

G. GIUBILEO, A. PUIU

Dipartimento Fusione e Tecnologie per la Sicurezza Nucleare
Unità Sviluppo di Applicazioni delle Radiazioni
Centro Ricerche Frascati, Roma

S. NUNZIANTE CESARO

Dipartimento di Chimica
Università di Roma "Sapienza"
Piazzale Aldo Moro 5, Roma

SPETTROSCOPIA DELLA MELAMMINA CON LASER A CO₂

RT/2016/23/ENEA

ENEA

AGENZIA NAZIONALE PER LE NUOVE TECNOLOGIE,
L'ENERGIA E LO SVILUPPO ECONOMICO SOSTENIBILE

G. GIUBILEO, A. PUIU

Dipartimento Fusione e Tecnologie per la Sicurezza Nucleare
Unità Sviluppo di Applicazioni delle Radiazioni
Centro Ricerche Frascati, Roma

S. NUNZIANTE CESARO

Dipartimento di Chimica
Università di Roma "Sapienza"
Piazzale Aldo Moro 5, Roma

SPETTROSCOPIA DELLA MELAMMINA CON LASER A CO₂

RT/2016/23/ENEA



AGENZIA NAZIONALE PER LE NUOVE TECNOLOGIE,
L'ENERGIA E LO SVILUPPO ECONOMICO SOSTENIBILE

I rapporti tecnici sono scaricabili in formato pdf dal sito web ENEA alla pagina <http://www.enea.it/it/produzione-scientifica/rapporti-tecnici>

I contenuti tecnico-scientifici dei rapporti tecnici dell'ENEA rispecchiano l'opinione degli autori e non necessariamente quella dell'Agenzia

The technical and scientific contents of these reports express the opinion of the authors but not necessarily the opinion of ENEA.

SPETTROSCOPIA DELLA MELAMMINA CON LASER A CO₂

G. Giubileo, A. Puiu, S. Nunziante Cesaro

Riassunto

Negli ultimi anni una adulterazione con melammina è stata segnalata in prodotti lattiero-caseari e alimenti per animali domestici. Questa pratica fraudolenta ha determinato lo sviluppo di patologie renali gravi in bambini e animali domestici, e anche la morte di alcuni di essi. Melammina e proteine del latte hanno un contenuto di azoto simile, per cui l'adulterazione del latte con melammina è difficile da rivelare, perché i test chimici standard misurano il contenuto totale di azoto come indicazione della quantità di proteine.

Anche da un punto di vista spettroscopico, melammina e latte sono molto simili. Tuttavia, un contributo innovativo per un rilevamento rapido qualitativo della presenza di melammina nel latte può essere fornito dalla spettroscopia laser ad alta risoluzione. A tal fine, uno studio di fattibilità è stato realizzato da noi con tecnica laser fotoacustica (LPAS). I dati sperimentali sono stati analizzati mediante trattamento statistico PCA. I risultati ottenuti sono riportati nel presente documento.

Parole chiave: IR, LPAS, melammina, latte

Abstract

In recent years melamine contamination has been reported in milk products and pet food. This fraudulent practice determined illness and death in children and pets. Melamine and milk proteins has a similar nitrogen content, then the melamine adulteration of milk is difficult to reveal, because standard chemical test measure the total nitrogen content as an indication of protein level.

From a spectroscopy point of view, melamine and milk are very similar. Nevertheless, an innovative contribution to a fast detection of melamine contaminated milk may be provided by high resolution laser spectroscopy. A feasibility study with this purpose was made using the Laser Photoacoustic Spectroscopy (LPAS) technique. Experimental data were analyzed by PCA statistical treatment. The obtained results are reported in the present paper.

Keywords: IR, LPAS, melamine, milk

INDICE

1. Introduzione	7
2. Materiali e metodi	16
3. Risultati	21
4. Discussione	24
Conclusioni	27
Ringraziamenti	28
Bibliografia	29

1. Introduzione

La melammina (2,4,6-triamino-1,3,5-triazine) è un composto fortemente azotato, comunemente usato come fertilizzante, come materia prima per la realizzazione di polimeri, nella produzione di laminati, plastiche e colle. Fisicamente la melammina pura si presenta come una polvere bianca (Fig.1). Scoperta nel 1834 da Liebig, la melammina, quando miscelata con formaldeide, produce una resina che è un ottimo materiale plastico, materia prima ampiamente utilizzata in prodotti commerciali per la produzione di stoviglie, contenitori da cucina, ripiani e mobili a costi molto minori del legno (Fig.2). E' stata inoltre utilizzata come fertilizzante in agricoltura, anche se non conviene perché più costosa di altri fertilizzanti.

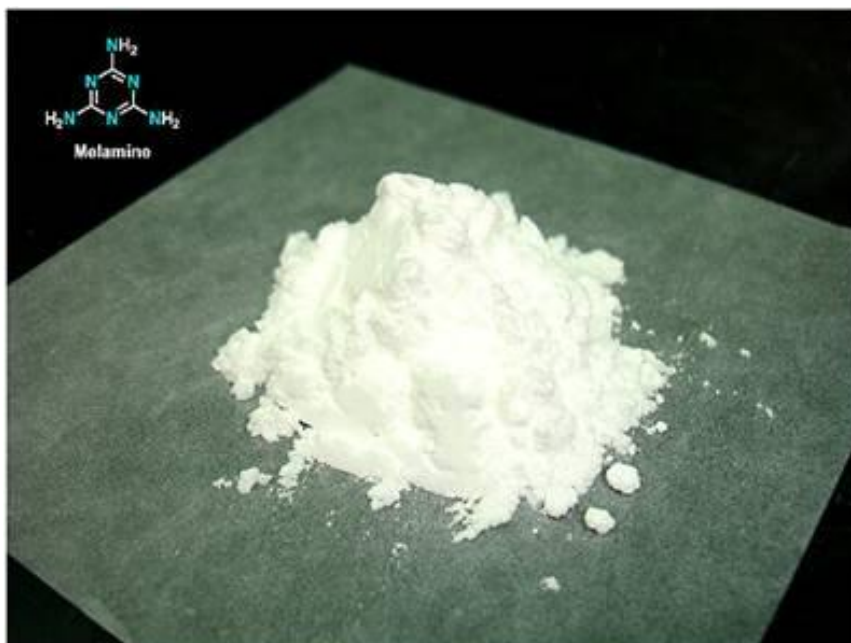


Fig. 1 – Melammina pura.



Fig. 2: Esempi di materiali prodotti con resine melaminiche.

In anni recenti la melammina è stata utilizzata a scopo fraudolento come adulterante alimentare. In molti paesi poco soggetti a controlli, la sofisticazione avviene generalmente per aggiunta del composto ai mangimi animali, per simulare in modo criminale una maggiore presenza proteica. La contaminazione, oltre che causare danni diretti all'animale stesso, si può estendere a ogni derivato della filiera di produzione: carne, latte, uova, e prodotti industriali da essi derivati come proteine del latte, mangimi di origine animale, integratori alimentari, eccetera, e provocare danni anche alle persone che consumano tali prodotti contaminati. Gli effetti possono essere più gravi nel caso di adulterazione diretta di prodotti destinati alla alimentazione umana, come il latte in polvere per alimentazione infantile. La melammina causa problemi renali e delle vie urinarie nell'uomo e negli animali quando reagisce con l'acido cianurico all'interno del corpo, per cui il suo uso nella produzione alimentare è universalmente vietato. Ciononostante, in Italia sono stati rivelati dai NAS alcuni casi, accertati con analisi chimiche, di contaminazione di latte e yogurt con concentrazioni dai 3 ai 22 mg/kg di melammina (contro un limite legale pari a **2,5**), non letali ma comunque tossiche. Nel 2008, migliaia di casi di complicanze renali nei bambini, e la morte di almeno 6 bambini, direttamente dovuti alla contaminazione del latte con la melammina, sono stati accertati in Cina. Successivamente in USA nello stesso anno i prodotti alimentari riportati nella Tabella in Fig.3 sono stati ritirati dal mercato perché trovati contaminati [1].

Products Withdrawn from the U.S. Market because of Melamine Contamination.				
Product	Brand	Distribution	Distributor and Location	Reason for Withdrawal
Candy	White Rabbit	CA, GA, HI, IL, MN, NY, OR, TX, WA	QFCO, Burlingame, CA	According to distributor, melamine contamination found
Biscuits	Fresh and Crispy Jacobina Biscuits	Nationwide	Everlasting Distributors, Bayonne, NJ	Melamine found on FDA testing
Cookies	Koala March	Nationwide	Lotte USA, Battle Creek, MI	Melamine contamination possible because cookie is produced in China
Milk	Yili Pure Milk and Yili Sour Milk	Nationwide	HUA XIA Food Trade USA, Flushing, NY	Melamine found on FDA testing
Drink	Blue Cat Flavor Drink (Lanmao)	Nationwide	Tristar Food, Jersey City, NJ	Melamine found on FDA testing
Coffee	Mr. Brown	Wholesale distributors and retail stores in CA, FL, GA, IA, IN, KS, KY, MA, MI, MN, NC, NM, NV, OH, PA, RI, TN, TX, VA, WA, and WI	Sunny Maid, Monterey Park, CA	Manufacturer says may contain melamine
Chocolate	Sweet Time Christmas Dressy Bear with Chocolate Bar	Not specified	Wal-mart, Bentonville, AR	Possible melamine contamination
Candy	Topaz Hazelnut Wafer Rolls with Hazelnut Chocolate Flavored Creme Filling	Not specified	Topaz	FDA says may contain melamine

Fig. 3: Prodotti alimentari ritirati dal mercato in USA nel 2008 [1].

Ma perché qualcuno dovrebbe intenzionalmente aggiungere al cibo una sostanza non nutriente e dannosa come la melamina? Premesso che la melamina contiene un sostanziale quantità di azoto, il 66% in massa, un motivo per l'adulterazione di un prodotto alimentare con melamina è che il suo alto contenuto di azoto aumenta il contenuto proteico "apparente" misurato dai test di analisi standard. Nel caso del latte, esso contiene lattosio e varie proteine; il lattosio non contiene azoto, ma le proteine sì, per cui l'aggiunta di melamina al latte inganna i clienti inducendoli a credere che il prodotto è ricco di proteine. Il fatto che la melamina aumenta il contenuto proteico apparente, e inoltre conferisce al prodotto un aspetto lattiginoso, può essere irresistibile per coloro alla ricerca di sistemi per adulterare. La motivazione di questa pratica è ottenere profitti facili, senza alcun riguardo per la morale del commercio o la sicurezza del consumatore. Questa adulterazione è anche difficile da rivelare, perché i test chimici standard misurano il contenuto "totale" di azoto per

avere una un'indicazione dei livelli di proteine: analisi del livello proteico = misura del contenuto totale di azoto. La struttura chimica della melammina (prodotto a basso costo) e di una catena proteica (prodotto a costo elevato) sono mostrati rispettivamente nella Fig.4 e nella Fig.5.

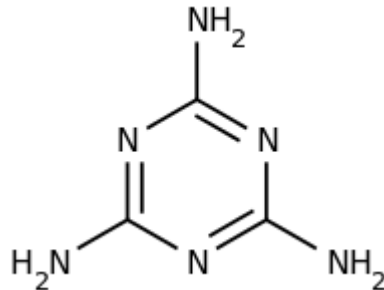


Fig. 4: *Struttura chimica della melammina (prodotto economico).*

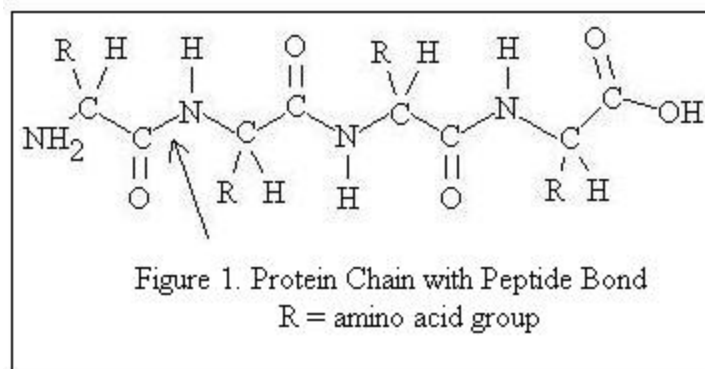


Fig. 5: *Struttura chimica di una catena proteica (prodotto costoso).*

Lo scandalo della sofisticazione del latte in Cina. Nel 2008, elevati livelli di melammina sono stati rilevati nel latte in polvere e altri prodotti lattiero-caseari provenienti dalla Cina. Questi alti livelli di melammina nel latte per lattanti e di altri prodotti derivati dal latte hanno portato a gravi effetti sulla salute e malattie in neonati e bambini cinesi, in particolare danni ai reni. Nel corso dell'epidemia di nefrotossicità dovuta alla ingestione di melammina del 2008 in Cina, i bambini sono stati esposti, tramite i latticini contaminati con melammina, a concentrazioni variabili da 0,1 ppm fino a un massimo di 2563 ppm; è stata stimata una esposizione alimentare variabile tra 8,6 e 23,4 mg/kg di

peso corporeo/giorno. Degli oltre 294.000 bambini esposti all'agente tossico in Cina, oltre 50.000 sono stati ricoverati per nefrolitiasi e insufficienza renale, con almeno 6 decessi documentati [2]. L'incidenza specifica per età è stata di 85% per bambini inferiori a 2 anni di età, 17% per 2-3 anni di età, e 0,8% per bambini con età maggiore di 3 anni. Dopo il rapporto iniziale sul ritrovamento di melammina nel latte artificiale in Cina, le autorità di regolamentazione alimentare internazionali hanno confermato che altri alimenti derivati dal latte (latte intero in polvere, latte scremato in polvere, siero di latte in polvere, lattosio in polvere e caseina), originari dalla Cina e altri paesi, potrebbero essere contaminati con melammina [3]. A parte l'adulterazione intenzionale di prodotti alimentari in Asia, la melammina potrebbe potenzialmente migrare dalla plastica al cibo. Questo si traduce nella stima di una esposizione di base da 0.0019 a 13 mg/kg di peso corporeo/giorno. La melammina continuerà ad essere un problema per la salute pubblica a causa dei suoi numerosi usi nel settore manifatturiero e nel settore agrochimico.

Tossicità della melammina. La dose di melammina che causa la morte nel 50% dei soggetti (LD50) è di 3000 mg/kg nel topo, il che indica la sua estrema bassa tossicità; in altre parole, chimicamente la melammina è una sostanza quasi non tossica [2]. Pertanto, ci si può chiedere come fa una sostanza non tossica a causare la morte in esseri umani e animali. È da notare che la DL50 è un concetto applicabile solo alla tossicità acuta. La tossicità della Melammina non è di tipo acuto, piuttosto è una tossicità cronica a corto raggio. La melammina è metabolizzata ad acido cianurico, nel corpo dopo l'ingestione. Due dei gruppi chetonici dell'acido cianurico formano legami idrogeno con i due gruppi amminici della melammina, producendo una sostanza altamente insolubile (cianurato di melammina) che precipita nei microtubuli renali formando dei calcoli. Conseguentemente i cristalli di melammina occludono il lume dei tubuli renali, provocando una insufficienza renale acuta, e determinano la necrosi delle cellule epiteliali tubulari. La Fig.6 riporta l'immagine al microscopio ottico di una sezione di tessuto renale nella quale è possibile osservare cristalli di melammina che occludono il lume di un tubulo renale e la necrosi di cellule epiteliali tubulari [2]. La formazione del complesso acido cianurico - melammina può essere confrontabile con quella di un calcolo renale; tuttavia, la composizione è differente da quella di un calcolo renale naturale. I calcoli renali naturali possono essere di vario tipo, tra cui fosfato di calcio, acido urico, cisteina, e tipi di acido ossalico. Esistono prove sufficienti per affermare che il meccanismo di tossicità renale in cani e gatti è associato alla cristallizzazione di triazine nel rene, dando luogo a insufficienza renale. L'immagine riportata nella Fig.7 mostra la presenza di calcoli nei calici renali e nell'uretere.

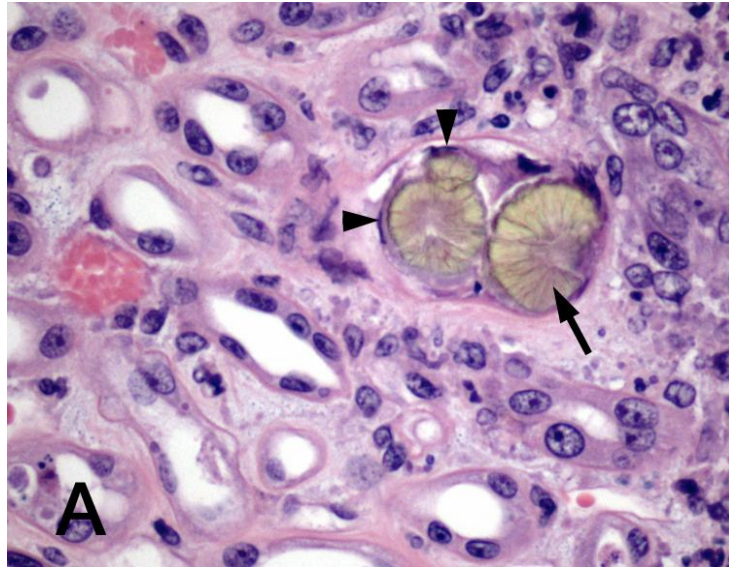


Fig. 6: *Cristalli di melamina (freccia) che occludono il lume di un tubulo renale, con necrosi di cellule epiteliali tubulari (triangoli).[2]*

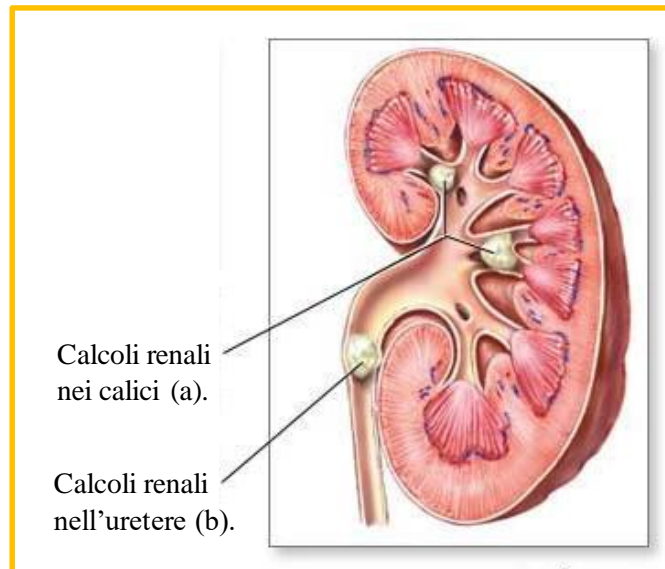


Fig. 7: *Calcoli renali nei calici (a) e nell'uretere (b).*

Valutazione del rischio. Le valutazioni del rischio per la salute umana si avvalgono attualmente di uno studio sui ratti. Diversi biomarcatori di tossicità renale (azotemia, creatininemia, clearance della creatinina) sono sensibili all'esposizione a miscele ME-CA (melamina–a.cianurico). Sono stati osservati cambiamenti significativi in azotemia, creatinina sierica e clearance della creatinina

quando i ratti sono esposti a miscele monodose. L'analisi dei biomarcatori di patologia renale precoce suggerisce che la formazione di calcoli melammina-correlati sembra essere associata più con disfunzione glomerulare piuttosto che disfunzione tubulare. Lo studio della formazione di calcoli nei ratti ha consentito di stimare per la melammina un livello massimo privo di effetti avversi (NOAEL) pari a 63 mg/kg di peso corporeo/giorno. In base a questo dato, e introducendo un fattore di incertezza di 100, utilizzato nelle estrapolazioni inter-specie e intra-specie, e un fattore di sicurezza supplementare di 10, per tenere conto di esposizioni combinate a melammina e acido cianurico, è stata calcolata una dose giornaliera totale (TDI) priva di effetti pari a 0.063 mg/kg di peso corporeo/giorno nell'uomo. Da qui, è stato determinato un livello di sicurezza, o meglio livello di tolleranza, della melammina nei prodotti alimentari pari a **2,5 ppm**, considerando un tasso di consumo di cibo pari a 1,5 kg/giorno. Questo calcolo è stato modificato per i neonati; assumendo un peso di 3 kg e un consumo di 0,15 kg di cibo, il livello di sicurezza per la melammina scende a 1.26 ppm, arrotondato a **1,00 ppm**, per fornire un ulteriore margine di sicurezza [2].

Rivelazione della melammina. La presenza della melammina non è facilmente rivelabile, in quanto il composto, in virtù della presenza del gruppo NH_2 nella molecola e del suo elevato tenore d'azoto, può falsare alcuni metodi di determinazione analitica della concentrazione di proteine negli alimenti, anch'esse dotate del gruppo funzionale NH_2 , essendo le proteine formate da polimeri di aminoacidi. La letteratura descrive numerose tecniche basate su ELISA, LC, GC che sono state usate con successo per analizzare le triazine in mangimi, sangue, urina, e tessuti. Nella Tabella in Fig.8 sono riassunti i metodi di rivelazione della melammina riportati dalla letteratura [4]. La diffrazione dei raggi X e la spettroscopia FTIR (Fourier Transform Infrared), insieme con la spettrometria di massa MS, sono stati utilizzati per l'identificazione di cristalli formati in queste matrici. Inoltre l'identificazione di biomarcatori affidabili di esposizione e tossicità potrebbe fornire un migliore strumento diagnostico durante le prime fasi di una epidemia; a oggi, molti dei parametri a disposizione della patologia clinica sembrano essere di limitato valore diagnostico nello screening di pazienti per la urolitiasi melammino-indotta. Questi sono metodi laboriosi che richiedono tempo, laboratori attrezzati e personale qualificato, oltre alla necessità di un pre-trattamento del campione da analizzare, mentre la gestione di eventuali future epidemie legate alla contaminazione da melammina in mangimi e alimenti per l'uomo richiederanno l'accesso a tecniche rapide di screening e metodi analitici di conferma per identificare e quantificare la presenza di melammina e le sue triazine correlate, sia in prodotti alimentari che in matrici biologiche. Esistono test semplici per rivelare la presenza di molte sostanze come urea o formalina o acido benzoico [5]. Ma al momento non esiste un test semplice per rivelare la presenza di melammina negli alimenti, in particolare nel

latte.

Table 1. Summary of Published Methods for Detecting Melamine in Food Products^a

method of melamine detection	food product	assay time	total time to detection	detection limit
UPLC-ESI-MS/MS	animal feeds		3+ h ^b	10 ppb
HPLC-DAD	plant origin protein powders		3+ h ^b	10 ppm
HPLC-MS/MS	plant origin protein powders		3+ h ^b	500 ppb
HPLC	rice, wheat, corn flours		3+ h ^b	5 ppm
ELISA	solution/buffer		1.5 h ^b	9 ppb
	dog food		1.5 h ^b	1 ppm
SERS	aqueous solutions ^c		0.5–1 h	33 ppb
ZIC-HILIC	animal feed		2+ h ^b	500 ppb
LTP-MS/MS	milk powder	25 s		6 ppb
EIA	pet food		1.5 h ^b	20 ppb
HPLC-DAD	pet food	15 min	3+ h ^b	100 ppb
SERS	wheat gluten		0.5–1 h	1000 ppm
	chicken feed		0.5–1 h	500 ppm
	cake		0.5–1 h	500 ppm
	noodles		0.5–1 h	700 ppm
HPLC	animal feed powdered rice protein	8 min	3+ h ^b	75 ppm
LC-MS/MS	dry infant formula	14 min	3+ h ^b	250 ppb
MS-DART	pet food	1–1.5 min	10 min	1 ppm
LC-MS	catfish, pork, chicken, pet food		30 min ^b	10 ppb

Fig. 8: Metodi per la rivelazione di melamina in alimenti [4].

La spettroscopia ottica. In linea di principio, la presenza di melamina nel latte in polvere può essere rilevata facilmente con metodi ottici senza distruggere il campione, limitandosi a esporlo a radiazione infrarossa e analizzando la dispersione o i dati di assorbimento nell'infrarosso. Poiché i metodi ottici non richiedono di estrarre la melamina dal campione di latte, questo riduce gli errori che possono verificarsi con l'uso di metodi chimici durante l'estrazione o l'interazione con reagenti chimici. Nella Fig.9 seguente riportiamo dati sulla spettroscopia IR della melamina tratti dalla letteratura.

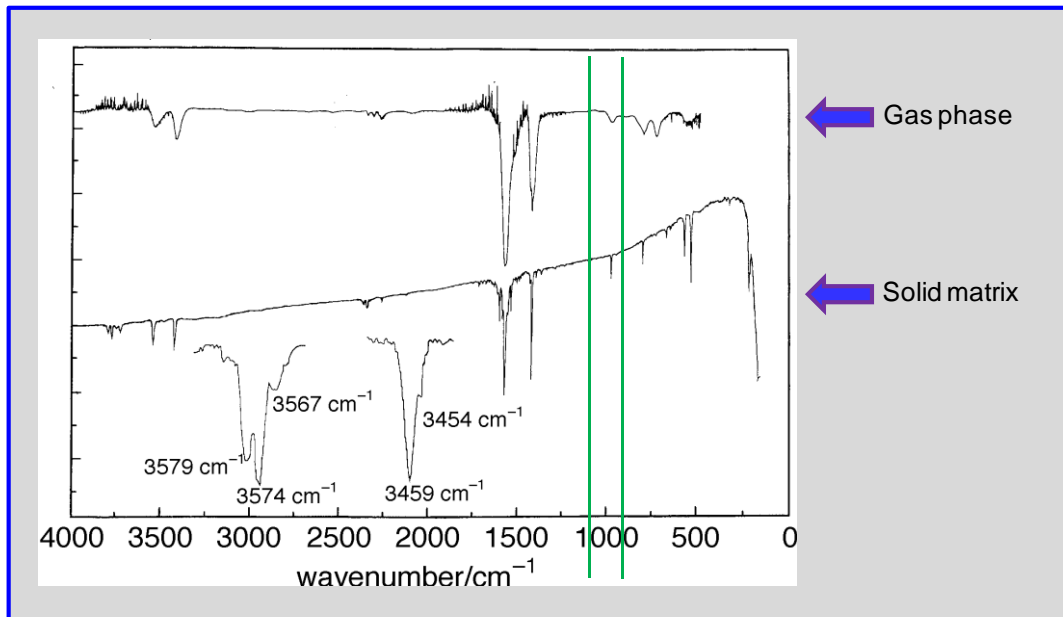


Fig. 9: Spettro MIR della melamina pura tra 2.5 e 25 μm . [6].

Un contributo innovativo per un rilevamento rapido qualitativo della presenza di melamina nel latte può essere fornito dalla spettroscopia laser ad alta risoluzione. A tal fine, abbiamo dato corso ad uno studio di fattibilità della rivelazione della melamina tramite spettroscopia ad alta risoluzione con uso della tecnica laser fotoacustica (LPAS). Nelle pagine che seguono riportiamo i dettagli del primo approccio sperimentale con i relativi risultati conseguiti.

2. Materiali e metodi

Spettroscopia LPAS. Per registrare gli spettri di assorbimento ad alta risoluzione dei campioni di melammina e di latte in polvere con tecnica LPAS abbiamo adottato un apparato ottico realizzato nel Laboratorio SPEMOL di FSN-TECFIS-DIM, Centro Ricerche ENEA di Frascati. Una foto dell'apparato LPAS è riportata nella Fig.10. L'apparato ottico LPAS è dotato di una sorgente laser a CO₂ (ACCESS LASER) con potenza di emissione massima pari a 2 Watt sintonizzabile su 60 righe di emissione nel range spettrale compreso tra 9,2 e 10,8 μm , un misuratore di potenza a due canali (Rk-5720 Laser Probe), ed un amplificatore lock-in (SR 830 Stanford Research Systems). Nella linea ottica è inoltre inserita una cella fotoacustica (Fig.11) con un volume interno circa 3 cc, progettata da noi per l'analisi di campioni allo stato condensato.

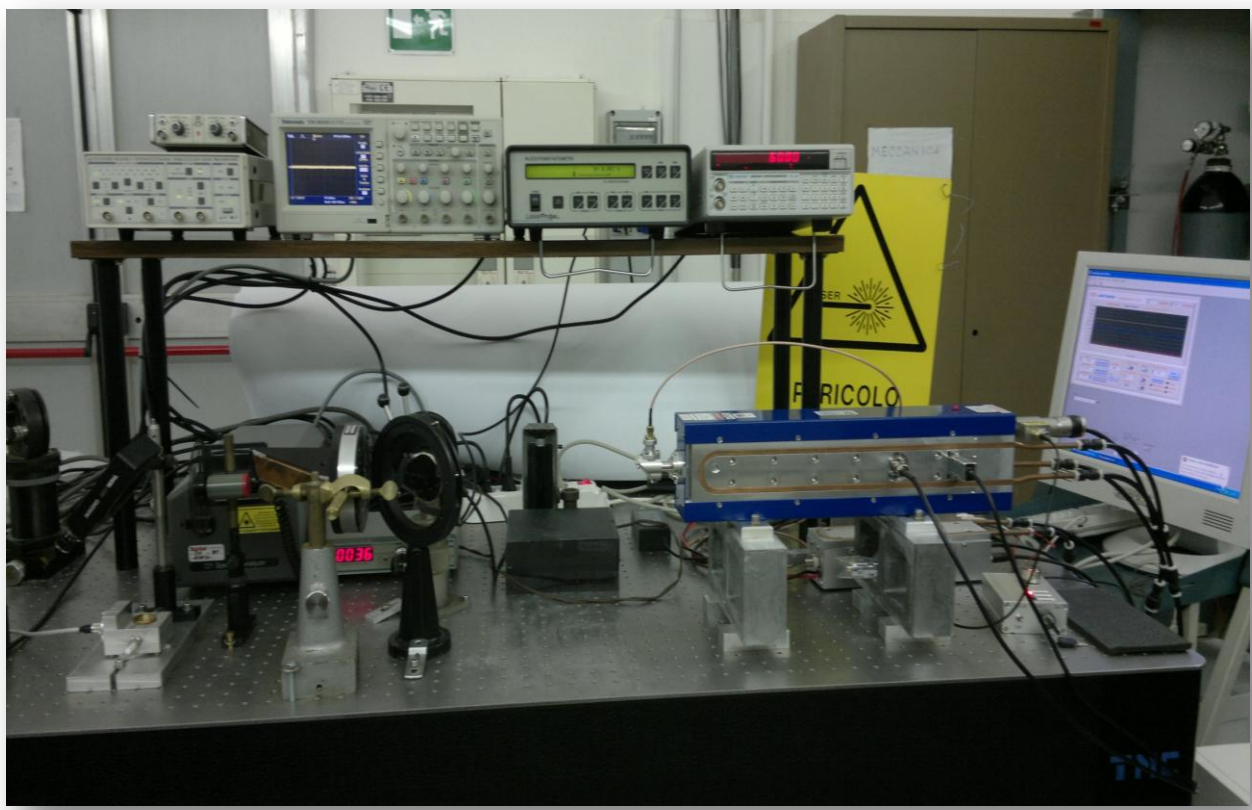


Fig. 10: Set-up sperimentale del sistema LPAS.

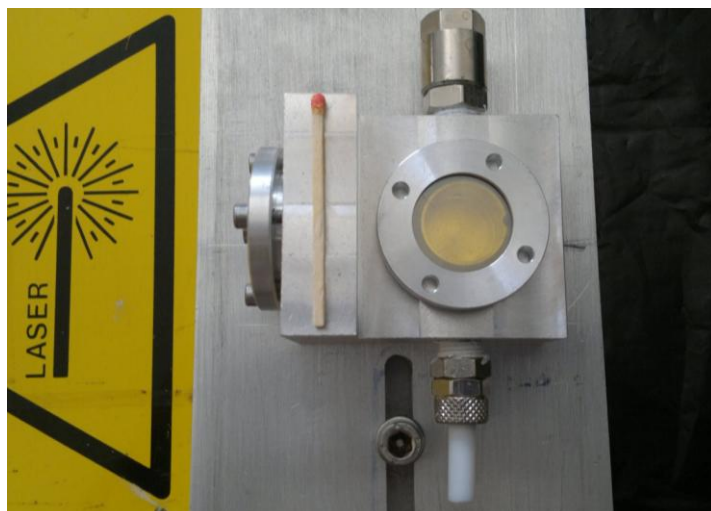


Fig. 11: Cella PA per l'analisi di materia allo stato condensato.

L'emissione dal laser CO₂ viene modulata alla frequenza di risonanza della cella fotoacustica (40 Hz) tramite un segnale esterno prodotto da un generatore di segnali digitale (SFG 830 INSTEK). Il segnale PA generato all'interno della cella PA viene rivelato da un microfono sensibile miniaturizzato (dimensioni 5,6 x 4,1 x 2,2 mm) e inviato all'amplificatore lock-in, che comunica con il PC tramite interfaccia GPIB. I dati sono acquisiti tramite un software specifico di controllo e acquisizione sviluppato in ambiente Labview. Una immagine della schermata del programma di controllo è mostrata nella Fig.12. Altre informazioni sul sistema LPAS sono state riportate in precedenti pubblicazioni [7-8].



Fig. 12: Programma di controllo durante l'analisi di un campione.

Spettroscopia FTIR. Lo spettro completo di assorbimento IR è stato acquisito tramite uno spettrometro commerciale (Alpha FT-IR della Bruker Optics, Ettingen, Germany). Una immagine dello spettrometro FTIR è riportata nella Fig.13. Gli spettri sono stati acquisiti con una risoluzione di 4 cm^{-1} in singolo scan nel range spettrale 2-18 μm . Prima dell'analisi di ogni campione è stato acquisito il segnale di fondo a cella vuota.



Fig. 13: Lo spettrometro FTIR.

Materiali analizzati. La melamina pura al 99% utilizzata nell'esperimento è prodotta dalla Aldrich Chemistry. Una immagine della confezione è mostrata nella Fig.14. La miscela alimentare per l'infanzia (latte in polvere) commerciale NEOLATTE2 prodotta dalla Unifarm è stata acquistata in una parafarmacia. Una immagine della confezione è riportata nella Fig.15.



Fig. 14: Melamina Aldrich.



Fig. 15: Latte in polvere commerciale.

3. Risultati

Gli spettri di assorbimento relativi alla Melamina e al Neolatte sono mostrati nella Fig.16. Entrambi i grafici rappresentano spettri continui registrati nel MIR con lo spettrometro FTIR nell'intervallo di lunghezze d'onda IR compreso tra 2 e 18 μm . Sulla figura è stata evidenziata la zona intorno a 10 μm all'interno della quale si verifica l'emissione della sorgente laser utilizzata nelle misure LPAS riportate. Come è chiaramente visibile, all'interno della zona evidenziata i due grafici mostrano differenze apprezzabili. In particolare, a circa 9.7 μm si osserva un marcato picco di assorbimento della melamina non riscontrabile nel Neolatte.

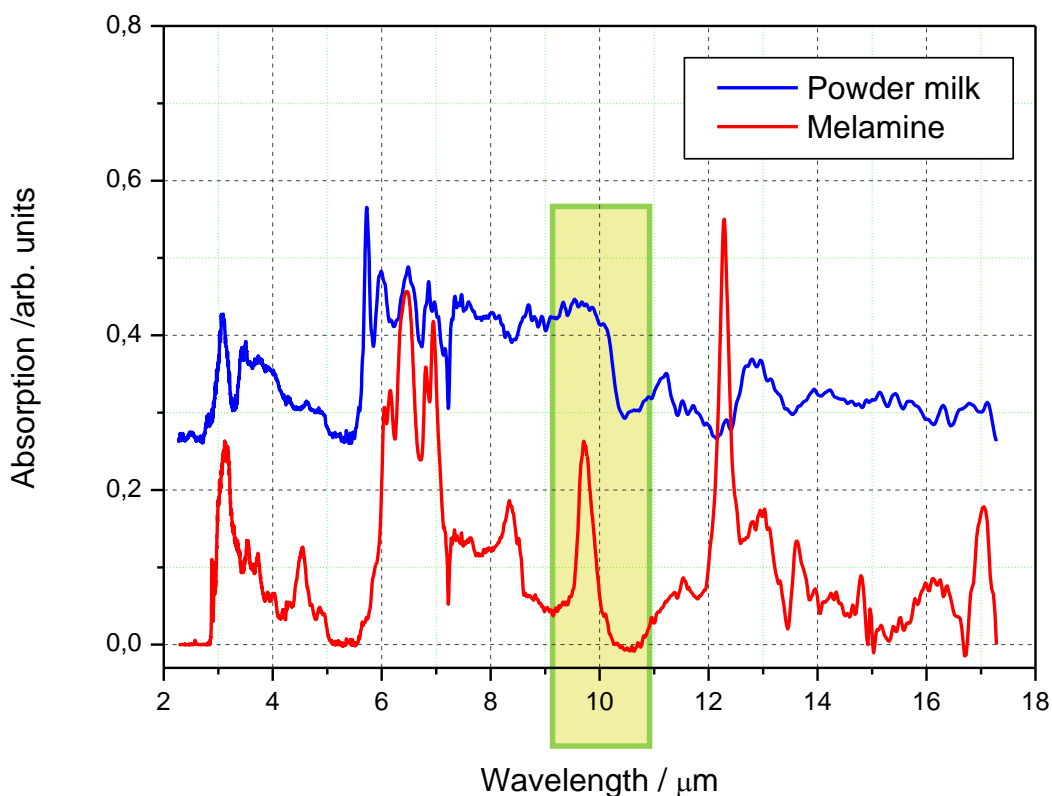


Fig. 16: Spettri IR di melamina e latte in polvere realizzati con spettrometria FTIR tra 2 e 18 μm .

Gli stessi campioni di Melammina e Neolatte sono stati analizzati ad alta risoluzione utilizzando il set-up ottico per spettroscopia fotoacustica con laser CO_2 . Segnali fotoacustici misurabili sono stati ottenuti da tutti i campioni analizzati nell'intero intervallo spettrale accessibile 9,2-10,8 μm . Gli spettri di assorbimento di Melammina pura in polvere e Neolatte puro in polvere ottenuti con LPAS nella zona di emissione della sorgente laser sono mostrati rispettivamente in Fig.17 e Fig.18. Ciascuno spettro riportato nelle due figure citate rappresenta la media di quattro spettri differenti dello stesso tipo di sostanza. L'errore di misura sperimentale è stato valutato come deviazione standard di 10 acquisizioni su ciascuna riga di emissione laser. La deviazione standard è risultata inferiore al 3% del valore misurato, il che significa una buona riproducibilità dei dati e una elevata stabilità del sistema di misura. I dati di assorbimento sono stati normalizzati rispetto alla potenza del fascio laser. Il segnale di background è risultato trascurabile rispetto al segnale del campione analizzato. Una registrazione indipendente dello spettro in potenza della radiazione emessa dalla sorgente laser è stata riportata nella Fig.19.

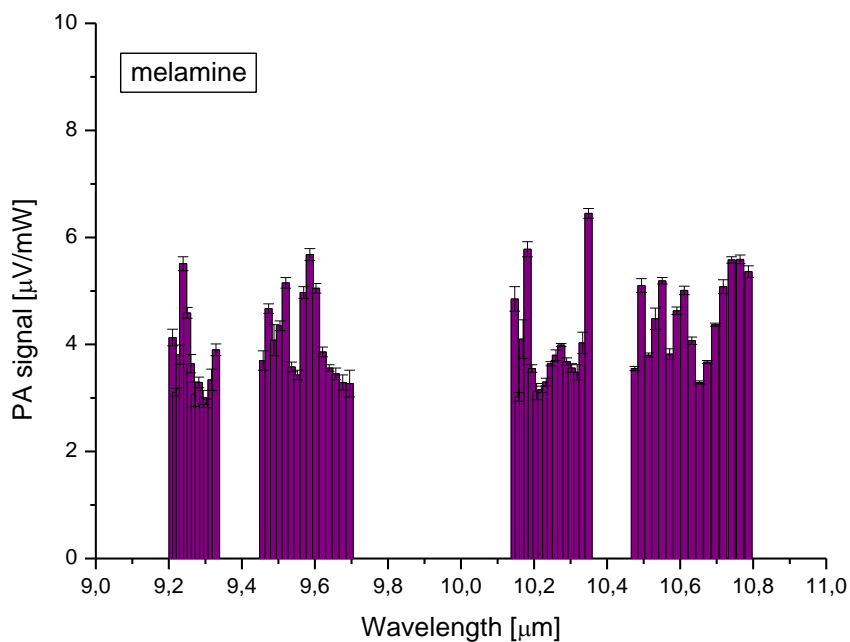


Fig. 17 – Spettro LPAS di melammina pura.

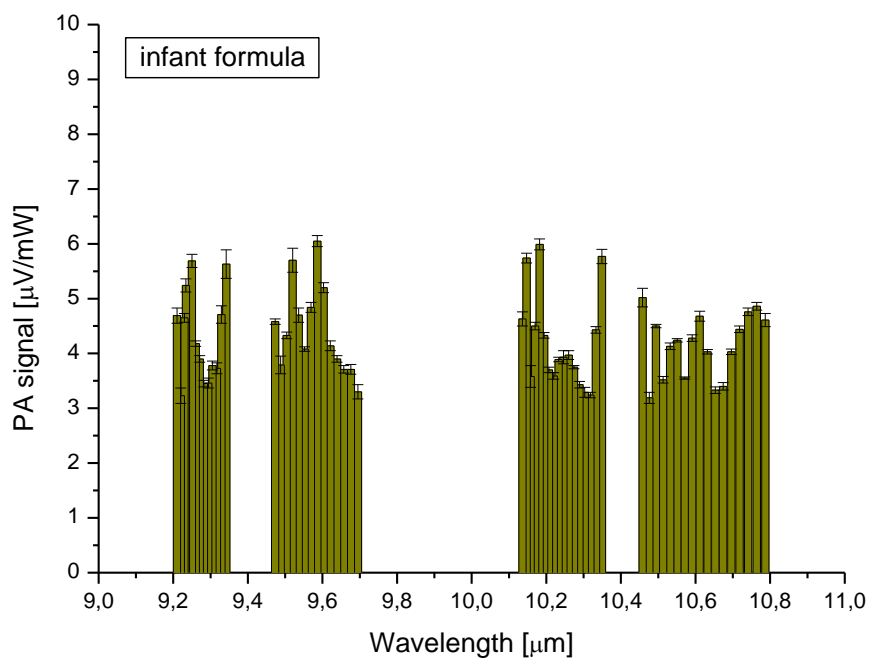


Fig. 18 – Spettro LPAS di Neolatte (Carrefour) puro.

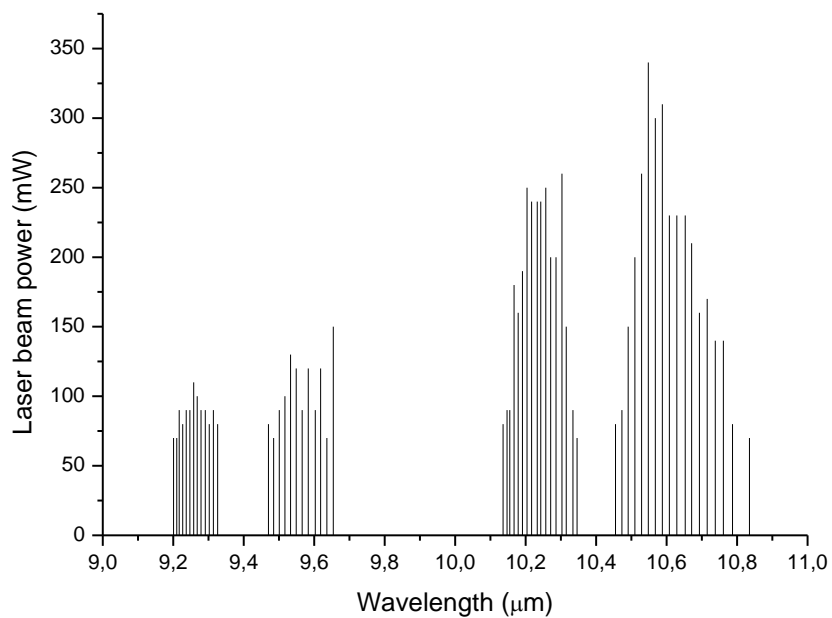


Fig. 19: Spettro della potenza di emissione del laser.

4. Discussione

Osservando gli spettri FTIR delle due sostanze (Fig.16), un evidente picco di assorbimento, verosimilmente discriminante nella banda di interesse LPAS, risulta presente a circa 9.7 μm nello spettro FTIR della melammina mentre risulta assente nel latte. Tale picco può essere assegnabile alla transizione NH_2 swing, come risulta dalla tabella riportata nella Fig.20 tratta da Wang 1997 [6]. L'assegnazione tiene conto di uno shift di frequenza dei picchi in fase solida (analizzata da noi) rispetto alla fase gassosa (riportata da Wang). In realtà molti picchi caratterizzanti la melammina rispetto al latte compaiono nello spettro FTIR completo, in particolare localizzati intorno alle lunghezze d'onda 3.1, 4.5, 8.35, 9.7, 12.27, 17.03 μm . Con eccezione del picco a 9.7, gli altri cadono fuori della banda CO_2 e pertanto non presentano interesse con l'attuale sorgente laser disponibile.

experimental frequency		matrix isolation		assignment	calculated frequency ^a		
gas phase melamine	melamine	[² H ₂]melamine			1 ^b	2	3
3571 m	3579 m		ν_{39}	asym. NH str.	a' 3588(2658)	e 3593	e' 3625
	3574 m	2685 m	ν_{38}		a" 3588(2657)		
	3567 w	2602 w	ν_{37}		a" 3585(2655)		
3453 m		2527 m	ν_{36}	sym. NH str.	a' 3469(2506)	a ₁ 3474	e' 3496
	3459 m		ν_{35}		a" 3468(2504)	e 3472	
	3454 m		ν_{34}		a' 3466(2503)		
1598 vs	1593 vs	1216 w	ν_{32}	NH ₂ scissor + ring str.	a' 1594(1206)	e 1593	e' 1587
1588 sh	1588 sh		ν_{31}		a" 1593(1205)		
1556 m	1561 s	1584 vs	ν_{30}	NCN bend + ring def.	a' 1565(1557)	e 1563	e' 1559
		1576 vs	ν_{29}		a' 1565(1557)		
		1485 m	ν_{27}		a' 1433(1455)	e 1432	e' 1433
1440 s	1438 vs	1470 vs	ν_{26}	ring and side-chain CN str.	a' 1433(1455)		
1000 m	992 m	819 m	ν_{21}		NH ₂ swing	a' 982(804)	e 978
		813 w	ν_{20}	a' 980(804)			
	925 w		ν_{19}	a' 955(956)		a ₁ 954	
824 m	820 m	823 m	ν_{18}	ring breathing ring def. (out of plane)	a' 798(796)	a ₁ 798	a ₂ 795
	752 m	696 vvw	ν_{17}		a' 715(713)	e 713	
		612 vw	ν_{16}		a" 713(711)		
581 w	691 w		ν_{15}	ring breath + NH ₂ bend	a' 657(614)	a ₁ 658	
	586 m	576 vvw	ν_{14}		a' 565(545)	e 563	e' 561
			ν_{13}		a" 564(545)		
337 vw	548 s	443 w	ν_{11}	NH ₂ swing	a" 512(378)	e 513	
		391 w	ν_{10}		a' 510(373)		
	394 vw		ν_8		a' 385(300)	a ₁ 358	
337 vw	385 vw		ν_6	NH ₂ tors.	a" 365(291)	e 325	
	356 vw	275 w	ν_5		a' 340(278)		
	337 vw	245 w	ν_4		a' 322(275)	e 315	e' 324
225 s			ν_3	side-chain out-of-plane bend	a' 322(262)		
					a' 200(181)	a ₁ 200	a ₂ 201

Fig. 20: Frequenze di vibrazione (sperimentali e calcolate) per la melammina [6].

Osserviamo inoltre che il picco in discussione a 9.7 μm non può comparire nello spettro ad alta risoluzione riportato nella Fig.18 perché localizzato in una zona dell'intervallo indagato non direttamente accessibile alla emissione del laser a CO_2 utilizzato nell'esperimento riportato nel presente manoscritto. Ciononostante la spettroscopia ad alta risoluzione ha ragione di essere indagata. Innanzitutto, uno dei picchi della melammina, incluso quello a 9.7 μm , può in linea di principio essere evidenziato utilizzando una diversa sorgente laser, come discusso nelle pagine seguenti. Inoltre, confrontando i grafici di Fig.17 e Fig.18, tra le due rappresentazioni spettrali si osservano piccole differenze in termini di intensità relative di assorbimento, sebbene non vadano a costituire andamenti specifici utili ai fini di una caratterizzazione spettrale delle sostanze analizzate. In aggiunta, tali differenze non sono agevolmente valutabili da una semplice osservazione diretta dei due spettri. Viceversa le stesse differenze possono essere quantificate applicando agli spettri LPAS ottenuti un algoritmo di calcolo basato sulla tecnica statistica nota come Principal Component Analysis (PCA). A tal fine, abbiamo acquisito gli spettri relativi a 10 campioni di melammina, altrettanti di latte, nonché altrettanti di una miscela di latte e melammina al 50% in peso. Sull'insieme dei dati acquisiti abbiamo applicato un algoritmo PCA. I risultati di tale analisi statistica sono riportati nella Fig.20, nella quale i tre gruppi di materiali analizzati sono identificati come segue:

La = latte in polvere Carrefour

Me = melammina pura

LM = miscela di latte e melammina

Nella citata figura appare evidente che le piccole differenze spettrali che rendono non sovrapponibili i vari spettri acquisiti assumono ora un valore quantitativo che, al di là della variabilità casuale, raggruppa in aree diverse non sovrapposte i 3 gruppi di campioni analizzati.

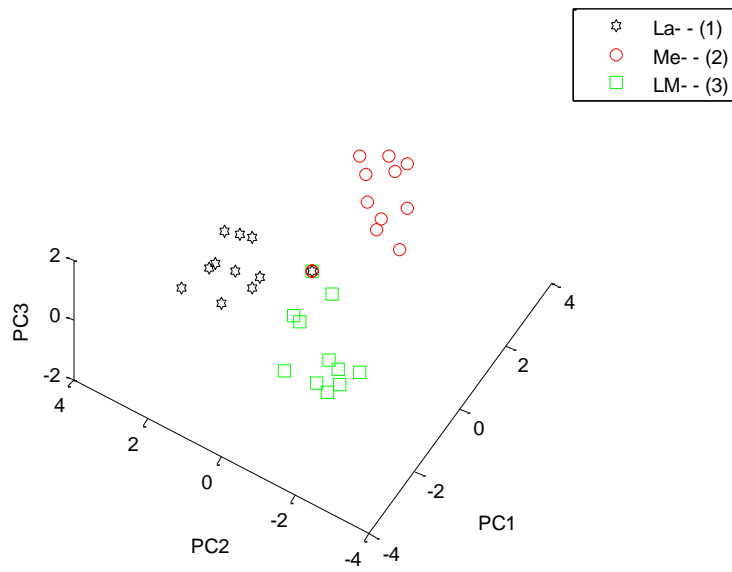


Fig. 20: *Rappresentazione 2D dei risultati della PCA.*

Conclusioni

Nel presente lavoro sono stati riportati i profili spettrali di assorbimento IR di latte in polvere e melammina, ottenuti tramite consueta spettroscopia FTIR convenzionale, nonché tramite spettroscopia ad alta risoluzione con tecnica LPAS nel range spettrale 9.2-10.8 μm in corrispondenza delle lunghezze d'onda accessibili con una sorgente laser a CO_2 . I profili FTIR (Fig.16) mostrano delle differenze spettrali molto evidenti tra le due sostanze, peraltro non evidenziabili chiaramente dalla tecnica LPAS nelle attuali condizioni di misura. Le differenze risultano specialmente marcate alle lunghezze d'onda 3.1, 4.5, 8.35, 9.7, 12.27, 17.03 μm , in corrispondenza di picchi di assorbimento della melammina ai quali non fanno riscontro analoghi incrementi di assorbimento nel latte. Non altrettanto discriminanti sotto il profilo diagnostico della presenza di melammina sono risultate le irregolari differenze negli spettri LPAS.

Analizzando i risultati ottenuti appare evidente che, per evidenziare e utilizzare tramite LPAS la segnatura spettrale che la melammina mostra nell'intervallo di lunghezze d'onda indagato, è necessario ripetere l'esperimento adottando una sorgente laser che emetta radiazione IR alla lunghezza d'onda specifica del picco della melammina localizzato da FTIR a circa 9.7 μm , laddove l'emissione del laser a CO_2 risulta assente. Oppure utilizzare una sorgente laser che emette in corrispondenza di un altro dei picchi che caratterizzano lo spettro della melammina. Allo scopo osserviamo che sono state recentemente realizzate sorgenti laser del tipo QCL che coprono con continuità la zona spettrale tra 9 e 11 μm . L'esperimento riportato nel presente rapporto potrà essere ripetuto utilizzando una tale sorgente, dopo aver verificato se la relativamente bassa potenza di emissione del QCL citato (ordine delle decine di mW) sia sufficiente a generare un segnale PA misurabile. L'interesse nella tecnica LPAS è motivato dalle potenzialità che essa offre nella realizzazione di apparati compatti e di facile uso per la rivelazione in tempo reale di una sostanza specifica senza pre-trattamento del campione analizzato.

Pur in assenza di risultati eclatanti, LPAS dimostra di avere la capacità di distinguere spettralmente tra le due sostanze (latte e melammina) e una miscela delle due. Tale capacità risulta amplificata dall'uso della PCA, tramite la quale tecnica di calcolo può essere reso quantitativo il confronto tra i vari spettri di assorbimento LPAS. La possibilità di operare, sulla base di una spettroscopia laser, una distinzione qualitativa tra melammina, latte in polvere e miscela delle due sostanze emersa dal presente lavoro costituirà il punto di partenza di un prossimo lavoro orientato a sperimentare la

tecnica con sorgenti laser differenti, a lunghezze d'onda differenti, ottenere valutazioni quantitative, nonché realizzare un sistema compatto per effettuare analisi *in situ*. L'obiettivo finale di questa ricerca rimane quello di realizzare un sistema di "alert" atto a rivelare in tempo reale una presenza anomala di melamina nel latte in polvere a una concentrazione superiore ai limiti di legge, rimandando il ricorso a laboratori di analisi specializzati solo a scopo di conferma.

Ringraziamenti

Si ringraziano il supporto del Progetto Nazionale MI01_00182-SAL@CQO, che ha consentito la realizzazione dell'apparato sperimentale, e il supporto del Progetto SAFE&SMART, che ha consentito la sperimentazione sui campioni di riferimento.

Bibliografia

- [1] – J.R. Ingelfinger, “*Melamine and the Global Implications of Food Contamination*”, N. Engl. J. Med. 359 (2008), 2745-2748.
- [2] – R. Baynes, J. Riviere, “*Risks Associated with Melamine and Related Triazine Contamination of Food*”, Emerging Health Threats Journal (2009); doi: 10.3134/ehjtj.10.005.
- [3] – Carla Hilts and Luc Pelletier, “*Background Paper on Occurrence of Melamine in Foods and Feed*”; World Health Organization, Geneva (2009).
- [4] – L.J. Mauer, A.A. Chernyshova, A. Hiatt, A. Deering, and R. Davis, “*Melamine detection in infant formula powders using near- and mid-infrared spectroscopy*”, J. Agric Food Chem. 57 (2009) 3974-3980.
- [5] – <http://www.dairyforall.com/milk-adulteration.php> .
- [6] – Yu-Lin Wang, A. M. Mebel, Chung-Jen Wu, Yit-Tsong Chen, Ching-Erh Lin, Jyh-Chiang Jiang, “*IR spectroscopy and theoretical vibrational calculation of the melamine molecule*”, J. Chem. Soc. Faraday Trans. 93 (1997) 3445-3451.
- [7] – G. Giubileo, F. Colao, A. Puiu, “*Identification of Standard Explosive Traces by Infrared Laser Spectroscopy: PCA on LPAS Data*”, Laser Physics 22 (2012) 1033-1037.
- [8] – A. Puiu, G. Giubileo, A. Lai, “*Investigation of Plant-Pathogen Interaction by Laser-Based Photoacoustic Spectroscopy*”, International Journal of Thermophysics 35 (2014) 2237-2245.

ENEA
Servizio Promozione e Comunicazione
www.enea.it

Stampa: Laboratorio Tecnografico ENEA - C.R. Frascati
agosto 2016