
INTERNATIONAL COUNCIL OF Beverages ASSOCIATIONS
WASHINGTON, DC · BRUSSELS · TOKYO

ICBA
Documento Guia para
Redução da Potencial
Formação de Benzeno em Bebidas

Adoptado Pelo Conselho do ICBA em 29 de Abril 2006

**Documento Guia do ICBA para redução da
Potencial Formação de Benzeno em Bebidas**

ÍNDICE

1. Introdução	Page 3
2. Contexto	Pages 3-4
3. Factores para redução da formação do Benzeno nas bebidas	Page 4
4. Recomendações importantes do ICBA para os produtores de bebidas para evitar a formação de benzeno	Page 5
5. Orientação: Testar a presença de benzeno nas bebidas	Page 5
6. Orientação: Estratégias a seguir no controlo das formulações	Pages 6-7
Anexo: Métodos de Análises	Pages 8-26

INTERNATIONAL COUNCIL OF Beverages ASSOCIATIONS

WASHINGTON, DC · BRUSSELS · TOKYO

Documento Guia do ICBA para redução da Potencial Formação de Benzeno em Bebidas

1. Introdução

International Council of Beverage Associations (ICBA) é uma organização não governamental que representa os interesses da indústria mundial de bebidas. Os membros do ICBA produzem, distribuem e vendem, uma variedade de bebidas não-alcoólicas, incluindo refrigerantes carbonatados e não-carbonatados e ainda bebidas á base de sumos, águas engarrafadas e bebidas prontas a beber à base de chá e café.

2. Contexto

Em 1990-1991, a indústria de bebidas não alcoólicas verificou que podiam ser encontrados teores elevados de benzeno nalgumas bebidas quando submetidas a determinadas condições. Trabalhando em estreita colaboração com a US Food and Drug Administration (FDA), a indústria concluiu que, quando o ácido ascórbico (Vitamina C) era usado como ingrediente em conjunto com benzoato de sódio (como conservante), em determinadas condições podia haver a formação de benzeno. Esta formação era mais elevada quando esta era armazenada durante longos períodos a altas temperaturas.

Embora os níveis e a frequência do aparecimento do benzeno nas bebidas não alcoólicas, não por em risco a saúde pública, a indústria imediatamente tomou medidas pró-ativas, para reformular alguns produtos, de modo a minimizar a potencial formação de benzeno, mas assegurando a sua integridade microbiológica.

Para refrigerantes, bebidas e outros alimentos, autoridades regulamentadoras e.g. Austrália e Nova Zelândia FSANZ, EU JRC, Canadá, FSA UK e FDA US, aplicaram uma metodologia para monitorizar a exposição bem como procederam a uma avaliação da análise de risco. O último estudo sobre, *Compostos Orgânicos voláteis em alimentos: Trata-se de um estudo de cinco anos que fo feito pela FDA* e publicado no Journal of Agriculture and Food Chemistry in 2003. O benzeno foi detectado em *todos os alimentos testados*, incluindo frutas e vegetais, bem como no queijo Americano e no gelado de baunilha. O intervalo de níveis encontrados variavam entre 1-190 ppb (microgramas por kg). A FDA concluiu que os dados recolhidos durante o estudo demonstraram que o abastecimento de alimentos na América é bastante seguro e que embora possa haver alguma exposição por ingestão de compostos voláteis orgânicos tais como benzeno, esta exposição é muito mais alta quando comparada com os valores encontrados para a inalação. De facto, e de acordo com um artigo publicado em 27 de Fevereiro de 2006 na revista Food Chemical News, é apresentada uma posição oficial da FDA's Center for Food Science and Applied Nutrition, que constata que todos os alimentos no seu conjunto são responsáveis somente por 5% da total exposição ao benzeno. Outros estudos chegaram a conclusões semelhantes: UK-MAFF Food Surveillance No 58 – Benzene and other Aromatic Hydrocarbons in Food-Average UK Dietary Intakes – March 1995; EU Joint Research Centre, HEXPOC, 2005

INTERNATIONAL COUNCIL OF Beverages ASSOCIATIONS

WASHINGTON, DC · BRUSSELS · TOKYO

– Human Exposure Characterisation of chemical substances; quantification of exposure routes; Canada: B.D. Page et al – Journal of AOAC Intl., 1992, 75, (2) 334-340.

Em face disto, a indústria tem tido uma aproximação responsável, para minimizar a presença de benzeno nas bebidas. Hoje, as Indústrias de bebidas continuam a crescer e expandir, e o International Council of Beverages Associations (ICBA) remodelou os seus compromissos a fim de criar um guia com a finalidade de minimizar a formação do benzeno. Este guia estará disponível para *todas as* companhias de bebidas no mundo, desde que estejam inscritas no ICBA. De igual modo, o Conselho está a proceder a um esforço concertado, através dos seus Associados, para que esta informação seja fornecida a todas as companhias produtoras de bebidas.

3. Factores que podem favorecer e levar ao desenvolvimento de Benzeno em Bebidas

Factores favoráveis ao desenvolvimento de benzeno em bebidas

*** *Guia principal:* A formação de Benzeno pode acontecer nas bebidas, onde pode ser detectado em partes por bilião (microgramas por kg) , cujas fórmulas contenham benzoato de sódio ou benzoato de potássio em conjunto com ácido ascórbico.⁽¹⁾ Os valores podem aumentar com aquecimento e/ou exposição à luz, sendo no entanto o aquecimento um factor importante.**

* Alguns estudos sugerem que o ácido eritritol – sempre que permitido – pode também levar à formação de benzeno da mesma forma que o ácido ascórbico.

* A formação de Benzeno pode também aparecer em sumos e noutros ingredientes naturalmente. Por outro lado – sempre que seja permitido a utilização de ácido benzóico - sempre que usado nas fórmulas das bebidas.

3.2 **Factores que podem reduzir a formação de benzeno nas bebidas que contenham fontes ácido benzóico e ácido ascórbico**

* Ingredientes, tais como edulcorantes (açúcar, com alto teor de frutose de milho ou xarope de amido) e etilenodiaminotetracetato de cálcio dissódico (EDTA) – quando permitido – ou polihexametafosfato de sódio, podem reduzir a formação do benzeno.

* Evidências indicam que os edulcorantes atrasam a reacção, este fenómeno é mais detectável nas bebidas “diet”, contudo quanto mais tempo o produto estiver no mercado (prazo de validade), maior é a possibilidade da formação de benzeno se os precursores estiverem presentes.

¹ L.K. Gardner and G.D. Lawrence, J. Agric. Fd. Chem. 1993, 41 (5), 693-695

INTERNATIONAL COUNCIL OF Beverages ASSOCIATIONS

WASHINGTON, DC · BRUSSELS · TOKYO

* Evidência também sugere que o EDTA – quando permitido – pode reduzir a reacção, possivelmente por complexação de iões metálicos que podem actuar como catalizadores. O grau de redução pode ser reduzido em produtos contendo cálcio ou outros minerais – especialmente quando usado como fortificantes – podendo interferir como acção de redução.

4. **Recomendações importantes do ICBA para os produtores de bebidas para eliminar/minimizar a formação de benzeno**

Tendo em linha de conta os factores que podem conduzir à formação de benzeno em bebidas tal como referido acima (secção 3), ICBA recomenda o seguinte:

✓ **RECOMENDAÇÃO 1: REVISÃO**

Todas as empresas de bebidas devem rever as fórmulas dos seus produtos e se for considerado importante, desenvolver novas fórmulas tendo em linha de conta as informações indicadas acima, relativamente aos produtores para a prevenção / minimização da formação do benzeno.

✓ **RECOMENDAÇÃO 2: TESTE**

Todas as empresas de bebidas devem proceder a amostragens para análise dos produtos onde eventualmente se possa haver a formação de benzeno, aplicando testes de aceleração da armazenagem (*para uma informação mais detalhada, para efectuar estes testes, ver secção 5 a seguir*).

✓ **RECOMENDAÇÃO 3: REFORMULAR**

Todas as empresas de bebidas devem reformular os produtos nos quais o benzeno se possa formar de modo a eliminar ou reduzir a formação deste criando uma situação o mais estável possível.

✓ **RECOMENDAÇÃO 4: MONITORIZAÇÃO POST-LANÇAMENTO**

Todas as companhias de bebidas devem incluir a determinação do benzeno nas análises das amostras do mercado.

5. **Guia: Testes para a determinação da presença de benzeno nas bebidas**

5.1 **Testes acelerados**

Testes acelerados devem ser efectuados nos produtos em cujas fórmulas entre o ácido benzóico - incluindo benzoato adicionado - e ácido ascórbico. Condições específicas dos testes podem variar de produtor para produtor mas devem ter em atenção as condições do período e temperatura a que normalmente ocorre a distribuição e verificar o seu

INTERNATIONAL COUNCIL OF Beverages ASSOCIATIONS

WASHINGTON, DC · BRUSSELS · TOKYO

comportamento. Como ponto de partida, os produtores devem submeter os seus produtos com as fórmulas habituais a temperaturas no mínimo entre 50-70 graus C durante 24 horas ou mais, dependendo da sua formulação, e algumas fórmulas necessitam de 14 dias de exposição a um teste acelerado para avaliar a sua reacção.

5.2 Procedimentos Analíticos

Procedimentos analíticos fiáveis para o benzeno devem ser validados através do comportamento adequado das amostras ou através de laboratórios externos acreditados, capazes de determinar pelo menos 5 ppb (microgramas/kg) de benzeno nas bebidas. (Ver anexo dos exemplos de metodologias).

INTERNATIONAL COUNCIL OF Beverages ASSOCIATIONS

WASHINGTON, DC · BRUSSELS · TOKYO

6. Guia: Estratégias para controlar as Fórmulas

Como foi indicado previamente, os principais factores que podem levar à formação de benzeno, são geralmente a combinação do ácido benzóico com ácido ascórbico, tendo a temperatura um papel muito importante. Contudo, outros pontos de controlo (PC), podem contribuir para o seu desenvolvimento e devem ser tidos em linha de conta nas formulações, se o produto incluir:

◆ Produtos à base de água

? Devem estar conforme com a legislação local, incluindo os níveis de benzeno, para água potável. *Em complemento ver a secção seguinte 'Metais de Transição'.*

PC – controlar o benzeno na água

◆ Açúcares (edulcorantes)

? a formação do benzeno é mais lenta, mas não inibem completamente.

◆ Sumos de frutas

? Podem ser fornecidos com benzoato como conservante - quando permitido - e/ou outras fontes naturais de ácido benzóico

PC – rever especificações com o fornecedor para controlar ou eliminar benzoato

? Pode ser uma fonte de ácido ascórbico (adicionada ou natural)

PC – análise do ascorbato ou obter quantidades adicionadas do fornecedor

◆ Edulcorantes

? Produtos “Diet / Light” têm um grande potencial para a formação do benzeno se houver percursos presentes.

◆ Dióxido de carbono

? Assegurar o cumprimento com os requisitos das legislações locais ou International Society of Drinks Technologists (ISBT) standard de 20 ppb (microgramas/kg) máximo de benzeno

PC – especificações do fornecedor, análises e controlos

◆ Ácidos

? A um baixo pH, ácido ascórbico e/ou ácido eritritol, em combinação com fontes de ácido benzóico, conduz a um elevado potencial de formação de benzeno

◆ Aromas/ Agentes de Turvação

? Aromas, emulsões e turvações podem conter conservantes e antioxidantes

PC – revisão das especificações com os fornecedores para controlar ou eliminar benzoato.

? Benzaldeído e ácido ascórbico podem também formar benzeno

PC – controlar a presença do benzaldeído

INTERNATIONAL COUNCIL OF Beverages ASSOCIATIONS

WASHINGTON, DC · BRUSSELS · TOKYO

◆ Corantes

? Podem conter ascorbato como antioxidante para evitar a perda de cor

PC – controlar com os fornecedores e elaborar nova especificação se for necessário

◆ Conservantes

Todos os produtores de bebidas devem ter implementado condições rigorosas de higiene, aplicando os Princípios do HACCP

? Considerar o uso de misturas de sorbato e benzoato, se houver uma necessidade tecnológica (estabilidade microbiológica ou solubilidade do sorbato).

PC – Considerar se o benzoato pode ser removido/reduzido/substituído por sorbato ou outro aditivo ou sistema de preservação. Note, que o sorbato pode precipitar quando diluído bem como nos xaropes pós-mix na origem

? Dissolúveis: (alguns sumos de frutas, bebidas que tenham álcool – normalmente quando diluídos 5x a sua concentração, antes de serem consumidas) requerem para ser preservadas que as embalagens não sejam abertas muitas vezes, uma vez que, frequentes aberturas durante o prazo de validade podem levar á formação de benzeno

PC – Considerar se o benzoato pode ser removido/reduzido/substituído por sorbato ou se há possibilidade de haver outro sistema de conservação.

Note que o sorbato deve ser usado com cuidado para evitar que precipite. Considerar uso alternativo para o ascorbato, quando presente.

◆ Antioxidantes

? Considerar o uso do ascorbato em relação à totalidade da fórmula, especialmente se estiverem presentes sumos de citrinos ou outros transportadores naturais de ascorbato.

PC – removido/reduzido/substituído o ascorbato quando se justifique se houver uma fonte de ácido benzóico presente.

◆ Luz

? Raios UV podem induzir na formação de radicais livres nos produtos

PC – Rever armazenagem e condições de prazo de validade, bem como instruções da rotulagem

◆ Temperatura

? Acelera a formação se existirem percursos presentes

PC – Rever armazenagem e condições de prazos de validade, bem como instruções da rotulagem.

◆ Metais de transição

? Traços de iões metálicos, tais como cobre e ferro, podem actuar como catalizadores na formação do benzeno nas bebidas que contenham fontes de ácido ascórbico. Fontes de metais de transição incluindo produtos à base de água ou outros ingredientes.

INTERNATIONAL COUNCIL OF Beverages ASSOCIATIONS

WASHINGTON, DC · BRUSSELS · TOKYO

PC- Complexar os compostos com EDTA (quando permitido) ou polifosfato de sódio podem contribuir para reduzir a formação de benzeno. Fortificação com cálcio ou outros minerais podem reduzir este efeito.

ANEXO: EXEMPLOS DE MÉTODOS DE ANÁLISES

- 1. “Purge/Trap” GCMS Quantificação de traços de Benzeno em refrigerantes Carbonatados ou Produtos á base de sumos.**
- 2. Determinação do Benzeno em bebidas Carbonatadas e Não - Carbonatadas – Método Cromatografia Gasosa com Câmara.**

INTERNATIONAL COUNCIL OF Beverages ASSOCIATIONS

WASHINGTON, DC · BRUSSELS · TOKYO

1. “Purge/Trap” do GCMS para Quantificação de traços de Benzeno em refrigerantes Carbonatados ou Produtos á base de sumos

Sumário:

A. Parâmetros dos instrumentos operacionais

Três “purges and Traps” GC/MS foram utilizados para as análises:

1. Agilent 6890/5973 #1 GC/MS, Tekmar Velocidade da “purge and trap concentrator” e um auto amostrador Tekmar Solatek “purge and Trap”.
2. Agilent 6890/5973 #2 GC/MS, EST Encon “purge and trap concentrator” e um auto amostrador EST Archon 5100 “purge and trap”
3. Agilent 6890/5973 #3 GC/MS, Tekmar Velocity purge and trap concentrator e um auto amostrador Archon (OI 4552).

1. 6890/5973 #1 Uma coluna com 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm HP-5MS (Agilent 19091S-433) foi mantida a 45 °C durante 2 minutos, tendo de seguida a temperatura sido aumentada a uma velocidade de 10 °C/minuto até 65 °C, aumentando de 25 °C até 250 °C e mantida a 250 °C durante 5 minutos. O orifício da a injeção foi fixado a 225 °C numa proporção de 50:1 e uma divisão de 4 mm ID/linha de divisão. O transportador de gás foi regulado para 6890's EPC e está regulado para esta Velocidade. Regresso aos 6890 através de uma linha de aquecimento que está ligada ao interior do GC.

A coluna foi operada a uma pressão constante no modo de 12.33 psig com um fluxo nominal de 0.8 mL/minuto. O economizador do gás foi mantido a 20 mL/minuto depois de 2 minutos a trabalhar. A coluna termina num divisor de microfluidos Agilent, em que aproximadamente 20% do caudal da coluna efluente foi enviado para um Agilent µ-ECD. Os valores ECD encontrados não foram tomados em linha de conta para esta análise. O divisor tem um sistema de fornecimento de gás de 3.8 psig e a capacidade da coluna 3.8 psig trabalha próximo da pressão atmosférica.

A linha de transferência MSD foi regulada para 280 °C, o MS Quad foi regulado para 150 °C e a fonte de MS para 230 °C. O multiplicador de electrões fixo foi regulado para 106 volts e a voltagem do multiplicador foi de 1694 volts. Foi usado um equipamento fiável ATUNE. A Selected-Ion-Monitoring foi utilizada na análise. Os iões monitorizados foram m/z 77, 78 para o benzeno e 82, 84 para o d⁶-benzeno padrão interno para utilização em modo de baixa resolução e o tempo de residência para estes iões foi de 100 ms.

Benzeno, o objectivo do ião m/z 78, e o ião qualificador 77, e d⁶-benzeno, ião objectivo m/z 84, e o ião qualificador 82, foi monitorizado de 3.23 a 3.65 minutos. Tempo de retenção do benzeno, 3.45 minutos, e d⁶-benzeno, 3.43 minutos.

INTERNATIONAL COUNCIL OF Beverages ASSOCIATIONS

WASHINGTON, DC · BRUSSELS · TOKYO

UM Tekmar Velocity “purge and Trap concentrator” com o autoamostrador Solatek foi usado no modo de solo. Neste modo, as amostras são preparadas em frascos de amostras 40-mL (I-Chem Certified 200 series, Fisher Scientific 05-719-102) pelo autoamostrador. A purga do gás foi levada a cabo na cabeça do “trap concentrator” através do SilcoSteel aquecida pela linha de transferência.

Um Supelco type J, ou BTEX, trap (Supelco 21064) foi utilizado. Este é em tubo de aço inox isolado com 25 cm comprimento 1/8” e 7.7 cm de Carbopak C e 1.2 cm de Carbopak B. As condições de análise para a “purge and trap concentrator/autoamostrador são como se descrevem a seguir. Estas condições foram fixadas no software Tekmar’s Teklink o qual está ligado ao amostrador e inicia o trabalho do GC/MS quando o ciclo de de desabsorção começa.

Variáveis	Valor	Variáveis	Valor
Água de Lavagem Temp	90 °C	Caudal de pré purga	40 mL/min
Cápsula de amostra Temp	40 °C	Aquecedor da amostra	desligado
Agulha para a amostra Temp	50 °C	Tempo do pré aquecedor da amostra	1.00 min
Linha de transferência Temp	150 °C	Préaquecimento Temp	40 °C
Válvula de descarga Temp	125 °C	Temp. da purga	0 °C (por defeito)
Amostra de lavagem Tempo	0.50 min	Caudal da purga	40 mL/min
Agulha Lavagem Volume	15 mL	Tempo de secagem da purga	0.50 min
Tempo para limpeza da Agulha	1.00 min	Temperatura de secagem da purga	20 °C
Tempo de pré aquecimento da amostra	1.00 min	Fluxo para secagem da Purga	50 mL/min
Aquecimento do agitador	desligado	Início do GC	Início do Desorb.
Modo de pré aquecimento do agitador	agitador	Temp. de pré aquecimento da Desabsorção	250 °C
Velocidade do pré aquecedor do agitador	5	Drenagem do Desorb.	Ligado
Tempo de purga do agitador	11.00 min	Tempo de Desorb.	2.00 min
Purga do agitador	desligado	Temp do Desorb.	250 °C
Modo de purga do	Agitação	Fluxo do Desorb	0 mL/min (por

INTERNATIONAL COUNCIL OF Beverages ASSOCIATIONS

WASHINGTON, DC · BRUSSELS · TOKYO

agitador			defeito)
Velocidade do agitador e da purga	5	Tempo de cozedura	4 min
Temperatura da válvula do forno	150 °C	Temperatura da cosedura	260 °C
Temperatura da linha de transferência	150 °C	Temperatura de secagem do fluxo de cosedura	300 °C
Temperatura do suporte da amostra	90 °C	Temperatura da cosedura	400 ml/min
Temperatura da purga pronta	35 °C	Temperatura do ponto central	-150 °C
Temperatura do fluxo seco à espera	200 °C	Tempo de injeção	1.00 min
Fluxo à espera	20 mL/min	Temperatura da injeção	180 °C
Tempo de pré purga	0.50 min	Temperatura de espera	100 °C

Tabela 1. Velocidade do Tekmar e pontos de ajustamento Solatek

INTERNATIONAL COUNCIL OF Beverages ASSOCIATIONS

WASHINGTON, DC · BRUSSELS · TOKYO

2. 6890/5973 #2

Uma coluna com 60 m x 0.25 mm x 1.4 µm DB-624 (Agilent 122-1364) foi mantida a 40 °C durante 2 minutos, tendo depois aumentado a temperatura a um ritmo de 10 °C/minuto até 180 °C, e a seguir de 40°C/minuto até 250 °C, e mantida a 250 °C durante 2 minutos. A injeção no orifício foi fixada a 200 °C com uma variação de 40:1. O transportador do gás foi regulado para 6890's EPC fornecido pela Encon. Voltou para 6890 através de uma linha de transferência de calor com uma sonda no interior do GC.

Verificaram-se alguns problemas com picos fantasmas no espectro/transporte da amostra devido ao comprimento da coluna. Este equipamento está preparado para outros tipos de análises que requerem esta coluna. É recomendado não utilizar colunas mais compridas do que com 30 m a coluna recomendada para a análise do benzeno deve ser uma coluna para um filme muito fino. A coluna trabalhou com um modo de fluxo constante a 16.65 psig com uma pressão inicial com um caudal de 1.0 mL/minuto. O economizador de gás foi fixado em 20 mL/minuto depois de estar a trabalhar durante 2 minutos.

A linha de transferência MSD foi fixada a 280 °C, o MS Quad foi colocado a 150 °C e o MS Source foi de 230 °C. O multiplicador de electrões fixos estava desligado e o multiplicador de voltagem a 1670 volts. Foi usado um rigoroso e afinado dispensador de solvente. O atraso no fornecimento de solvente foi fixado em 10 minutos.

Selected-Ion-Monitoring foi utilizado para a análise. Os iões foram controlados a m/z 77, 78 para o benzeno e 84, 82 para d⁶-benzeno como standard interno. O tempo de residência para os iões foi de 85 ms.

Ao fim de Rt 11.3 minutos, foi detectado ião benzeno a m/z 78, qualificador de iões a 77. O standard interno d⁶-benzeno foi detectado usando o objectivo do standard interno de 84 iões e o qualificador de iões de 82. O espectrómetro de massa trabalhou em alta resolução.

A Encon Purge and trap concentrator com o Archon 5100 autoamostrador foi usado para o modo de solo. A purga do gás foi levada até à cabeça do aparelho concentrador através da linha de transferência por aquecimento no SilcoSteel. O Encon usado é do Type K, ou Vocab 3000 trap (PTS Catálogo E70300-K03). É um tubo em aço inox isolado com comprimento de 25 cm por 1/8" 10 cm Carboxen B, 6 cm Carboxen 1000 e 1 cm Carboxen 1001.

Variáveis	Valor	Variáveis	Valor
Fluxo em espera	Ligado	drenagem	Ligado
Desvio do gás de cosedura	Ligado	Antiespuma	Cont
Tempo total GC	0 Minutos	Válvula do forno	130 °C
Linha de transferência Line	130 °C	MoRT pronto	40 °C
MoRT cozedura	260 °C	Purga pronta	35 °C

INTERNATIONAL COUNCIL OF Beverages ASSOCIATIONS

WASHINGTON, DC · BRUSSELS · TOKYO

Tempo de purga	11 minutos	Dry Purga Time	1 Minuto
Purga Flow	40 mL/minuto	Fluxo de Desabsorção	0 mL/Min (fixo por defeito)
Temperatura de pré aquecimento	40 °C	Tempo de préaquecimento	0.5 Minuto
Pré aquecimento de desabsorção	245 °C	Temperatura de desabsorção	250 °C
Tempo de desabsorção	2 Minutos	cozedura	260 °C
Tempo de cozedura	10 Minutos		

Tabela 2. Encon e Archon Fixotings

3. 6890/5973 #3

Uma coluna 20 m x 0.18 mm x 1 µm DB-624 (Agilent 122-1324) foi submetida a 40 °C durante 3 minutos, tendo a temperatura sido aumentada a um ritmo de 15 °C/minuto até 210 °C e mantida a 210 °C durante 0.33 minutos. O orifício de injeção foi fixado 210 °C com uma proporção de 50:1. O transportador de gás é regulado por 6890's EPC fornecido pela Encon. O retorno do 6890 via linha de transferência do aquecedor que está soldado ao interior do GC.

A coluna trabalhou no modo de fluxo constante a 16.53 psig com uma pressão inicial e um caudal de 0.8 mL/minuto. O economizador de gás estava desligado.

A linha de transferência MSD foi fixada a 190 °C, e o MS Quad a 150 °C a fonte do MS Fonte a 230 °C. O multiplicador fixo de electrões estava desligado e o multiplicador de voltagem foi fixo a 1176 volts. Foi usado um doseador muito rigoroso ATUNE. O retardador do solvente foi de 4.5 minutos.

A monitorização do selector de iões foi utilizada para a análise. Os iões foram monitorizados a m/z 77, 78 para o benzeno e 84, 82 for d⁶-benzeno como standard interno. O MSD foi fixado para baixa resolução e o tempo de residência dos iões foi de 85 ms.

Benzeno, Rt 5.19 minutos, foi detectada uma quantidade quantificada usando o limite de ião de m/z 78. d⁶-benzeno, Rt 5.16 minutos, foi detectado usando o limite de ião de m/z 84.

A velocidade do concentrador da purga e ratoeira com o Archon auto amostrador foi utilizado no modo de solo. A purga do gás foi efectuada na cabeça do concentrador através da Trap utilizando uma linha de transferência aquecida SilcoSteel. A velocidade usada na trap foi do Type K, ou Vocarb 3000. É um tubo isolado em aço inox com 25 cm comprimento 1/8" com 10 cm Carboxen B, 6 cm Carboxen 1000 e 1 cm Carboxen 1001.

INTERNATIONAL COUNCIL OF Beverages ASSOCIATIONS

WASHINGTON, DC · BRUSSELS · TOKYO

Variáveis	Valor	Variáveis	Valor
Temp da válvula do forno	150	Temp da purga seca	40
Tem da linha de transferência	150	Fluxo da purga seca	200 mL/Min
Temp da amostra Mount	90	Início do GC	Início da desabsorção
Temp da purga pronta	40	Temp de pré aquecimento da desabsorção	245
Temp do fluxo seco à espera	175	Drenagem da desabsorção	Ligado
Fluxo à espera	0 mL/min	Tempo de desabsorção	2 min
Tempo de pré-purga	0.5 min	Temperatura de desabsorção	250
Fluxo de pré-purga	40 mL/min	Fluxo Desabsorção	0 mL/min (fixo por defeito)
Aquecedor da amostra	desligado	Tempo de cosedura	2 min
Tempo do aquecedor da amostra	1 min	Tempo de cosedura	270
Temperatura de préaquecimento	40	Temperatura do fluxo seco da cosedura	300
Tempo da purga	11 min	Fluxo da cosedura	400 mL/min
Temperatura da purga	0 (fixo por defeito)	Temperatura do Focus	-150
Fluxo da purga	40 mL/min	Tempo de Injecção	1 min
Tempo da purga seca	1 min	Temperatura de injecção	180
Tipo de amostra	Solo	Volume da amostra	5 mL
Factor de diluição	0	Volume de Lavagem	0 (fixo por defeito)
Lavagens	0	Standard 1	Sim
Standard 2	Não	Preaquecimento da amostra no agitador	Não
Agitador	Não	W. tempo de agitação	0 (fixo por defeito)
Tempo W. Fixotle	0	Fluxo das seringas	0 (fixo por defeito)
Modo Opr.	Remoto	Temporizador do ciclo	0 (fixo por defeito)
Relógio Auxiliar	0	Ligado ao método #	#0

INTERNATIONAL COUNCIL OF Beverages ASSOCIATIONS

WASHINGTON, DC · BRUSSELS · TOKYO

Tabela 3. Velocidade e Archon Fixotings

INTERNATIONAL COUNCIL OF Beverages ASSOCIATIONS

WASHINGTON, DC · BRUSSELS · TOKYO

B. Calibração dos Instrumentos

Reagentes e padrões (d⁶ benzeno ISTD)

A informação da calibração é para o GC/MS #1 com o Tekmar Velocity and Solatek.

0.9251 g de 5.023 mg/mL benzeno foi diluído em metanol, tendo sido pesado num frasco volumétrico de 50 mL e cheio até á marca com metanol (117,448 µg/L benzeno). Esta solução foi rigorosamente diluída de 1:10 usando pipetas de vidro Class A de 5 mL e frascos volumétricos de 50 mL para preparar as soluções de 11,745 µg/L benzeno, 1,174 µg/L benzeno e 117 µg/L benzeno. Em partes iguais, a estas soluções foram adicionados 10 mL de Purgad, água desionizada em frascos de 40 mL EPA de acordo com a tabela 5 para fazer a calibração do padrão.

Foram usadas seringas de microlitros Hamilton 800 Series para adicionar a solução afim de calibrar os tubos EPA contendo água ou amostra. Estas seringas estão descritas na tabela 4.

Volume da seringa	Número do modelo	Número no catálogo Fisher
10 µ	801RNW	14-815-300
25 µL	802RNW	14-815-301
50 µL	805RNW	14-815-302
100 µL	810RNW	14-815-303

Tabela 4. Seringas usadas para adição das soluções padrões nos tubos

0.9712 g of 2.015 mg/mL d⁶-benzeno em metanol foram pesados num frasco volumétrico com um volume 50 mL e cheio até à marca com metanol (49,460 µg/L d⁶-benzeno). Esta solução foi diluída de 1:5 com uma pipeta de vidro de 20 mL Class A para um frasco volumétrico de 100 mL para fazer a solução de 9892 µg/L d⁶-benzeno para ser utilizado como padrão. O método foi baseado na “Purge and Trap” e auto amostrador para injectar 5 µL do padrão para cada tubo EPA antes de proceder á “Purge”.

A solução d⁶-benzeno foi somente utilizada para GC/MS #1. O auto amostrador Solatek estava preparado para injectar 5 µL da solução padrão. O outro auto amostrador (Archon) utilizado nestas análises injectava 1 e 2 µL em partes iguais, respectivamente, da solução padrão, das soluções de d⁶-benzeno com diferentes concentrações. O Archons lavou o ISTD da amostragem com 10 mL de água de lavagem.

Um do reservatório standard do equipamento do Solatek foi cheio com uma porção da solução padrão. Antes de proceder à purga da amostra, a válvula de injeção foi cheia com 5 µL de solução de d⁶-benzeno que depois foi adicionada ao tubo EPA com 10 mL de água de lavagem.

INTERNATIONAL COUNCIL OF Beverages ASSOCIATIONS

WASHINGTON, DC · BRUSSELS · TOKYO

μL of 117 $\mu\text{g/L}$ Benzene	Standard Conc $\mu\text{g/L}$	Cal Level	μL of 1,174 $\mu\text{g/L}$ Benzene	Standard Conc $\mu\text{g/L}$	Cal Level	μL of 11,745 $\mu\text{g/L}$ Benzene	Standard Conc $\mu\text{g/L}$	Cal Level	
	10	0.117	1	10	1.17	4	10	11.74	7
	20	0.235	2	20	2.35	5			
	40	0.470	3	40	4.70	6			
μL of 9892 $\mu\text{g/L}$ d^6 -Benzene									
	5	4.90	All						

Tabela 5. Preparação dos Standards para 10 mL Calibração de amostras padrão

Adicionalmente a esta calibração padrão 5 e 50 μL de 1,174 $\mu\text{g/L}$ solução de benzeno foram adicionados a 10 mL em partes iguais de água desionizada ao Purgad. Este é usado para fazer a calibração e verificação das amostras 0.59 e 5.87 $\mu\text{g/L}$ de benzeno.

Finalmente a amostra controlada foi preparada por uma fonte independente de benzeno a fim de verificar se o equipamento está a fornecer informações com consistência. A 100 μL em partes iguais de uma solução contendo 2000 $\mu\text{g/mL}$ de benzeno em metanol foi adicionado a 100 mL de Purgad, água desionizada..

A 5 μL em partes iguais de 2000 $\mu\text{g/L}$ de solução foi adicionado a 10 mL Purgad, de água desionizada no tubo EPA dando 1.0 $\mu\text{g/L}$ de benzeno. Este controlo do padrão foi tratado como uma amostra desconhecida para a calibração e verificação para assegurar que todos os instrumentos usados neste projecto dão resultados consistentes.

O Agilent 6890/5973 #1 GC/MS, Tekmar Velocity “Purge and trap concentrator” e Tekmar Solatek Purge and Trap auto amostrador foi calibrado com este padrão. A ChemStation foi calibrada usando uma curva de calibração linear que dá a quantidade de Benzeno. O ChemStation foi “preparado” para que a concentração do padrão interno d^6 -benzeno fosse de 1.0 $\mu\text{g/L}$ para todas as amostras. Isto dá a proporção para cada nível de calibração com indicação da concentração de benzeno para aquele nível.

Uma lista de calibrações padrões está incluída em Anexo. Todas são baseadas em um 1 mL de solução numa ampola selada.

- 1- Standard para Benzeno: Supelco 40004, 5023 $\mu\text{g/mL}$ benzeno em metanol
- 2- Standard para d^6 -benzeno: Supelco 48940-U, 2015 $\mu\text{g/mL}$ benzeno em metanol
- 3- Controlo da amostra standard do benzeno: Restek 30249, 2000 $\mu\text{g/mL}$ benzeno

Calibração dos instrumentos

A calibração e verificação das amostras é feita adicionando microlitros em partes iguais microlitros do padrão da tabela 5 para 10 mL de Purgad, de água desionizada em tubos de 40 mL

INTERNATIONAL COUNCIL OF Beverages ASSOCIATIONS

WASHINGTON, DC · BRUSSELS · TOKYO

EPA. Soluções em partes iguais do padrão 5 µL são adicionadas pelo Solatek. Para outros equipamentos a concentração standard de d⁶-benzeno deverá ser alterado para adequar em partes iguais da solução do ISTD do auto amostrador para injectar as amostras. A tabela 5 ainda é aplicável para a diluição do benzeno para a calibração dos padrões.

Tabela 6 mostra-nos os valores da calibração para 6890/5973/Velocidade/Solatek “Purge and Trap” do GC/MS. Recolha a actual concentração do d⁶-benzeno seja 4.9 µg/L e o ChemStation foi considerado que era de 1 µg/L para ajustar a proporção da quantidade à concentração do benzeno.

A primeira e última amostras na calibração devem ter lugar quando o Purgad, com água desionizada é utilizada para controlar a viabilidade da informação do instrumento. Uma sequência típica destas análises começa com um ensaio em branco com água, a 5.87 µg/L verificação da amostra com valor de benzeno conhecido e só depois amostras com valores desconhecidos quer com 0.59 ou 5.87 µg/L amostra de verificação entre cada 8 – 10 amostras desconhecidas. Figura 1 representa a tabela de calibração do ChemStation.

Seguindo a tabela em Excel utilizando os valores encontrados para ChemStation.

Sample Name	Benzene Area	Benzene Conc µg/L	d6 Benzene Area	d6 Benzene Area	Benzene Found µg/L
0 µg/L	10942	0.00	1	818157	0.0
0.12 µg/L	32807	0.12	1	817882	0.1
0.24 µg/L	57300	0.24	1	827709	0.3
0.47 µg/L	101968	0.47	1	828011	0.5
1.17 µg/L	221872	1.17	1	818283	1.2
2.35 µg/L	419894	2.35	1	818604	2.2
4.70 µg/L	906480	4.70	1	831742	4.8
11.74 µg/L	2192056	11.74	1	835169	11.7
0 µg/L	17214	0.00	1	825647	0.0
0.59 µg/L Check Sample	123141	0.59	1	833539	0.6
5.87 µg/L Check Sample	1153599	5.87	1	837021	6.1

Tabela 6. Valores de calibração entre 0.12 to 11.74 µg/L padrões para Benzeno

INTERNATIONAL COUNCIL OF Beverages Associations

WASHINGTON, DC · BRUSSELS · TOKYO

Chemstation Benzene Calibration

March 13, 2006

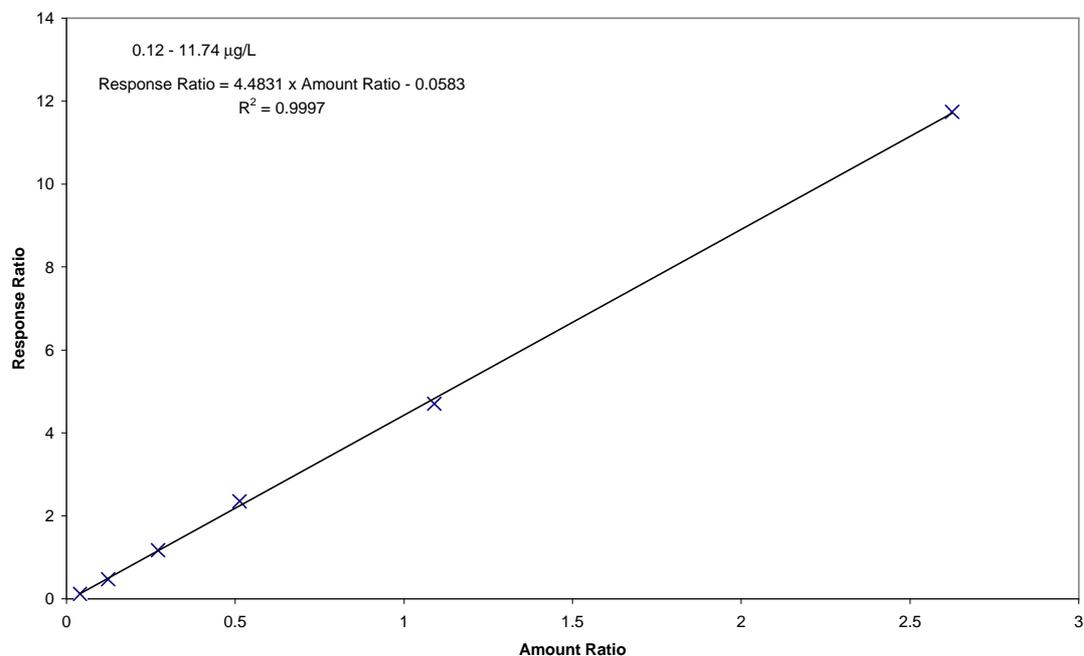


Figura 1. Curva de calibração para o ChemStation calibração entre 0.12 a 11.74 µg/L benzeno standards

O fabricante das soluções padrões do d^6 -benzeno indica uma pureza de 99.9 %. O padrão interno de 4.9 µg/L d^6 -benzeno pode conter como máximo 0.004 µg/L de benzeno. Em adição ao espectro de massa de d^6 -benzeno na literatura do NIST tem uma pequena percentagem de m/z 78 e 77.

INTERNATIONAL COUNCIL OF Beverages Associations

WASHINGTON, DC · BRUSSELS · TOKYO

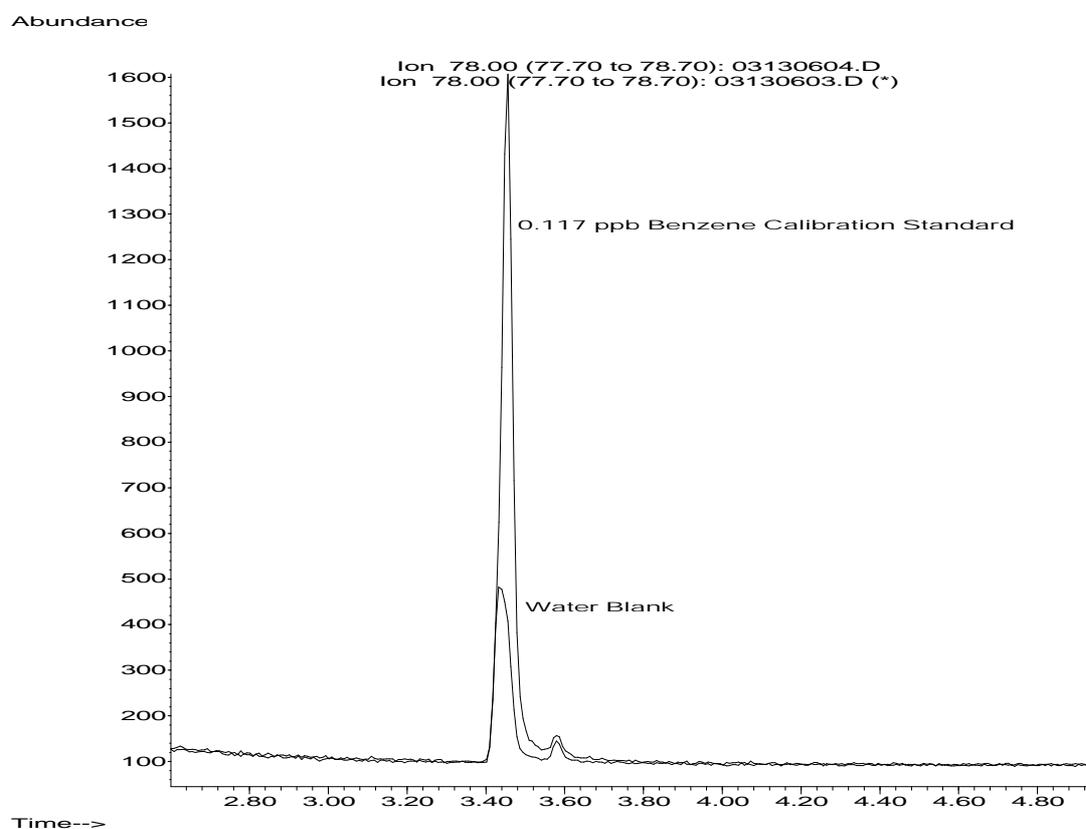


Figura 2. Superimposed ion chromatograms of blank run and 0.12 µg/L benzeno

Preparação da Amostra

A 10 mL da amostra em partes iguais (mais 10 mL água de lavagem) são directamente colocadas no tubo de 40-mL EPA. As amostras são pipetadas para os tubos e estes tapados para a análise.

As bebidas carbonatadas (CSDs) dum forma geral tendem a libertar CO₂ quando são abertas e durante a amostragem por pipetagem. Esta é uma situação inevitável e certas (perdas desconhecidas) dos voláteis podem acontecer. A perda de CO₂ pode ser minimizada por arrefecimento do CSD durante a noite num frigorífico ou num depósito com gelo durante várias horas antes de abrir o contentor. Evitar agitar o contentor antes de abrir. Humidificar previamente o interior da pipeta com partes iguais da amostra e disposta de modo a ajudar a minimizar as perdas devido as bolhas do gás. Encher e drenar a pipeta suavemente para minimizar a perda de CO₂. Permite assim que a amostra corra no interior da parede do frasco de 40-mL para reduzir as perdas gasosas do CO₂.

Nota:

Sumos contendo polpa e outros sólidos não podem ser analisados usando este método de “Purge and trap” desde que a amostra seja colocada correctamente.

Estas amostras devem ser analisadas na cabeça do – GC/MS.

INTERNATIONAL COUNCIL OF Beverages ASSOCIATIONS

WASHINGTON, DC · BRUSSELS · TOKYO

2. Determinação do benzeno em bebidas carbonatadas e não-carbonatadas bebidas – cromatografia gasosa usando câmara

1. ÂMBITO E FINALIDADE

Este método é especificado para ser usado em cromatografia gasosa utilizado a cabeça para a determinação do benzeno em bebidas carbonatadas e não-carbonatadas.

2. RESPONSABILIDADES

2.1. Laboratório experientes são responsáveis pela preparação dos reagentes e por efectuar as análises. Também são responsáveis por registar os resultados obtidos das amostras e controlá-las numa forma adequada em folhas próprias. Devem ser avaliadas para obter resultados de modo a poderem ser analisados numa forma crítica e aplicar os meios necessários para controlá-los para efeitos das calibrações e controlos.

2.2. O Responsável pelo Laboratório é responsável pela realização e efectividade do procedimento. Ele/ela também devem fornecer assistência para avaliar os métodos e resultados.

2.3. O responsável do laboratório é responsável por assegurar que o laboratório tem meios (equipamento e pessoal) para realizar as actividades adequadas para os testes, controlo e calibração.

3. PRINCÍPIO

A amostra deve ser aquecida num tubo fechado com “headspace”, de modo a obter o equilíbrio entre a concentração do benzeno acima da amostra e a concentração na amostra. Antes de analisar, amostras de bebidas carbonatas estas devem ser tratadas com hidróxido de sódio para neutralizar o dióxido de carbono. De modo a rentabilizar a eficiência do benzeno, a matriz modificadora (cloreto de sódio) é adicionada ao frasco. Depois de estabelecer o equilíbrio, em partes iguais da fase gasosa é injectada em cromatografia gasosa. Com o fim de obter maior sensibilidade na detenção do benzeno a “Trap” a frio antes da injeção na coluna capilar. Os componentes são detectados por espectrometria de massa (MS) no modo cheio “scan”. Identificação é baseada no tempo de retenção e comparação com a literatura do espectro de massa. A quantificação dos iões é baseada na intensidade do ião principal usando quarto pontos de calibração e o método standard interno.

4. EQUIPAMENTO E UTENSÍLIOS DE VIDRO

4.1. Equipamento adequado de vidro

INTERNATIONAL COUNCIL OF Beverages ASSOCIATIONS

WASHINGTON, DC · BRUSSELS · TOKYO

- 4.2. Frascos volumétricos com rolhas de vidro
- 4.3. Frascos de 20 ml com “headspace” com rolhas metálicas magnéticas
- 4.4. Finnigan Trace GC- DSQ- espectrómetro de massa com Combipal, auto amostrador com “headspace” configuração (GC210 ou 212)
- 4.5. Coluna capilar: Restek RTX-1 60m * 1µm df * 0.25 mm ID
- 4.6. Gerador de água ultra pura: Millipore MilliQ (PW202 ou 203)
- 4.7. Seringas graduadas Hamilton (10, 25 e 50 µl)
- 4.8. Seringa digital Hamilton 25 µl
- 4.9. Balança analítica (AB201, 202 ou 203)

5. REAGENTE E SOLUÇÕES

5.1. REAGENTES

- 5.1.1. Água ultra pura arrefecida a 4 °C
- 5.1.2. Benzeno (CHBEN92)
- 5.1.3. Benzeno-d6 (CHBEN91)
- 5.1.4. Metanol, Purga e ratoeira grade (CHMET05)
- 5.1.5. Hidróxido de sódio (CHSOH04)
- 5.1.6. Cloreto de sódio (CHSOC05)

5.2. SOLUÇÕES

Só usar frascos volumétricos com rolhas de vidro (4.2)

5.2.1. Solução padrão de benzeno 1000 mg/l (Código da solução SL-045-01)

Pesar numa balança analítica (AB201) um frasco volumétrico vazio, seco de 50 ml com rolha, com uma precisão de 0.1 mg. (**m1**). Colocar 25 ml metanol (5.1.4) num frasco volumétrico, colocar o frasco na balança analítica e tarar. Usando um pipeta “Pasteur”, adicionar +/- 50 mg de benzeno (5.1.2) e determinar o peso exacto. (**m2**). Ter a certeza que o benzeno é adicionado directamente ao metanol (não deve haver contacto na superfície). Completar até à marca com metanol.

Determinar o peso do frasco com a solução e a rolha com uma precisão de 0.1 mg (**m3**).

A concentração exacta do padrão standard é calculado como segues:

$$C1 = (m2 / ((m3 - m1) / 0.7915)) * 1000 \text{ (mg/l)}$$

Onde

C1 é a concentração da solução padrão do benzeno (mg/l)

m1 é a massa do frasco vazio (g)

m2 is the massa of the benzeno (mg)

m3 é a massa do frasco cheio (g)

0.7915 is the density of methanol (20°C)

Esta solução é estável durante um mês quando armazenada a -18 °C no escuro. Armazenar a solução num frasco de vidro âmbar.

5.2.2. Controlo da solução padrão do Benzeno 1000 mg/l (solução código SL-045-02)

INTERNATIONAL COUNCIL OF Beverages ASSOCIATIONS

WASHINGTON, DC · BRUSSELS · TOKYO

Preparar uma solução padrão de benzeno 1000 mg/l usando o mesmo procedimento tal como descrito em 5.2.1. Esta solução é estável durante um mês quando armazenada a -18 °C no escuro. Armazenar a solução num frasco de vidro âmbar.

5.2.3. Solução de Benzeno a 2 ppm (solução código SL-045-03)

Pesar um frasco volumétrico de 50 ml com rolha, seco e vazio com uma precisão de 0.1 mg (m4). Colocar +/- 45 ml de metanol no frasco volumétrico. Usando uma seringa de 0.25 ml adicionar 0.1 ml de solução padrão de benzeno 1000 mg/l (5.2.1). Registrar o peso da solução adicionada (m5). Completar pela marca com metanol e determinar o peso do frasco cheio com a rolha. (m6).

A concentração exacta da solução é calculada como segue:

$$C2 = ((m5)/(m6-m4)) * C1 \text{ (mg/l)}$$

Onde

C2 é a concentração da solução de benzeno

m4 é a massa do frasco vazio (g)

m5 é a massa do benzeno adicionado na solução padrão 1000 mg/l (mg)

m6 é a massa do frasco cheio (g)

C1 é a concentração da solução padrão de benzeno 1000 mg/l (5.2.1)

Esta solução é estável durante um mês quando armazenada a -18 °C no escuro. Armazenar a solução num frasco de vidro âmbar.

5.2.4. Controlar a solução padrão do benzeno a 2 ppm (código da solução SL-045-04)

Pesar um frasco volumétrico de 50 ml, seco e vazio, com rolha com uma precisão de 0.1 mg (m7). Colocar +/- 45 ml de metanol no frasco. Usando uma seringa de 0.25 ml adicionar 1 ml de benzeno e controlar a solução padrão de 1000 mg/l (5.2.2). Registrar o peso da solução adicionada (m8). Completar até à marca com metanol e determinar o peso do frasco cheio com a rolha. (m9).

A concentração exacta da solução trabalhada é calculada como segue:

$$C3 = ((m8)/(m9-m7)) * C \text{ concentr (mg/l)}$$

Onde

C3 é a concentração da solução de benzeno a controlar

m7 é a massa do frasco vazio (g)

m8 é a massa do benzeno adicionado à solução padrão 1000 mg/l (mg)

m9 é a massa do frasco cheio (g)

A concentração da solução de benzeno padrão 1000 mg/l 5.2.2.

Esta solução é estável durante um mês quando armazenada a -18 °C no escuro. Armazenar a solução num frasco de vidro âmbar.

5.2.5. Standard Interno da solução padrão 1000 ppm (código da solução SL-045-05)

INTERNATIONAL COUNCIL OF Beverages ASSOCIATIONS

WASHINGTON, DC · BRUSSELS · TOKYO

Pesar um frasco volumétrico de 50 ml, seco e vazio, com rolha com uma precisão de 0.1 mg. (**m10**) numa balança analítica. Colocar 25 ml de metanol (5.1.5) no frasco volumétrico. Pesar \pm 50 mg de benzeno-d6 (5.1.3) para o frasco e tomar nota do peso exacto (**m11**). Completar até à marca com metanol e fechar. Ter a certeza que o benzeno foi directamente adicionado ao metanol (não deve haver contacto com a superfície interior). Determinar o peso do frasco com a solução e a rolha com uma precisão de 0.1 mg (**m12**). A concentração exacta de cada padrão é calculado como segue:

$$C4 = (m10 / ((m11 - m9) / 0.7915)) * 1000 \text{ (mg/l)}$$

Onde

C4 é a concentração da solução standard interna stock

m9 é a massa do frasco volumétrico vazio com rolha (g)

m11 é a massa do frasco volumétrico com rolha com a solução (g)

m10 é a massa do standard interno (mg)

0.7915 é a densidade do metanol (20°C)

Esta solução é estável durante um mês quando armazenada a -18 °C no escuro. Armazenar a solução num frasco de vidro âmbar.

5.2.6. Standard interno de suma solução padrão a 1 ppm (código da solução SL-045-06)

colocar \pm 40 ml de metanol (5.1.5) num frasco volumétrico de 50 ml. Injectar 50 μ l da solução padrão (5.2.5) usando uma seringa de 0.25 ml sobre a superfície do metanol. Ajustar pela marca com metanol. Esta solução é estável durante um mês quando armazenada a -18 °C no escuro. Armazenar a solução num frasco de vidro âmbar.

5.2.7. VOC calibração padrão (0.4 – 4 ppb) e controlo do padrão a 1 ppb

Todas as soluções padrões têm que ser preparadas com água ultra pura e fria (5.1.1)

Preparar a calibração padrão como segue:

5.2.7.1. 0.4 ppb: Pesar +/- 3.5 gr of NaCl (5.1.6) para um frasco até 20 ml “headspace”. Pipetar 10 ml de água ultra pura e fria. Adicionar 10 μ l de solução padrão (5.2.6)

Usando uma seringa digital de 25 μ l (4.8). Adicionar 2 μ l da solução padrão do benzeno a 2 ppm (5.2.3) usando uma seringa de 10 μ l . Fechar o frasco imediatamente com uma cápsula metálica magnética.

5.2.7.2. 1 ppb: Pesar +/- 3.5 gr de NaCl (5.1.6) para um frasco de 20 ml “headspace”. Pipetar 10 ml de água ultra pura e fria. Adicionar 10 μ l de solução padrão (5.2.6) usando uma seringa digital de 25 μ l (4.8). Adicionar 5 μ l de solução padrão de benzeno a 2 ppm (5.2.3) usando uma seringa de 25 μ l. Fechar o frasco imediatamente com uma cápsula metálica magnética.

5.2.7.3. 2 ppb: Pesar +/- 3.5 gr de NaCl (5.1.6) para um frasco de 20 ml headspace. Pipetar 10 ml de água ultra pura e fria. Adicionar 10 μ l de solução padrão (5.2.6) usando uma seringa digital de 25 μ l (4.8). Adicionar 10 μ l de benzeno trabalhando a solução 2 ppm (5.2.3) usando uma seringa de 25 μ l. Fechar o frasco imediatamente com uma cápsula metálica magnética.

INTERNATIONAL COUNCIL OF Beverages ASSOCIATIONS

WASHINGTON, DC · BRUSSELS · TOKYO

5.2.7.4. 4 ppb: Pesar +/- 3.5 gr de NaCl (5.1.6) para um frasco de 20 ml com “headspace”. Pipetar 10 ml de água ultra pura e fria. Adicionar 10 µl da solução padrão (5.2.6) usando uma seringa digital de 25 µl (4.8). Adicionar 20 µl de solução padrão de benzeno a 2 ppm (5.2.3) usando uma seringa de 25 µl . Fechar o frasco imediatamente com uma cápsula metálica magnética.

5.2.7.5. Contr 1 ppb: Pesar +/- 3.5 gr de NaCl (5.1.6) para um frasco de 20 ml com “headspace”. Pipetar 10 ml de água ultra pura e fria. Adicionar 10 µl de solução padrão (5.2.6) usando uma seringa digital de 25 µl (4.8). Adicionar 5 µl de solução padrão de benzeno 2 ppm (5.2.4) usando uma seringa de 25 µl. Fechar o frasco imediatamente com uma cápsula metálica magnética.

5.2.8. Hidróxido de sódio a 30 %

Pesar +/- 60 g de hidróxido de sódio (5.1.5) para um frasco de vidro limpo para preparação da solução adicionar 200 ml de água ultra pura e fria..

Dissolver o hidróxido de sódio e arrefecer á temperatura ambiente.

6. ARMAZENAGEM DAS AMOSTRAS

As amostras devem ser armazenadas a 4 °C no escuro.

7. PROCESSO

7.1. Pré tratamento das amostras

Para amostras de bebidas carbonatadas adicionar 1 ml de hidróxido de sódio a 30% para um frasco de 40 ml e encher até cima com a amostra. Fechar o frasco com um septo de PTFE com uma rosca metálica.

As amostras das bebidas não carbonatadas não necessitam de pré tratamento.

7.2 Preparação da amostra para o ensaio em branco

Pesar +/- 3.5 g NaCl (5.1.6) para um frasco de 20 ml com “headspace”. Pipetar 10 ml da amostra para o frasco de 20 ml com “headspace” (4.3). Adicionar 10 µl da solução padrão (5.2.6) usando uma seringa digital de 25 µl. O frasco deve ser fechado com cápsula metálica magnética com um septo de silicone/PTFE.

Para a preparação do ensaio em branco, a 10 ml de água ultra pura é tratada da mesma forma que a amostra.

7.2. Preparação do auto amostrador com “headspace”.

Colocar os frascos num tabuleiro de Combipal com “headspace” e auto amostrar. Os frascos devem ser analisados pela seguinte ordem:

branco - calibração padrão - branco – controlar solução padrão 1 ppb – amostras – controlar standard 1 ppb

INTERNATIONAL COUNCIL OF Beverages ASSOCIATIONS

WASHINGTON, DC · BRUSSELS · TOKYO

Depois de cada 10 amostras, deve ser controlado um padrão de 1 ppb. Indicar no software do Cycle Composer quais os frascos que devem ser analisados e começar a auto amostragem. Começar o arrefecimento crioscópico da “trap” uma vez que o tempo de termostatização quase expirou.

7.3. Software Excalibur

Preencha a tabela das amostras de acordo com as amostras a serem analisadas.

Marque as amostras dos ensaios em branco e as amostras desconhecidas com a calibração do padrão.

Use nomes de arquivo apropriados para guardar as informações. Use o nome das amostras para as descrever numa forma clara. Selecione o método apropriado para a cromatografia gasosa. Os parâmetros da cromatografia gasosa são descritos no anexo 2. Guarde a tabela das amostras.

7.4. Calibração

7.5.1. Frequência da Calibração

A curva de calibração deve ser analisada pelo menos uma vez por semana. Cada dia de calibração padrão de 1 ppb deve ser analisado.

7.5.2. Tipo de calibração

Usar a curva de calibração linear, usando o padrão como referência para o cálculo.

$$Y = aX + b$$

onde

Y = resposta relativa ao factor calculado por A_s/A_i

Onde

A_s = área benzeno na amostra

A_i = área interna da amostra padrão

X = concentração do benzeno na amostra

a = inclinação da regressão linear da curva (dY/dX)

b = intercepção

8. RESULTADOS

8.1. Identificação e quantificação

A identificação dos componentes é baseada nos tempos de retenção e na massa do espectro por comparação com a literatura. Tabela 1 apresenta um indicativo das vezes de retenção dos componentes.

Estes tempos de retenção variam ligeiramente devido à idade da coluna que deve ser corrigida.

A quantificação dos componentes deve ser feita automaticamente utilizando o software com a regressão linear com um standard interno para compensação. Para amostras de bebidas carbonatadas, o factor de correcção usado é de 1,025 calculado no resultado final (ter em conta a adição de NaOH).

Subtrair os valores dos testes em branco dos resultados das amostras não é permitido.

INTERNATIONAL COUNCIL OF Beverages ASSOCIATIONS

WASHINGTON, DC · BRUSSELS · TOKYO

Tabela 1: Indicativo dos tempo de retenção dos componente a serem quantificados.

Component name	Retention time	Main ion
Benzene-d8	14,1	84
Benzene	14,17	78

8.2. Apresentação dos resultados

Os resultados são expressos em $\mu\text{g/l}$. Resultados abaixo de $0.5 \mu\text{g/l}$ devem ser apresentados como $<0.5 \mu\text{g/l}$.

9. REFERÊNCIAS

- **Método** EPA 5021A. Volatile organic compounds in various samples matrices using equilibrium headspace analysis.
- **Método** EPA 8260B Volatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry.
- **Método** EPA 524.2 Measurement of Purgable organic compounds in water by capillary column gas chromatography/mass spectrometry.

Apêndice 1: Combipal headspace parameters

Nome do método : VOC-25min-benz

Temperatura de incubação: $60 \text{ }^\circ\text{C}$

Tempo de Incubação: 25 min

Temperatura da seringa: $90 \text{ }^\circ\text{C}$

Velocidade do agitador: 500 rpm

Tempo de agitação: 2 sec

Tempo do agitador parado: 5 sec

Velocidade de enchimento: $250 \mu\text{l/sec}$

Velocidade de injeção: $15 \mu\text{l/sec}$

Tempo de trabalho do GC : 30 min

Apêndice 2: Parâmetros do GC/MS

Nome do método : VOC-20-benzeno

Parâmetros do MS :

Tempo de aquisição: 16 min

Temperatura da fonte : $280 \text{ }^\circ\text{C}$

Scan mode : Cheio scal

Scan rate : 750 amu/s

INTERNATIONAL COUNCIL OF Beverages ASSOCIATIONS

WASHINGTON, DC · BRUSSELS · TOKYO

Scan range : 40-250 amu

GC parameters:

Método do forno:

Temp inicial : 40 °C

Tempo inicial: 5 min

Proporção 1: 5 °C/min

Temp 1: 90 °C

Tempo de residência 1: 0 min

Proporção 2: 80 °C/min

Temp 2: 300 °C

Tempo de residência 2: 5 min

Método de injeção:

Temp. de injeção: 230 °C

Modo: Splitless

Splitless time: 6 min

Split flow: 25 ml/min

Método do Caudal:

Modo: Caudal constante

Caudal: 1 ml/min

Apêndice 3: Exemplo de um cromatograma

RT: 13.22 - 14.99

