

PROJECTE FINAL DE CARRERA

Enginyeria Tècnica Industrial, Especialitat Química Industrial

***POSADA A PUNT I VALIDACIÓ DE L'ANÀLISI D'UREA EN LLET
CRUA MITJANÇANT IR PER TRANSFORMADA DE FOURIER***

Anna Cabrespina Abril
Cerdanyola del Vallès, setembre de 2009



María del Mar Baeza, professora lectora del Departament de Química Analítica de la Universitat Autònoma de Barcelona i Anna Jubert, tutora de l'empresa col·laboradora Laboratori Interprofessional Lleter de Catalunya,

CERTIFIQUEN:

Que l'alumna Anna Cabrespina Abril ha dut a terme, sota la nostra direcció, el treball amb títol "Posada a punt i validació de l'anàlisi d'urea en llet crua mitjançant IR per transformada de Fourier" que presenta en aquesta memòria, la qual constitueix el seu treball en l'assignatura "Projecte Final de Carrera" (Codi 24675).

I perquè consti als efectes que correspongui, es presenta el treball esmentat davant l'Escola Tècnica Superior d'Enginyeria de la Universitat Autònoma de Barcelona, signant el present certificat.

Cerdanyola del Vallès, 17 de setembre de 2009

María del Mar Baeza

Anna Jubert

ÍNDEX

1. Introducció.....	1
1.1. Associació Interprofessional Lletera de Catalunya.....	1
1.2. Urea en llet.....	2
1.2.1 Definicions importants.....	2
1.2.2. Origen de la urea a la llet.....	3
1.3. Anatomia i fisiologia bovina.....	3
1.4. Importància de la determinació d'urea a la llet.....	4
2. Objectius.....	9
3. Materials i mètodes.....	11
3.1. Mètode de referència mitjançant pH-metria diferencial CL-10.....	11
3.1.1. Principis de pH-metria diferencial.....	11
3.1.2. Instrumentació.....	13
3.1.3. Procediment d'anàlisi.....	15
3.2. Tecnologia d'infraroig per Transformada de Fourier.....	15
3.2.1. Principis de la tècnica d'IR per Transformada de Fourier.....	15
3.2.2. CombiFoss™ FT+.....	17
3.2.3. MilkoScan™ FT+.....	18
3.2.4. Fossomatic™ FT+.....	20
3.2.5. Preparació de reactius.....	21
3.2.6. Preparació de patrons.....	21
3.2.7. Preparació de mostres.....	22
4. Resultats.....	25
4.1. Posada a punt del mètode d'espectroscòpia IR per transformada de Fourier.....	25
4.1.1. Assajos previs amb mostres sintètiques.....	25
4.1.2. Comprovació de la calibració interna de l'equip.....	27
4.1.3. Mètode addició estàndard.....	35
4.1.4. Patró control.....	36
4.2. Validació del mètode.....	41
4.2.1. Verificació del bon funcionament dels equips CL-10 i MilkoScan.....	41
4.2.2. Validació del mètode.....	42
4.3. Anàlisi de mostres.....	43
5. Conclusions.....	45

6. Bibliografia.....	49
7. Annex.....	51
7.1. Valors típics d'urea en mostres de control de qualitat.....	51
7.2. Noticia curiosa.....	53
7.3. Entrevista a un veterinari.....	54
7.4. Regeneració dels elèctrodes (CL-10).....	55
7.5. Regeneració forta dels elèctrodes (CL-10).....	56
7.6. Procediment d'anàlisi (CL-10).....	58
7.7. Especificacions tècniques MilkoScan.....	61
7.8. Taula de conversions.....	56
7.9. Control de l'estabilitat de la llet UHT.....	62
7.10. Certificats d'anàlisi dels patrons de referència CECALAIT.....	64
7.11. Taules de valors dels patrons CECALAIT.....	67
7.12. Comparació de mètodes.....	68
7.12.1. Resultats obtinguts amb l'equip CL-10.....	68
7.12.2. Resultats obtinguts amb l'equip MilkoScan 6000.....	70
7.13. Controls dels patrons LLET UREA i LAB2.....	72
7.14. Certificat d'anàlisi dels patrons de referència de QSE (MUVA).....	73

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Associació Interprofessional Lletera de Catalunya

L'Associació Interprofessional Lletera de Catalunya (ALLIC) es regeix per l'Assemblea General que està formada el 50% per representants del gremi d'indústries Làcties de Catalunya i el 50% per representants de les diverses Organitzacions Agràries de Productors de Catalunya. L'objectiu principal de l'activitat de l'ALLIC és determinar la qualitat de la llet en origen, arbitrando entre productors i industrials làctics pel pagament per qualitat segons les indicacions que en cada moment determini la legislació vigent [1].

Actualment, el laboratori per determinar la **qualitat de la llet crua en origen**, està realitzant d'una manera sistemàtica els següents anàlisis:

- Anàlisis fisicoquímics: greix, proteïna, lactosa, extracte sec magre i punt de congelació de la llet.
- Anàlisis microbiològics: recompte de bacteris aerobis mesòfils a 30°C, recompte de cèl·lules somàtiques i residus d'inhibidors de creixement (antibiòtics).

El laboratori també està realitzant l'anàlisi de control individual o **anàlisi vaca a vaca**, ja que s'ha consolidat com una eina eficaç per fer prevenció o correcció de cèl·lules somàtiques, i per a la millora genètica dels animals, realitzant els anàlisis següents:

- Anàlisis fisicoquímics: greix, proteïna, lactosa i extracte sec magre.
- Anàlisis microbiològics: recompte de cèl·lules somàtiques.

A banda d'aquests controls de la llet crua de vaca (de qualitat i vaca a vaca) que es realitzen de manera sistemàtica al laboratori d'anàlisis automatitzades, l'ALLIC també fa altres controls al laboratori de química de referència i al laboratori de microbiologia. Aquests controls són:

- Mamitis:
El control de mamitis de tanc permet conèixer els microorganismes patògens dominants, així com el tipus de mamitis: ambiental o contagiosa. L'anàlisi de mamitis individual de cada quarteró permet la identificació dels microorganismes causants de la mamitis.
- Control de la potabilitat de l'aigua: L'anàlisi de l'aigua de l'explotació vol prevenir possibles contaminacions i infeccions a la granja. Sobretot pel que fa a la neteja de la instal·lació de munyir, el tanc de fred i la potabilitat de l'aigua dels abeuradors de les vaques.
- Anàlisi d'urea: els nivells d'urea a la llet ens poden orientar sobre el correcte aprofitament proteic de l'aliment subministrat a la vaca.

- Anàlisi de productes el·laborats: Per el compliment de diverses normatives alimentàries, el Laboratori ofereix l'anàlisi dels diferents paràmetres, tant químics com microbiològics, especialment en productes derivats de la llet.

1.2. Urea en llet

Des de mitjans dels anys 90 s'ha incrementat notablement l'oferta per a la determinació del contingut en nitrogen ureic a la llet o *MUN* (Milk Urea Nitrogen) per part dels laboratoris de determinació de qualitat de la llet al món, particularment a Europa i Estats Units.

Determinar la concentració d'urea a la llet és una bona manera d'estimar la concentració d'urea a la sang, amb l'avantatge, que des del punt de vista pràctic obtenir una mostra de llet és més simple. Els nivells de nitrogen ureic a la sang i a la llet tendeixen a ser molt similars, és a dir, una vaca amb un alt nivell ureic a la sang tindrà un alt nivell ureic a la llet, i viceversa. A més, si s'acompanya l'anàlisi d'urea amb el de producció (contingut en greix, proteïnes i lactosa) permet identificar millor els possibles problemes. Tots els factors que afecten a la concentració d'urea a la sang, tenen influència sobre la concentració d'urea a la llet [2 - 5].

1.2.1. Definicions importants

LLET

Fluid blanc o groguenc segregat per les glàndules mamàries de les femelles dels mamífers, que serveix per al nodriment de llurs cries. Llet de vaca, de cabra,...

Llet d'alguns mamífers domèstics que beu l'home com a aliment o usada per a fer mantega, formatge, etc.

Es pot definir la llet des dels següents punts de vista:

Biològic: substància segregada per la femella dels mamífers amb la finalitat de nodrir les cries.

Legal: producte de la muniada d'un mamífer sa que no representa un perill pel consum humà.

Fisicoquímic: sistema en equilibri constituït per tres sistemes dispersos: solució, emulsió i suspensió.

UREA

Substància nitrogenada derivada de la degradació de les proteïnes, diamina de l'àcid carbònic, molt soluble, cristal·lina, el constituent sòlid més important de l'orina dels humans i d'altres mamífers, molt emprada en fertilitzants líquids [6].

La urea és una petita molècula orgànica ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) molt soluble i no tòxica (Figura. 1.1), composta per carboni, oxigen, hidrogen i nitrogen, que normalment es troba a la sang i altres fluids corporals. La urea és molt soluble i es distribueix per tots els compartiments aquosos del cos i les seves secrecions [2].

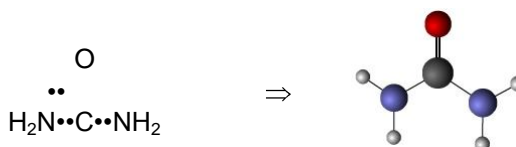


Figura 1.1. Molècula d'urea [2,3]

1.2.2. Origen de la urea a la llet

Les proteïnes que entren a l'organisme provinents de la dieta són metabolitzades i transformades en amoníac, aquest és molt tòxic, de manera que al fetge es converteix en urea, que no és tòxica i pot estar a nivells alts sense causar alteracions. La urea es dissemina ràpidament amb l'aigua als teixits corporals, aquesta, ràpidament, es propaga de la sang a la llet. La urea és un constituent normal de la llet, i comprèn part del nitrogen no proteic que es troba a la llet.

Les concentracions d'urea a la sang varien, i poden estar influenciades per la ingesta de proteïna degradable, la ingesta de proteïna no degradable, la ingesta d'energia, la ingesta d'aigua, la funció hepàtica i per la producció urinària. Degut a que aquesta surt del cos per la orina, incrementant la ingesta d'aigua (el que pot augmentar la producció urinària) tendirà a disminuir la concentració d'urea a la sang.

L'objectiu és prevenir la toxicitat de l'amoníac i actuar com a portador del nitrogen excessiu fora del cos, principalment a través de la orina. Les concentracions a la sang (i a la llet) estan influenciades per l'energia continguda a la dieta i la provisió de proteïnes, i el funcionament del fetge i els ronyons.

1.3. Anatomia i fisiologia bovina

La vaca és un animal vertebrat, mamífer, vivípar i herbívor. Els remugants (*Ruminantia*) són un subordre de mamífers que es caracteritzen per digerir l'aliment en dues etapes, en la primera de les quals mengen l'aliment cru i el regurgiten en una forma semidigerida anomenada bol, i que després remuguen (masteguen per segona vegada) per tal de digerir el bol. És a dir, els remugants primer pasturen els vegetals activament i després, pausadament, els digereixen. El remuc consisteix en la regurgitació de l'aliment ingerit per a continuar amb la masticació del mateix [8-9].

En vaques alimentades amb excés de proteïna degradable o amb dèficit d'energia fermentable, les bacteries ruminals no poden utilitzar tot el nitrogen disponible per elaborar la proteïna bacteriana, i per tant, aquest excés d'amoníac és absorbit a través de les parets ruminals i passa al fetge per ser processat i eliminat de l'organisme com a urea.

L'estómac o aparell digestiu dels remugants està dividit en quatre cavitats: el remuc, el reticle, el llibret i el quall o estómac real, com es pot veure a la Figura 1.2. El remuc i el reticle formen una càmera, que manté un ambient favorable per a la fermentació anaeròbia. L'amoníac és el principal compost

nitrogenat que utilitzen els microorganismes per a la síntesis dels aminoàcids i proteïnes. L'amoniac alliberat al remuc és absorbit a la sang, conduït al fetge on es forma urea, la qual es pot reciclar a la saliva o eliminar-se a través de la orina [10-11].

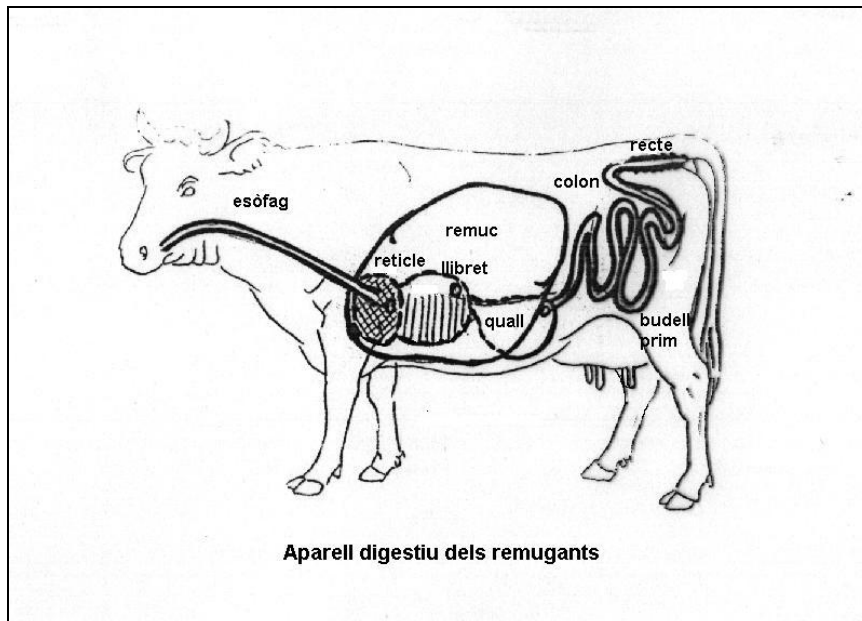


Figura 1.2. Aparell digestiu dels remugants [7]

Els remugants produeixen grans quantitats de saliva, les vaques adultes produeixen entre 100-150 l/dia. La saliva dels remugants té, entre altres funcions, ser una font de nitrogen no proteic, ja que la urea sintetitzada al fetge és secretada a la saliva per nodrir la microbiota ruminal [8].

Per a una mostra de llet provinent d'un grup de vaques (mostres de control de qualitat) el rang d'urea òptim està entre 170-220 ppm. Valors d'urea menors a 150 ppm es consideren baixos, i valors superiors a 300 ppm es consideren elevats (veure annex 7.1. Valors típics d'urea en mostres de control de qualitat) [5].

1.4. Importància de la determinació d'urea a la llet

L'alimentació és la principal responsable del contingut d'urea a la llet. El contingut total de proteïna a la dieta, combinat amb baixes concentracions d'energia són els responsables principals del contingut d'urea a la llet. Els nivells d'urea a la llet ens poden orientar sobre el correcte aprofitament proteic de l'aliment subministrat a la vaca.

La urea és un producte de la detoxificació de l'excés de nitrogen. Aquesta detoxificació de l'amoniac constitueix una pèrdua d'energia per la vaca lletera que pot limitar la producció de llet. La determinació d'urea a la sang o més fàcilment a la llet, és una eina útil que pot ajudar a portar a terme un anàlisi permanent del balanç energia/proteïna a les persones que s'encarreguen de la nutrició de l'explotació bovina.

L'excés d'urea a la llet podria tenir alguns efectes negatius als processos d'industrialització dels productes làctics, i això ha portat a alguns països a incorporar la seva determinació dins dels anàlisis rutinaris del control lleter. Institucions a Alemanya, Dinamarca, Eslovènia, Suècia, Finlàndia, Noruega, Canadà i Estats Units ja ho estan fent.

Actualment a l'ALLIC es realitza l'anàlisi d'urea utilitzant el mètode de pH-metria diferencial, aquest és un mètode estàndard utilitzat en molts laboratoris lleters. Aquesta tècnica d'anàlisi suposa un cost elevat de reactius i, degut a la baixa freqüència d'anàlisi de l'aparell utilitzat, és un mètode lent d'anàlisi ja que és un mètode manual, no està automatitzat.

Quan es parla de la relació existent entre l'energia i la proteïna, s'ha de considerar la composició de la proteïna, per poder estimar quin percentatge de la fracció proteica és degradable al rumen i quina és proteïna passant. Per als productors i assessors lleters resulta un eina pràctica per controlar la proteïna i l'energia subministrada en l'alimentació del ramat. Aquest tipus de control pot jugar un important paper en l'alimentació de les vaques lleteres, ja que permet:

- Tenir una indicació indirecta del nitrogen a la sang sense prendre ni processar mostres de sang.
- Disposar d'indicis d'excés de nitrogen a l'alimentació.
- Disposar d'informació sobre la ingesta alimentària.
- Intentar reduir l'excés de nitrogen excretat ja que té un impacte negatiu per el medi ambient (veure annex 7.2 Notícia curiosa).

El procés de conversió d'amoníac a urea no és gratuït energèticament parlant per al metabolisme. Per eliminar el nitrogen excedent es consumeix energia. Les conseqüències productivo-econòmiques de tot aquest procés afecten en 2 nivells : a la indústria i al productor lleter :

1- A nivell industrial:

- En el processament de la llet el rendiment és menor a l'esperat ja que una part del que es creia que eren proteïnes en realitat és nitrogen no proteic. Això significa que la planta processadora paga per una proteïna que no ho era i finalment té menor rendiment en productes làctics.

2- A nivell productiu:

- Disminució de la fertilitat. Diversos estudis [4] han demostrat la relació existent entre un excés de proteïna degradable a la dieta i la disminució dels nivells de fertilitat.
- Disminució de la producció de llet. Degut al desgast energètic que suposa la transformació de l'amoníac a urea, es destina menys energia a la producció de llet.
- Major cost de la ració degut a que la proteïna és la més cara en l'alimentació de les vaques.
- Augment del % de la mastitis i dels nivells de cèl·lules somàtiques en animals amb alts nivells d'urea a la llet.

Els controls oficials de la producció de llet crua són necessaris per comprovar el compliment dels criteris i objectius establerts en la legislació comunitària. Aquests controls han de centrar-se, en particular, a les explotacions de producció de llet i en el moment de la seva recollida. El Departament d'Agricultura, Alimentació i Acció Rural és l'òrgan competent pel què fa a la qualitat de la llet crua de vaca produïda a les explotacions ubicades a Catalunya i de llet crua de vaca produïda a altres comunitats autònomes que es tracti i/o transformi als establiments ubicats a Catalunya [2]. L'anàlisi de la llet crua és important (tant per als ramaders com per als industrials) degut al pagament per qualitat de la llet. La influència de l'aplicació dels sistemes de pagament per qualitat ha sigut decisiva en la millora de la qualitat químicofísica i higiènica de la llet a tots els països.

El sistema de pagament per qualitat a Espanya es va establir l'any 1967, basat principalment, en el pagament per la riquesa en greix. Durant molts anys la llet entregada a la indústria per els ramaders es va controlar només tenint en comte la seva riquesa en greix, ja que és el paràmetre de major importància econòmica i el més fàcilment mesurable.

Per l'Ordre del Ministeri d'Agricultura del 27 de juny de 1985 es va establir un nou sistema de pagament de la llet en funció de la seva composició i de la seva qualitat higiènica. Es considera que la llet crua de vaca no compleix els paràmetres de qualitat quan supera els límits següents:

- Punt de congelació > 0.520 °C
- Contingut de gèrmens a 30 °C (per ml) > 100.000
- Contingut de cèl·lules somàtiques (per ml) > 400.000
- Presència de residus: quan el contingut de residus de substàncies farmacològiques actives superi els nivells autoritzats, d'acord amb el Reglament CEE 2377/1990.

En resum, quanta més quantitat de proteïna i de greix conté la llet més elevat és el preu que s'ha de pagar ja que se'n pot treure més rendiment. En canvi, el preu de la llet disminueix quan la quantitat de cèl·lules és superior a 400000 cèl/ml, les bacteries superen els 100000 bact/ml i també degut a la presència d'aigua i/o d'antibiòtics [12-13].

La determinació del contingut d'urea a la llet de forma rutinària podria ser útil pels productors i veterinaris, ja que seria una manera de controlar adequadament la proteïna continguda a la dieta, per tal d'optimitzar la utilització de nitrogen respecte a la producció de llet, i d'aquesta manera, també, disminuir les emissions de N a l'ambient (veure annex 7.3 Entrevista a un veterinari).

Segons un estudi realitzat per el *Laboratorio de Calidad de Leche del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA)* entre el 4 d'agost i el 7 de novembre de 2003 es va arribar a les consideracions finals següents.

- De totes les variables que es van analitzar, les que millor expliquen el comportament de MUN varen ser les variables de l'alimentació, i dins d'aquestes, la proteïna crua és la que més afecta.

- El monitoratge de MUN permet al productor millorar l'eficiència en l'alimentació, evitant excessos, deficiències o desbalanços.
- La determinació de MUN de manera rutinària, podria ser útil per als productors, ja que seria una forma de fer el seguiment adequat de la proteïna subministrada a la dieta, per optimitzar la utilització de N respecte a la producció de llet i d'aquesta manera disminuir les emissions de N a l'ambient. No se sap com afecta en la industrialització dels productes làctics, encara que es creu que podria ser útil per estimar les emissions de N a l'ambient, el qual té un impacte negatiu.

En general, un inadequat balanç de proteïna a la dieta pot originar alts o baixos nivells de nitrogen ureic a la llet, i això pot ocasionar pèrdua de nutrients, alt cost d'aliment, efecte desfavorable sobre la salut de l'animal i reducció en la producció de llet [2, 4].

2. OBJECTIUS

Actualment a l'ALLIC es realitzen les analítiques d'urea amb el mètode estàndard de pH-metria diferencial en funció de la demanda. Degut a la baixa freqüència d'anàlisi de l'aparell utilitzat (CL-10 Micro) amb el que compta el laboratori i a l'alt cost dels reactius utilitzats, a l'ALLIC es vol intentar introduir dins dels anàlisis sistemàtics la determinació de la urea mitjançant un altre mètode més ràpid, el que permetria una informació important per als ramaders i veterinaris.

L'objectiu principal d'aquest projecte és posar a punt el mètode d'anàlisi d'urea en llet crua de vaca mitjançant la tècnica d'Infraroig per Transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FTIR). S'haurà de portar a terme la validació del mètode per FTIR (seguint els criteris de la ISO 17025) mitjançant la comparació amb el mètode de referència utilitzat actualment al laboratori.

L'equip utilitzat per a la determinació mitjançant FTIR serà el CombiFoss que integra en un mateix programa el funcionament sincronitzat d'un MilkoScan (determinació quantitativa del contingut en greix, proteïna, lactosa i ESM) i d'un Fossomàtic (determinació del contingut en cèl·lules somàtiques). D'aquesta manera es podran determinar tots els paràmetres amb una única mostra, amb un mateix anàlisi i un mateix equip.

S'estudiarà l'estabilitat d'un patró de control per a l'anàlisi d'urea. Una vegada comprovada l'estabilitat es calibrarà internament l'equip mitjançant l'ajust d'una corba de calibració, i finalment, es realitzarà un estudi amb mostres reals. La validació es portarà a terme mitjançant l'anàlisi de mostres reals per el mètode estàndard (pH-metria diferencial) i per el mètode de FTIR.

S'estudiarà tant la viabilitat tècnica com la econòmica per tal que l'empresa pugui valorar la introducció d'aquest mètode d'anàlisi de la urea dins la seva rutina de treball.

3. MATERIALS I MÈTODES

Com ja s'ha comentat abans, l'anàlisi d'urea permet avaluar la concentració de proteïna que s'ha de subministrar al menjar de les vaques, reduir els costos de la granja i reduir les emissions de nitrogen al medi ambient. Però aquesta avaluació depèn molt de la precisió en l'anàlisi al laboratori. Per exemple, 100 litres de llet de vaca contenen:

- 3600 g de greix (3.6×10^4 ppm)
- 3200 g de proteïna (3.2×10^4 ppm)
- 12 g de urea (120 ppm)

El mètode de pH-metria diferencial (CL-10 d'Eurochem) requereix analitzar les mostres amb un procés diferent que per l'anàlisi del greix i la proteïna [14]. El mètode basat en l'espectrofotometria d'infraroig, utilitzant un instrument FOSS, permet utilitzar el mateix equip i el mateix mètode per a la determinació simultània de la concentració d'urea, greix i proteïna a la llet. A més, també es determina lactosa, punt crioscòpic i cèl·lules somàtiques en la mateixa anàlisi.

El sistema CL-10 calcula la concentració d'urea mesurant l'amoníac format a partir de la urea després de tractar la mostra amb un enzim: ureasa. El CL-10 mesura el canvi de pH provocat per la formació d'amoníac. D'altra banda, el sistema MilkoScan 6000 mesura la concentració d'urea indirectament mitjançant espectroscopia d'infraroig. Aquesta tècnica fa anys que s'utilitza per a la determinació del greix i la proteïna de la llet. Les molècules orgàniques, quan s'escalfen, emeten un espectre infraroig. Aquest espectre es pot relacionar amb la concentració de la molècula i determinar el contingut de la mostra. Això pot proporcionar una manera molt ràpida i fàcil de mesurar la urea a la llet [15].

3.1. Mètode de referència (pH-metria diferencial CL-10)

3.1.1. Principis de pH-metria diferencial

La mesura es basa en una reacció enzimàtica simple: la hidròlisi de la urea per part de la ureasa, la qual causa una variació de pH directament proporcional al contingut d'urea a la mostra de llet [17]. El principi de la mesura diferencial de pH es basa en la correlació entre les variacions de pH (com es pot veure a la Figura 3.1), que es mesuren mitjançant dos elèctrodes capil·lars de vidre, i la quantitat de H^+ produïts per la reacció catalitzada per l'enzim ureasa afegit [16].

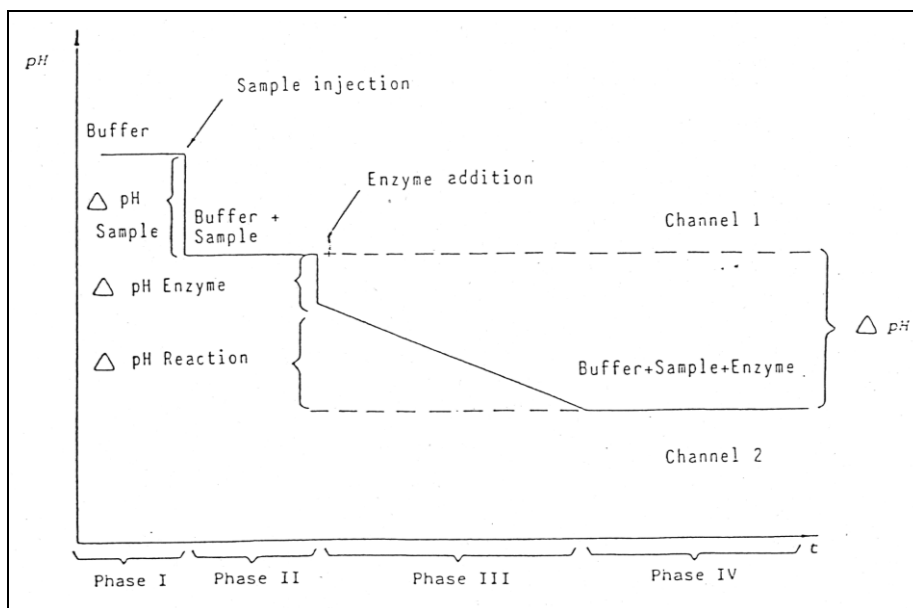
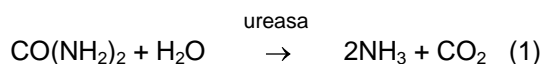


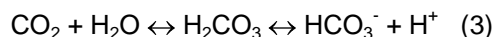
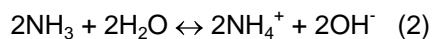
Figura 3.1. Fases de l'anàlisi mitjançant el mètode de pH-metria diferencial [16]

- Fase I: A la fase inicial de la medicció, els dos elèctrodes de pH s'omplen amb solució tampó.
- Fase II: Després de la injecció de la mostra a la càmera de mescla, part de la mescla tampó+mostra és aspirada als dos elèctrodes per a la medicció del pH-mostra. Això correspon al zero de la mostra individual.
- Fase III: S'afegeix una quantitat d'enzim (ureasa) a la càmera de mescla per catalitzar la reacció.
La mescla de solució tampó+mostra+ureasa és aspirada a l'elèctrode 2.
La mescla de solució tampó+mostra es manté a l'elèctrode 1.
- Fase IV: Després de la reacció, s'efectua la medicció de pH, és a dir la diferència de senyal entre els elèctrodes 2 i 1.

L'addició d'ureasa a una solució que conté urea provoca la següent reacció [17]:



La reacció (1) està limitada per la quantitat d'ureasa addicionada. La reacció (2) produeix amoníac, el qual a pH 6.7 immediatament s'hidrolitza i allibera ions hidroxil. El diòxid de carboni també s'hidrolitza (3), i així neutralitza parcialment els OH^- formats al pas (2):



3.1.2. Instrumentació

EUROCHEM ha desenvolupat un analitzador de ΔpH amb protocols analítics per a la medicció de diverses substàncies, entre elles la urea, que es pot analitzar directament a la llet i productes làctics sense cap tractament de la mostra [16].

El canvi de pH produït per la reacció de la urea, en un sistema adequadament tamponat, es mesura amb un analitzador de pH diferencial disponible comercialment anomenat CL-10 Micro (Eurochem). Com es pot observar a la figura 3.2 l'equip està format principalment per:

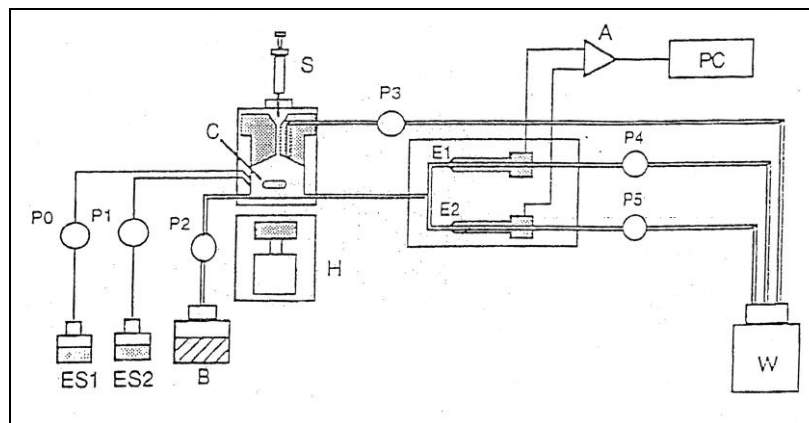


Figura 3.2. Diagrama d'un aparell CL-10 [16]

1. ES1/ES2 Recipients de estarter (per l'aigua destil·lada i la ureasa)
2. P0/P1 Bombes d'alimentació de estarter
3. B Recipient de solució tampó
4. P2 Bomba d'alimentació de solució tampó
5. H Motor agitador
6. C Càmera de mescla
7. S Microxeringa per injectar la mostra
8. P3 Bomba per l'excés
9. E1 Elèctrode de mesura (tampó+llet+enzima)
10. E2 Elèctrode de referència (tampó+llet)
11. P4 Bomba per omplir l'elèctrode de mesura
12. P5 Bomba per omplir l'elèctrode de referència
13. A Amplificador diferencial
14. W Contenidor de residus
15. PC Ordinador



Figura 3.3. Detall de l'equip CL-10 Micro utilitzat per realitzar aquest projecte

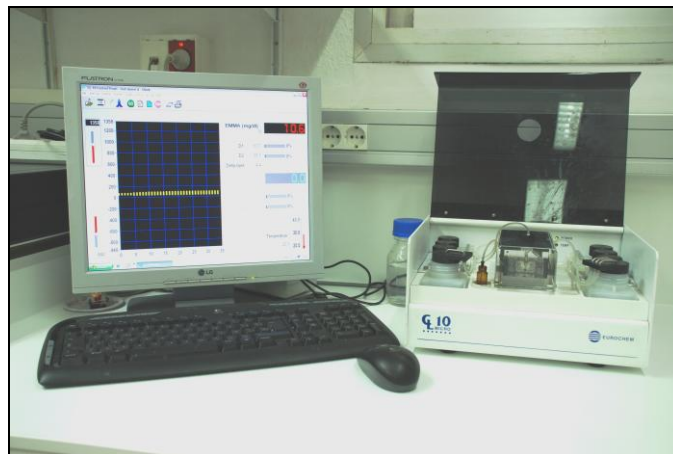


Figura 3.4. Equip CL-10 complet

Com es pot observar a la Figura 3.3 i Figura 3.4 el CL-10 és un instrument compacte i de fàcil utilització, a més, aquest mètode no requereix cap pretractament de la mostra. Els conservants afegits durant la presa de mostra (tant bronopol com azidiol) en concentracions fins a deu vegades superiors a les recomanades no afecten als resultats.

L'equip CL-10 Micro d'Eurochem permet la determinació d'urea a la llet dins un rang lineal entre 50 - 4000 ppm (5 - 400 mg/dl) i amb un temps d'anàlisi de 75 segons [16].

3.1.3. Procediment d'anàlisi

Consideracions inicials:

- Les mostres de llet han d'estar a temperatura ambient (18-30 °C).
- Agitar les mostres abans del seu anàlisi.
- Els reactius (ureasa i urea buffer) han d'estar a temperatura ambient.
- Abans de començar l'anàlisi l'equip ha d'estar a una temperatura de 37°C.
- Cada setmana s'ha de realitzar una regeneració dels elèctrodes (Annex 7.4) i cada més s'ha de realitzar una regeneració forta dels elèctrodes (Annex 7.5).

➤ Reactius

- Wash solution: MILK POLIF KIT.
Introduir el contingut de l'ampolla de Concentrated wash solution (50 ml) a una ampolla de 250 ml. Afegir 180 ml d'aigua destil·lada i agitar.
- Urea buffer
- Ureasa
- Patró d'urea
- Regenerating Solution (200 ml) (per regeneració setmanal)
- Solució Regenerant Forta (per regeneració mensual)

El procediment detallat d'anàlisi i el funcionament de l'equip es pot consultar a l'annex 7.6.

3.2. Tecnologia d'Infraroig per Transformada de Fourier

3.2.1 Principis de la tècnica d'IR per Transformada de Fourier

La tecnologia FTIR significa anàlisi mitjançant la tècnica d'infraroig per transformada de Fourier. Per a la regió d'infraroig, el mètode més important i àmpliament utilitzat per obtenir immediatament l'espectre complet és l'espectrofotometria de Transformada de Fourier.

La determinació de la composició química de la llet per espectrofotometria d'infraroig, es basa en el principi de què l'absorció de la llum en una longitud d'ona específica per a cada component a analitzar, és proporcional a la seva concentració [18]. La radiació infraroja és la part de l'espectre electromagnètic amb una longitud d'ona més llarga que la llum visible però més curta que la radiació de microones [21]. L'infraroig es pot dividir en bandes espectrals determinades:

- Infraroig proper: 0.75 – 1.4 μm
- Infraroig mitjà: 1.4 – 15 μm
- Infraroig llunyà: 15 – 1000 μm

L'ànima de l'espectrofotòmetre de la transformada de Fourier és l'interferòmetre, dissenyat per Albert Michelson el 1891 (Figura 3.5). En aquest dispositiu, la radiació es fa incidir a un divisor de feix de llum, que separa el feix en dos parts iguals. Aquests dos feixos de llum interfereixen al divisor després del viatge de tornada quan són reflectats sobre dos miralls. Un dispositiu davant la trajectòria del feix de llum original (mirall mòbil) i l'altre perpendicular (mirall estacionari). En aquesta trajectòria hi ha la mostra i a continuació el detector IR [20].

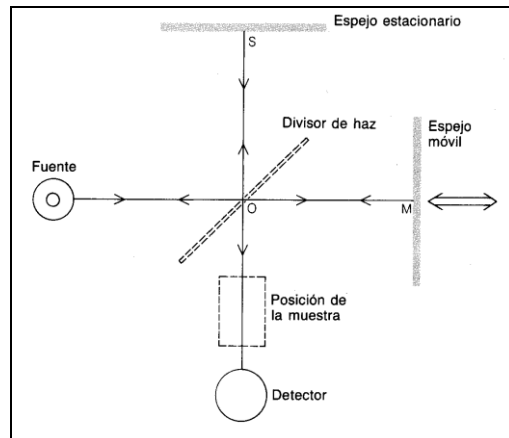


Figura 3.5. Diagrama esquemàtic de l'interferòmetre de Michelson [18]

En un espectrofotòmetre de Fourier, la mostra s'acostuma a col·locar entre la sortida de l'interferòmetre i el detector, com es mostra a la Figura 3.5.

La Transformada de Fourier s'utilitza com un mètode matemàtic per el desenvolupament en sèrie de la corba obtinguda (interferograma, gràfic resultant de intensitat vs. desfasament). La transformada està constituïda pel sumatori de sinus i cosinus de les diferents freqüències òptiques que componen la radiació. Gràcies a un programa informàtic aquest càlcul matemàtic es simplifica i s'obtenen resultats exactes i ràpids [20]. D'aquesta manera amb un únic espectre es poden identificar simultàniament els diferents components de la mostra.

L'espectrofotòmetre d'infraroig de transformada de Fourier és un instrument tècnicament molt complex. Tot i així, per les avantatges de rapidesa, exactitud de freqüència, ús més eficient de la radiació per l'interferòmetre (comparat amb un monocromador), millor relació senyal-soroll per a una resolució donada, i mitjans de tractament de dades incorporats a l'equip, ràpidament està substituint als instruments tradicionals de dispersió [18].

Per a realitzar aquest projecte s'utilitzarà l'equip anomenat MilkoScan (espectrofotòmetre d'infrarojos per transformada de Fourier), que juntament amb un Fossomatic (recompte de cèl·lules somàtiques), formen el CombiFoss. El funcionament i les característiques d'aquests equips es detallen a continuació.

3.2.2. CombiFoss™ FT+

El CombiFoss, com es pot veure a la Figura 3.6, actualment integra en un mateix programa el funcionament sincronitzat d'un MilkoScan (determinació quantitativa del contingut en greix, proteïna, lactosa i ESM) i d'un Fossomatic (determinació del contingut en cèl·lules somàtiques), controlant alhora el funcionament del conjunt de la pipeta, el lector de codis de barres i el *conveyor* (cinta transportadora), per tal d'obtenir resultats simultanis dels dos equips, tal com es pot veure a la figura 3.7.



Figura 3.6. Equip CombiFoss 6000 utilitzat per realitzar aquest projecte

CombiFoss™ FT+ és la integració perfecte de MilkoScan FT i Fossomatic™ FC que proporciona:

- Anàlisi de composició basat en tecnologia FTIR d'espectre complet.
- Recompte de cèl·lules somàtiques per citometria de flux.
- Integració d'instruments.
- Integració d'analitzadors i sistemes de laboratori.
- Control i ajust automàtic del rendiment.
- Identificació automàtica de mostres.
- Registre automàtic de dades relacionades amb el control de qualitat.
- Possibilitat d'actualització i millora de l'equip.
- Modularitat



Figura 3.7. Detall pipeta i pots de mostres

Integrated Milk Testing™ (IMT) és la solució analítica més completa per a l'anàlisi de la composició i higiene de la llet. És aplicable, per exemple, al procés de pagament (per calcular el preu final del producte) i per a la millora ramadera. El concepte IMT està format per :

- Unitats d'anàlisi de la llet : composició de la llet, determinació del punt de congelació i recompte de cèl·lules somàtiques.
- Sistema compartit de transport i pipeta amb lector de codis de barres.
- Software compartit.
- Impressora.

3.2.3. *MilkoScan™ FT+*

El sistema òptic de l'equip és un sistema compacte d'un sol feix de llum, una única cubeta de lectura i un mecanisme d'interposició de filtres òptics. A la llet existeixen constituents amb grups funcionals molt definits, la determinació dels quals dona informació sobre els diferents compostos presents a la llet, com es pot observar a la taula 3.1:

Taula 3.1. Grups funcionals d'alguns components de la llet

Paràmetre	Grup funcional	λ d'absorció (nm)
Greix	Grups carbonil (-C=O)	5.73
	Grups (-CH)	3.50
Proteïna	Grups amida (-CO-NH-)	6.50
Lactosa	Grups hidroxil (-OH)	9.60
Urea	Grups amina (-NH ₂)	3.40

A més, aquest equip permet mesurar de manera indirecta l'extracte sec magre (ESM) sumant els resultats de proteïna+lactosa+constant de minerals (cendres). El MilkoScan FT 6000 (Figura 3.8) és un espectrofotòmetre d'infrarojos de FTIR de gama mitja (2-10 μ m) que analitza els paràmetres de greix, proteïna, lactosa i ESM. El diagrama de l'equip MilkoScan es pot veure a la figura 3.9.



Figura 3.8. Detall equip MilkoScan [19]

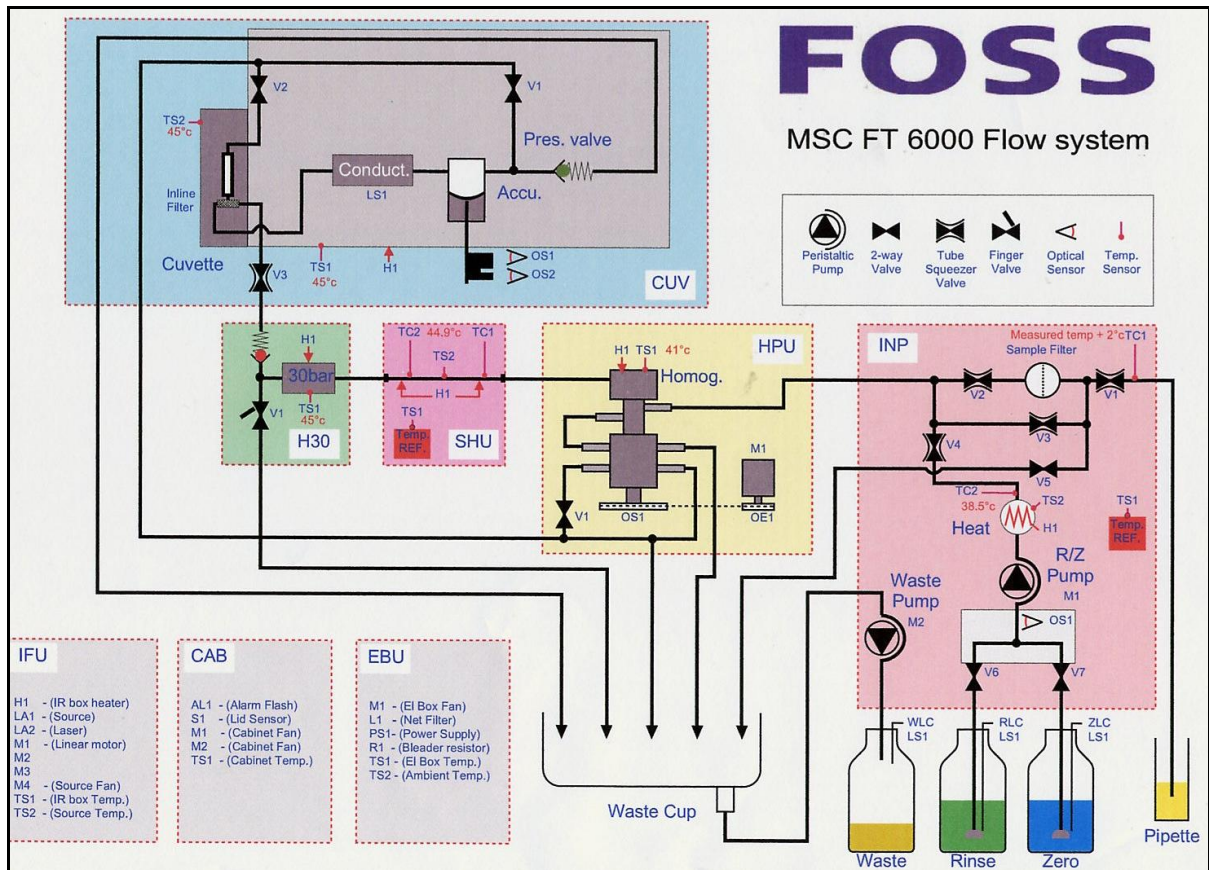


Figura 3.9. Diagrama del MilkoScan [23]

➤ Seqüència d'operacions:

- L'equip aspira per la pipeta una quantitat suficient de mostra (8 ml)
- Bombeja la mostra a través del circuit de líquids homogeneïtzant la mida dels glòbuls grassos i arrossegant les restes de l'anterior mostra analitzada.
- Omple la cubeta de lectura amb la mostra ja homogeneïtzada (mantenint una pressió i temperatura constants) formant una fina pel·lícula de poques micres de gruix.
- El sistema òptic fa passar un feix de llum infraroja a través de la cubeta, interposant en ràpida successió una sèrie de filtres que seleccionen les longituds d'ona específiques per als components a determinar.
- La senyal de llum produïda és detectada i processada. En funció de les dades de calibratge es presenten les dades dels resultats a la pantalla.

El MilkoScan™ FT+ és un analitzador de llet per l'anàlisi del pagament per qualitat i la millora de l'explotació ramadera dedicada a la producció de llet. Aquest sistema ofereix:

- Temps d'anàlisi per mostra de 20 segons.
- FTIR d'espectre complet que proporciona un ampli rang de paràmetres de composició de la llet crua.
- Anàlisi precís d'urea.
- Selecció de depressió del punt de congelació.

Permet un anàlisi ràpid i rentable de la composició de la llet :

- Ampli rang de paràmetres analitzats
- Baix cost per mostra analitzada
- La pipeta autonetejant facilita l'anàlisi inclús de les mostres més difícils de manera ràpida.
- Identificació de radiofreqüència per identificació de mostres amb codi de barres.
- Eficax sistema de cinta transportadora.

MilkoScanTM FT+ s'ha dissenyat per l'anàlisi de llet crua de vaca, ovella, cabra i búfala. La tecnologia FTIR ofereix un ampli rang de paràmetres de composició incloent greixos, proteïnes, lactosa, sòlids, caseïna, àcids grassos lliures, urea i depressió del punt de congelació (veure punt 7.7 de l'annex).

Actualment a l'ALLIC l'equip està calibrat i realitza de manera sistemàtica els anàlisis següents en llet de vaca:

- Greix, proteïna, lactosa i extracte sec magre: aquests paràmetres s'utilitzen als esquemes de pagament per qualitat i en la informació del seguiment de les granges.
- Depressió del punt de congelació (FPD): per a la detecció de l'aigua afegida. Les mostres de llet amb aigua afegida tenen una temperatura de congelació més alt que les mostres sense aigua afegida.

3.2.4. FossomaticTM FT+

Aquest equip s'utilitza per al recompte de cèl·lules somàtiques en llet crua. Aquest procediment és d'aplicació a totes les mostres de llet crua que tinguin cèl·lules somàtiques en un rang comprès entre 10×10^3 i 10000×10^3 cèl/ml. El contingut en cèl·lules somàtiques és un paràmetre de qualitat de la llet, indicatiu de la condició sanitària del ramat.

El mètode fluoro-òptico-electrònic en el que es basa el funcionament del Fossomatic, consisteix en tenyir l'ADN del nucli de les cèl·lules presents a la mostra amb un colorant específic (Bromur d'Etidi), que emetrà una fluorescència vermella al ser sotmès a llum blava en una determinada longitud d'ona. Aquesta llum vermella es detecta i després pot comptar-se amb un fotomultiplicador com polsos de llum.

El sistema de mesura d'aquest Fossomatic és per mitjà de citometria de flux, la qual es basa en el principi de fer passar un fil de mostra molt petit per sota d'una unitat comptadora.

L'equip Fossomatic realitza de manera completament automàtica tota la seqüència d'operacions, des de la barreja de la llet a analitzar amb el colorant, fins al comptatge microscòpic, necessari per donar el resultat [19, 23].

3.2.5. Preparació de reactius

Reactius per al MilkoScan 6000

- Solució de zero: per ajustar el zero i per netejar entre mostra i mostra.
Introduir un sobre de S-6060 (5 ml, FOSS) en 4 l d'aigua destil·lada.
(caducitat 1 setmana)
- Solució de purga: per netejar el sistema de flux.
Dissoldre una ampolla de MSC-Rinse Concentrate (50 ml, FOSS) en 10 l d'aigua destil·lada.
(caducitat 2 setmanes)
- Líquid de neteja de la cubeta i cèl·lula de flux:
Preparar una solució al 0.5% de solució de purga en aigua destil·lada.
(caducitat 2 setmanes)
- Blanc: s'utilitza per a la neteja del sistema de flux des de la pipeta fins al filtre d'aspiració.
Dissoldre 4 g de KCl (Panreac PA-ACS-ISO) en 1 l de solució de purga. S'afegeix KCl per assegurar la conductivitat de manera que la pipeta detecti líquid.
(caducitat 2 setmanes)

3.2.6. Preparació de patrons

Patrons per realitzar els assajos previs amb mostres sintètiques.

Es prepara un patró stock d'urea d'uns 12000 ppm. Per tant, s'hauran de pesar 1.2 g d'urea dissolts en 100 ml d'aigua.

$$\frac{12000 \text{ mg urea}}{1000 \text{ ml}} \cdot \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \cdot 100 \text{ ml} = 1.2 \text{ g urea en } 100 \text{ ml}$$

$$\frac{1.2012 \text{ g}}{100 \text{ ml}} \cdot \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \cdot \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ l}} = 12012 \text{ ppm urea} \rightarrow \text{Patró stock de } 12012 \text{ ppm d'urea.}$$

Es preparen 3 nivells a partir del patró stock per obtenir una recta:

UREA 1: Sense addició

UREA 2: 10 ml de patró stock en 2000 ml de llet

$$12012 \text{ ppm urea} \cdot \frac{10 \text{ ml}}{2000 \text{ ml}} = 60.06 \text{ ppm} \Rightarrow \text{Es fa una addició de } 60.06 \text{ ppm d'urea}$$

UREA 3: 20 ml de patró stock en 2000 ml de llet

$$12012 \text{ ppm urea} \cdot \frac{20 \text{ ml}}{2000 \text{ ml}} = 120.12 \text{ ppm} \Rightarrow \text{Es fa una addició de } 120.12 \text{ ppm d'urea}$$

La lectura directa de la llet UHT (amb l'equip CL-10) és de 300 ppm aproximadament. Es vol aconseguir un valor d'unes 200 ppm, per tant, s'haurà de fer una dilució 2:1 (2 parts de llet: 1 part d'aigua). Es partirà d'un volum total de 6 l per poder preparar patrons per tot el mes, ja que la llet UHT és la única que garanteix 30 dies d'utilització sense alterar el valor d'urea i sense acidificar-se [22]. Per tant, s'hauran de mesclar 4 l de llet i 2 l d'aigua.

Es preparen 2 l d'aigua amb KCl al 0.7%. La llet s'ha de diluir amb aquesta aigua per no perdre la conductivitat de manera que la pipeta dels equips detectin líquid. Es pesen 14 g de KCl i s'enrasa fins a tenir 2 l amb aigua destil·lada. Es mesclen 4 l de llet UHT comercial assegurant que corresponen al mateix lot (Llet ATO UHT sencera, Lot 06291647491TG, Cad. 26/6/09). Als 6 l s'hi ha d'afegir conservant, en aquest cas dicromat de potassi al 1‰, per tant, s'haurà d'afegir 6 g de dicromat de potassi als 6 l preparats.

$$6 \text{ litres} \quad \left\{ \begin{array}{l} 2 \text{ litres} \rightarrow \text{sense addició} \Rightarrow \text{UREA 1} \\ 2 \text{ litres} \rightarrow \text{addició de 10 ml de patró stock} \Rightarrow \text{UREA 2} \\ 2 \text{ litres} \rightarrow \text{addició de 20 ml de patró stock} \Rightarrow \text{UREA 3} \end{array} \right.$$

Patró control LLET UREA

Es prepara un patró stock d'urea d'uns 12000 ppm, per tant, s'hauran de pesar 1.2 g d'urea dissolts en 100 ml d'aigua destil·lada:

$$\frac{12000 \text{ mg urea}}{1000 \text{ ml}} \cdot \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \cdot 100 \text{ ml} = 1.2 \text{ g urea en 100 ml}$$

$$\frac{1.2009 \text{ g}}{100 \text{ ml}} \cdot \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \cdot \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ l}} = 12009 \text{ ppm urea} \rightarrow \text{Patró stock de 12009 ppm d'urea.}$$

Amb aquesta llet diluïda es prepara un patró de la següent manera: 20 ml de patró stock diluïts amb llet fins a 2000 ml.

$$12009 \text{ ppm urea} \cdot \frac{20 \text{ ml}}{2000 \text{ ml}} = 120.09 \text{ ppm} \Rightarrow \text{Es fa una addició de 120.09 ppm d'urea.}$$

3.2.7. Preparació de mostres

Protocol de presa de mostres

- La presa de mostra per pagament per qualitat es realitzarà sempre de manera aleatòria, directament del tanc o tancs de refrigeració de llet de l'explotació ramadera, en presència del titular de l'explotació lletera.
- La presa de mostres la realitzarà personal que hagi rebut una formació adequada per aquesta finalitat.

1/ Moment i lloc de la presa de mostres:

- La mostra es prendrà en condicions higièniques adients, per tant, en el lloc de la presa de mostra s'haurà d'evitar tot allò que pugui actuar com a contaminant.
- En el moment de prendre la mostra, la llet continguda en el tanc de refrigeració haurà d'estar homogeneïtzada per agitació, durant, com a mínim, tres minuts.

2/ Recollida de mostres:

- Es desinfectarà el ferro per a la presa de mostra mitjançant un cotó hidròfil mullat en alcohol, tal i com es pot observar a la figura 3.10.



Figura 3.10. Desinfecció del ferro per la presa de mostra

- Es col·locarà el flascó de recollida de mostra, que haurà de ser d'un sol ús, estèril i precintable, al ferro i es procedirà a la presa de mostra de llet del tanc. Es recollirà un volum de llet de 50 ml.
- Un cop recollit el volum de llet indicat, s'afegirà un producte bacteriostàtic (azidiol), una monodosi per mostra, amb la finalitat d'evitar que es produeixi un increment de bacteris en el temps que passa des de la recollida de mostra fins a l'anàlisi de la mateixa. Per evitar aquest increment de bactèries, és molt important una **bona refrigeració de la mostra durant el transport**.
- Es precintarà la mostra i s'agitarà per tal que l'azidiol sigui distribuït de manera uniforme en tot el volum de llet.

3/ Etiquetatge:

- La mostra serà identificada mitjançant codificació amb codi de barres, com es pot observar a la figura 3.11. El Laboratori Interprofessional Lleter de Catalunya té establert un codi intern amb la finalitat de garantir la confidencialitat de la mostra. En l'etiqueta de la mostra s'hi escriurà la data de recollida.



Figura 3.11. Identificació de les mostres amb etiqueta de codi de barres

- És molt important identificar la mostra correctament amb el codi de barres de l'explotació. En cas de trobar una explotació amb més d'un tanc, si es recull mostra dels diferents tancs, les mostres recollides s'han de diferenciar amb el codi de barres que correspon a cadascun dels tancs (tanc1, tanc2,...).
- Les mostres s'introduiran en gradetes.

4/ Transport:

- Les mostres es transportaran en neveres isoterms portàtils.
- Les mostres es conservaran en tot moment a una temperatura inferior a 4°C i protegides de la llum fins que arribin al laboratori on es realitzaran les analítiques corresponents. És molt important que la mostra no es congeli. En cas de congelació cal indicar-ho mitjançant una senyal a la mateixa mostra.
- Totes les mostres seran analitzades al Laboratori Interprofessional Lleter de Catalunya on es determinarà la qualitat de la llet.
- No han de passar mai més de tres dies des de la presa de mostra fins a la realització de l'anàlisi [25].

Condicionament de les mostres

Les mostres no necessiten cap preparació, l'únic paràmetre important a tenir en compte és la temperatura: per analitzar-les mitjançant l'equip CL-10 han d'estar entre 18-30 °C (temperatura ambient) i per l'anàlisi mitjançant FTIR han d'estar entre 37-42 °C (s'escalfen amb un bany d'aigua termotitzat extern a l'equip).

El bany de què disposa el laboratori (veure figura 3.12) permet tenir la suficient quantitat de mostres al bany i a la temperatura adequada per tal de no haver de parar. A mesura que es van traient mostres del bany per col·locar-les a la cinta transportadora, es van posant altres mostres perquè es vagin escalfant, de manera que quan s'agafen per posar-les a l'equip ja estan a la temperatura adequada. Està comprovat que una mostra de control de qualitat necessita estar 15 minuts al bany per arribar a la temperatura de 37-42 °C.



Figura 3.12. Bany d'aigua termotitzat a 42 °C

4. RESULTATS

Inicialment es farà un estudi previ per determinar l'estabilitat dels patrons i la reproducibilitat del mètode FTIR. En segon lloc, una vegada estigui comprovat que l'equip MilkoScan és repetitiu i reproduïble per l'anàlisi d'urea es comprovarà la calibració interna de l'equip. En tercer lloc s'avaluarà l'efecte de possibles interferències en l'anàlisi d'urea en llet crua de vaca mitjançant l'equip MilkoScan. Finalment es validaran els resultats obtinguts amb el mètode proposat comparant resultats de mostres reals i de patrons de referència analitzats amb el mètode de referència i amb el mètode de FTIR.

4.1. Posada a punt del mètode d'espectroscòpia IR per transformada de Fourier

4.1.1. Assajos previs amb mostres sintètiques

Els patrons de Greix, proteïna, lactosa, ESM i cèl·lules somàtiques no afecten a l'hora de preparar els patrons d'urea. Només s'exposarà la preparació dels patrons d'urea ja que és el paràmetre que es vol estudiar.

El primer que es vol obtenir és un patró que sigui estable i que permeti controlar l'estabilitat de l'equip MilkoScan una vegada estigui calibrat per a l'anàlisi d'urea. La llet UHT és la única que garanteix 30 dies d'utilització sense alterar el valor d'urea i sense acidificar-se, segons explica un article publicat per el Laboratorio de Calidad de Leche del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) a Uruguai el 2005 [22]. El que es farà abans de posar a punt el mètode serà controlar l'estabilitat dels patrons d'urea preparats amb la llet UHT. D'aquesta manera, es podrà controlar l'estabilitat del MilkoScan i així garantir que la senyal que ens dona l'equip és correcte, o en cas contrari, saber que existeix algun problema.

Aquestes lectures dels patrons es realitzen sense calibrar l'equip, ja que el que interessa en aquest cas només és comprovar que les lectures son estables i no el valor exacte de la concentració, és a dir, la repetibilitat de l'equip.

Es preparen 3 patrons d'urea en llet UHT amb aigua destil·lada. Aquests patrons tindran una concentració aproximada de 300, 360 i 420 ppm d'urea. La preparació d'aquests patrons està descrita a l'apartat 3.2.6. Cada patró (Urea 1, Urea 2 i Urea 3) es reparteix en 40 pots de 50 ml i es conserven a la nevera. D'aquesta manera cada dia es treu un pot de cada patró per tal de fer la lectura d'urea per l'equip MilkoScan. A l'Annex 7.9 (taula 7.4) es poden veure els valors d'urea obtinguts dels patrons de llet UHT analitzats cada dia durant un mes per l'equip MilkoScan.

Es pot comprovar que el coeficient de variació és inferior a 5% (calculat com $Sd \cdot 100 / \text{mitjana}$) en tots tres patrons, i per tant, es poden utilitzar aquests patrons per avaluar l'estabilitat de l'equip.

A la taula 4.1 hi ha reflectida la mitjana dels valors obtinguts dels patrons d'UHT durant 1 mes, i a les figures 4.1, 4.2 i 4.3 s'hi pot observar la representació de l'interval que podem donar com a vàlid, es considera ± 15 ppm sobre el valor obtingut el primer dia de la lectura. Aquest interval de ± 15 ppm és la incertesa que accepten els certificats de CECALAIT (patrons de referència d'un laboratori extern) per aquests nivells de concentració, i s'ha considerat la mateixa incertesa per els patrons preparats al laboratori. La línia discontinua de color blau representa el valor de la primera lectura realitzada del patró, i s'agafa aquest valor com el de referència per tal de seguir la seva estabilitat al llarg del temps. Les línies de color vermell representen l'interval de ± 15 ppm referit a aquest valor de referència.

Taula 4.1. Valors mitjans d'urea dels patrons de llet UHT pel control de l'estabilitat (taula completa a l'annex 7.9, taula 7.4)

	UREA 1	UREA 2	UREA 3
1	182	231	277
2	181	216	288
3	173	226	287
4	186	232	288
5	182	236	287
6	179	220	278
7	175	228	272
8	181	242	304
9	182	221	286
10	172	227	279
11	177	236	280
12	171	233	283
13	169	222	285
14	176	235	288
15	179	235	276
16	173	222	277
Mitjana	177	229	283
Sd	4.87	7.27	7.53
C.V.	2.75	3.18	2.66

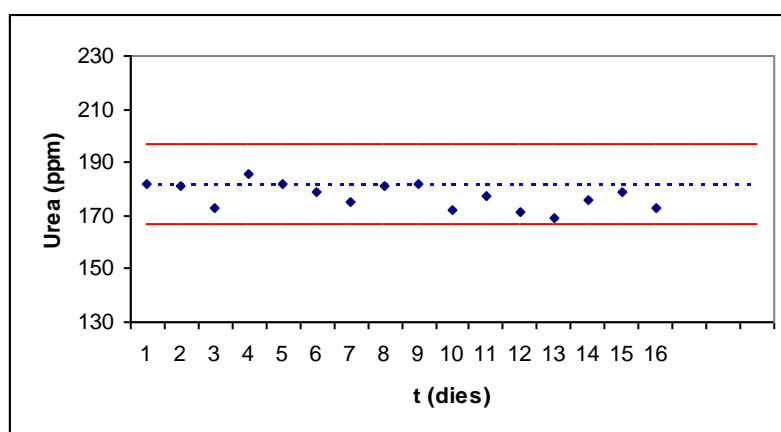


Figura 4.1. Evolució de la senyal de la concentració d'urea del patró UHT d'urea 1 indicant la incertesa acceptada de ± 15 ppm respecte el primer resultat obtingut.

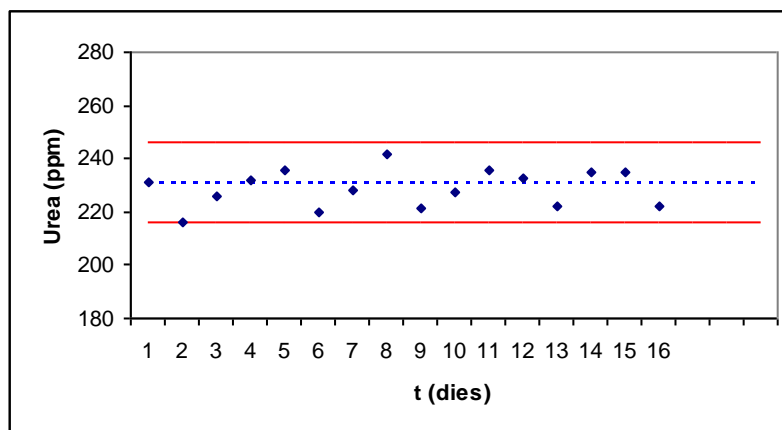


Figura 4.2. Evolució de la senyal de la concentració d'urea del patró UHT d'urea 2 indicant la incertesa acceptada de ± 15 ppm respecte el primer resultat obtingut.

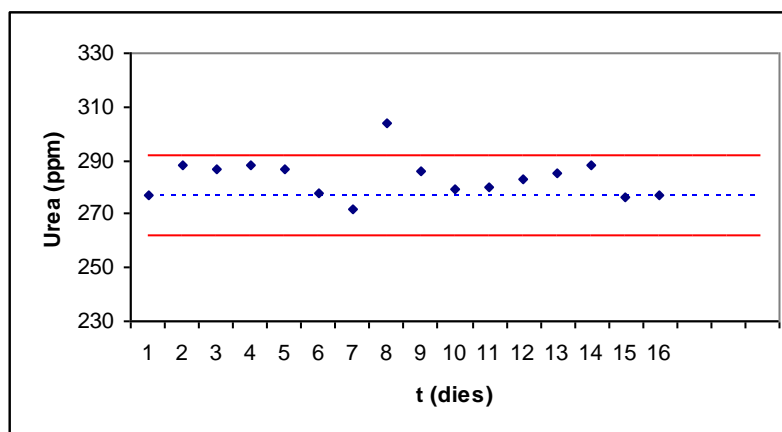


Figura 4.3. Evolució de la senyal de la concentració d'urea del patró UHT d'urea 3 indicant la incertesa acceptada de ± 15 ppm respecte el primer resultat obtingut.

Les lectures dels patrons al llarg del temps estan dins els límits establerts pel laboratori (incertesa de ± 15 ppm del primer resultat obtingut), excepte un punt del patró UHT de urea 3. Per tant, els patrons preparats amb llet UHT es consideren patrons vàlids per tal de portar a terme un control de l'estabilitat dels resultats i de la reproduïbilitat de l'equip.

4.1.2. Comprovació de la calibració interna de l'equip

L'equip MilkoScan està calibrat internament per la casa FOSS. Quan es fa un anàlisi d'urea en llet no s'obté una senyal analítica per la pantalla sinó que l'equip indica directament la concentració d'urea de la mostra. Per tant, no es pot realitzar un calibrat estàndard analitzant una sèrie de patrons per obtenir una corba de calibratge, i després, extrapolar en aquesta corba la senyal que dona cada mostra per obtenir la concentració. Amb aquest equip, s'han de modificar els paràmetres de la corba interna, per fer això, s'han d'analitzar patrons de concentració coneguda i anar ajustant els paràmetres de la corba interna fins a obtenir la concentració desitjada.

Per tenir uns valors de referència fiables, i poder fer la comparació dels valors obtinguts per ambdós equips, es demanen els patrons d'urea de CECALAIT. Els patrons que tenim són del 05/2009 (veure certificat d'anàlisi a l'annex 7.10). A la taula 4.2 hi ha els primers anàlisis obtinguts amb l'equip CL-10, que és el mètode de referència.

Taula 4.2. Valors d'urea dels patrons CECALAIT 05/2009 mesurats amb l'equip CL-10 (mètode de referència)

patró	Valor Urea amb CL-10 (ppm)	Valor certificat (ppm)	Diferència (desviació respecte el valor de referència)
1	170	167±15	3
2	342	335±19	7
3	507	503±22	4
4	672	671±27	1
5	843	838±27	5

Es pot observar i comprovar que totes les lectures dels patrons realitzades amb el CL-10 entren dins el rang establert per l'organisme certificador CECALAIT, i s'obté una corba (veure figura 4.4) amb un coeficient de correlació de 0.9999. Per tant, aquests valors demostren el correcte funcionament de l'equip CL-10 per poder-lo utilitzar com a instrument de referència per posar a punt el MilkoScan per a la determinació de la urea.

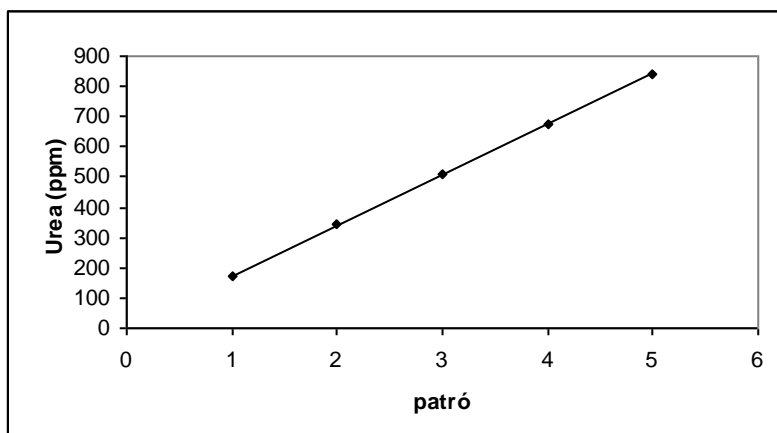


Figura 4.4. Corba de calibratge de l'equip CL-10 amb els patrons CECALAIT, $R^2=0.999$

Una vegada s'han comprovat els patrons amb el CL-10 es fa l'anàlisi amb el MilkoScan sense modificar cap paràmetre de l'equip. Ja que suposadament està calibrat per defecte aquest paràmetre, primer es fa una primera lectura per situar els valors i, així conèixer, quins són els ajustos que s'hauran de realitzar als paràmetres d'operació de l'equip. Els valors obtinguts i la calibració interna de l'equip es poden veure a la taula 4.3.

Taula 4.3. Valors promig d'urea en els patrons CECALAIT mesurats amb l'equip MilkoScan. Corba de l'equip $y=1.08663 \cdot x-155$
La taula completa de valors obtinguts es pot observar a l'annex 7.11, taula 7.5

patró	Valor Urea promig amb MilkoScan (ppm) (n=3)	Valor certificat (ppm)	Diferència (desviació respecte el valor de referència)
1	125±10	167±15	-42
2	295±13	335±19	-40
3	447±17	503±22	-56
4	618±5	671±27	-53
5	778±13	838±27	-60

Es pot observar que els resultats obtinguts difereixen unes 50 unitats de promig respecte els valors de referència. Els valors obtinguts són inferiors als esperats però segueixen una tendència lineal (veure figura 4.5), ja que el coeficient de regressió de la corba obtinguda és 0.9997 i la corba corresponent és $Y = 1.08663 \cdot X - 155$

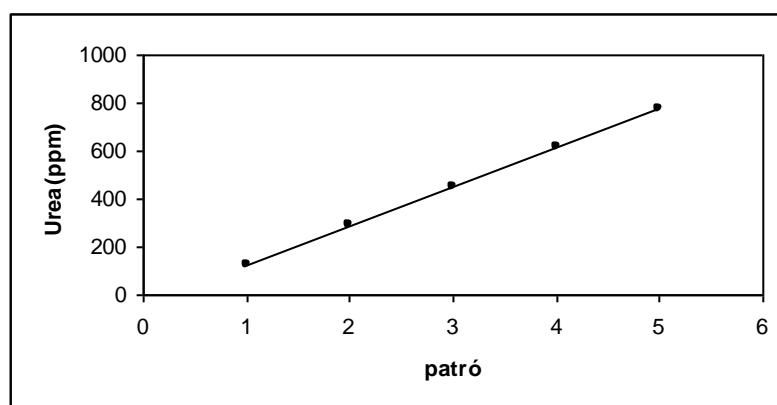


Figura 4.5. Primera aproximació a la corba de calibratge de l'equip MilkoScan, $R^2=0.9997$

S'ha comprovat que l'equip es troba amb unes condicions inicials que no són les correctes per a l'anàlisi de la urea, per tant, s'ha de recalibrar abans de poder ser utilitzat per l'anàlisi d'urea en llet. Inicialment es té una corba amb la qual s'obtenen uns valors d'urea unes 50 unitats (50 ppm) per sota dels valors obtinguts amb el mètode de referència, tal com es pot observar a la taula 4.4. Si es comparen els resultats obtinguts amb ambdós mètodes:

Taula 4.4. Comparació dels valors obtinguts amb els dos mètodes abans de canviar les condicions del MilkoScan

patró	Urea (ppm) CL-10	Urea (ppm) MilkoScan
1	170	125
2	342	295
3	507	447
4	672	618
5	843	778

Amb els valors d'aquesta taula elaborem la representació gràfica, com es pot observar a la figura 4.6, on es pot veure gràficament que les pendents són gairebé iguals però les ordenades a l'origen són força diferents. Amb el MilkoScan els resultats són sempre unes 50 ppm inferiors que amb el CL-10.

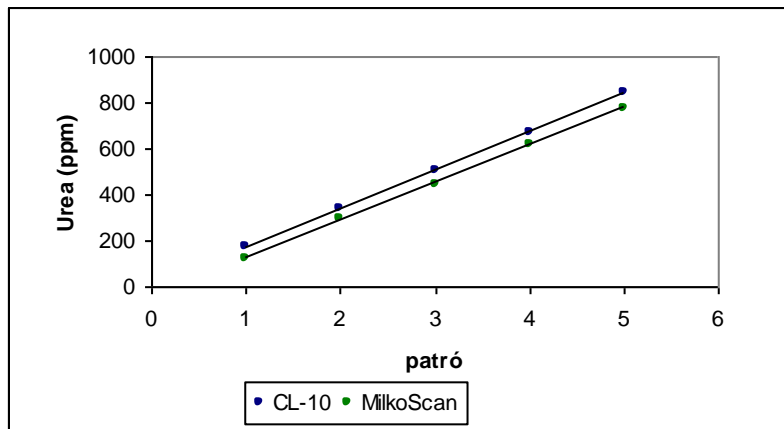


Figura 4.6. Representació de les corbes obtingudes amb els dos equips: CL-10 i MilkoScan

S'utilitza la comparació de mètodes per regressió lineal [24]. En aquest mètode es calcula el valor de l'ordenada a l'origen, la pendent i el coeficient de correlació per regressió directa dels valors obtinguts front als de referència. Si cada mostra presenta un resultat idèntic amb els dos mètodes analítics, la recta de regressió tindrà una ordenada a l'origen de 0 i pendent de 1. Per comprovar que la ordenada a l'origen i la pendent no difereixen significativament de 0 i 1 respectivament, s'han determinat els límits amb un nivell de confiança del 95%. Si es comparen els resultats obtinguts amb les dues tècniques mitjançant aquest mètode, com es pot veure a la figura 4.7, s'obté una pendent quasi de 1 i una ordenada a l'origen de -40. L'equació de la recta obtinguda és: $Y=0.97(\pm 0.03)\cdot X-40(\pm 16)$ amb un coeficient de correlació de $R^2=0.9997$, Això indica que s'ha d'ajustar la corba de calibració interna del MilkoScan, sobretot l'ordenada a l'origen ja que la recta no passa per el zero.

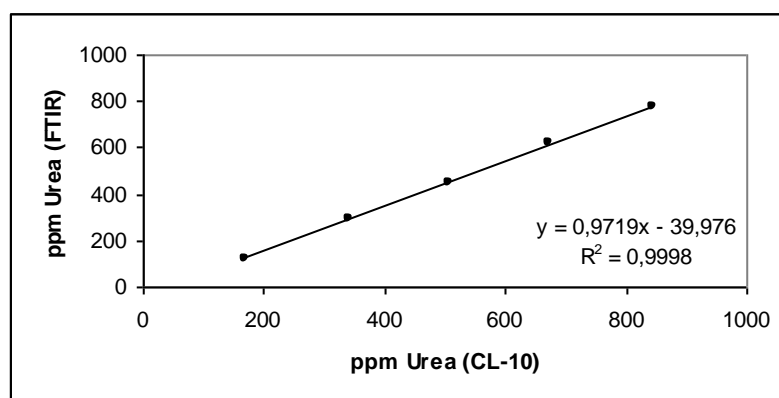


Figura 4.7 Corba de comparació dels resultats obtinguts amb els dos mètodes

S'haurà de determinar si s'ha de variar i en quina mesura l'ordenada a l'origen de la corba de l'equip i/o la pendent. Partim d'una corba de regressió inicial $Y = 1.08663\cdot X-155$. Amb els valors de la concentració obtinguts (valors de Y) es calcula la senyal analítica que s'obté mitjançant la corba (valors de X). Els resultats obtinguts es poden veure a la taula 4.5.

Corba de regressió inicial**Taula 4.5.** Corba de regressió inicial

Y _i (concentració)	X _i (senyal)
125	257.677
295	414.124
447	554.006
618	771.374
778	858.618

Calculant X_i mitjançant la formula: $X_i = \frac{(Y_i - b)}{a}$

Es calcula una corba amb una ordenada a l'origen 50 unitats superior (50 ppm) i sense variar la pendent, s'obté la corba de regressió $Y = 1.08663 \cdot X - 105$. Teòricament s'obtindrien els valors mostrats a la taula 4.6.

Corba de regressió aparell**Taula 4.6.** Valors de Y teòrics obtinguts amb la corba $Y = 1.08663 \cdot X - 105$

Y (estimada)
175
345
497
668
828

Calculant Y (estimada) mitjançant la corba de regressió de l'aparell substituint els valors de X_i calculats amb la corba de regressió amb l'ordenada a l'origen 50 unitats superior:

$$Y (\text{estimada}) = a \cdot X_i + b = 1.08663 \cdot X_i - 105$$

Corba de regressió estimada

Si es calcula una corba tenint en comte la senyal analítica que dona l'aparell com a valors de X i els valors de referència dels patrons de CECALAIT com a valors de Y, s'obté una corba de regressió estimada on s'ha de canviar l'ordenada a l'origen i la pendent de la següent manera:

$$a = 1.11903$$

$$b = -122.91447$$

$$\text{Obtenint la corba: } Y = 1.11903 \cdot X - 122.91447$$

Aquests valors de la corba s'obtenen de la següent manera:

Valor de b: es calcula la intersecció entre els punts de Y (referència) i els valors de X_i (senyal)

Valor de a: és la pendent de la recta entre els punts de Y (referència) i els valors de X_i (senyal)

Calculant Y (estimada) mitjançant la corba de regressió estimada substituint els valors de X_i calculats amb la corba:

$$Y (\text{estimada}) = a \cdot X_i + b = 1.11903 \cdot X_i - 122.91447$$

Amb aquesta corba i tenint en compte la senyal analítica de l'aparell s'haurien d'obtenir els valors d'urea estimats dels patrons de CECALAIT exposats a la taula 4.7, que són valors molt pròxims als valors de referència de l'organisme certificador.

Taula 4.7. Valors de Y teòrics obtinguts amb la corba $Y = 1.11903 \cdot X - 122.91447$ i valors de referència

Y (referència)	Y (corregida)
167	165.4
335	340.5
503	497.0
671	673.1
838	837.9

Segons aquests càlculs s'ha de canviar la pendent i l'ordenada a l'origen de la corba per tal d'aconseguir que els valors dels patrons de CECALAIT entrin dins els rangs definits al certificat d'anàlisi i es puguin comparar amb els valors obtinguts amb l'equip de referència CL-10.

A la figura 4.8 s'hi poden observar les 3 corbes obtingudes per calibrar l'equip (la corba inicial, la corba de l'aparell i la corba estimada).

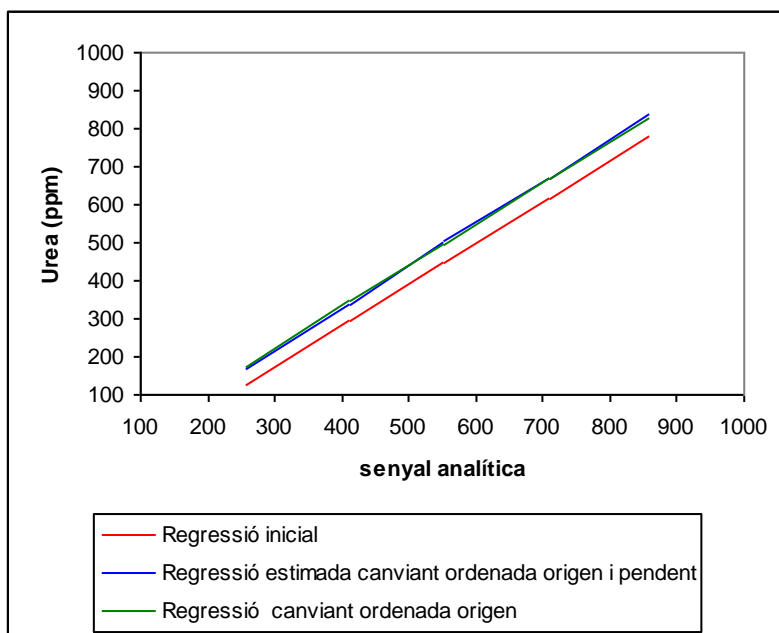


Figura 4.8. Representació gràfica de les corbes de regressió obtingudes

A la taula 4.8 es poden veure els resultats obtinguts després de realitzar els canvis a les condicions del MilkoScan.

Taula 4.8. Valors d'urea dels patrons CECALAIT 05/2009 mesurats amb l'equip MilkoScan.
Corba de l'equip $y=1.11903 \cdot x-122.91447$

La taula completa de valors obtinguts es pot observar a l'annex 7.11, taula 7.5

patró	Valor Urea promig amb MilkoScan (ppm) (n=3)	Valor certificat (ppm)	Diferència (desviació respecte el valor de referència)
1	175±19	167±15	+9
2	350±6	335±19	+15
3	514±2	503±22	+11
4	674±4	671±27	+3
5	856±8	838±27	+18

Es pot observar que totes les lectures dels patrons realitzades entren dins el rang establert per CECALAIT, i s'obté una corba de calibració amb un coeficient de correlació de 0.9996 (veure figura 4.9).

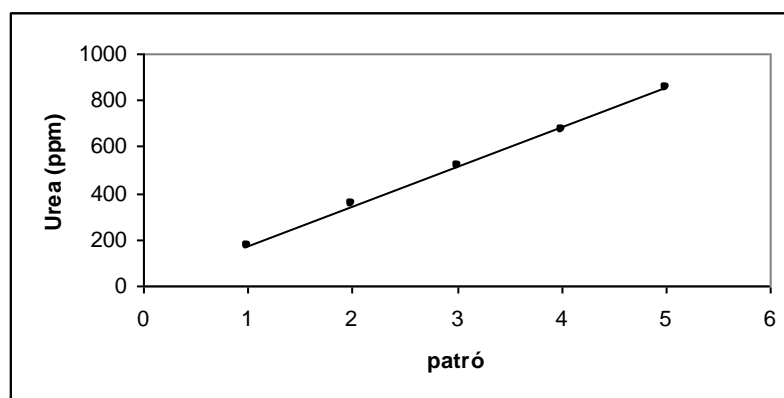


Figura 4.9. Corba obtinguda amb el patrons CECALAIT 05/2009 i amb la corba de calibració de l'equip $y=1.11903 \cdot x-122.91447$

Per comprovar que el mètode és correcte es comparen els resultats obtinguts amb els dos mètodes mitjançant la prova *t de student* de diferències entre parelles de valors, els resultats es poden observar a la taula 4.9.

Taula 4.9. Comparació dels valors obtinguts amb els 2 mètodes mitjançant el mètode de la prova *t*

Patró	Urea (ppm) CL-10 Mètode A	Urea (ppm) MilkoScan Mètode B	Diferència (d _i)
1	170	175±19	5
2	342	350±6	8
3	507	514±2	7
4	672	674±4	2
5	843	856±8	13

$$\bar{d} = 7$$

El mètode B (MilkoScan) dona uns resultats una mica superiors als resultats del mètode A (mètode de referència). S'ha de comprovar si el mètode B és sistemàticament diferent al mètode A. Per fer això

s'utilitza una prova t amb les diferències individuals entre els resultats de cada patró. Les fórmules a utilitzar són:

$$t = \frac{\bar{d}}{s_d} \cdot \sqrt{n} \quad \text{Equació 4.1}$$

$$s_d = \sqrt{\frac{\sum (d_i - \bar{d})^2}{n-1}} \quad \text{Equació 4.2}$$

On \bar{d} és la diferència promig entre els mètodes A i B, i n és el número de parells de dades.

$$s_d = \sqrt{\frac{(5-7)^2 + (8-7)^2 + (7-7)^2 + (2-7)^2 + (13-7)^2}{5-1}} = 4.06$$

Introduint el valor a l'equació 4.1 s'obté:

$$t = \frac{7}{4.06} \cdot \sqrt{5} = 3.85$$

Mirant la taula 7.6 de l'annex 7.12 es comprova que $t_{\text{calculada}} < t_{\text{tabulada}}$. Segons aquest mètode si $t_{\text{calculada}}$ resulta inferior a un valor crític tabulat (t_{tabulada}) s'accepta la hipòtesi: el mètode no proporciona valors significativament diferents per a les concentracions mesurades, i per tant, es pot concloure que les dues tècniques no són significativament diferents amb un 95% de confiança per $n=4$ [24].

Per acabar de confirmar que les lectures de la concentració d'urea amb l'equip MilkoScan són correctes i comparables amb l'equip de referència CL-10, s'analitzen tres patrons preparats al laboratori addicionant urea a llet UHT per ambdós equips i es comparen els valors obtinguts. A la taula 4.10 es poden veure els resultats obtinguts dels patrons Urea 1 (0 ppm d'urea addicionada), Urea 2 (60 ppm d'urea addicionada) i Urea 3 (120 ppm d'urea addicionada). La diferència de concentracions entre els patrons és de 60 ppm. A l'annex 7.12 hi ha les taules complertes amb tots els valors obtinguts (taula 7.7 i 7.8) i les seves corresponents representacions gràfiques.

Taula 4.10. Resultats dels patrons de llet UHT mitjançant els dos mètodes

	CL-10 (referència)	Diferència de concentració entre patrons (ppm)	MilkoScan 6000 (proposat)	Diferència de concentració entre patrons (ppm)
UREA 1	189	59	208	49
UREA 2	248	61	257	58
UREA 3	309		315	

Amb el CL-10 les addicions de 60 ppm a cada patró es detecten molt bé, amb el MilkoScan els valors obtinguts són una mica més alts que amb el CL-10 però el resultat per les addicions de patró stock no són tant exactes. Les diferències entre els patrons urea2-urea1 i urea3-urea2 queden per sota de les 60 ppm que s'haurien de detectar però es consideren acceptables, ja que són inferiors a ± 15 ppm que és la incertesa mínima que indica el certificat del patró de referència CECALAIT.

4.1.3. Mètode addició estàndard

S'utilitza aquest mètode per detectar possibles interferències i minimitzar l'efecte de les interferències a les mesures. D'aquesta manera es podrà comprovar si existeixen interferències d'efecte matriu. Es preparen 6 patrons a partir de llet crua de vaca. Es preparen 6 matrassos aforats de 50 ml i s'afegeixen volums diferents de patró concentrat d'urea (patró stock de 12009 ppm). A la taula 4.11 hi ha reflectits els volums de patró stock afegits a cada matràs i les lectures obtingudes per l'equip MilkoScan.

Taula 4.11. Volums afegits de patró stock i concentracions d'urea obtingudes amb el MilkoScan.

Volum afegit (ml)	0.125	0.250	0.625	0.750	0.875	1.000
	271	281	368	395	424	442
	257	269	358	381	408	467
	253	270	360	411	430	446
	269	272	382	383	424	461
	242	275	374	403	433	433
	233	273	350	390	427	456
Mitjana	254	273	365	394	424	451
Sd	14.892	4.320	11.639	11.635	8.733	12.734
C.V.	5.859	1.581	3.186	2.954	2.058	2.825

A la figura 4.10 s'hi pot observar la representació gràfica elaborada per obtenir l'equació de la corba de calibració i poder extrapolar el valor d'urea a la mostra original de llet crua de vaca.

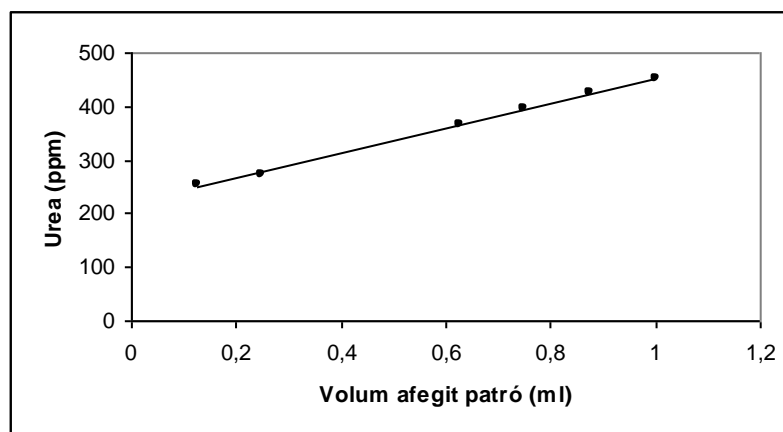


Figura 4.10. Corba obtinguda amb el mètode de l'addició Standard. $Y=230.45 \cdot X+221.08$ i $R^2=0.9984$

$$[\text{Urea}] = a \cdot V_{\text{patró}} + b = 230.45 \cdot V_{\text{patró}} + 221.08$$

$$R^2 = 0.9984$$

$$[\text{Urea}] = 0 \rightarrow V_{\text{patró}} = -\frac{b}{a} = -\frac{221.08}{230.45} = -0.959 \text{ ml} \Rightarrow 0.959 \text{ ml}$$

[Urea] a la mostra:

$$[\text{Urea}] = \frac{V_{\text{patró}} \cdot [\text{Urea}]_{\text{patró}}}{V_{\text{total}}} = \frac{0.959 \text{ ml} \cdot 12009 \text{ ppm}}{50 \text{ ml}} = 230.3 \text{ ppm}$$

Segons el mètode de l'addició estàndard, la mostra de llet crua de vaca conté 230 ppm d'urea. Si es fa la lectura directa amb l'equip MilkoScan el resultat que obtenim és de 239 ppm. Per tant, es pot deduir que no existeix efecte matriu, es a dir, no hi ha interferències degut a la naturalesa de la matriu.

4.1.4. Patró control

Control patró LLET UREA

Una vegada s'ha comprovat que els patrons de UHT són vàlids per fer el control de l'estabilitat del MilkoScan, es vol aconseguir tenir un patró de UHT preparat al laboratori que serveixi per fer el control diari del bon funcionament de l'equip. Només es prepararà un nivell de concentració del patró, per fer el control cada dia abans de començar a passar mostres i també cada 100 mostres. Aquest patró s'identificarà amb una etiqueta amb un codi de barres i d'aquesta manera l'equip el reconeixerà automàticament. Si el resultat d'urea obtingut queda fora dels nivells predeterminats l'equip avisarà informàticament de que el paràmetre està fora de control.

Es prepara un patró que s'anomenarà LLET UREA a partir d'un patró stock d'unes 12000 ppm d'urea. Per preparar aquest patró partim d'un valor d'unes 420 ppm d'una llet UHT (Llet ATO natura UHT desnatada, Lot 140905551, Cad. 17/9/09), es fa una dilució amb aigua amb KCl al 0.7% (per no perdre la conductivitat de manera que la pipeta de l'equip detecti líquid) per obtenir una concentració d'urea d'unes 100 ppm. El procediment de preparació d'aquest patró està explicat a l'apartat 3.2.6. A la taula 4.12 es poden veure els resultats obtinguts d'aquesta llet diluïda i del patró.

Taula 4.12. Valors d'urea del patró LLET UREA, sense addició i amb addició de 120.09 ppm

	LLET DILUÏDA	PATRÓ LAB-2
UREA	145	218
	139	210
	115	224
	130	218
	136	230
	123	211
	108	241
	115	223
	141	218
Mitjana	128	221
Sd	14	10
C.V.	10.978	4.349

Es determina una addició de 93 ppm. Es partirà d'un volum total de 4 l per poder preparar patrons per tot el mes, degut a l'estabilitat de la llet UHT. Als 4 l s'hi ha d'afegir conservant, dicromat de potassi al 1‰, per tant, s'haurà d'afegir 4 g de dicromat de potassi als 4 l preparats.

El patró de LLET UREA es reparteix en pots de 50 ml i s'identifiquen amb una etiqueta amb un codi de barres (veure figura 4.11), d'aquesta manera l'equip ja l'identificarà automàticament cada vegada que es passi un pot d'aquest patró per l'equip. Es conserven a la nevera, a cada sessió de treball es treuen els pots de patró necessaris per tal de fer la lectura d'urea per l'equip MilkoScan. Abans de l'anàlisi les mostres es posen al bany perquè estiguin a 37-42 °C.



Figura 4.11. Etiqueta amb codi de barres identificativa pel patró de LLET UREA

Mitjançant els valors obtinguts amb el càlcul de la repetibilitat es construeix un gràfic de control de Shewhart. Mitjançant aquesta eina es podrà avaluar si els resultats d'urea al llarg del temps es troben dins dels límits acceptats, llavors es podrà dir si la resposta del sistema és estadísticament correcta [25]. Abans de repartir el patró amb recipients de 50 ml es fan 25 lectures del patró per fer el càlcul de la repetibilitat, els valors obtinguts es poden observar a la taula 4.13. Els valor mitjana obtingut és 229 ppm.

Taula 4.13. Lectures del patró LLET UREA per calcular la repetibilitat i la mitjana del valor d'urea

Valors urea (ppm)						
218	211	248	229	232		
210	241	230	232	228		
224	223	223	233	233	Mitjana	229
218	218	248	226	232	Sd	10.536
230	253	227	230	228	C.V.	4.601

A la taula 4.14 hi ha reflectits els valors obtinguts per elaborar el gràfic.

Taula 4.14. Càlculs i valors per elaborar el gràfic de control de Shewhart del patró LLET UREA

	Càlculs	Valor
Mitjana (\bar{X}) (n=25)		229
$\bar{X} + 2 \cdot Sd$	$229 + 2 \cdot 10.536$	250
$\bar{X} - 2 \cdot Sd$	$229 - 2 \cdot 10.536$	208
$\bar{X} + 3 \cdot Sd$	$229 + 3 \cdot 10.536$	261
$\bar{X} - 3 \cdot Sd$	$229 - 3 \cdot 10.536$	197

El fonament dels gràfics de control es basa en assumir la normalitat dels resultats de mesura: quan es porta a terme algun procés (per exemple, algun mètode d'anàlisi) de manera sistemàtica, és a dir, sota les mateixes fonts d'influència o variació, el procés es veurà afectat per errors aleatoris que portaran a una distribució normal dels resultats.

Es diu que un mètode analític està sota control si els resultats obtinguts amb aquest mètode segueixen les característiques d'una distribució normal. Quan els resultats dels anàlisis de la mostra de control al llarg del temps es troben dins els límits acceptats, es diu que el sistema està sota control estadístic. Quan es troben punts fora dels límits especificats o es troben tendències, es diu que el sistema està fora de control.

Els gràfics de control són eines estadístiques molt simples de construir i d'utilitzar, i molt útils per controlar tendències i la estabilitat del procés analític. El primer que es fa és obtenir un valor de línia central, aquest valor s'obté mitjançant un mínim de 15-30 anàlisis de la mostra control, en aquest cas mitjançant el càlcul de la repetibilitat es tenen 25 lectures de la mostra control, els valors obtinguts es poden veure a la taula 4.13. Els límits s'estableixen a una distància del valor central $\pm 2 \cdot Sd$ (línia d'avís) i a una distància $\pm 3 \cdot Sd$ (línia de control).

Aquests límits d'avís i de control situats a unes distàncies de ± 2 i ± 3 respectivament, poden construir-se utilitzant els valors 2 i 3 quan el valor promig de la mostra control s'ha trobat amb un número suficientment gran de repeticions (un mínim de 15-30 repeticions). En aquest cas es poden utilitzar aquests valors ja que el valor promig s'ha trobat mitjançant 25 repeticions [25]. El valor de la mitjana és el valor de línia central, i mitjançant el valor de Sd obtingut es pot elaborar el gràfic de control. El gràfic de Shewhart obtingut és el representat a la figura 4.12.

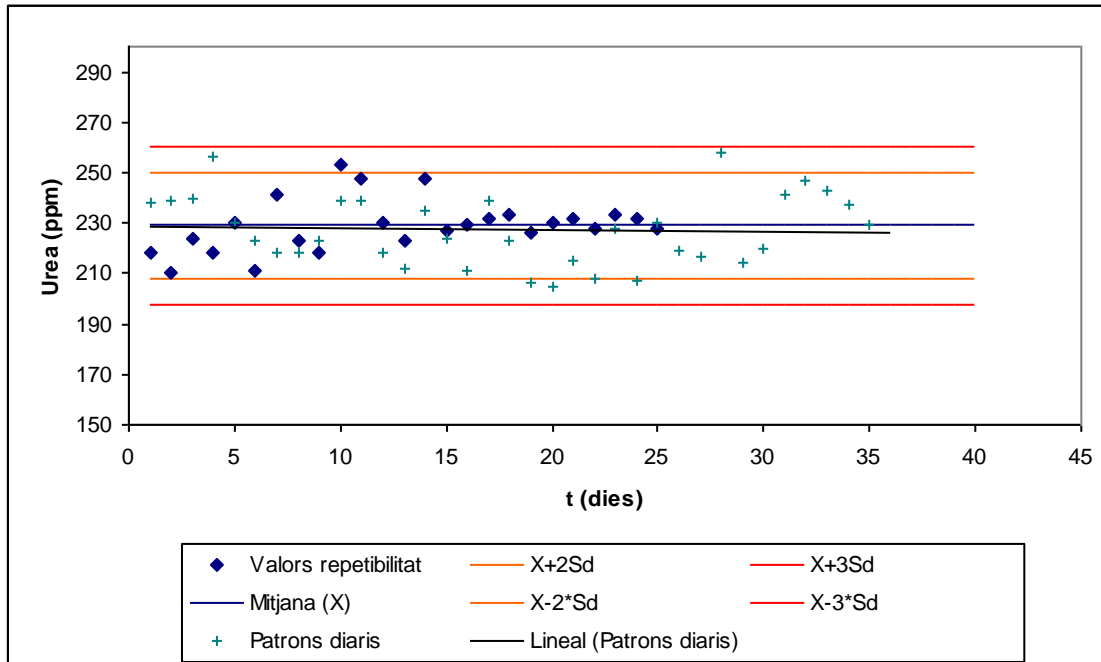


Figura 4.12. Gràfic de control de Shewhart amb les lectures utilitzades pel càlcul de la repetibilitat del LLET UREA juntament amb la tendència de les lectures diàries del patró LLET UREA

Amb el gràfic de Shewhart elaborat es pot controlar cada dia el patró LLET UREA que es passa per l'equip. S'introdueixen els valors obtinguts a cada sessió de treball al gràfic i es pot veure gràficament si el sistema (l'equip MilkoScan) està sota control respecte el paràmetre de la urea. A més, l'equip

avisa automàticament quan algun valor està fora de control, ja que se l'hi hauran assignat els valors de control.

Al llarg de 15 dies es passa el patró LLET UREA per l'equip MilkoScan i s'observa la seva resposta expressada com a concentració d'urea. Si es representen gràficament els patrons a la gràfica de Shewhart, es pot observar la tendència dels patrons que es passen diàriament. A la figura 4.12 es pot observar el gràfic de control de Shewhart juntament amb els patrons que s'han anat passant diàriament als quals s'hi adjunta la seva tendència lineal, i es pot veure que la tendència és lleugerament descendent però es manté dins la zona de control (la taula de valors es pot observar a la taula 7.9 de l'annex 7.13).

Control patró LAB2

Paral·lelament al control del patró LLET UREA, també es fa el control del patró que utilitza el laboratori per el control diari dels paràmetres de: greix, proteïna, lactosa i extracte sec. Aquest patró està preparat amb llet crua de vaca i amb dicromat de potassi com a conservant (amb una proporció de 1‰). Si es confirma que aquest patró també és vàlid per el control de les lectures d'urea, el laboratori podrà utilitzar un únic patró per el control de tots els paràmetres químics.

El patró (LAB2) es reparteix en pots de 50 ml i s'identifiquen amb una etiqueta amb un codi de barres, igual que el patró LLET UREA, d'aquesta manera l'equip ja l'identificarà automàticament cada vegada que es passi un pot d'aquest patró per l'equip. Es conserven a la nevera, a cada sessió de treball es treuen els pots de patró necessaris per tal de fer la mesura d'urea per l'equip MilkoScan.

Abans de repartir el patró amb recipients de 50 ml es fan 25 lectures del patró per fer el càlcul de la repetibilitat, els valors obtinguts es poden observar a la taula 4.15. El valor mitja obtingut és 231 ppm.

Taula 4.15. Lectures del patró LAB2 per calcular la repetibilitat i la mitjana del valor d'urea

Valors urea (ppm)						
235	232	215	223	216		
229	235	238	231	235		
241	238	231	249	217	Mitjana	231
243	220	213	237	239	Sd	10.132
239	243	216	233	236	C.V.	4.379

A la taula 4.16 hi ha reflectits els valors obtinguts per elaborar el gràfic.

Taula 4.16. Càlculs i valors per elaborar el gràfic de control de Shewhart del patró LAB2

	Càlculs	Valor
Mitjana (\bar{X}) (n=25)		231
$\bar{X} + 2 \cdot Sd$	$231 + 2 \cdot 10.132$	252
$\bar{X} - 2 \cdot Sd$	$231 - 2 \cdot 10.132$	211
$\bar{X} + 3 \cdot Sd$	$231 + 3 \cdot 10.132$	262
$\bar{X} - 3 \cdot Sd$	$231 - 3 \cdot 10.132$	201

El gràfic de Shewhart obtingut és el representat a la figura 4.13 que es pot veure a continuació.

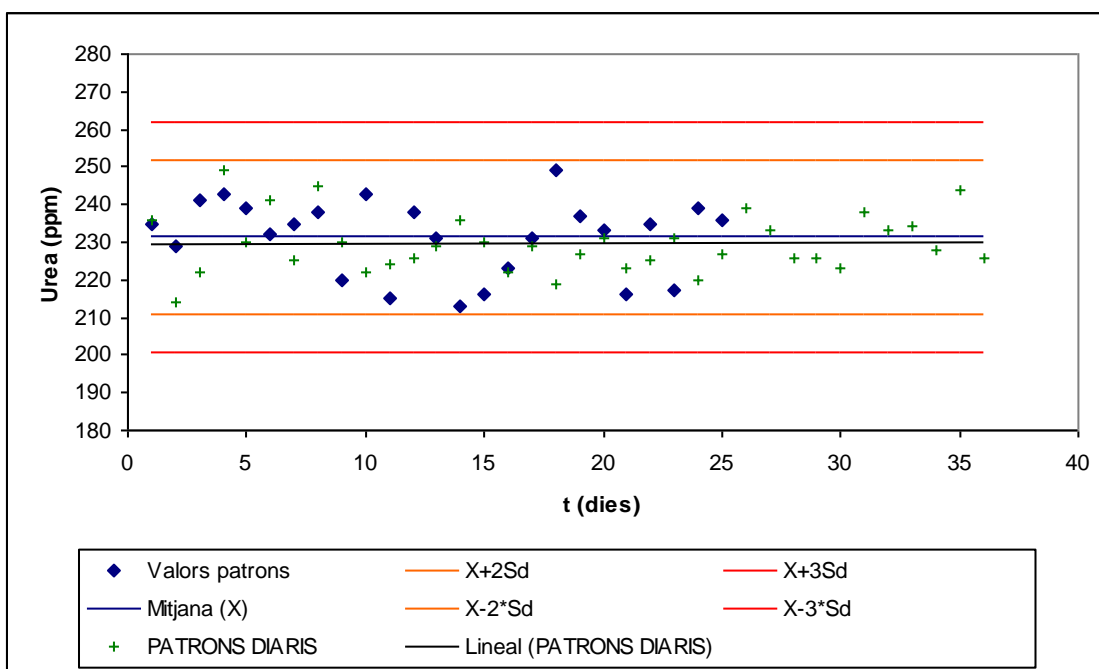


Figura 4.13. Gràfic de control de Shewhart amb les lectures utilitzades pel càlcul de la repetibilitat del LAB juntament amb la tendència de les lectures diàries del patró LAB2

Al llarg de 15 dies es passa el patró LAB2 per l'equip MilkoScan i s'observa la seva senyal (concentració d'urea). Si es representen gràficament els patrons a la gràfica de Shewhart, es pot observar la tendència dels patrons que es passen diàriament. A la figura 4.13 es pot observar el gràfic de control de Shewhart juntament amb els patrons que s'han anat passant diàriament als quals s'hi adjunta la seva tendència lineal, i es pot observar que la senyal es manté gairebé constant al llarg dels dies dins la zona de control (la taula de valors es pot observar a la taula 7.10 de l'annex 7.13).

4.2. Validació del mètode

4.2.1. Verificació del bon funcionament dels equips CL-10 i MilkoScan

Es verifica el bon funcionament del CL-10 abans de fer la última comprovació. Per fer això, es posa en marxa segons el procediment descrit a l'apartat 3.1.3. La seva posta en marxa és correcta, el patró d'urea de 100 ppm del Kit de l'equip CL-10 entra dins els límits establerts per l'equip i dona un resultat de 101 ppm. Després, es passen els patrons de CECALAIT nous que ha demanat el laboratori, són els patrons amb referència 07/2009 (veure certificat d'anàlisi a l'annex 7.10). Els resultats obtinguts es poden veure a la taula 4.17, on es pot observar que tots els resultats estan dins el rang definit per CECALAIT i segueixen una tendència lineal amb un coeficient de correlació de 1 quan es calcula la corba de calibració.

Taula 4.17. Valors d'urea dels patrons CECALAIT 07/2009 mesurats amb l'equip CL-10 (mètode de referència)

patró	Valor Urea amb CL-10 (ppm)	Valor certificat (ppm)	Diferència (desviació respecte el valor de referència)
1	163	173±15	-10
2	330	344±19	-14
3	496	515±22	-19
4	670	686±27	-16
5	852	857±27	-5

Una vegada s'ha comprovat que el mètode de referència funciona correctament, es passa a comprovar que l'equip MilkoScan continua ben calibrat, per fer això es passaran els patrons de CECALAIT 07/2009. Els resultats obtinguts es poden veure a la taula 4.18.

Taula 4.18. Valors d'urea dels patrons CECALAIT 07/2009 mesurats amb l'equip MilkoScan

patró	Valor Urea amb MilkoScan (ppm)	Valor certificat (ppm)	Diferència (desviació respecte el valor de referència)
1	171±7	173±15	-2
2	333±8	344±19	-11
3	501±6	515±22	-14
4	677±4	686±27	-9
5	858±6	857±27	-1

Amb el MilkoScan els valors obtinguts són una mica superiors que amb el CL-10 però estan dins els límits permesos per CECALAIT, i s'obté una recta amb un coeficient de correlació de 0.9994. Per tant, es considera que l'equip MilkoScan no ha variat la seva senyal respecte l'última vegada que es va comparar amb el CL-10.

4.2.2. Validació del mètode

Per fer la validació del mètode, el laboratori disposa d'un patró de referència extern de MUVA. Aquest és un organisme certificador extern, i per tant, aquests patrons es poden utilitzar per a validar el mètode. El certificat d'anàlisi es pot consultar a l'annex 7.14. A la taula 4.19 hi ha reflectits els valors d'urea indicats al certificat d'anàlisi i els valors obtinguts amb l'equip MilkoScan.

Taula 4.19. Comparació dels valors d'urea dels patrons de referència de MUVA i els obtinguts amb l'equip MilkoScan.

Patró	[Urea] Certificat (ppm)	[Urea] MilkoScan (ppm)
F1	172.7±5.3	178±9
F2	468.3±9.1	478±9
F3	247.8±8.1	254±7

Com es pot comprovar, al analitzar els patrons de referència amb el nou mètode, s'obtenen resultats correctes, dins els límits marcats per l'organisme certificador. Això indica que l'equip MilkoScan funciona correctament i es poden començar a passar mostres reals.

4.3. Anàlisi de mostres

Una vegada s'ha comprovat que el MilkoScan està llest per al seu ús, es fa una última comprovació: s'analitzen 15 mostres per els dos equips (el de referència i el mètode proposat) i després es farà la comparació dels resultats obtinguts per els dos mètodes, mitjançant la prova de *t de student* de diferència entre parelles de valors i el test de la regressió lineal.. Els resultats obtinguts es poden veure a la taula 4.20.

Taula 4.20. Comparació dels valors obtinguts amb mostres reals amb els 2 mètodes mitjançant el mètode de la prova *t*

Mostra	Urea (ppm) CL-10 Mètode A	Urea (ppm) MilkoScan Mètode B	Diferència (d _i)
1	254	251	-3
2	243	249	6
3	214	214	0
4	213	210	-3
5	216	214	-2
6	242	248	6
7	218	212	-6
8	259	263	4
9	149	146	-3
10	326	331	5
11	380	385	5
12	273	269	-4
13	233	237	4
14	165	170	5
15	301	294	-7

$$\bar{d} = 0.5$$

Les fórmules a utilitzar són:

$$t = \frac{\bar{d}}{s_d} \cdot \sqrt{n} \quad \text{Equació 4.3}$$

$$s_d = \sqrt{\frac{\sum (d_i - \bar{d})^2}{n-1}} \quad \text{Equació 4.4}$$

On \bar{d} és la diferència promig entre els mètodes A i B, i n és el número de parells de dades.

$$s_d = \sqrt{\frac{(-3-0.5)^2 + (6-0.5)^2 + (0-0.5)^2 + (-3-0.5)^2 + (-2-0.5)^2 + (6-0.5)^2 + (-6-0.5)^2 + (4-0.5)^2 + (-3-0.5)^2 + (5-0.5)^2 + (5-0.5)^2 + (-4-0.5)^2 + (4-0.5)^2 + (5-0.5)^2 + (-7-0.5)^2}{(15-1)}}$$

$$s_d = \sqrt{\frac{4.69}{14}} = 4.69$$

Introduint el valor a l'equació 4.3 s'obté:

$$t = \frac{0.5}{4.69} \cdot \sqrt{15} = 0.41$$

Mirant la taula 7.6 de l'annex 7.12 es comprova que $t_{\text{calculada}} < t_{\text{tabulada}}$, i per tant, el mètode no proporciona valors significativament diferents per a les concentracions mesurades, i es pot concloure que les dues tècniques no són significativament diferents amb un 95% de confiança per $n=14$ [24].

Finalment, s'utilitza la comparació de mètodes per regressió lineal [24]. Si cada mostra presenta un resultat idèntic amb els dos mètodes analítics, la recta de regressió tindrà una ordenada a l'origen de 0 i pendent de 1. Per comprovar que la ordenada a l'origen i la pendent no difereixen significativament de 0 i 1 respectivament, s'han determinat els límits amb un nivell de confiança del 95%.

Si es comparen els resultats obtinguts amb les dues tècniques mitjançant aquest mètode, com es pot veure a la figura 4.14, s'obté una pendent quasi de 1 i una ordenada a l'origen de -3. L'equació de la recta obtinguda és: $Y=1.02 (\pm 0.05) \cdot X - 3 (\pm 12)$ amb un coeficient de correlació de $R^2=0.994$.

Tenint en compte la incertesa per la ordenada a l'origen i per la pendent es pot concloure amb un nivell de confiança del 95% que no existeixen diferències significatives entre els dos mètodes, i per tant, es pot concloure que el nou mètode proposat és vàlid per a la determinació d'urea en llet crua de vaca.

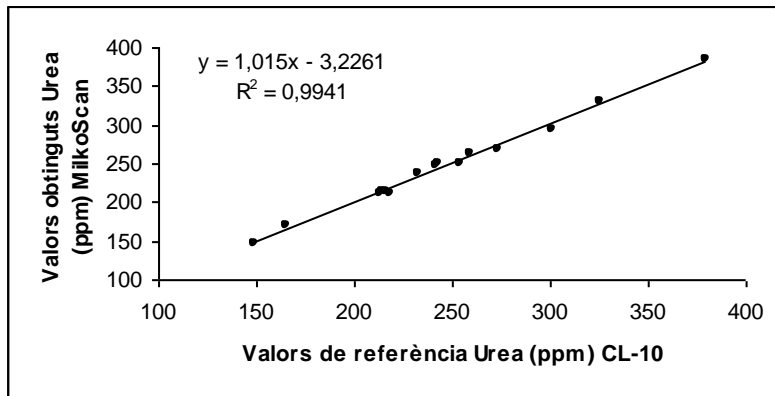


Figura 4.14. Comparació per regressió dels dos mètodes d'anàlisi

5. CONCLUSIONS

L'objectiu d'aquest projecte, que era posar a punt l'anàlisi d'urea en llet crua de vaca mitjançant un mètode de FTIR, amb l'equip MilkoScan, s'ha aconseguit amb èxit.

S'ha pogut comprovar i verificar la:

- Estabilitat dels patrons amb llet UHT i crua.
- Bona calibració interna de l'equip MilkoScan mitjançant els patrons de CECALAIT (patrons de referència externs).
- Inexistència d'interferències en la determinació de la urea a la llet crua de vaca.
- Bona repetibilitat
- Bona reproduïbilitat

Per a l'ALLIC la introducció de l'anàlisi d'urea dins els anàlisis sistemàtics del laboratori significa un estalvi econòmic i de temps important, ja que s'analitzen totes les mostres però destinant una persona menys a realitzar aquest anàlisi i sense cost afegit per mostra. Amb el CL-10 s'utilitzen uns reactius bastant cars ja que un d'ells és l'enzim ureasa.

Amb l'equip CL-10 només s'analitzaven unes 175-200 mostres mensuals, només les mostres en les quals es demanava expressament fer aquest anàlisi. A més, les mostres s'havien de separar després de passar pel MilkoScan, guardar, apuntar amb llistes manualment i analitzar separatament i manualment; i finalment, imprimir els resultats i introduir-los manualment a l'ordinador per fer el seu tractament informàtic, tal i com es pot veure a la figura 5.1. En aquest moment, utilitzant el MilkoScan, s'introdueix el paràmetre de la urea com un paràmetre addicional dins la informació de la qualitat de la llet i s'analitzen unes 14000 mostres mensuals. Per analitzar 200 mostres es destinaven més de 4 hores només amb l'anàlisi, sense tenir en comte la preparació i la calibració de l'equip CL-10. Amb el MilkoScan el temps afegit per mostra per obtenir el resultat de la urea és nul.

A la taula 5.1 es poden veure les diferències entre els dos mètodes i es pot concloure que introduir l'anàlisi de la urea dins els anàlisis sistemàtics del laboratori és molt més rentable econòmicament ja que s'estalvia molt de temps i molta feina en comparació amb l'anàlisi amb el CL-10. A més, amb el MilkoScan s'analitzen totes les mostres de control de qualitat.

Taula 5.1. Taula comparativa per l'anàlisi d'urea utilitzant el MilkoScan o el CL-10

	MilkoScan	CL-10
Temps d'anàlisi per mostra	20 segons	75 segons
Mostres mensuals	14000	200
Cost afegit reactius (mensual)	0	238 €
Personal destinat a l'anàlisi	1 persona	2 persones
Temps afegit de tractament de mostres i posada a punt de l'equip	0	1 hora (dies d'anàlisi) 15 minuts (resta de dies)
Introducció de resultats	Informàtic	Manual

A la figura 5.1. s'hi representa el diagrama del procés per l'anàlisi de mostres. Es pot observar l'estalvi de temps que representa deixar d'analitzar les mostres amb el CL-10.

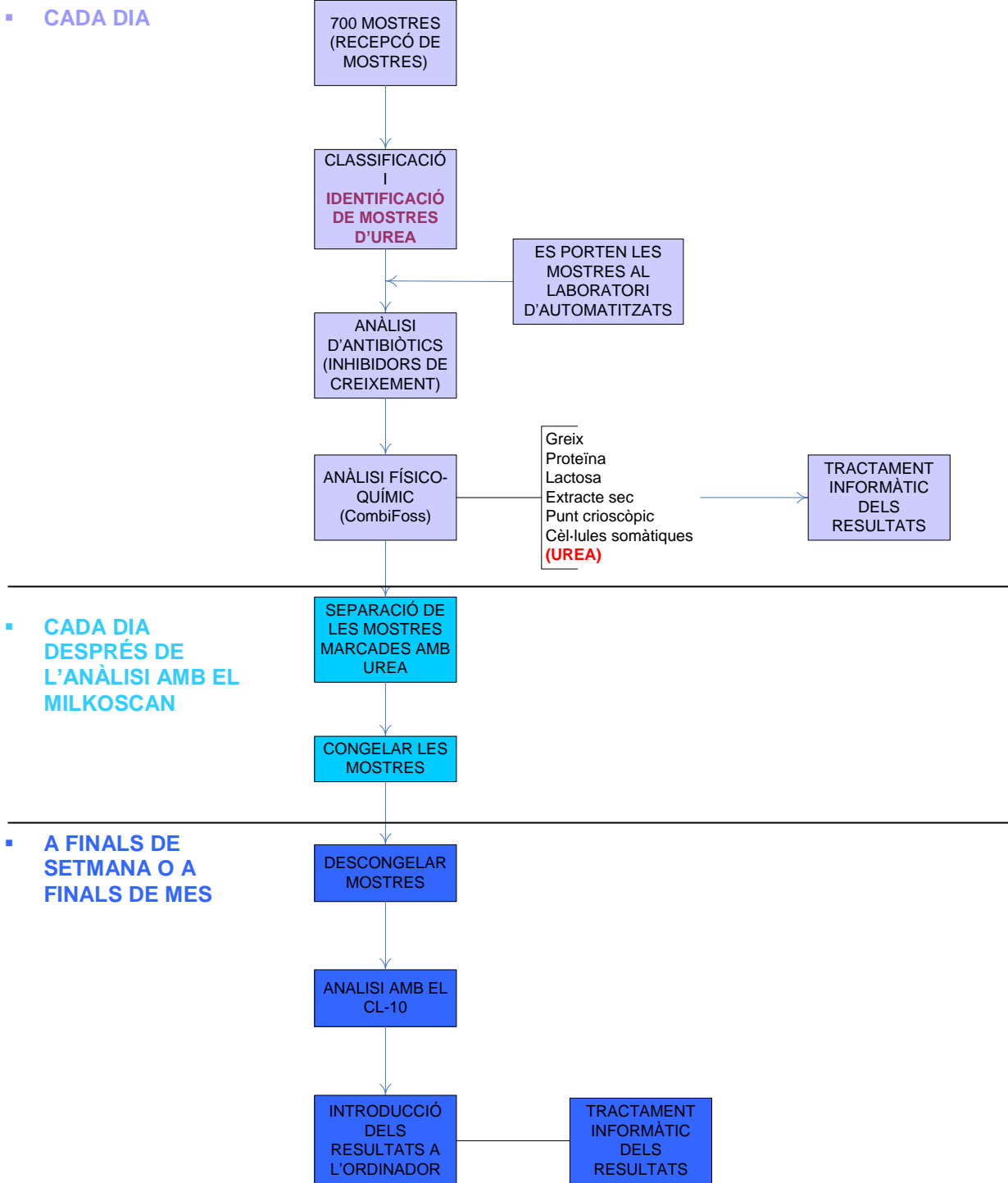


Figura 5.1. Diagrama comparatiu del procés de recepció de mostres i anàlisi. Comparació del temps i la feina destinats a analitzar la urea amb el MilkoScan o amb el CL-10.

A la figura 5.1 es pot veure que analitzant la urea pel MilkoScan les mostres no s'han de separar, ni congelar, ni introduir els resultats manualment a l'ordinador per el seu tractament informàtic posterior. Si s'analitza la urea de les mostres juntament amb la resta de paràmetres químics, totes les mostres segueixen el mateix procés, no s'han de separar i el resultat es processa informàticament, ja que amb el sistema de codi de barres tots els resultats passen automàticament al sistema informàtic de tractament de dades. D'aquesta manera l'anàlisi d'urea no significa cap feina extra per part del personal del laboratori (al contrari, s'estalvia feina) ni cap sobrecost econòmic.

Després de 5 mesos d'estudi es pot arribar a les següents conclusions des del punt de vista tècnic per l'anàlisi d'urea amb l'equip MilkoScan (espectrofotòmetre d'Infraroig per Transformada de Fourier):

- S'ha pogut posar a punt l'anàlisi d'urea mitjançant la tècnica FTIR amb èxit. Els resultats obtinguts són comparables amb els obtinguts amb el mètode de pH-metria diferencial (mètode de referència).
- S'han obtingut resultats correctes i acceptables de:
 - Reproducibilitat
 - Repetibilitat
 - Estabilitat de patrons
- Es pot portar un control diari de l'estabilitat de les lectures (dels resultats) utilitzant tant patrons preparats amb llet UHT com amb llet crua. S'ha decidit utilitzar el patró preparat amb llet crua ja que és el mateix que s'utilitza per el control de la resta de paràmetres químics, que són: greix, proteïna, lactosa, extracte sec magre. El patró de llet UHT també és estable però s'ha de preparar expressament només per la urea, a més, la matriu no és la mateixa que la de les mostres a analitzar, i per tant, s'ha descartat com a patró de control.
- Periòdicament es passaran patrons de referència externs (com els de CECALAIT o MUVA) per tal de verificar que la calibració de l'equip és correcte. També es podran passar els patrons de referència per l'equip CL-10.
- El temps d'anàlisi és molt més ràpid amb el mètode FTIR.
- Els resultats obtinguts de cada mostra passen directament al sistema informàtic per el seu tractament juntament amb la resta de paràmetres de qualitat de la llet.
- Permet analitzar tots els paràmetres de qualitat de la llet crua (excepte els inhibidors de creixement) al mateix moment i amb el mateix equip, i per tant, només amb 20 segons s'obtenen els resultats de:
 - Greix
 - Proteïna

- Lactosa
- Extracte sec
- Punt crioscòpic
- Cèl·lules somàtiques
- Urea

Finalment, s'ha de destacar que després de realitzar aquest projecte l'ALLIC ja té implementat a la seva rutina de treball l'anàlisi d'urea amb l'equip MilkoScan.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] www.allic.org Associació Interprofessional Llitera de Catalunya, 15 de gener de 2009
- [2] www.inia.org, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, gener de 2009
- [3] www.educaplus.org, 19 de juny de 2009
- [4] www.produccion-animal.ar Sitio Argentino de Producción Animal, gener de 2009
- [5] C. A. Gómez, M. Fernández. Nitrogeno ureico en la leche y el balance proteico en raciones de vacas lecheras. Dep. Académico de Nutrición, Universidad Nacional Agraria La Molina / Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Científica del Sur.
- [6] La Vanguardia. 2006. Biblioteca de la llengua catalana. Diccionaris Essencials. Volum 6. Barcelona: Edicions 62
- [7] www.images.google.es, Google
- [8] www.fmzv.unam.mx, Facultat de Medicina Veterinaria i Zootècnia (Mèxic)
- [9] K. M. Dyce *et al.* 1999. Anatomía Veterinaria. 2ª Ed. Mèxic: McGraw-Hill.
- [10] www.xtec.es, Xarxa Telemàtica Educativa de Catalunya, 12 de març de 2009
- [11] www.elmanescal2.blogspot.com, El manescal, el món de la vaca de llet
- [12] P. Casado Cimiano, J.A. García Álvarez. 1986. La calidad de la leche y los factores que influyen en ella. Madrid. Ed. ILE, Industrias Lácteas Españolas.
- [13] D.O.G. de Catalunya Núm. 3447-7.8.2001 Decret 221/2001, 1 d'agost
- [14] www.dhia.org/mundata.asp, National Dairy Herd Information Association
- [15] <http://jds.fass.org/cgi/content/full/87/6/1747>, Journal of Dairy Science
- [16] www.eurochem.it, Eurochem Technologie Analitiche, 16 de febrer de 2009
- [17] Massimo Luzzana, Raffaella Giardino. 1998. Urea determination in milk by a differential pH technique. Dipartimento di scienze e tecnologie biomediche, Univesità degli Studi di Milano.
- [18] Daniel C. Harris. 1992. Análisis químico cuantitativo. Mèxic: Grupo Editorial Iberoamérica.
- [19] www.foss.es, FOSS, gener de 2009
- [20] D. A. Skoog, J. J. Leary. 1994. Anàlisis Instrumental. 4ª Ed. Madrid: McGraw-Hill
- [21] www.wikipedia.org, Wikipedia, La enciclopedia libre, 15 d'abril de 2009

- [22] I. Delucchi, P. Bouchard. 2005. Hacia la acreditación ISO/IEC 17025. Importancia de las muestras piloto en el chequeo y funcionamiento de los equipos analizadores de leche. Tercer Congreso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de Calidad en Laboratorios. Laboratorio de Calidad de Leche del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA).
- [23] Sr. Félix Rodríguez (tècnic de manteniment de l'empresa FOSS)
- [24] Miller, J.C., Miller, J.N. 1993. Estadística para Química Analítica. Ed. Addison-Wesley Iberoamericana, S.,A.
- [25] <http://www.quimica.urv.es/quimio>, Universitat Rovira i Virgili, juliol 2009
- [26] Pagament per qualitat. Protocol per a la presa de mostres de llet crua del tanc de refrigeració a les explotacions de producció. Laboratori Interprofessional Lleter de Catalunya
- [27] Catàleg dels reactius de l'equip CL-10. EC Milk Urea. Biocontrol pàgina 4.

7. ANNEX

7.1. Valors típics d'urea en mostres de control de qualitat

Per tal d'obtenir dades reals dels valors típics d'urea en mostres de llet de vaca de control de qualitat, s'han utilitzat els resultats obtinguts al llarg de diferents dies al laboratori una vegada l'equip ja estava calibrat i a punt per al seu ús. Els valors obtinguts es poden observar a la taula 7.1. Amb la figura 7.1 es pot observar que la majoria dels resultats es troben entre 150-300 ppm, tenint en comte que valors d'urea menors a 150 ppm es consideren baixos, i valors superiors a 300 ppm es consideren elevats.

Taula 7.1. Valors d'urea en mostres de control de qualitat

179	179	255	147	259	360	195	382	193
287	132	128	281	261	277	181	271	336
114	209	178	77	141	158	213	189	196
155	196	222	205	111	224	151	227	128
180	275	103	206	292	243	269	184	164
330	286	115	163	209	216	201	220	96
227	153	174	115	226	214	242	136	227
289	143	80	100	268	127	132	102	312
135	285	174	202	151	235	89	247	205
360	147	208	175	202	290	192	83	200
159	278	236	264	107	195	144	261	239
240	200	171	196	170	216	251	182	124
214	126	194	158	170	122	325	105	228
229	213	235	203	187	221	247	260	204
180	225	125	187	301	258	273	167	212
209	181	228	198	323	204	272	262	187
247	287	167	184	189	276	382	286	265
246	301	185	292	169	272	246	265	156
226	200	227	201	210	222	229	112	245
168	314	152	153	91	298	240	84	120
194	174	204	215	204	198	237	196	141
249	208	216	201	115	206	187	147	153
177	142	178	213	266	131	241	235	161
222	202	172	206	61	104	220	275	177
258	151	215	248	86	185	240	168	352
178	142	167	133	290	137	271	205	304
280	113	167	246	298	245	247	164	237
196	310	146	248	161	145	296	305	205
190	129	177	158	203	271	224	194	123
148	113	226	139	150	176	228	247	325
208	202	157	170	128	210	235	358	289
133	225	156	148	302	183	271	180	216
135	191	147	127	187	177	225	189	253
172	82	63	262	127	163	220	230	128
248	182	113	158	187	240	260	245	74
322	166	208	223	237	181	234	229	221
216	218	241	196	264	148	269	161	189
239	171	206	162	143	176	265	262	220

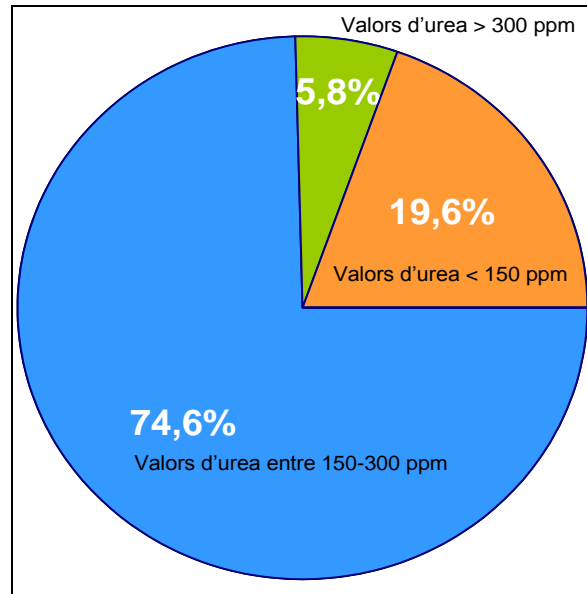


Figura 7.1. Representació de la distribució dels valors típics d'urea en llet crua de vaca

Els valors superiors a 300 ppm d'urea a la llet són només del 6% ja que els valors elevats d'urea és el que pot causar més problemes.

7.2. Notícia curiosa

A continuació s'exposa un article publicat a un diari de la xarxa on es pot constatar la importància de les quantitats de metà que pot expulsar una vaca al medi ambient. El control de la urea a la llet, i en conseqüència, la quantitat de proteïna continguda a la dieta, permeten optimitzar la utilització de nitrogen respecte a la producció de llet, i d'aquesta manera, també, disminuir les emissions de N a l'ambient

Les vaques produeixen el 30% dels gasos contaminants a l'Argentina

Buenos Aires.- Les vaques produeixen el 30% de les emissions de gasos d'efecte hivernacle a l'Argentina, segons conclou un estudi de l'Institut Nacional de Tecnologia Agropecuària (INTA) del país sud-americà.

Els científics que han realitzat l'estudi van col·locar a una desena de vaques un enorme tub de plàstic vermell a l'esquena dels animals per mesurar aquests nivells. El sistema es compon d'un tanc que va connectat a l'estómac de la vaca i del qual s'obté informació amb la finalitat de tractar de reduir les emissions de gasos amb efecte hivernacle.

1000 litres diaris d'emissions de metà

Un dels investigadors de l'INTA, Guillermo Berra, ha declarat que es van quedar "sorpresos" quan van tenir els primers resultats, ja que "el 30% de les emissions totals de gasos contaminants del país es produeixen per les emissions generades pels bovins".

L'Argentina és un dels principals exportadors mundials de carn vacuna. Berra ha afegit que "mai" es van imaginar que un boví de prop de 550 quilos "pogué produir entre 800 i 1.000 litres per dia d'emissions de metà".

Font: Reuters

08-07-2008

www.absurddiari.com, L'absurd diari, 12 de març de 2009

7.3. Entrevista a un veterinari

El Sr. Josep Torra de l'empresa V3 Equip Veterinari de Lleida és un client de l'ALLIC el qual em va explicar el què es fa una vegada els veterinaris tenen el resultat d'urea que els hi proporciona el laboratori.

Els Sr. Torra em va confirmar que els valors d'urea a la llet que ells consideren òptims estan compresos entre 170-220 ppm, però es consideren acceptables valors compresos entre 150-300 ppm.

Quan el valor d'urea és inferior a 150 ppm el primer que fan és comprovar la quantitat de llet que està produint aquella vaca o grup de vaques; si el volum de llet està entre 25-30 litres de llet per vaca/dia, encara que el valor d'urea sigui baix no es pren cap acció correctora, perquè la quantitat de llet produïda indica que la ració és adequada.

Quan el valor d'urea és elevat, superior a 300, s'ha de recalculer la fórmula de la ració, mirant el nivell d'energia i/o modificant la font de proteïna. Això ho porten a terme mitjançant unes publicacions americanes on hi ha unes taules per poder fer aquests càlculs.

És molt més problemàtic tenir valors elevats d'urea a la llet (i en conseqüència a la sang i a la orina) que valors baixos, ja que a banda de fer disminuir la producció de llet també comporta problemes d'infeccions (mastitis, vaginitis,...) degut a l'augment de pH vaginal i a l'úter. Això també pot causar diarrees que fan variar el pH del jaç on dormen les vaques i augmenta la proliferació de bacteris. A part de tots els problemes que causa de contaminació ambiental, poc rendiment de la llet,... És per això, que cada vegada més, els ramaders, veterinaris i industrials estan interessats en obtenir el valor d'urea de la llet.

FONT:

Sr. Josep Torra
V3 Equip Veterinari, S.L.
C/ Joc de la bola, 22
25003 Lleida
02-07-2009

7.4. Regeneració dels elèctrodes (CL-10)

Aquesta regeneració s'ha de realitzar un vegada a la setmana. És preferible fer-la 24 hores abans de treballar amb l'equip. El millor moment per realitzar-la és els divendres al finalitzar la lectura de les mostres.

a) Preparació

- Posició R1: Regenerating Solution
- Posició R2: Aigua destil·lada nova
- Start up → Run prime enzime*
- Start up → Clean*
- Esperar 1 minut

b) 1 cicle de neteja amb Regenerating Solution

- Posició R1: Regenerating Solution
- Posició R2: Aigua destil·lada nova
- Start up → Clean*
- Esperar 1 minut

c) 2 cicles de neteja amb aigua destil·lada

- Posició R1: Aigua destil·lada
- Posició R2: Aigua destil·lada
- Start up → Clean (* 2 vegades)*

d) 5 cicles de neteja amb Milk Polif

- Posició R1: Milk Polif (wash solution)
- Posició R2: Aigua destil·lada
- Start up → Clean (* 5 vegades)*

e) Deixar en Standby

- Posició R1: Milk Polif (wash solution)
- Posició R2: Aigua destil·lada nova
- Buidar l'ampolla del residu
- Service → Enter Rest mode*
- Deixar el CL-10 i l'ordinador encès.

Taula 7.4. Valors obtinguts dels patrons UHT durant 1 mes amb el MilkoScan pel control de l'estabilitat

D. anàlisi:	7/4/09	8/4/09	9/4/09	14/4/09	15/4/09	16/4/09	17/4/09	20/4/09	21/4/09	22/4/09	23/4/09	24/4/09	27/4/09	28/4/09	29/4/09	30/4/09	4/5/09
Pendent:	1.08663	1.08663	1.08663	1.08663	1.08663	1.08663	1.08663	1.08663	1.08663	1.08663	1.08663	1.08663	1.08663	1.08663	1.08663	1.08663	1.08663
Or. origen:	-155	-155	-155	-155	-155	-155	-155	-155	-155	-155	-155	-155	-155	-155	-155	-155	-155
UREA - 1	201	192	180	169	192	187	182	191	186	174	199	165	163	185	184	178	183
	196	183	167	201	175	189	174	167	177	177	160	169	168	175	186	184	149
	180	182	170	194	181	177	169	197	182	169	169	169	168	170	185	172	159
	181	167	176	180	178	163	176	169	184	173	175	182	180	173	156	174	143
	174									167	180		166		183	159	
	182																
	170																
	177																
Mitjana	182	181	173	186	182	179	175	181	182	172	177	171	169	176	179	173	159
Sd	10	10	6	14	7	12	5	15	4	4	15	7	6	7	13	9	18
C.V.	5.461	5.724	3.378	7.691	4.086	6.642	3.068	8.415	2.119	2.326	8.251	4.327	3.835	3.698	7.156	5.342	11.114
UREA - 2	232	234	221	234	234	234	229	241	218	220	229	232	234	235	242	235	193
	244	219	232	217	245	210	243	242	206	242	232	243	225	235	234	217	213
	229	196	231	246	235	238	236	242	226	227	238	228	230	237	219	208	201
	229	225	222	226	236	212	217	243	229	223	237	229	219	225	241	228	214
	226	197	225	236	227	203	215		226	225	243	235	202	244	239	221	203
	224	227			240	221							222				
	227																
	230																
Mitjana	231	216	226	232	236	220	228	242	221	227	236	233	222	235	235	222	205
Sd	6	16	5	11	6	14	12	1	9	9	5	6	11	7	9	10	9
C.V.	2.791	7.440	2.241	4.710	2.560	6.352	5.281	0.337	4.221	3.765	2.311	2.581	5.040	2.890	4.026	4.657	4.290
UREA - 3	294	291	292	292	298	280	272	297	278	268	287	286	291	296	277	279	262
	268	296	299	276	275	285	282	294	285	286	277	271	275	294	293	276	276
	278	278	293	300	283	279	259	312	295	261	288	287	304	291	269	290	271
	275		265	282	293	280	273	314	284	299	267	291	270	268	270	258	249
	282		284		285	280			287	282		281	283	290	272	281	
	267					266											
	274																
	272																
Mitjana	277	288	287	288	287	278	272	304	286	279	280	283	285	288	276	277	265
Sd	8	9	13	11	9	6	9	10	6	15	10	8	13	11	10	12	12
C.V.	3.019	3.223	4.607	3.697	3.123	2.302	3.488	3.356	2.148	5.381	3.519	2.717	4.731	3.934	3.579	4.239	4.479

7.5. Regeneració forta dels elèctrodes (CL-10)

Aquesta regeneració s'ha de realitzar com a mínim cada 3 mesos però és recomanat fer-la mensualment. És preferible fer-la 24 hores abans de treballar amb l'equip. El millor moment per realitzar-la és els divendres al finalitzar la lectura de les mostres.

a) Preparació

- Posició R1: Solució Regenerant Forta
- Posició R2: Aigua destil·lada nova

Start up → Run prime enzyme

b) 2 cicles de neteja amb Solució Regenerant Forta: durant aquesta operació aixecar a intervals regulars el tap de l'ampolla per absorbir, aproximadament, 5 cm de solució regenerant i 5 cm d'aire.

- Posició R1: Solució Regenerant Forta
- Posició R2: Aigua destil·lada

Start up → Clean (2 vegades)*

Esperar 1 minut

c) 1 cicle de neteja amb solució regenerant forta: durant aquesta operació deixar l'extrem del tub submergit amb la Solució Regenerant Forta.

- Posició R1: Solució Regenerant Forta
- Posició R2: Aigua destil·lada

Start up → Clean (1 vegada)*

d) 3 cicles de neteja amb aigua destil·lada

- Posició R1: Aigua destil·lada
- Posició R2: Aigua destil·lada

Start up → Clean (3 vegades)*

e) 5 cicles de neteja amb Milk Polif: durant el cinquè cicle de neteja deixar l'extrem del tub del Milk Polif a l'aire.

- Posició R1: Milk Polif (wash solution)
- Posició R2: Aigua destil·lada

Start up → Clean (5 vegades)*

f) Injectar 1 ml de llet crua a la càmera de mescla

- Posició R1: Milk Polif (wash solution)
- Posició R2: Aigua destil·lada

Esperar 1 minut

- g) 1 cicle de neteja amb Milk Polif
- Posició R1: Milk Polif (wash solution)
- Posició R2: Aigua destil·lada
Start up → *Clean* (* 1 vegada)
- h) Deixar en Standby
- Posició R1: Milk Polif (wash solution)
- Posició R2: Aigua destil·lada nova
Buidar l'ampolla del residu
Service → *Enter Rest mode*
Deixar el CL-10 i l'ordinador encès.

7.6. Procediment d'anàlisi (CL-10)

L'equip es troba en posició STANDBY de manera que fa un cicle de neteja cada 90 min. A la posició R1 hi ha wash solution i a la posició R2 hi ha aigua destil·lada.

Posar l'aparell en stop i reciclar el líquid de residu R3 (wash solution).

a) Estabilització

- Posició R1: wash solution
- Posició R2: Vial buit

Start up → Run prime enzyme

Routine → Sample → Start measure → Accept

b) Preparació: amb la finalitat d'omplir els tubs de reactius i que no quedin bombolles

- Posició R1: Urea buffer
- Posició R2: Ureasa

Start up → Run prime enzyme

Start up → Clean (2 vegades)*

c) Estabilització

Esperar que la temperatura de l'equip estigui estabilitzada a 37°C.

- Posició R1: Urea buffer
- Posició R2: Ureasa

Run start up procedure

El màxim error entre resultats ha de ser 1.

d) Calibratge

- Posició R1: Urea buffer
- Posició R2: Ureasa

Routine blank (sense injectar mostra)

El resultat ha de ser ± 3 mPH

Injectar 25 μ l de patró d'urea i fer *Routine Calibrate*

El resultat de l'slope ha d'estar entre 2.3-3.1

Si els valors no entren dins dels marges repetir des del blanc.

e) Check calibratge

Start up → Run sample sense mostra

El resultat ha d'estar entre ± 1.5 mg/dl

Injectar 25 μ l de patró d'urea i fer *Start up → Run sample*

El resultat ha d'estar entre 98-102 mg/dl

f) Mostres

- Posició R1: Urea buffer
- Posició R2: Ureasa

Injectar 25 µl de mostra i fer *Start up* → *Run sample*

g) Finalitzar sessió

Recuperar ureasa:

- Posició R1: Urea buffer
- Posició R2: Tub de l'ureasa a l'aire, desconnectar el tub de la càmera de mescla i posar-lo al vial de la ureasa.

Start up → *Run prime enzyme*

- Posició R1: wash solution
- Posició R2: Aigua destil·lada nova

Start up → *Run prime enzyme* (* 2 vegades)

Start up → *Clean* (* 5 vegades)

Guardar els reactius a la nevera (2-8 °C)

h) Deixar en Standby

- Posició R1: wash solution
- Posició R2: Aigua destil·lada nova

Buidar l'ampolla del residu

Service → *Enter Rest mode*

Deixar el CL-10 i l'ordinador encès.

7.7. Especificacions tècniques

Taula 7.2. Especificacions tècniques de l'equip Milkoscan

Velocitat d'anàlisi	200, 300, 400, 500, 600 mostres per hora
Rang d'anàlisi (només llet crua)	Greix: 0 - 15% Proteïna: 0 - 10% Sòlids totals: 0 - 20% Depressió punt congelació: 450-550 m°C Urea: 10 - 100 mg/dl (100-1000 ppm) Àcid cítric: 0.1-0.5% Lactosa: 0-10%
Repetibilitat (Cv denota relativa, en cas contrari, absoluta)	Greix, proteïna, lactosa: 0.5% Cv Sòlids totals, sòlids no grassos: 1.0% Cv Depressió punt congelació: 0.5 m°C Urea: 1.5 mg/dl (15 ppm) Àcid cítric: 0.005%
Precisió (Cv denota relativa, en cas contrari, absoluta)	Greix: 1.0% Cv(*) Proteïna, lactosa: 0.9% Cv(*) Sòlids totals, sòlids no grassos: 1.0% Cv(*) Depressió punt congelació: 4 m°C(*) Urea: 3.5 mg/dl (35 ppm) (+) Àcid cítric: 0.015%(+) (*) llet granel de vaca, (+) llet de vaca individual
Eficàcia depuració	>99% (1% remanent)
Temperatura de la mostra	37 - 42° C

Nota: Cv (Coeficient de variació) és igual a la Sd (desviació estàndard) dividida per la mitjana dels resultats de referència multiplicat per 100. Els mètodes de referència utilitzats són: Röse Gottlieb per greix, Kjeldahl per proteïna, mètode de polarimetria o enzimàtic per la lactosa i forn d'escalfament per sòlids totals [19].

7.8. Taula de conversions

Taula 7.3. Taula de conversions urea [27]



	Urea (mg/dl)	Urea (mM)	Urea (% p/v)	M.U.N.
Valor STD	100	16.66	0.100	46.67
STD min	97	16.16	0.097	45.27
STD max	103	17.16	0.103	48.07
Factor Conv.	1	0.1666	0.001	0.4667


7.9. Control de l'estabilitat de la llet UHT

Per tal de comprovar l'estabilitat de les lectures amb l'equip MilkoScan, es segueixen les pautes de l'article publicat per el Laboratorio de Calidad de Leche del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) el qual diu que la llet UHT és la única que garanteix 30 dies d'utilització sense alterar el valor d'urea i sense acidificar-se [21].


Es preparen patrons amb llet UHT (mostres pilot de llarga vida) i es passen per l'equip durant 1 mes per comprovar-ne la seva estabilitat. Els resultats obtinguts es poden observar a la taula 7.4.

7.10. Certificat d'anàlisi dels patrons de CECALAIT

				6
BL n° : E.T.G. 09-3645		ALLIC Ctra. de Vilassar a Cabrils, s/n 08348 CABRILS (BARCELONA) ESPAGNE		
Poligny, le 20/04/09				
ECHANTILLONS A TENEUR GARANTIE UREE SUR LAIT 05/2009				
IDENTIFICATION	UREE (mg/l) méthode enzymatique selon NF ISO 14637	INCERTITUDE mg/l		
ETG 5 UREE 1	167	15		
ETG 5 UREE 2	335	19		
ETG 5 UREE 3	503	22		
ETG 5 UREE 4	671	27		
ETG 5 UREE 5	838	27		
Valeurs moyennes linéarisées, calculées à partir de 2 analyse(s) en provenance de 2 laboratoire(s)-expert(s)				
<i>Ces échantillons sont à utiliser jusqu'au:</i> 31/05/09				
Le Responsable physico-chimie X. QUERVEL				
<i>La reproduction de ce document n'est autorisée que sous forme de fac similé integral. Il comporte une page.</i>				
<i>Cecalait - Centre d'expertise et de contrôle des analyses laitières</i> Rue de Versailles - B.P. 70129 - 39802 Poligny - Tél. +33 (0)3 84 73 63 20 - Fax +33 (0)3 84 73 63 29 E-mail : cecalait@actilait.com - Sites : www.cecalait.com & www.actilait.com				



Cecalait
Association loi 1901



7

ALLIC
Ctra. de Vilassar a Cabrils, s/n

BL n° : E.T.G. 09-4743

08348 CABRILS (BARCELONA)
ESPAGNE

Poligny, le 25/05/09

ECHANTILLONS A TENEUR GARANTIE

UREE SUR LAIT

06/2009

IDENTIFICATION	UREE (mg/l) méthode enzymatique selon NF ISO 14637	INCERTITUDE mg/l
ETG 6 UREE 1	167	15
ETG 6 UREE 2	335	19
ETG 6 UREE 3	503	22
ETG 6 UREE 4	671	27
ETG 6 UREE 5	838	27

Valeurs moyennes linéarisées, calculées à partir de 2 analyse(s) en provenance de
2 laboratoire(s) expert(s)

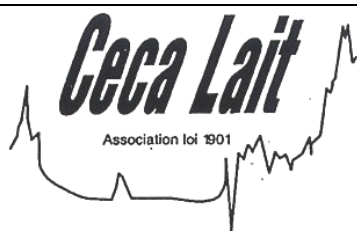
Ces échantillons sont à utiliser jusqu'au: 28/06/09

Le Responsable physico-chimie
X. QUERVEL

La reproduction de ce document n'est autorisée que sous forme de fac similé intégral. Il comporte une page.

Cecalait - Centre d'expertise et de contrôle des analyses laitières

Rue de Versailles - B.P. 70129 - 39802 Poligny - Tél. +33 (0)3 84 73 63 20 - Fax +33 (0)3 84 73 63 29
E-mail : cecalait@actilait.com - Sites : www.cecalait.com & www.actilait.com



Actilait

9

BL n° : E.T.G. 09-6141

ALLIC
Ctra. de Vilassar a Cabrils, s/n

08348 CABRILS (BARCELONA)
ESPAGNE

Poligny, le 25/06/09

ECHANTILLONS A TENEUR GARANTIE

UREE SUR LAIT

07/2009

IDENTIFICATION	UREE (mg/l) méthode enzymatique selon NF ISO 14637	INCERTITUDE mg/l
ETG 7 UREE 1	173	15
ETG 7 UREE 2	344	19
ETG 7 UREE 3	515	22
ETG 7 UREE 4	686	27
ETG 7 UREE 5	857	27

Valeurs moyennes linéarisées, calculées à partir de 5 analyse(s) en provenance de
3 laboratoire(s) expert(s)

Ces échantillons sont à utiliser jusqu'au: 26/07/09

Le Responsable physico-chimie
X. QUERVEL

La reproduction de ce document n'est autorisée que sous forme de fac similé intégral. Il comporte une page.

Cecalait - Centre d'expertise et de contrôle des analyses laitières

Rue de Versailles - B.P. 70129 - 39802 Poligny - Tél. +33 (0)3 84 73 63 20 - Fax +33 (0)3 84 73 63 29
E-mail : cecalait@actilait.com - Sites : www.cecalait.com & www.actilait.com

7.11. Taules de valors dels patrons CECALAIT

Taula 7.5. Valors d'urea amb l'equip MilkoScan dels patrons de CECALAIT utilitzant la recta de regressió inicial i la estimada.

D. anàlisi:	12/5/09	12/5/09
Pendent:	1.08663	1.11903
Ordenada origen:	-155	-122.91447
cecalait 1	115	163
	125	166
	134	197
Mitjana	125	175
Sd	10	19
%C.V.	7.624	10.736
cecalait 2	285	347
	310	346
	290	356
Mitjana	295	350
Sd	13	6
C.V.	4.484	1.575
cecalait 3	444	516
	466	512
	432	514
Mitjana	447	514
Sd	17	2
C.V.	3.855	0.389
cecalait 4	619	677
	612	675
	622	670
Mitjana	618	674
Sd	5	4
C.V.	0.831	0.535
cecalait 5	779	864
	790	849
	764	854
Mitjana	778	856
Sd	13	8
C.V.	1.678	0.893

7.12. Comparació de mètodes

Taula 7.6. Valors de *t* de Student [17]

Graus de llibertat	Nivell de confiança (%)				
	50	80	90	95	99
1	1.000	3.078	6.314	12.706	63.657
2	0.816	1.886	2.920	4.303	9.925
3	0.765	1.638	2.353	3.182	5.841
4	0.741	1.533	2.132	2.776	4.604
5	0.727	1.476	2.015	2.571	4.032
6	0.718	1.440	1.943	2.447	3.707
7	0.711	1.415	1.895	2.365	3.500
8	0.706	1.397	1.860	2.306	3.355
9	0.703	1.383	1.833	2.262	3.250
10	0.700	1.372	1.812	2.228	3.169
11	0.697	1.363	1.796	2.201	3.106
12	0.696	1.356	1.782	2.179	3.055
13	0.694	1.350	1.771	2.160	3.012
14	0.692	1.345	1.761	2.145	2.977
15	0.691	1.341	1.753	2.131	2.947
20	0.687	1.325	1.725	2.086	2.845
∞	0.674	1.282	1.645	1.960	2.576

7.12.1. Resultats obtinguts amb l'equip CL-10

Taula 7.7. Valors d'urea dels patrons analitzats amb l'equip CL-10

	UREA 1	UREA 2	UREA 3
1	174	239	313
2	183	250	297
3	176	252	333
4	204	258	312
5	202	248	312
6	193	247	304
7	197	245	311
8	188	247	294
9	188	245	307
10	189	249	310
Mitjana	189	248	309
Sd	10.02	4.97	10.60
C.V.	5.29	2.00	3.43

A la taula 7.7 hi ha exposats els valors obtinguts dels patrons d'UHT amb l'equip CL-10, i a les figures 7.2, 7.3 i 7.4 s'hi pot observar la representació de l'interval que podem donar com a vàlid, es considera ± 30 ppm sobre la mitjana de les lectures. La línia discontinua de color blau representa la mitjana. Les línies de color vermell representen l'interval de ± 30 ppm referit a aquest valor de referència (mitjana dels valors obtinguts).

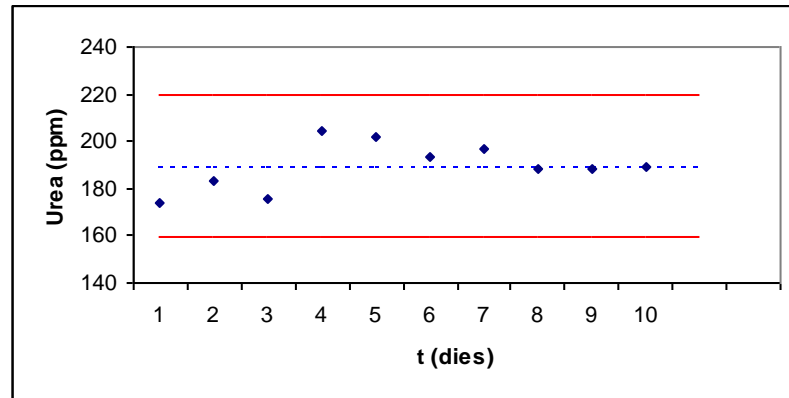


Figura 7.2. Evolució de la senyal de la concentració d'urea al patró d'UHT urea 1 indicant la incertesa acceptada de ± 30 ppm respecte la mitjana dels resultats obtinguts.

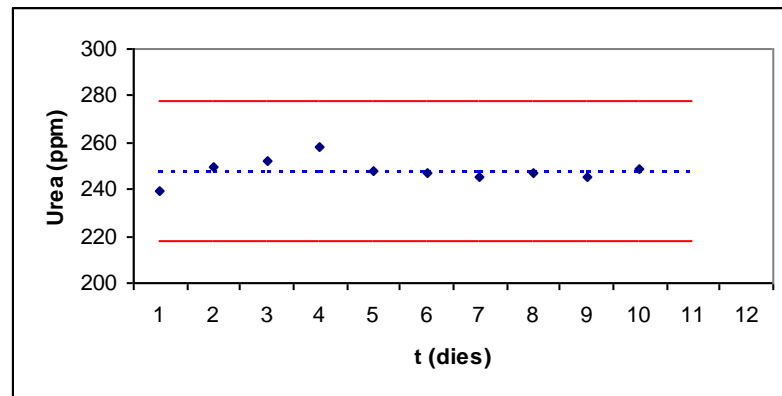


Figura 7.3. Evolució de la senyal de la concentració d'urea al patró d'UHT urea 2 indicant la incertesa acceptada de ± 30 ppm respecte la mitjana dels resultats obtinguts.

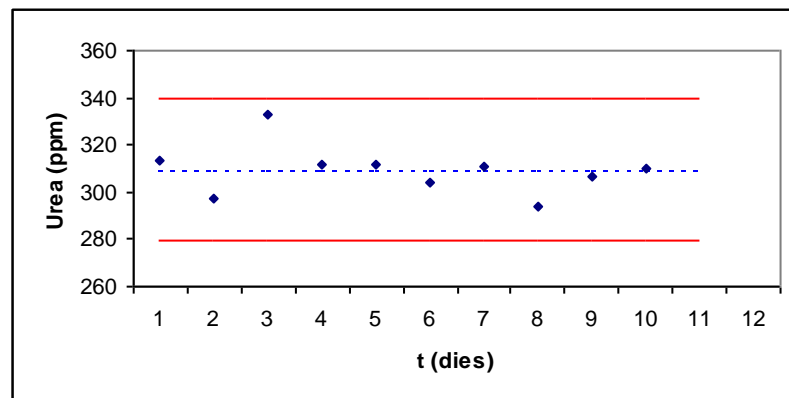


Figura 7.4. Evolució de la senyal de la concentració d'urea al patró d'UHT urea 3 indicant la incertesa acceptada de ± 30 ppm respecte la mitjana dels resultats obtinguts.

7.12.2. Resultats obtinguts amb l'equip MilkoScan 6000

Taula 7.8. Valors d'urea dels patrons analitzats amb l'equip MilkoScan amb la recta $Y=1.11903 \cdot X-122.91447$

	UREA 1	UREA 2	UREA 3
1	206	260	311
2	224	263	324
3	199	239	299
4	195	254	307
5	205	253	314
6	217	270	332
Mitjana	208	257	315
Sd	10.95	10.60	11.88
C.V.	5.27	4.13	3.78

A la taula 7.8 s'hi poden veure els valors obtinguts dels patrons d'UHT una vegada s'han modificat les condicions d'anàlisi (recta de regressió de l'equip), i a les figures 7.5, 7.6 i 7.7 s'hi pot observar la representació de l'interval que podem donar com a vàlid, es considera ± 30 ppm sobre el valor obtingut el primer dia de la lectura. La línia discontinua de color blau representa la primera lectura realitzada del patró, i s'agafa aquest valor com el de referència per tal de seguir la seva estabilitat al llarg del temps. Les línies de color vermell representen l'interval de ± 30 ppm referit a aquest valor de referència.

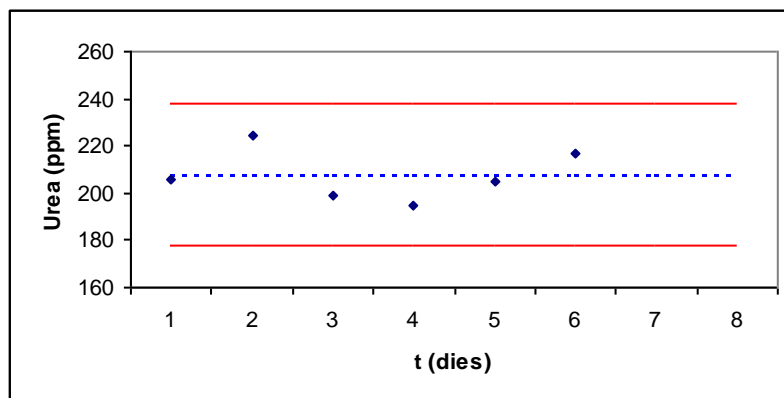


Figura 7.5. Evolució de la senyal de la concentració d'urea al patró d'UHT urea 1

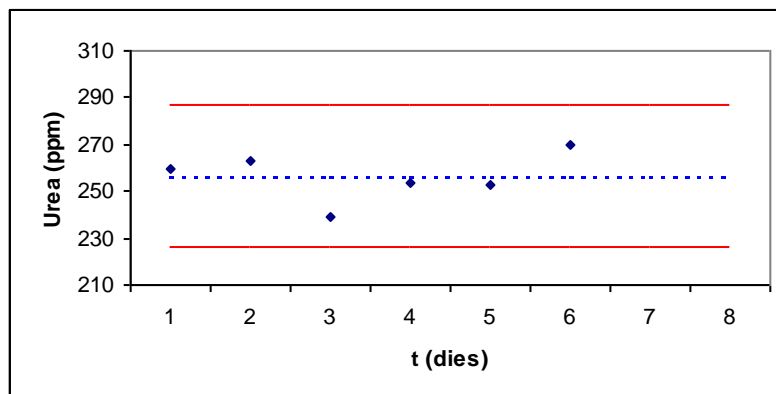


Figura 7.6. Evolució de la senyal de la concentració d'urea al patró d'UHT urea 2

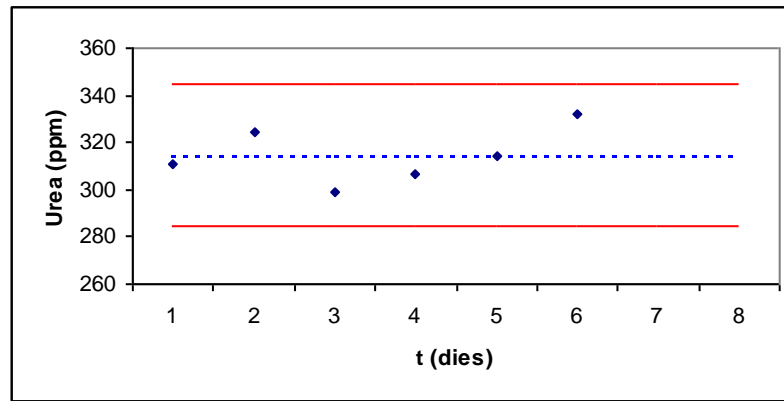


Figura 7.7. Evolució de la senyal de la concentració d'urea al patró d'UHT urea 3

7.13. Control dels patrons LLET UREA i LAB2

Taula 7.9. Valors d'urea diaris del patró LLET UREA

	Urea (ppm)
DIA 1	238
	239
	240
DIA 2	256
	230
	223
DIA 3	218
	218
	223
DIA 4	239
	239
DIA 5	218
DIA 6	212
DIA 7	235
	224
DIA 8	211
	239
	223
DIA 9	206
	205
DIA 10	215
	208
	228
DIA 11	207
	230
DIA 12	219
	217
	258
DIA 13	214
	220
DIA 14	241
	247
DIA 15	243
	237
	229

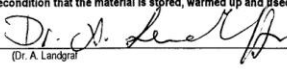
Taula 7.10. Valors d'urea diaris del patró LAB2

	Urea (ppm)
DIA 1	236
	214
	222
DIA 2	249
	230
	241
DIA 3	225
	245
	230
DIA 4	222
	224
DIA 5	226
DIA 6	229
DIA 7	236
	230
DIA 8	222
	229
	219
DIA 9	227
	231
DIA 10	223
	225
	231
DIA 11	220
	227
DIA 12	239
	233
	226
DIA 13	226
	223
DIA 14	238
	233
DIA 15	234
	228
	244
	226

7.14. Certificat d'anàlisi dels patrons de referència de QSE (MUVA)

		Long term calibration standards for raw milk Data sheet and certificate of quality (Rev.: 18/05/2007)							MR 0229 a 0232	
		Data sheet of the materials : production march 2007; best before: march 2010							DATA DE RECEPCIÓ : 12/6/07	
									DATA D'OBERTURA :	
									CADUCITAT : anys/mesos de la data d'obertura o veure etiqueta del pot	
Prod. Nr.		Fat (Rose-Cottlab) (g/100g = %)	Protein (Kjeldahl) (g/100g = %)	Lactose (Monohydrat. enzym.) (g/100g = %)	Freezing point (Cryoscopy) (°C)	Urea (pH-Differential; Skalar, enzym.) (mg/l)	pH	Drymatter (Sea sand) (g/100g = %)	Intended use	
F 1 MR 0229	Reference value and uncertainty *	2,559 +/- 0,010				172,7 +/- 5,3			Slope for fat and urea	
	Range of variation (95%) **	0,010				5,29				
	Confidence interval ***, number of single results	0,005; 23				4,46; 12				
F 2 MR 0230	Reference value and uncertainty *	3,389 +/- 0,010				468,3 +/- 9,1			Slope for fat and urea	
	Range of variation (95%) **	0,006				5,93				
	Confidence interval ***, number of single results	0,010; 24				9,14; 12				
F 3 MR 0231	Reference value and uncertainty *	4,261 +/- 0,012	3,461 +/- 0,014	4,729 +/- 0,013	-0,5187 +/- 0,0011	247,8 +/- 8,1	6,67 +/- 0,01	13,15 +/- 0,05	Intercept for fat, protein, lactose, freezing point, urea, pH and dry matter Slope for fat Multi parameter standard	
	Range of variation (95%) **	0,012	0,009	0,006	0,0011	4,07	0,007	0,02		
	Confidence interval ***, number of single results	0,008; 24	0,014; 24	0,013; 24	0,0005; 30	8,14; 12	0,008; 12	0,05; 12		
F 4 MR 0232	Reference value and uncertainty *	5,388 +/- 0,012				255,0 +/- 4,3			Slope for fat and urea	
	Range of variation (95%) **	0,012				4,25				
	Confidence interval ***, number of single results	0,012; 24				3,01; 9				

Firmensitz: QSE GmbH Hochstatt 2 85283 Wolnzach	Tel. +49(0)8442/9599-600 Fax +49(0)8442/9599-5600 info@qse-gmbh.de www.qse-gmbh.de USI-IdNr. DE248818115	Geschäftsführung: Christa Bout Amtsgericht Ingolstadt HRB4147	Betriebsstätte: Steingruber Straße 6 91746 Weidenbach/Triesdorf Tel. +49(0)9826/623-44 Fax +49(0)9826/623-45	Ein Unternehmen des Milchprüfung Bayern e.V.
--	--	--	--	---

		Long term calibration standards for raw milk Data sheet and certificate of quality (Rev.: 18/05/2007)							MR 0229 a 0232						
		Data sheet of the materials : production march 2007; best before: march 2010							DATA DE RECEPCIÓ : 12/6/07						
									DATA D'OBERTURA :						
									CADUCITAT : anys/mesos de la data d'obertura o veure etiqueta del pot						
<p>GENERAL INFORMATION ON THE MATERIALS Shock frozen raw milk, minimum 40 ml per packaging unit.</p> <p>PACKAGING Screw capped plastic bottles for direct use in IR instruments or direct pipetting.</p> <p>BASIS OF REFERENCE VALUES</p> <p>Reference values and uncertainty * Reference values are established on the basis of corresponding statistical data. Uncertainty is established by taking into account both the confidence interval from interlaboratory data and the homogeneity between packaging units. The higher of the two values was chosen.</p> <p>Homogeneity between packaging units ** To estimate homogeneity between bottles obtained by the homogenizing and dispensing procedure applied, single determinations from 10 bottles and a 10 fold determination from one bottle were carried out using FTIR measurement.</p> <p>Interlaboratory characterization of reference values *** Mean and confidence interval; number of single results. Results were obtained from up to 8 laboratories each working under repeatability conditions. In parallel, reference material was used for statistical control to secure accuracy.</p> <p>ADVICE HOW TO USE The materials are suitable for calibration in IR analysis of raw milk. They have been in use at the laboratories of Milchprüfung Bayern, whereby a substantial improvement of accuracy and stability of calibration has been achieved. Due to the long term stability and exact characterization these materials are best for comparison and statistical control in reference analysis, too.</p> <p>The materials must be stored, warmed up and used according to the following procedure:</p> <ul style="list-style-type: none"> When receiving the materials check first if they are still completely frozen. If this is not the case materials must be used immediately. It is not possible to freeze them again. If they are still completely frozen they can also be stored. Storage temperature must be below -20°C. At the day of analysis materials must be warmed up to 40 °C and gently mixed prior to analysis. In case you'd find a pellet on the bottom of the bottle, try to solve it. We recommend to place them for 35 - 40 minutes into a water bath set a temperature between 41 and 43 °C. After that analysis can be started according to the laboratory's method. If the method prescribes a measurement at 20 °C, the necessary cooling shall proceed slowly at an ambient temperature of 20°C. In no way materials shall be cooled down in an ice bath. The samples are only for laboratory usage and not for human consumption. <p>Stability The materials are kept under regular control during storage at a temperature below -20°C. After storage at this temperature it is best before, see description of material. Reference values and their uncertainties are guaranteed under the precondition that the material is stored, warmed up and used as described above.</p>															
 (Dr. A. Landgraf)															
<table border="0"> <tr> <td>Firmensitz: QSE GmbH Hochstatt 2 85283 Wolnzach</td> <td>Tel. +49(0)8442/9599-600 Fax +49(0)8442/9599-5600 info@qse-gmbh.de www.qse-gmbh.de USI-IdNr. DE248818115</td> <td>Geschäftsführung: Christa Bout Amtsgericht Ingolstadt HRB4147</td> <td>Betriebsstätte: Steingruber Straße 6 91746 Weidenbach/Triesdorf Tel. +49(0)9826/623-44 Fax +49(0)9826/623-45</td> <td>Ein Unternehmen des Milchprüfung Bayern e.V.</td> </tr> </table>											Firmensitz: QSE GmbH Hochstatt 2 85283 Wolnzach	Tel. +49(0)8442/9599-600 Fax +49(0)8442/9599-5600 info@qse-gmbh.de www.qse-gmbh.de USI-IdNr. DE248818115	Geschäftsführung: Christa Bout Amtsgericht Ingolstadt HRB4147	Betriebsstätte: Steingruber Straße 6 91746 Weidenbach/Triesdorf Tel. +49(0)9826/623-44 Fax +49(0)9826/623-45	Ein Unternehmen des Milchprüfung Bayern e.V.
Firmensitz: QSE GmbH Hochstatt 2 85283 Wolnzach	Tel. +49(0)8442/9599-600 Fax +49(0)8442/9599-5600 info@qse-gmbh.de www.qse-gmbh.de USI-IdNr. DE248818115	Geschäftsführung: Christa Bout Amtsgericht Ingolstadt HRB4147	Betriebsstätte: Steingruber Straße 6 91746 Weidenbach/Triesdorf Tel. +49(0)9826/623-44 Fax +49(0)9826/623-45	Ein Unternehmen des Milchprüfung Bayern e.V.											

