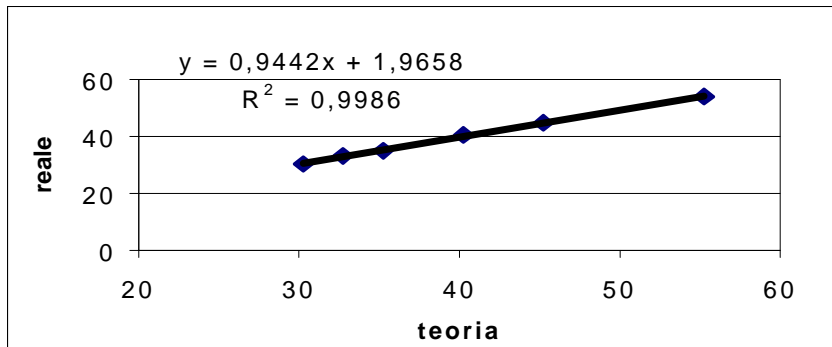


Grafico 9a: Sulle ascisse sono riportati i valori teorici e sulle ordinate i valori reali ottenuti. La retta, la cui equazione è mostrata nel grafico, è indice di linearità.

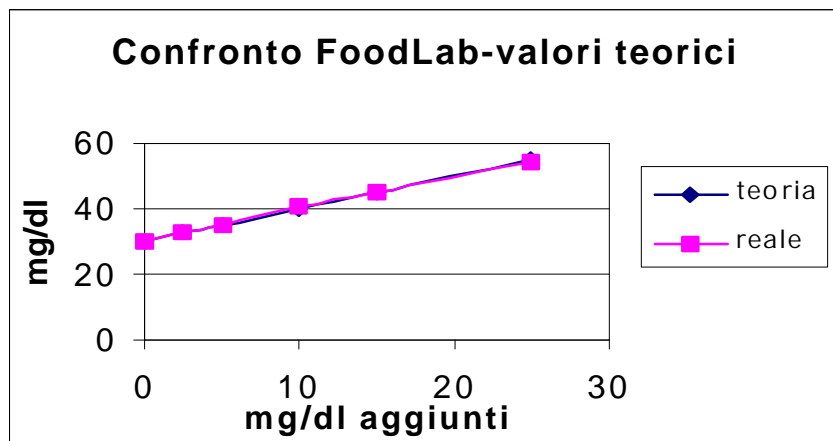


Grafico 9b: Confronto tra le misurazioni reali e quelle teoriche. In ascissa vengono riportati i mg/dl di urea aggiunti



Tabella 15b: Prove di sensibilità e recupero per il latte di bufala

mg/dl urea	Reale (n=2)	Teorico	Differenze
0	48,65	48,65	0,00
2.5	51,15	50,20	0,95
5	56,15	56,20	0,05
5	61,15	59,50	1,65
10	71,15	69,80	1,35
20	91,15	84,70	6,45

Grafico 9c: Andamento della linearità per il latte di bufala. L'equazione della retta di regressione è riportata sul grafico

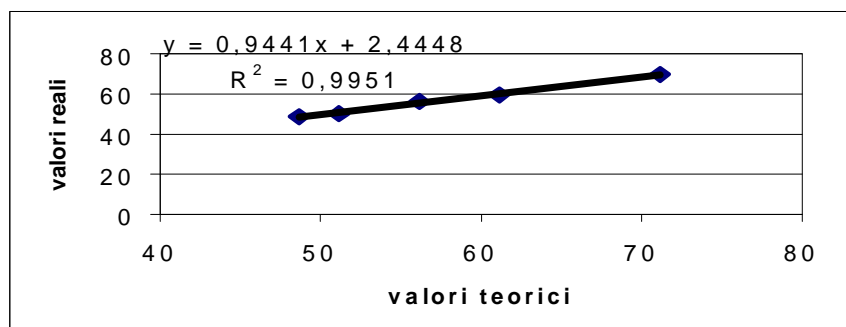


Tabella 15c: Prove di sensibilità per il latte di pecora

mg/dl urea	Reale (n=2)	Teorico	Differenze
0	27,13	27,13	0,0
2,5	29,63	29,17	0,0
2,5	32,13	31,67	1,3
5	37,13	36,67	0,6

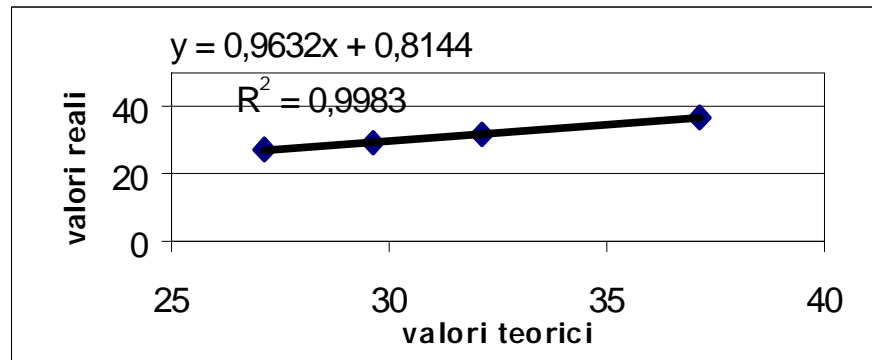


Grafico 9d: Andamento della retta di regressione, che risulta lineare, per il latte di pecora, in seguito all'aggiunta di mg/dl di urea. L'equazione della retta è riportata sul grafico.

7. VARIAZIONE DEI LOTTI

Sono state verificate le eventuali differenze tra blisters di diversi lotti, testando lo stesso campione di latte, in 10 letture per ciascun lotto, per verificare che un eventuale difetto di produzione non influenzi le misurazioni.

Tabella 16: In tabella sono mostrati i valori medi delle 10 letture, con le relative deviazioni standard, di ciascun campione per ogni lotto, e le differenze tra di essi.

camp.	Lotto 0107_b	Lotto 0108	Differenze tra lotti
1 (n=10)	18.49	18.90	0.41
DS	0.27	0.31	–
2 (n=10)	24.06	24.66	0.60
DS	0.37	0.46	–
3 (n=10)	38.62	39.32	0.70
DS	0.44	0.42	–



8. VERIFICA DELL'INTERFERENZA DELLA SODIO AZIDE UTILIZZATA COME CONSERVANTE IN ASSOCIAZIONE CON IL BRONOPOL

Sono stati analizzati due diversi campioni di latte in triplice lettura sia con la sodio azide sia senza sodio azide. Le differenze, tra i campioni trattati nei due modi diversi, sono nulle.

Tabella 17: In tabella vengono riportati i valori medi delle tre misurazioni di due diversi campioni di latte, ciascuno dei quali è stato suddiviso in un sottocampione trattato con sodio azide (SA) ed in un sottocampione senza sodio azide (SSA)

Campioni	SSA	SA	Diff.
1 (n =3)	26,70	25,93	-0,77
2 (n =3)	30,20	30,27	0,07

9. PROVE DI DILUIZIONI

Sono state effettuate anche delle prove di diluizione per verificare l'influenza del grasso del latte sullo strumento.

Il campione di latte è stato diluito al 50% con acqua distillata e dopo aver eseguito 10 misurazioni, è stato rigrassato per ripristinare la matrice iniziale. Le misurazioni sono state eseguite sia sui 5 μ l che su 10 μ l.



Tabella 18a: Prove di diluizioni per verificare un'eventuale influenza del grasso nel latte vaccino.

Letture	Sgrassato	Diluito 50%	10μl diluito	Rigrassato	10μl rigrassato
1	23,8	13,6	23,7	13,6	24,4
2	23,9	14,0	23,7	14,3	24,7
3	25,1	13,2	23,8	13,8	24,2
4	24,5	14,8	24,3	13,8	24,2
5	24,2	14,1	23,6	14,1	25,1
6	24,2	14,0	24,2	14,5	25,6
7	23,8	13,6	23,8	13,9	24,8
8	24,2	13,9	24,2	14,1	25,2
9	24,2	14,1	24,2	14,2	24,8
10	24,1	14,1	23,8	14,3	24,6
MEDIA	24,2	13,9	23,9	14,1	24,8
DS	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4
cv	1,6	3,0	1,1	2,0	1,8
MIN	23,8	13,2	23,6	13,6	24,2
MAX	25,1	14,8	24,3	14,5	25,6



Tabella 18b: Prove di diluizioni per il latte di bufala. Dalla tabella risultano evidenti delle discordanze per il latte rigrassato dovute probabilmente ad un effetto matrice.

Letture	Sgrassato	Diluito 50%	10μl diluito	Rigrassato	10μl rigrassato
1	51,1	28,1	51,3	31,5	61,6
2	51,6	27,8	50,6	31,9	64,1
3	52,7	27,4	51,3	31,6	62,9
4	54,8	27,7	51,1	31,8	63,2
5	50,1	27,8	53,2	31,9	62,9
6	53,2	28,0	51,2	31,7	61,4
7	49,8	27,7	51,9	32,0	62,9
8	52,5	27,7	51,5	31,6	62,7
9	50,8	28,0	51,1	30,3	61,1
10	51,3	27,8	50,9	32,1	60,6
MEDIA	51,8	27,8	51,4	31,6	62,3
DS	1,5	0,2	0,7	0,5	1,1
cv	2,9	0,7	1,4	1,6	1,8
MIN	49,8	27,4	50,6	30,3	60,6
MAX	54,8	28,1	53,2	32,1	64,1



Tabella 18c: Prove di diluizione per il latte di pecora. Anche in questo caso si riscontrano dei valori discordanti per il campione rigrassato dovuti ad un effetto matrice.

Letture	Sgrassato	Diluito 50%	10μl diluito	Rigrassato	10μl rigrassato
1	36,7	20,3	37,4	21,2	41,4
2	35,8	19,6	36,1	20,8	41,5
3	36,0	19,6	36,4	21,0	41,5
4	36,5	19,8	--	21,7	40,8
5	36,2	19,3	36,7	22,6	39,6
MEDIA	36,2	19,7	36,7	21,5	41,0
DS	0,4	0,4	0,6	0,7	0,8
cv	1,0	1,9	1,5	3,4	2,0
MIN	35,8	19,3	36,1	20,8	39,6
MAX	36,7	20,3	37,4	22,6	41,5



CONCLUSIONI

Sono stati eseguiti test sullo strumento FoodLab nel periodo di luglio- ottobre 2001 per un totale di 2400 determinazioni.

Sulla base dei risultati ottenuti è possibile stabilire le seguenti conclusioni:

- Il sistema FoodLab permette la determinazione della concentrazione di urea senza trattamento preventivo del campione.
- Pozzetti totali: 15 (1 di lettura e 14 di incubazione)
- La termostatazione dei 15 pozzetti ($37^{\circ}\text{C} \pm 0,4^{\circ}\text{C}$) è risultata omogenea e le differenze registrate rientrano ampiamente nella tolleranza dichiarata.
- La velocità nominale è di 60 analisi/h.
- La velocità reale, misurata nella normale routine di lavoro, è di 48 analisi/h.
- I test sono stati eseguiti su latte vaccino, bufalino e di pecora.

INTERFERENZE

- Il latte congelato in azoto liquido e scongelato in un bagnetto termostatato a 40°C non presenta alcuna variazione della concentrazione di urea.
- Il latte congelato in un freezer per uso domestico e scongelato in un bagnetto termostatato a 40°C non presenta alcuna variazione della concentrazione di urea.
- La presenza di Bronopol tecnico allo 0,02% non comporta alcuna interferenza
- L'associazione della sodio azide con il Bronopol non determina variazioni della concentrazione di urea.
- Lo smistamento del latte, sia in Eppendorf da 1,5ml che in provette da 100ml, non causa disomogeneità nel campione.
- Non è stata riscontrata l'influenza della manualità dell'operatore.

RIPETIBILITA'

- La ripetibilità è complessivamente buona. La deviazione standard totale calcolata dagli scarti delle medie di ogni misurazione è di 0,67mg/dl per il latte vaccino, 0,74mg/dl per il latte bufalino e di 0,72mg/dl per il latte di pecora.



- La ripetibilità di lettura di ogni singola provetta è ottima ed è stata espressa dalla deviazione standard degli scarti della media di tutti i valori, ed è pari a 0,1mg/dl per il latte vaccino, 0,4mg/dl per il latte bufalino e 0,15mg/dl per il latte di pecora.
- La ripetibilità intermedia (analisi di uno stesso campione ripetute per più giorni) non presenta nessuna variazione.

RECUPERO

- Il recupero è pressochè totale per tutte e tre le specie.

SENSIBILITA'

- Lo strumento è in grado di discriminare fino a 2,5mg/dl

TARATURA E STABILITA'

- Lo strumento viene tarato con tre diversi materiali di riferimento che cadono nel range di concentrazione di 15-27-40mg/dl. Lo strumento viene quindi allineato su una retta di equazione $y = Kx + q$, (passante per i tre punti corrispondenti ai tre valori dei materiali di riferimento), dove K e q sono i coefficienti della retta, e nello specifico K = slope e il q = bias.
- La taratura si mantiene stabile ed allineata nel tempo
- La misurazione dello strumento risulta essere perfettamente allineata con la curva di taratura che presenta sempre un $r^2 > 0,99$.

CARRY OVER

- Non si riscontra alcun effetto di carry over perché i campioni sono inoculati in singole cuvette e lette separatamente.

MALFUNZIONAMENTI

Lo strumento non ha riportato alcun tipo di problema nel funzionamento per tutto il tempo di sperimentazione.

MANUTENZIONE

Lo strumento non necessita di alcuna manutenzione.