



Tecniche di screening per l'individuazione delle frodi

Dr. Roberto Piro



Le frodi nel miele
Bologna, 19 ottobre 2015



Abbiamo visto nelle relazioni precedenti come le analisi di laboratorio siano importanti per definire la qualità del prodotto, ma solo una piccola parte dei controlli rivela situazioni non conformi, quindi visti i costi della analisi convenzionali di laboratorio sarebbe importante avere la possibilità di effettuare indagini di screening per utilizzare al meglio le risorse che ci sono in campo.

Il mercato è in continuo cambiamento, le frodi sono più complesse da svelare. È da sottolineare come lo scandalo della melanina nel latte in polvere abbia dato una scossa ai laboratori, e ha evidenziato come sia necessario cambiare strategia

Le frodi degli ultimi anni non sono più frodi commerciali (vendere qualcosa di minor qualità), ma sono frodi di tipo tossico (presenza di sostanze pericolose per la salute dei consumatori) quindi è necessario essere sempre al passo con l'evoluzione delle tecniche analitiche. Le nuove tecniche offrono nuove opportunità che però generalmente si scontrano con l'evoluzione lenta delle normative nazionali e comunitarie.

Fraud



Questo è un documento molto interessante emesso l'anno scorso da un gruppo di lavoro della commissione europea a seguito dello scandalo della carne di cavallo.

Un documento di analisi, che non comporta e non impone l'adozione di nessuna nuova normativa, ma semplicemente è una riflessione che ha fatto la commissione europea sulle frodi alimentari.



Frauds – EU reference laboratory

Lessons learned and recommendations

Institutional framework

14. Welcomes the Commission's decision to set up a food fraud team and acknowledges the efforts made by Europol in the fight against food fraud; encourages the Commission to consider the development of an EU Reference Laboratory (EURL) for food authenticity;
15. Welcomes the Commission's plan to organise a conference on food fraud in 2014 in order to raise awareness among relevant actors;



Fra le tante riflessioni afferma la necessità di avere un laboratorio di riferimento comunitario sulle frodi, al pari di altri temi come i residui i pesticidi o altro. Esisterà quindi un laboratorio centrale di riferimento su queste questioni.



Frauds – Change control strategy

Enforcement and controls

52. Calls on the Commission, pursuant to Articles 7 and 17 of Regulation (EU) No 1169/2011 on the provision of food information to consumers, to pursue and prevent the marketing of products which remain on the market under a deliberately inaccurate or misleading name, since this is also to be considered a type of food fraud;

53. Is convinced that a change of attitude is needed within the competent authorities, moving from an administrative and veterinary approach towards a policing approach, based on the experience of the Danish Food Administration's 'flying squad' and of the Arma dei Carabinieri and the Guardia di Finanza in Italy; stresses that such an approach is dependent on designated courts being staffed by judges with expertise in food law;



La seconda affermazione a mio giudizio molto importante è che bisogna cambiare strategia nel controllo: "il lavoro svolto dalle autorità competenti, quindi tutti gli organi di controllo, compreso il mio, dovrebbero muovere da un sistema amministrativo/veterinario cioè da qualcosa di burocratico (del tipo devo fare 100 campioni, li ho prelevati e quindi sono a posto) a qualcosa più basato su indagini come l'esperienza maturata dall'arma dei

carabinieri (NAS) o la guardia di finanza. Ovvero bisogna andare a cercare le frodi più che sperare che vengano scovate facendo le solite analisi di laboratorio”.

Frauds – Research

54. Stresses that the carrying-out of controls should be risk-based and include the development of risk profiles and vulnerability assessments for each supply chain and food product, drawing on ongoing academic studies which combine knowledge in the areas of food authenticity and criminology, such as the research being carried out by VU University Amsterdam and the University of Wageningen;

55. Calls on the Commission and Member States to further stimulate European and national research and development programmes to develop and implement technologies and methods used to detect food fraud, such as sensor technology, data analysis and the fingerprinting of products, and to facilitate the commercial availability of tests in the short term; acknowledges the existing European research projects on food integrity and authenticity, such as TRACE and AuthenticFood;



Infine dà un’indicazione molto chiara sul fatto che è ora di cambiare strategia, quindi invita tutti quanti i Paesi membri a promuovere, studiare nuovi sistemi, a sviluppare nuove tecniche che siano adatte a rivelare meglio le frodi, esempio tecnologie basate su sensori, analisi statistiche o sistemi di fingerprinting (impronta digitale), cercando di sfruttare quelle che sono le evidenze dei progetti di ricerca europei come il progetto «Trace» o il progetto «AuthenticFood».

Frauds – products

Top 10 products that are most at risk of food fraud	
1	Olive oil
2	Fish
3	Organic foods
4	Milk
5	Grains
6	Honey and maple syrup
7	Coffee and tea
8	Spices (such as saffron and chili powder)
9	Wine
10	Certain fruit juices

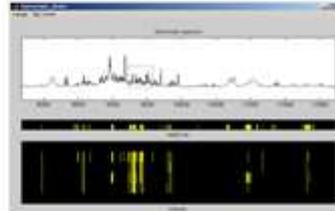
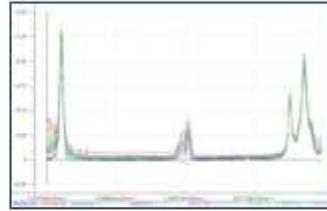


Il documento include un elenco dei prodotti maggiormente frodati, secondo questa classifica il miele è al sesto posto.

Questi sono i 10 prodotti più frodati su cui la Commissione Europea intende aprire una finestra e accertare la situazione e promuovere attività di contrasto.

TRACE - Fingerprinting

- NMR
- Mass Spectrometry
- NIR, MIR
- Raman Spectroscopy
- Data interpretation techniques
- Food verification methods



WPL Gerry Downey (TEAGASC)



Consolidating and Exploiting EU research on food and feed traceability,
CSL, York, 11-13 October 2006

il progetto «Trace» citato in precedenza è arrivato alla conclusione che la tecnica NMR, la spettrometria di massa, la tecnica NIR, piuttosto che il Raman forniscono informazioni molto utili per la rilevazione delle frodi. Queste tecniche devono essere associate a complesse interpretazioni dei dati, quindi la parte statistica è uno dei punti nodali per trovare efficienti sistemi di identificazione delle frodi.

Summary

- Expansion of EU- increased scope for fraud
- Move away from detecting CAP frauds to verification of food labelling, i.e. protecting the consumer (and industry)
- "value added" products often not well defined and require sophisticated solutions to verify
- Increased emphasis on profiling techniques, chemometrics, integrated with traceability
- Methods for determining fraud will always lag behind methods for performing fraud.....



MoniQA, Rome, 8-10 October 2008



Viene data molta enfasi alla possibilità offerta dalle tecniche di fingerprinting associata alla chemiometria (statistica) come elementi essenziali.

New Screening demands

- Automated
- Rapid analysis
- Portable
- Multiplexing



Quindi sarebbe necessario avere sistemi automatici rapidi magari portatili e multiplex cioè che possono vedere più cose possibili contemporaneamente.

Favorite methods

- Star Trek - Tricoder (1966-1969)
 - First example of instant analytical instrument



- CSI style
 - Rapid, easy and "reliable"
 - CSI syndrome
 - unreasonable expectations regarding the amount and kind of physical and chemical evidence that must be detected
 - unrealistic beliefs concerning the capabilities of labs.
 - If they don't see in real life, they are disappointed.



La possibilità di avere strumenti che ci forniscano tutte le risposte in un istante appartiene soltanto alla fantasia, solo nei film si vedono persone che arrivano, appoggiano uno strumentino e scoprono tutto sull'oggetto in esame.

Come anche nella serie TV «CSI» sono bravissimi scoprono tutto in 5 minuti, le cose nella realtà sono un po' più complesse, tanto che in America i laboratori di medicina legale nei tribunali cominciano avere problemi, si parla di "CSI syndrom". Alla giuria sembra quasi impossibile che a volte il laboratorio non riesca a scoprire o a trovare niente.

Magical Food Scanner (crowdfunding fraud?!)

- The gadget works by scanning (by laser beam) the food and uploading the data to special web server.
- There's an algorithm that creates a report which is sent to a **mobile phone app** revealing the food's contents and the app can also keep a diary of what a user has eaten that day
- TellSpec can also identify **allergens, chemicals, nutrients, calories, and ingredients** in foods or beverages to make life easier for allergy sufferers



indiegogo

\$ 386392 USD



Però l'esigenza di avere sistemi per monitorare quello che si mangia è una esigenza sentita, ci sono alcuni esempi in rete di «crowdfunding» che è riuscito a raccogliere somme considerevoli (credo il progetto sia finito male) in cui promettevano tramite un sistema Raman miniaturizzato con una semplice scansione dell'alimento, lo spettro veniva inviato in internet ad un sito che lo elaborava e ti tornavano sul cellulare tutte le informazioni di composizione: presenza allergeni, presenza di sostanze nocive e quant'altro.

Tecnicamente, per chi conosce le difficoltà legate alla tecnica Raman alla sua peculiarità, risulta essere una enorme stupidaggine, però sono riusciti a raccogliere un sacco di soldi.

Methodology

- ✓ **Targeted approach**
 - Standard procedures
 - Detection predefined specific markers
 - **One-shot analysis**
- ✓ **Holistic - Untargeted approach**
 - Rapid
 - Maps / Profiles
 - Chemiometrics - statistics
 - Omics (Metabolomics, Proteomics, Lipidomics)
 - **Reusable spectra/data**



Le tecnologie analitiche sono suddivise fondamentalmente in 2 tipologie le targeted (mirate), cioè sono basate su metodi e operazioni standardizzate, sono utili per cercare un gruppo definito di composti e sono quindi «one shot», cioè una volta sparato il colpo non si torna indietro, ovvero se cerco la sostanza (o il gruppo di

composti es. tetracicline) A, posso sapere soltanto se A c'era o non c'era, se nel campione in esame ci fosse stata la sostanza (o il gruppo di composti es. sulfamidici) B non lo potrò mai sapere.

Mentre l'approccio, olistico/untargeted (non mirato) come viene normalmente indicato, è più rapido, è basato su spettri o mappe (fingerprint), l'analisi dei dati utilizza la statistica e cosa interessante, se i dati vengono raccolti e creo un database posso riutilizzare i dati vecchi, se un giorno viene scoperto un nuovo problema (frode, inquinante etc.) io posso ri-indagare/verificare i dati presenti nei vecchi spettri. Quindi posso sapere se e quando quel problema era stato presente nel mercato Italiano.

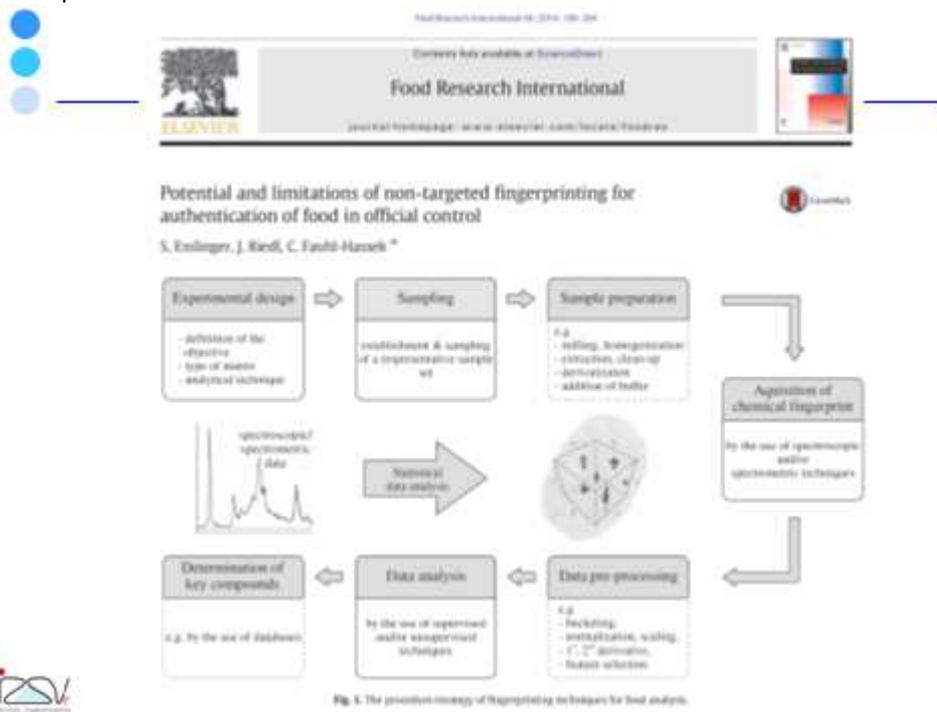


Fig. 1. The procedure strategy of fingerprinting techniques for food analysis.

Questo è una pubblicazione scientifica molto interessante perché ripercorre in maniera critica le modalità di lavoro, i vantaggi e gli svantaggi dell'approccio non-targeted fingerprinting, partendo dal campionamento, l'analisi e la creazione e la verifica del modello statistico/matematico.

A che punto siamo

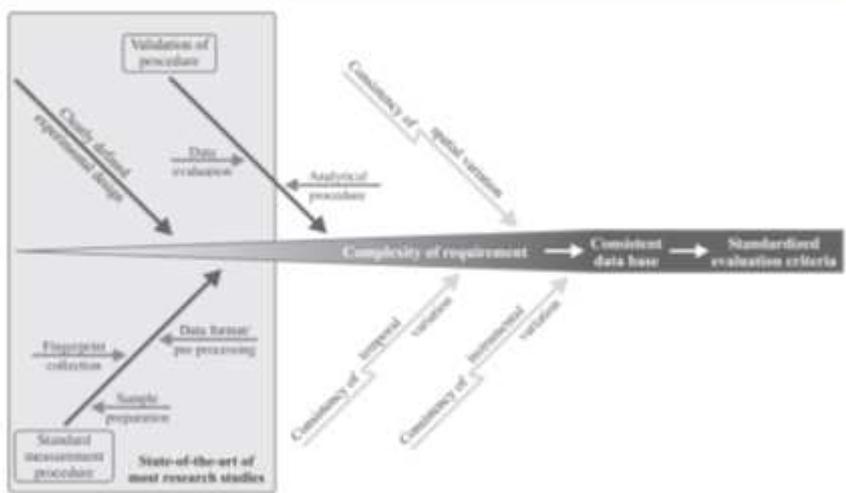


Fig. 2. Requirements for food fingerprinting approaches for the application in food control.



Viene fatta una disamina abbastanza impietosa, perché la ricerca è ancora all'inizio di un lungo percorso, per poter ottenere una metodologia standardizzata. È necessario ancora parecchio lavoro, ma è proprio l'investimento in ricerca che chiede anche la Commissione Europea.

Table 3
Selected applications of food fingerprinting approaches for the various honey, olive oil, and wine.

Matrix/objective of investigation	Analytical technique ^a	n(%)	Sample preparation ^b	Pre-processing ^c	Validation method ^d	Source		
Honey	Metabolic origin	NMR	4(3)	Direct analysis	100% correction, normalization, 1st derivative, noise-reducing, scaling	PCA, PLS-DA, SIMCA, PLS-DA	DiMillo, Tascioni, Tullio, Perotta, & Ferraro (2012)	
		FTIR-ATR	20(7)	Extraction and clean-up (phenolic compounds)	Integration (1st-2nd), scaling to zero mean and unit variance	PCA, LDA	Cherrier, Gonzalez, Mounier & Schieffelin (2012)	
		NMR	230(3)	Homogenization	1st and 2nd derivatives, Savitzky-Golay smoothing, baseline, normalization	PCA, SIM-DA, BP-ANN	Cherrier et al. (2012)	
		% NMR	31(3)	Extract with chloroform, pH adjustment		PCA, OPLS-DA, SVM	Schirone et al. (2012)	
		% NMR	110(4)	Dilution with water, extraction with chloroform		PCA, PLS-DA	Cherrier et al. (2010)	
		FTIR	8(7)	Dilution with distilled water		PCA	Truchel & Scherberg-Krag (2008)	
		% NMR	71(3)	Dilution with distilled water, simplification, dilution with different concentration solvent		PCA, LDA	Li et al. (2008)	
		Wine & geo-graphical origin/ geographical origin	GC-MS	11(7)	Direct analysis (MS-SPME)	Normalization	OPLS-DA, OPLS-DA, SIMCA	Cherrier, Tascioni, Perotta, & Schieffelin (2010)
			Raman	17(2)	Direct analysis	MSC	PCA, PLS-DA, SVM	Perotta et al. (2011)
			NMR	111(2)	Direct analysis	1st, 2nd derivatives, SW	SIMCA, OPLS, PLS-DA	Cherrier et al. (2011)
FTIR	17(3)		Direct analysis	SW, 1st, 2nd derivatives	OPLS, PLS-DA	Herrero, Swearing, & O'Connell (2010)		
NMR	17(2)		Homogenization, dilution with distilled water	None, different derivations, SW	PCA	Truchel & Scherberg (2008)		
% NMR	41(3-5)		Diluted in D ₂ O	Noise-reducing, unit variance	PCA, PLS-DA	Schirone & Caporaso (2008)		
% NMR	44(3-10)		Homogenization, dilution with distilled water, centrifugation, dilution	None	PLS-DA, CP, PLS-CP	Cherrier et al. (2008)		
FTIR	110(3)		Dilution with distilled water	SW, 1st, 2nd derivatives	PLS, PLS, SIMCA	Herrero et al. (2008)		
Adulteration	Raman		71-110(2)	Direct analysis	AutoPE	PLS-DA	Li et al. (2011)	
	% NMR		110(4)	Direct analysis	None	PLS-DA	Cherrier et al. (2010)	
	NMR	110(2)	Homogenization	Smoothing, SW	PCA, LS-SVM, SVM, BP-ANN, SVM, ANN	Cherrier et al. (2010)		

In questo lavoro vengono citati alcuni esempi di pubblicazioni e lavori inerenti il miele, e mi preme far notare come le tecniche maggiormente utilizzate sono sempre le stesse NIR, Raman, NMR e quant'altro.



Review on metabolomics for food authentication

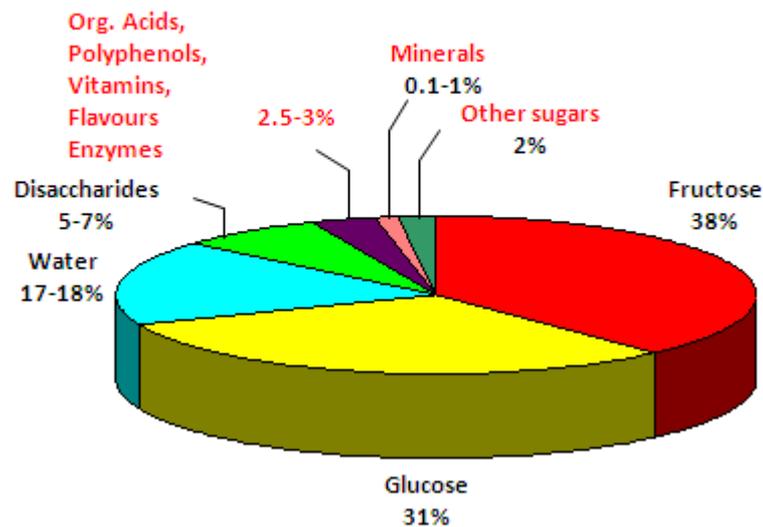
Elena Cubero-Leon, Rosa Peñalver, Alain Maquet[✉]

European Commission, Joint Research Centre (JRC), Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM), B-1358 Geel, Belgium

Food	Region of analysis	Detection technology	Number of samples	Data Treatment	References
Honey	Geographical origin	NMR	101	PLS-DA, two stage GP, PLS-GP	DiMillo, Jones, & Charlton (2008)
		NMR	174	GP	DiMillo, Jones, Perotta, Triffield, & Charlton (2010)
		NMR	81	PCA, PLS-DA	Cherrier & Caporaso (2008a)
		GC-IG-TDMS	174	LDA, IRLS, SVM	Schirone et al. (2010)
		GC-IG-TDMS	174	PCA, ANN, MLP	Cabo, Higueras, Peña, & Koozekan (2010)
	Metabolic origin	FT Raman	174	PCA, SVM	Woolcock, Jermolov, & O'Donnell (2009)
		NMR	147	PLS-DA	Perotta, Tascioni, DiMillo, & Jones (2011)
		FTIR	10(5)	PLS-SVM	Liang, Li, & Wu (2011)
		MFT-MS	10	PCA	Truchel & Scherberg-Krag (2008)
		GC-MS	77	SMBR	Agüero & Barja (2011)
		GC-MS/MS analysis	10	OPLS-DA, SIMCA, OPLS-PCA	Alfaro, Tascioni, Perotta, & Almaraz (2010)
		NMR	44	PCA, CA	Carro-Villaverde, Diaz-Molina, González-Félix, & Basso-Cadiel (2009)
		NMR	110	PCA	Berthiault et al. (2009)
		NMR	110	PCA, PLS-DA	Schirone, Peggion, & Maffei (2010)
		NMR	110	PCA, OPLS-DA	Schirone, Tascioni, DiMillo, Perotta, & Maffei (2012)
Adulteration	IR, NMR	71	PCA, LDA	Li, Scott, Poni, Sabaria & Perotta (2008)	
	MS/MS	174	CP	Cherrier et al. (2010)	
	Raman	110	PLS-DA	Li, Shen, Zhu, Zhang, & Liu (2012)	
	FTIR	74	PDR, PLS	Galvão-Vieira, Castro-Ribeiro, Liu, & Basso-Cadiel (2010)	
	FTIR	170	PLS, PLS, SIMCA	Herrero, Swearing, & O'Connell (2008)	
NMR	110	PLS, LS-SVM, SVM, SVM, LDA, BP-ANN	Zhou et al. (2010)		
IR	144	OPLS	Cherrier et al. (2011)		

Anche questo è un altro lavoro, interessante perché scritto da uno dei centri di ricerca della Commissione Europea che probabilmente sarà designato come laboratorio di riferimento comunitario per quanto riguarda il discorso delle frodi, vengono fatte lo stesso tipo di valutazioni e di sintesi delle migliori tecniche di indagine.

Honey



Tornando al miele, la sua composizione è ben nota, per valutare un frode non sono da prendere in considerazione gli elementi maggiormente rappresentati come fruttosio, glucosio, acqua, ma bisogna concentrarsi sui componenti minori come ad esempio i minerali, gli acidi organici o gli enzimi .

Adulterants

- High-fructose corn syrup (HFCS)
- High-fructose rice syrup (HFRS)
 - ❑ hydrolysis of starch into glucose,
 - ❑ isomerization into fructose.
 - ❑ use of enzymes
 - β -amylase
 - α -amylase
 - pullulanase dextrinase
 - gamma-amylase
 - Xylose isomerase
 - Beta-fructofuranosidase



Quando prendo in considerazione le possibili frodi devo indagare su quali «componenti minori» posso introdurre utilizzando alcune materie prime e devo conoscere il loro processo produttivo. Ad esempio gli sciroppi zuccherini vengono prodotti per idrolisi enzimatica dell'amido e questi enzimi possono residuare nel miele.

Emerging technologies

Main component

- NIR
- RAMAN

Flavours, VOCs

- PTR-TOF

Molecular profiling

- NMR
 - High resolution
 - Benchtop / Low resol.
- MS
 - DART-HRMS

Minerals fingerprint

- TXRF

Stable isotopes

- CRDS



Le tecnologie emergenti su cui focalizzare l'attenzione, partendo dai dati presenti nella letteratura scientifica, per cercare di trovare una soluzione ai problemi delle frodi sono: il NIR, il Raman, l'NMR, la Spettrometria di massa, il PTR-TOF-MS per l'analisi della frazione volatile, tecniche di fluorescenza ai raggi X (XRF) per la frazione minerale e a livello delle analisi isotopiche il CRDS che è stato citato in precedenza.

In sintesi si può affermare che stanno nascendo tecnologie differenti da quelle utilizzate in passato, che semplificano la vita al laboratorio, semplificano le analisi dal punto di vista operativo e impegnano poco il laboratorio anche dal punto di vista degli spazi e degli impianti.

General Assumptions

- Spectral data contains useful and relevant information
- One technique does not contain all the necessary information and is not sufficient for an efficient control system
- Samples used to generate models span most of the variability likely to be encountered in the future
- Instrumental measurements are precise and reproducible



Una delle assunzioni fondamentali è che il dato spettrale contiene tutte le informazioni che mi servono, devo solo essere in grado di tirarle fuori,

L'altra assunzione (mia personale, che si differenzia dall'esperienza della Coop) è che una tecnica da sola per quanto potente, non può essere sufficiente a fornire tutte le risposte ai problemi, bisogna metterne insieme più di

una e bisogna fare in modo che il modello matematico-statistico deve essere rappresentativo di quello che è successo oggi ma anche che succederà domani, quindi la banca dati deve essere corposa, e devo dare come associato che il laboratorio e la strumentazione funzioni in maniera riproducibile e precisa nel tempo.

Key words

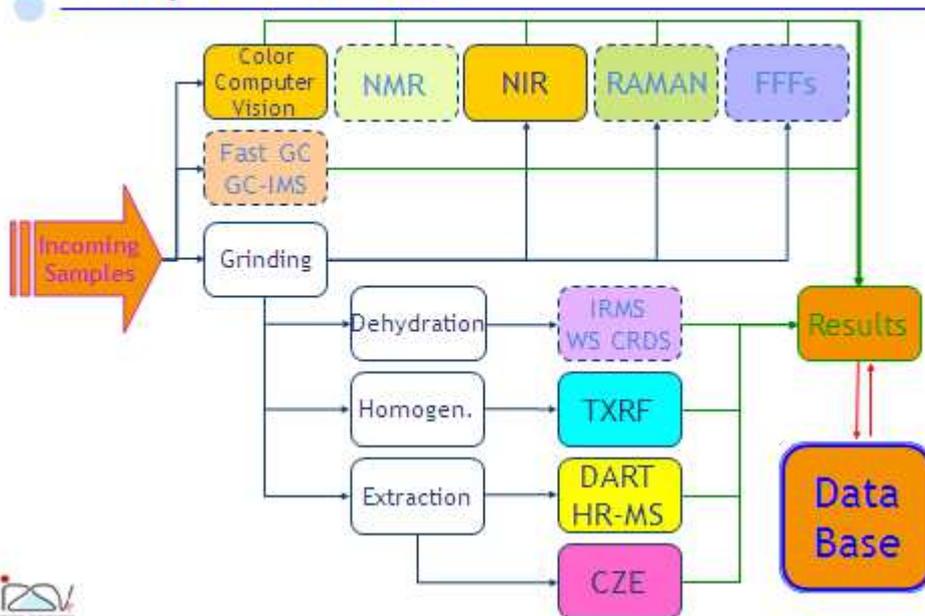
- ✓ NO (Less) sample treatment
- ✓ NO (Less) sample preparation
- ✓ NO (Less) matrices effect
- ✓ HIGH flexibility
- ✓ HIGH sample throughput
- ✓ HIGH number of detectable parameters
- ✓ Retrospective analysis
- ✓ Low energy consumption
- ✓ Low waste
- ✓ Solventless



Gli elementi essenziali sono: che non ci sia trattamento al campione, che non ci sia effetto matrice cioè che ci sia una certa flessibilità nel passare da una matrice all'altra, che sia in grado di produrre una grande quantità di risultati su un numero elevato di campioni, che vengano valutati molti parametri.

Inoltre che sia possibile un'analisi retrospettiva, che si consumi poca energia e si usino pochi solventi. Questo ultimi due aspetti relativi alla salvaguardia dell'ambiente sono molto innovativi ed interessanti per il laboratorio.

Sample flow chart

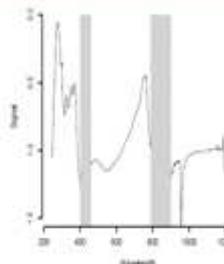


Lo schema di lavoro, che abbiamo in uso presso il laboratorio, prevede che il campione viene semplicemente macinato, deidratato, piuttosto che omogenizzato, estratto in maniera molto semplice (non operazioni complicate),

poi viene letto nelle varie metodologie e infine tutti i risultati vanno a comporre il database per fare l'analisi statistica.

Honey parameters

Water	Glucose
Fructose	Sucrose
Fruct + Gluc	Fruct/Gluc
Gluc/Water	Specif. Rot.
<i>Diastase</i>	<i>HMF</i>
Proline	pH
Eletr. Cond.	Acidity
Maltose,	Erlose
Threalose	Isomaltose
Melezitose	Raffinose



Questo è un esempio di applicazione del vicino infrarosso (NIR), in cui possono essere determinati in maniera semplice e contemporanea diversi parametri (non tutti evidenziati in corsivo) del miele.

FT IR - Calibrations

	Fructose	Glucose	Saccharose	Erlose	Isomaltose	Maltose	Maltulose	Trealosic	Galattosic	Raffinosic	Melicitosic
N	160	152	216	116	24	207	110	19	25	46	24
Mean	194.2	28.49	0.85	0.91	1.08	1.09	2.01	0.16	0.22	0.02	0.14
Min	26.24	16.48	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Max	526.0	40.20	2.24	1.76	1.15	2.36	6.27	1.12	1.20	0.26	0.16
SEC	1.995	1.110	0.175	0.194	0.205	0.121	0.725	0.116	0.011	0.027	0.014
RSQ	0.794	0.795	0.632	0.329	0.227	0.561	0.740	0.709	0.790	0.206	0.772
SECV	2.057	1.11920	0.441	0.475	0.256	0.159	0.822	0.126	0.069	0.049	0.056
1-VR	0.780	0.820	0.596	0.751	0.228	0.426	0.675	0.471	0.959	0.461	0.452

N: number of samples.
 SEC: standard error of calibration; RSQ: coefficient of determination in calibration;
 SECV: standard error of cross-validation; 1-VR: coefficient of determination in cross-validation;



Qui sono riportati i dati delle curve di calibrazione degli zuccheri.

FT IR - Calibrations

	N	Water	Free Acidity	Conductibility	pH	Color Pfund	Specific Gravity	HMF	Diastase	Ash	Proline
N	171	173	169	176	501	46	218	129	84	161	
Mean	16,77	16,79	0,63	4,26	39,66	-5,61	3,38	24,80	0,40	480,06	
Min	13,17	0,01	0,00	2,68	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
Max	20,37	39,50	2,36	5,84	104,27	29,53	9,73	75,15	1,53	1294,37	
SEC	0,309	1,399	0,048	0,115	8,817	0,836	1,626	3,035	0,034	103,385	
RSQ	0,934	0,967	0,993	0,952	0,851	0,956	0,409	0,909	0,992	0,849	
SECV	0,354	1,649	0,059	0,132	9,377	1,223	2,010	6,521	0,038	128,086	
1-VR	0,912	0,935	0,990	0,938	0,832	0,989	0,291	0,847	0,990	0,790	

N: number of samples.

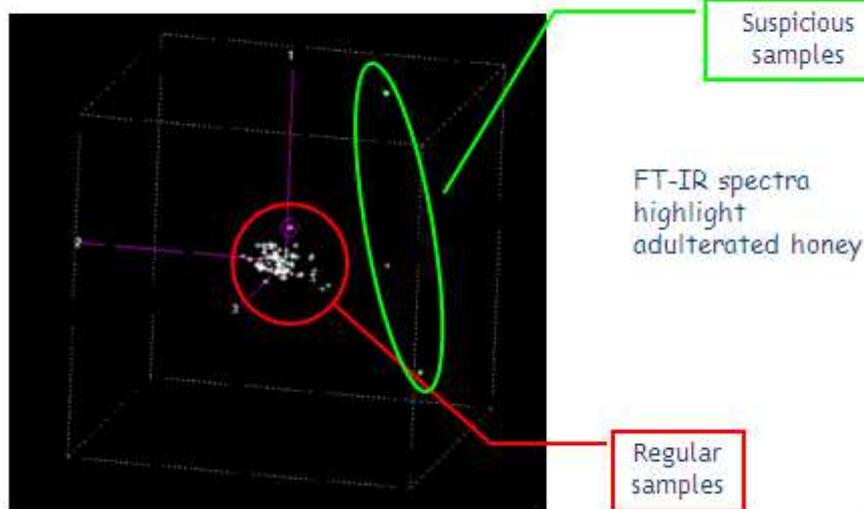
SEC: standard error of calibration; RSQ: coefficient of determination in calibration;

SECV: standard error of cross-validation; 1-VR: coefficient of determination in cross-validation;



Nella successiva tabella sono riportati i dati relativi ad altri parametri di caratterizzazione del miele (acqua, acidità, conducibilità, pH, colore, HMF, indice diastatico, ceneri, prolina)

FTIR - Frauds



Con una semplice analisi NIR è possibile verificare alcune frodi. Nel grafico è visibile al centro il gruppo di campioni «buoni» mentre è molto evidente che i tre mieli adulterati sono molto diversi e distanti dal centro basta un colpo d'occhio.



DART – HRMS

Direct Analysis in Real Time - High Resolution Mass Spectrometry

- ✓ Atmospheric pressure ion source
- ✓ Not requiring sample preparation (solid / liquid).
- ✓ Ionization can take place directly on the sample surface
- ✓ Gas (N₂ or He) electrically charged 2 kV.
- ✓ Generation ionized gas containing electrons and excited state atoms/molecules (metastable species).
- ✓ 100 -500 V applied to the electrostatic lenses (grid).
- ✓ The gas stream can be heated from 100 up to 600 °C.
- ✓ The distance between mass spectrometer 5 25 mm.

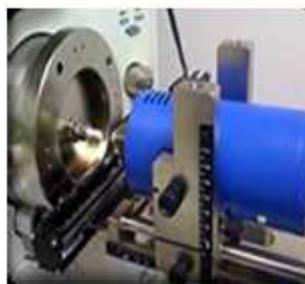
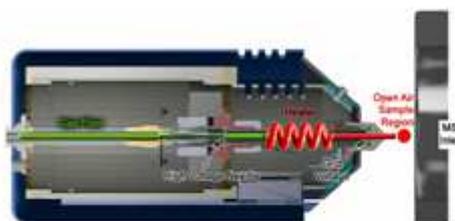


L'altra analisi interessante che abbiamo studiato e applicato è il DART associato ad uno spettrometro di massa ad all'alta risoluzione (HRMS).

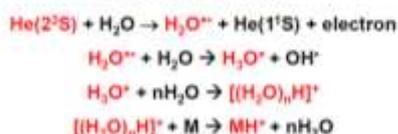
Il DART è un sistema introduzione diretto del campione.



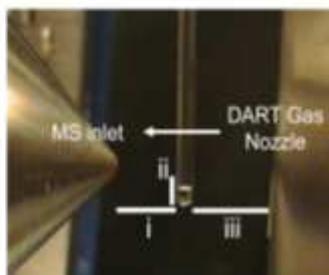
Direct Analysis in Real Time (DART)



Proton Transfer

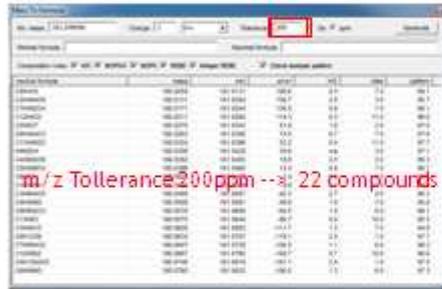


- Metastable atoms react with atmospheric water to produce ionized water clusters
- Dominant reaction mechanism when helium carrier used: He(2³S) energy = 19.8 eV
- Huge reaction cross section: 100 Å²

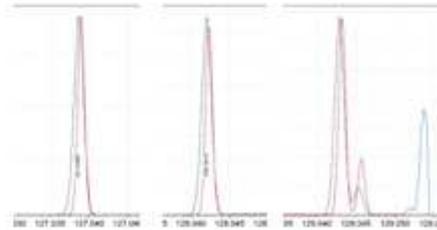


Lasciamo stare la descrizione tecnica, è semplicemente un piccolo cannoncino in cui viene riscaldato un gas (Elio/Azoto da 100°C a 550°C) e lo ionizzo lo carico di potenziale elettrico (±100-500V), il campione diluito viene posto, tramite un supporto in vetro, tra l'uscita del DART e la sorgente dello spettrometro di massa.

High Resolution Mass Spectrometry



HRMS allows the identification of the molecular formula of a compound through the determination of accurate mass and its isotope pattern



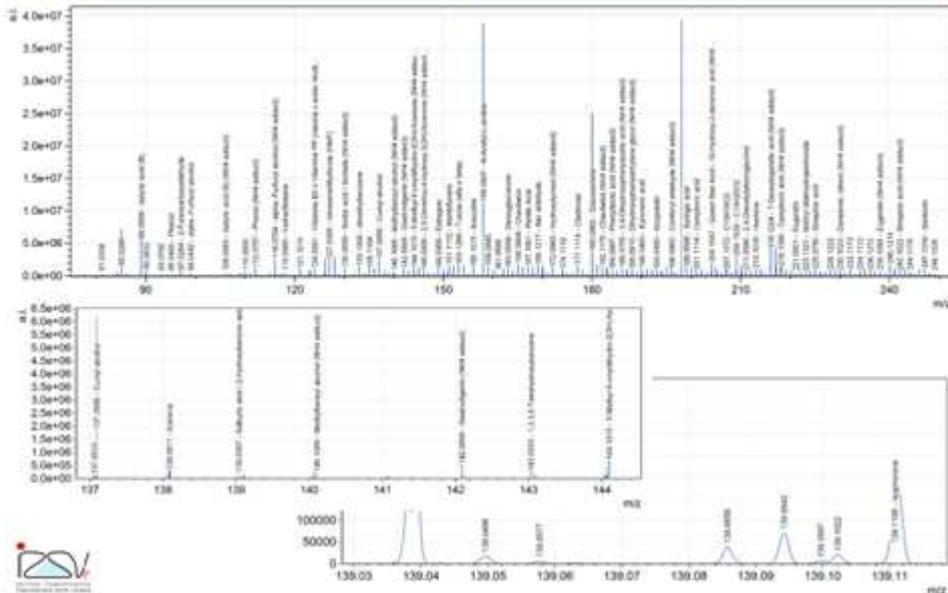
HMF isotopic pattern



Uno dei vantaggi è che il campione viene analizzato tal quale (o quasi) e che vengono ionizzate (e quindi sono visibili) gran parte delle molecole presenti nel campione. L'altro punto di forza è lo spettrometro di massa ad alta risoluzione che riesce a distinguerle quasi tutte.

L'alta risoluzione cosa significa, significa che determino la massa di una molecola alla quarta/quinta cifra decimale

Honey sample – Positive Spectra



Questo è lo spettro di un miele con tutti i vari picchi che possono arrivare fino ad un numero di 5000, è una massa di dati imponente.

Stiamo decodificando i dati per creare una banca dati per identificare singoli componenti uno a uno, nelle figure c'è un dettaglio, si notano piccole differenze dell'ordine di variazioni della quarta cifra decimale. La macchina le identifica come 2 sostanze diverse, questo livello di dettaglio non è possibile con altre tecniche.

TXRF - Sample preparation



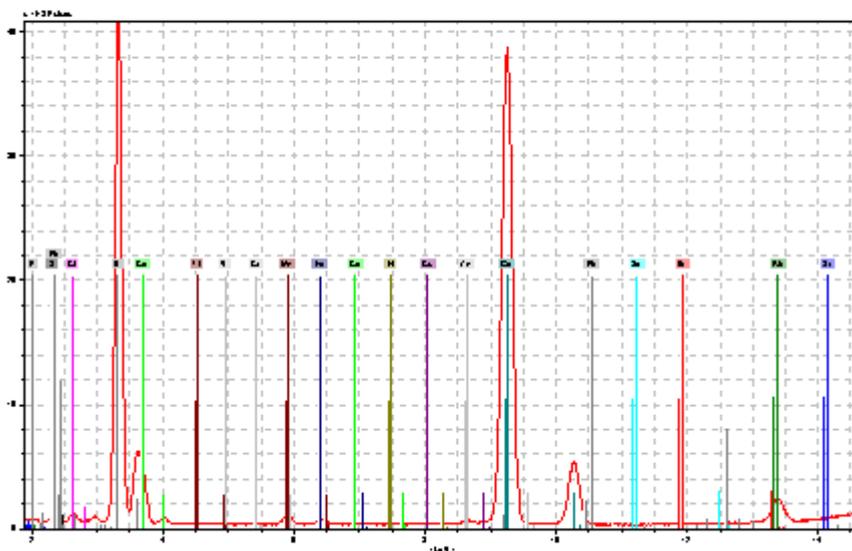
H																	He	
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne	
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar	
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr	
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe	
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn	
Fr	Ra	Ac															Rf	
			Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu		
			Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr		



Il campione è semplicemente diluito (miele) viene aggiunto uno standard interno (di solito si utilizza il Gallio, elemento raro) mescolato e depositato su un dischetto di plastica o di quarzo.

Nella tabella periodica sono evidenziati gli elementi preselezionati che abbiamo deciso di ricercare

TXRF Spectra



Questo è lo spettro, si nota il picco del Gallio, e questi sono tutti gli elementi visibili.

Se si paragona questo risultato e il tempo per ottenerlo, con le tecniche di riferimento come l'assorbimento atomico o l'ICP Massa, si può affermare che questo è tutto un altro vivere. La tecnica TXRF ha comunque dei limiti e non è in grado di quantificare bene alcuni elementi (es. cadmio), però è molto semplice per dare un'occhiata a quella che è la composizione del prodotto, inclusi elementi al momento sottovalutati, ma molto utili per un discorso di tracciabilità geografica come lo Stronzio e il Rubidio.

Proton Transfer Reaction – Time of Flight

High sensitivity sensor for real-time monitoring of volatile compounds (VOCs)

Based on the rapid, non-dissociative transfer of protons from H_3O^+ to most common VOCs, but not to the principal gases in air sample.

Used for

- Environmental monitoring
- medical sciences (breath test, diagnostic tool)
- food technology (flavor, aroma)
- bioprocess monitoring

No sample treatment



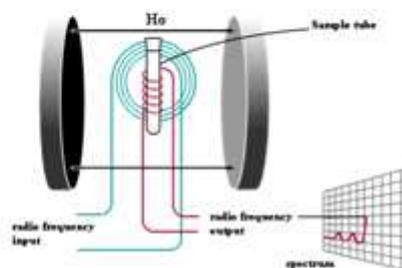
Altra cosa abbiamo provato ad utilizzare (in collaborazione con la Fondazione Edmund Mach) il PTR-TOF (Proton Transfer Reaction - Time Of Flight).

Il miele viene semplicemente messo nella vial e viene registrato direttamente lo spettro di massa della frazione volatile, questo dato elaborato statisticamente consente di identificare e classificare i mieli di differenti origine botanica.

Questo è un esempio di un articolo recentemente pubblicato in cui sette diverse tipologie di miele sono state classificate tramite questo semplice, veloce sistema d'identificazione.

Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

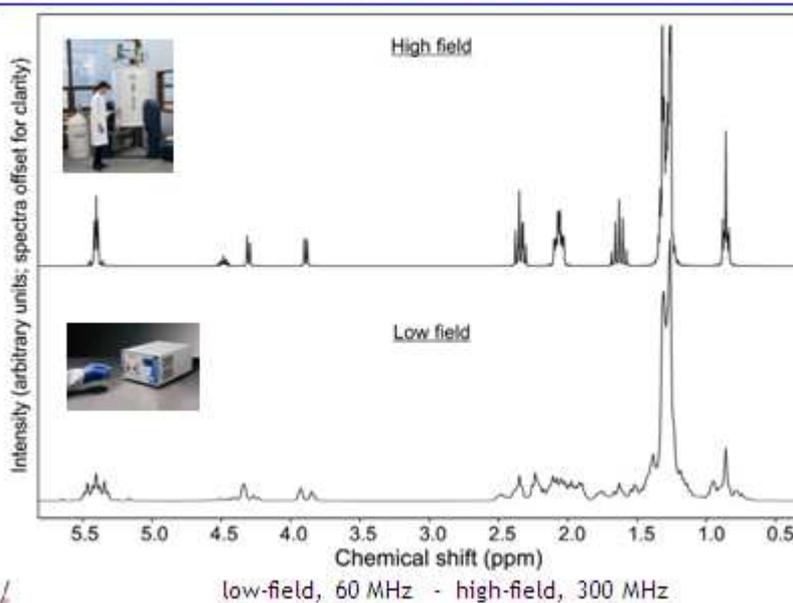
- Powerful spectroscopic technique used for:
 - quality control
 - Research
 - to determine molecular structure of organic compounds
- Wine's adulteration - Official method
- Recently were developed many application for:
 1. Fruit juices
 2. Olive oil
 3. Honey



Anche l'NMR ha avuto storicamente un grande sviluppo come tecnica di fingerprinting, l'NMR non è lo strumento più semplice da utilizzare

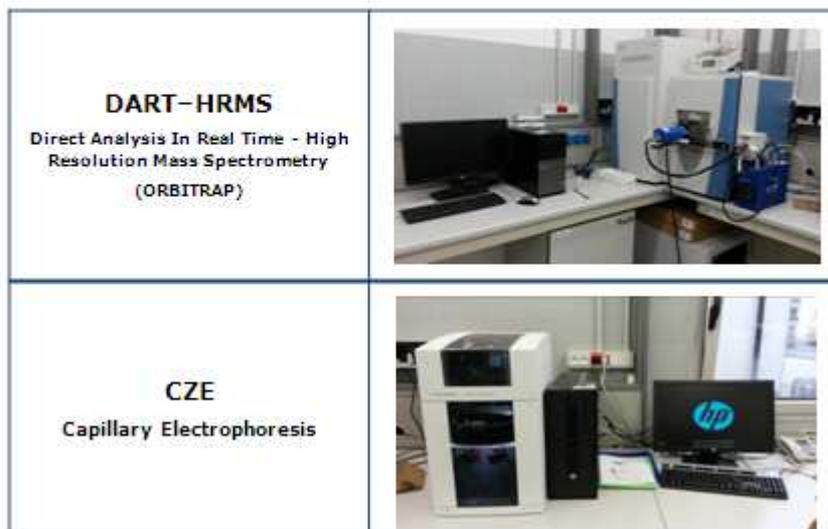
È una delle tecniche di riferimento ufficiale per la verifica dell'adulterazione del vino
Recentemente ha avuto nuovi sviluppi, e ci sono nuove applicazioni che riguardano i succhi di frutta, l'olio d'oliva e il miele.

Bench-top instrumentation (low-field)

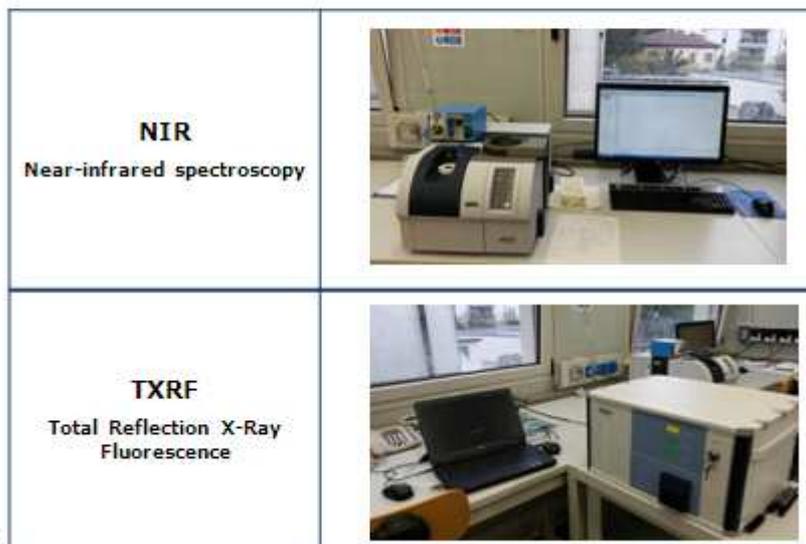


Riporto alcuni esempi che mi sono stati gentilmente forniti dalla prof.ssa E. Schievano dell'Università di Padova, in cui si vede molto chiaramente come ci sono dei segnali unici e identificativi riferiti a molecole tipiche di alcune tipologie di mieli.

Anche se questa è generalmente un'analisi complessa, ultimamente sono disponibili strumenti da banco a bassa risoluzione che non richiedono le attenzioni e gli impianti di quelli convenzionali, producono spettri meno dettagliati (come visibile nella figura) ma molto probabilmente i loro dati associati alla chemiometria in futuro saranno in grado di dare informazioni molto utili.



In queste fotografie sono visibili gli strumenti del laboratorio di Vicenza dove abbiamo cominciato a usare il DART associato alla Spettrometria di Massa ad Alta Risoluzione, l'Elettroforesi Capillare.



Qui sono visibili gli strumenti NIR e TXRF

Voglio far notare come si tratti di strumenti di piccole dimensioni che impegnano spazi limitati e possono stare comodamente sopra i banconi da laboratorio

Conclusions



Fantasy



Historical



Fake



Alternative



Actual



Future



In conclusione se da una parte la fantasia ha sempre ipotizzato l'uso di strumenti incredibili ma impossibili, e i furbetti provano a ingannare con promesse irrealizzabili, dall'altra parte sopravvivono ancora molti metodi ufficiali che sono troppo datati rispetto alle esigenze di oggi, in attesa del futuro già oggi è possibile utilizzare sistemi alternativi ma concreti e possibili con grandi potenzialità di sviluppo



Roberto PIRO rpiro@izsvenezie.it
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie