
CONSIGLIO INTERNAZIONALE DELLE ASSOCIAZIONI DI BEVANDE

WASHINGTON, DC · BRUXELLES · TOKYO

*Linee guida ICBA per mitigare la
potenziale formazione di benzene nelle
bevande*

Secretariat 2005-2006

UNESDA - Union of European Beverages Associations

Boulevard Saint Michel 77-79, B-1040 Brussels, Belgium

Tel: 32 2 743 40 50 Fax: 32 2 732 51 02 · E-mail: icba@agep.be

www.icba-net.org

Linee guida ICBA per mitigare la potenziale formazione di benzene nelle bibite

INDICE

1. Introduzione	Pagina 3
2. Background	Pagina 3-4
3. Fattori di attivazione ed attenuazione della formazione di benzene nelle bevande	Pagina 4
4. Raccomandazioni chiave dell'ICBA per i produttori di bevande in relazione alla formazione di benzene	Pagina 5
5. Riferimento: Controllo sulla presenza di benzene nelle bibite	Pagina 5
6. Riferimento: Strategie di controllo della formulazione	Pagine 6-7
Allegato: Esempi di metodi di analisi	Pagine 9-29

Linee guida ICBA per attenuare la potenziale formazione di benzene nelle bibite

1. Introduzione

L'International Council of Beverages Associations (ICBA) è un'organizzazione non governativa che rappresenta gli interessi dell'industria delle bevande a livello mondiale. I membri dell'ICBA producono, distribuiscono e vendono una gamma completa di bevande non alcoliche tra cui bevande analcoliche gassate e bevande non gassate, quali succhi di frutta, acqua, caffè e tè.

2. Background

Nel 1990-1991, l'industria delle bevande analcoliche riscontrò che in alcune bevande selezionate, sotto determinate condizioni, potevano originarsi elevati livelli di benzene. Collaborando con la US Food and Drug Administration (FDA), l'industria delle bevande analcoliche scoprì che l'utilizzo congiunto di acido ascorbico (Vitamina C), come ingrediente, e benzoato di sodio (come conservante), poteva dar luogo alla formazione di benzene. La formazione di questo composto risultava maggiore quando le bevande venivano stoccate per lunghi periodi di tempo ad alte temperature.

Anche se la frequenza ed i livelli ai quali veniva rilevata la formazione di benzene non costituivano motivo di rischio per la salute pubblica, l'industria adottò immediatamente misure proattive per riformulare i prodotti chiamati in causa, riducendo così al minimo il potenziale di formazione e garantendo comunque la massima integrità microbiologica.

Con riferimento alle bevande analcoliche e, analogamente, ad altri cibi e bevande, autorità quali la FSANZ in Australia e in Nuova Zelanda, la EU JRC in Canada, la FSA nel Regno Unito e la FDA negli Stati Uniti, utilizzano per la determinazione del rischio un approccio basato sul monitoraggio e la valutazione dell'esposizione totale. Lo studio più recente, "*Volatile Organic Compounds in Foods: A Five Year Study*", è stato condotto dalla FDA e pubblicato sul *Journal of Agriculture and Food Chemistry* nel 2003. La presenza di benzene è stata riscontrata in *tutti* gli alimenti, comprese la frutta e la verdura e fatta eccezione per il formaggio americano ed il gelato alla vaniglia. I livelli rilevati variano da 1 a 190 ppb (microgrammi per chilo). La FDA ha quindi concluso che i dati raccolti nel corso dello studio dimostrano che l'offerta di cibo americano è comparativamente sicura e che, seppure esiste il rischio di una leggera esposizione per via orale a composti organici volatili quali il benzene, l'esposizione risulta essere decisamente superiore nel caso di inalazione. Infatti, sulla base di quanto dichiarato in un articolo pubblicato il 27 febbraio 2006 sul *Food Chemical News*, un funzionario del *Center for Food Science and Applied Nutrition* della FDA ha dichiarato che i prodotti alimentari sono responsabili solo nella misura percentuale del 5% dell'esposizione complessiva al benzene. Altri studi sono giunti a conclusioni simili. Tra questi: lo studio "UK-MAFF Food Surveillance N. 58 – Benzene and other Aromatic Hydrocarbons in Food-Average UK Dietary Intakes – Marzo 1995"; lo studio condotto dall'EU Joint Research Centre, HEXPOC, 2005, "Human Exposure

CONSIGLIO INTERNAZIONALE DELLE ASSOCIAZIONI DI BEVANDE

WASHINGTON, DC · BRUXELLES · TOKYO

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

Alla luce di ciò, l'industria ha adottato un approccio responsabile per evitare/ridurre al minimo la presenza di benzene nelle bevande. Oggi, proprio in considerazione del fatto che l'industria delle bevande continua a svilupparsi ed ad espandersi, l'International Council of Beverages Associations (ICBA) ha rinnovato il proprio impegno nel fornire linee guida mirate ad evitare/ridurre al minimo la formazione di benzene. Queste linee guida sono a disposizione di *tutti* i produttori di bevande al mondo, indipendentemente dalla loro associazione o meno all'ICBA. Contestualmente, il Consiglio ha cercato di concertare gli sforzi attraverso le Associazioni Membri, per fornire tali informazioni a tutte le aziende produttrici di bevande.

3. Fattori di attivazione ed attenuazione della formazione di benzene nelle bevande

3.1 Fattori di attivazione che potrebbero dar vita alla formazione di benzene nelle bevande

***Driver Primario:** La formazione di benzene potrebbe verificarsi a livello di parti per miliardo (microgrammi per chilo) in alcune formulazioni di bevande che contengono contemporaneamente benzoato di sodio o di potassio ed acido ascorbico.⁽¹⁾ I livelli aumentano con calore e/o luce. Il calore costituisce il fattore predominante.

* Alcuni studi suggeriscono che l'acido eritorbico – quando ammesso – potrebbe provocare la formazione di benzene al pari dell'acido ascorbico.

* La formazione di benzene potrebbe verificarsi quando i succhi o altri ingredienti, contenenti fonti di acido benzoico ed acido ascorbico (allo stato naturale o artificiale), vengono utilizzati per la formulazione di bevande.

3.2 Fattori attenuanti che potrebbero mitigare la formazione di benzene nelle bevande che contengono fonti di acido benzoico ed acido ascorbico

* Ingredienti quali i dolcificanti nutrizionali (zucchero, sciroppo ad alto contenuto di fruttosio o amido) ed acido etilendiamminotetraacetico disodio di calcio (EDTA) - quando ammesso - o poli (o esameta) fosfato di sodio, potrebbero attenuare la formazione di benzene.

* I risultati dei test effettuati indicano che i dolcificanti nutrizionali ritardano la reazione, atteso che il fenomeno sembra essere più marcato nel caso delle bevande dietetiche. Tuttavia, qualora siano già presenti segnali precursori della formazione di benzene, più il prodotto rimane sugli scaffali, maggiore è il potenziale di formazione.

* I risultati dei test effettuati suggeriscono anche che l'EDTA – quando ammesso – potrebbe attenuare la reazione, possibilmente “complessando” gli ioni di metallo che

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

CONSIGLIO INTERNAZIONALE DELLE ASSOCIAZIONI DI BEVANDE

WASHINGTON, DC · BRUXELLES · TOKYO

potrebbero agire da catalizzatori. Il grado di attenuazione potrebbe essere ridotto nel caso di prodotti che contengono calcio o oli minerali – soprattutto se utilizzati come ricostituenti – visto che tali sostanze potrebbero interferire con l'azione attenuante.

4. **Raccomandazioni chiave dell'ICBA ai produttori bevande in relazione alla formazione di benzene**

Tenendo in debita considerazione i fattori di attivazione ed attenuazione della formazione di benzene nelle bevande, così come sopra specificati (sezione 3), l'ICBA consiglia quanto segue:

- ✓ **RACCOMANDAZIONE 1: RIESAME**
Tutte le aziende che producono bevande saranno tenute a **riesaminare i prodotti esistenti e le nuove formulazioni** tenendo conto delle informazioni relative alle procedure per la prevenzione/riduzione al minimo della formazione di benzene.
- ✓ **RACCOMANDAZIONE 2: TEST**
Tutte le aziende che producono bevande saranno tenute ad **effettuare campionamenti analitici degli specifici prodotti** per rilevare la presenza di benzene attraverso test di stoccaggio accelerati (*per maggiori dettagli sui test, fare riferimento alla sezione 5 di cui sotto*).
- ✓ **RACCOMANDAZIONE 3: RIFORMULAZIONE**
Tutte le aziende che producono bevande saranno tenute a **riformulare qualsiasi prodotto interessato**, in cui potrebbe essere presente il benzene, al fine di evitarne/ridurne al minimo la formazione.
- ✓ **RACCOMANDAZIONE 4: MONITORAGGIO SUCCESSIVO AL LANCIO**
Come parte integrante del processo di valutazione e campionamento diretto sul mercato da parte delle aziende produttrici di bevande, le aziende stesse sono tenute a **confirmare che le nuove formulazioni o riformulazioni saranno efficaci nella prevenzione/riduzione al minimo della formazione di benzene**.

5. **Riferimento: Test per rilevare la presenza di benzene nelle bevande**

5.1 Test accelerati

Si dovrebbe procedere a test accelerati per le formulazioni di prodotti che contengono fonti di acido benzoico, tra cui benzoato ed acido ascorbico aggiunto. Le condizioni specifiche del test potranno variare da produttore a produttore ma dovrebbero includere anche condizioni di durata e temperatura che coprano le normali condizioni di distribuzione dello specifico prodotto. Come punto di partenza, i produttori potrebbero considerare l'opportunità di assoggettare le formulazioni di prodotti a temperature pari a 40-60 gradi C per 24 ore o per una durata superiore, a seconda della formulazione. Ad

CONSIGLIO INTERNAZIONALE DELLE ASSOCIAZIONI DI BEVANDE

WASHINGTON, DC · BRUXELLES · TOKYO

esempio, alcune formulazioni di prodotto richiedono 24 giorni di sottoposizione al test accelerato per consentire di poter successivamente valutare il potenziale di reazione.

5.2 Procedure analitiche

Dovranno essere convalidate procedure analitiche affidabili per la rilevazione della presenza di benzene attraverso trials specifici o tramite il ricorso a laboratori esterni accreditati, in grado di rilevare almeno 5 ppb (microgrammi/kg) di benzene nelle bevande. (Fare riferimento all'Allegato per esempi di metodologie).

6. Riferimento: Strategie di controllo della formulazione

Come sopra rilevato, i fattori che danno vita alla formazione di benzene nelle bevande si individuano generalmente nella combinazione di fonti di acido benzoico, acido ascorbico, calore e durata. Tuttavia, ulteriori elementi per il controllo (CP) che i produttori di bevande sono tenuti a considerare quando formulano un nuovo prodotto includono anche:

◆ Contenuto di acqua nel prodotto

? deve conformarsi ai requisiti indicati nelle normative locali, compresi i livelli massimi consentiti di benzene per l'acqua potabile. *Fare anche riferimento alla sezione 'Metalli di transizione'.*

CP – controllo di benzene nell'acqua

◆ Zuccheri (Dolcificanti nutrizionali)

? sembrano rallentare la formazione di benzene, sebbene non la inibiscano totalmente.

◆ Succhi di frutta

? possono essere prodotti "con conservanti", con l'aggiunta di benzoato – quando ammesso – e/o con fonti naturali di acido benzoico

CP – riesaminare le specifiche con il fornitore per controllare o eliminare il benzoato

? potrebbero rappresentare una fonte di acido ascorbico (aggiunta o naturale)

CP – analizzare l'ascorbato o richiederne i livelli al produttore

◆ Dolcificanti intensi

? E' solitamente nei prodotti dietetici/light che, in presenza di segnali precursori, il potenziale di formazione di benzene risulta essere maggiore.

◆ Biossido di carbonio o anidride carbonica

? garantire la conformità ai requisiti locali o agli standard dell'International Society of Beverage Technologists (ISBT), pari a 20 ppb (microgrammi/kg) di livello massimo di benzene consentito.

CP – specifiche del produttore ed analisi con controlli

CONSIGLIO INTERNAZIONALE DELLE ASSOCIAZIONI DI BEVANDE

WASHINGTON, DC · BRUXELLES · TOKYO

◆ Acidi

? A basso pH, l'acido ascorbico e/o l'acido eritrobico, reagendo con fonti di acido benzoico, possono dar vita ad una maggiore formazione di benzene.

◆ Aromi/agenti addensanti

? Gli aromi, le emulsioni e gli addensanti potrebbero contenere conservanti ed antiossidanti
CP – riesaminare le specifiche con il fornitore per controllare o eliminare il benzoato

? Anche il benzaldeide e l'acido ascorbico possono formare benzene

CP – controllare l'eventuale presenza di benzaldeide

◆ Coloranti

? potrebbero contenere ascorbato come antiossidante per prevenire lo scolorimento

CP – controllare con i fornitori e ri-specificare se necessario

◆ Conservanti

Le bevande devono essere prodotte in condizioni altamente igieniche, conformemente ai principi HACCP

? Considerare l'uso di miscele di sorbato e benzoato, nel caso di necessità tecnica (stabilità microbiologica e solubilità del sorbato).

CP – Considerare la possibilità di rimuovere/ridurre/sostituire il benzoato con il sorbato o con altri sistemi conservanti. Attenzione: il sorbato potrebbe precipitare in sciroppi diluibili o post-miscelazione (fontane)

? Prodotti diluibili: (Succhi e simili solitamente in concentrazioni quintuplicate, diluiti prima del consumo) stante la frequente apertura durante la vita del prodotto, richiedono conservanti.

CP – Considerare la possibilità di rimuovere/ridurre/sostituire il benzoato con sorbato o altri sistemi conservanti.

Attenzione: il sorbato deve essere utilizzato con la massima attenzione per evitare la precipitazione. Considerare la possibilità di utilizzare alternative all'acido ascorbico, se presente.

◆ Antiossidanti

? considerare la possibilità di utilizzare ascorbato nella formula generale, nell'ipotesi usuale in cui siano presenti succhi di limone o conduttori naturali di ascorbato.

CP – Rimuovere/ridurre/sostituire, a seconda dei casi, l'ascorbato, quando è presente una fonte di acido benzoico

◆ Luce

? La presenza di raggi UV potrebbe favorire la formazione di radicali liberi nei prodotti

CP – Riesaminare le condizioni di stoccaggio e di vita sugli scaffali, oltre che le istruzioni per l'etichettatura

CONSIGLIO INTERNAZIONALE DELLE ASSOCIAZIONI DI BEVANDE

WASHINGTON, DC · BRUXELLES · TOKYO

◆ Temperatura

? accelera la formazione di benzene, qualora siano presenti segnali precursori

CP – Riesaminare le condizioni di stoccaggio e di vita sugli scaffali, oltre che le istruzioni per l'etichettatura

◆ Metalli di transizione

? tracce di ioni di metallo, quali rame e ferro, potrebbero agire da catalizzatori della formazione di benzene nelle bevande, in presenza di fonti di acido benzoico e acido ascorbico. Tra le fonti di metalli di transizione è possibile annoverare acqua, dolcificanti ed altri ingredienti.

CP- Composti chelanti quali l'EDTA (quando ammesso) o i polifosfati di sodio potrebbero attenuare la formazione di benzene. L'aggiunta di calcio o altri minerali potrebbe ridurre l'effetto in esame.

ALLEGATO: ESEMPI DI METODI DI ANALISI

Attenzione: I seguenti metodi di analisi rappresentano raccomandazioni ed esempi non vincolanti, fruibili dalle aziende ove ritenuto opportuno.

**Determinazione del benzene nelle bevande gassate e non gassate – gascromatografia con campionamento in spazio di testa Purge/trap GC/MS
Quantificazione di tracce di livelli di benzene nelle bevande analcoliche gassate e nei succhi**

1. Determinazione del benzene nelle bevande gassate e non gassate – gascromatografia con campionamento in spazio di testa

1. PORTATA E SCOPO

Questo metodo descrive la gascromatografia con l'utilizzo di un campionamento in spazio di testa per l'individuazione della presenza di benzene nelle bevande analcoliche gassate e non gassate.

2. RESPONSABILITÀ

2.1. Tecnici di laboratorio adeguatamente formati saranno incaricati della preparazione dei reagenti e della conduzione delle analisi. Saranno anche responsabili della registrazione dei risultati del campione e dell'adeguato controllo del campione sui moduli specifici relativi ai valori grezzi. Dovranno valutare criticamente i dati ottenuti ed applicare qualsiasi strumento e metodo utile al monitoraggio dei dati stessi, attraverso calibrazioni e controlli.

2.2. I direttori dei laboratori sono responsabili della verifica dell'efficacia della procedura. Dovranno garantire un supporto qualificato per valutare i metodi ed i risultati.

2.3. Il direttore di laboratorio dovrà accertarsi che il laboratorio abbia a disposizione tutte le risorse necessarie (apparecchiature e personale) per effettuare test, controlli e calibrazioni in maniera adeguata.

3. PRINCIPIO

Il campione viene scaldato in una fiala con spazio di testa chiuso per ottenere il necessario equilibrio tra la concentrazione di benzene nello spazio vuoto sopra il campione e la concentrazione nel campione stesso.

Prima dell'analisi, i campioni gassati sono sottoposti a trattamento con idrossido di sodio per neutralizzare l'anidride carbonica. Per aumentare l'efficienza nello spazio vuoto del benzene, nella fiala viene aggiunto un modificatore di matrice (cloruro di sodio). Dopo aver ottenuto il

CONSIGLIO INTERNAZIONALE DELLE ASSOCIAZIONI DI BEVANDE

WASHINGTON, DC · BRUXELLES · TOKYO

perfetto equilibrio, un'aliquota di fase gassosa viene iniettata in un gascromatografo. Per ottenere la maggiore sensibilità, il benzene viene intrappolato in una trap a freddo prima dell'iniezione in una colonna capillare. I componenti sono rilevati con un rilevatore di spettrometria di massa (MS) nella modalità di scansione completa. L'identificazione si basa sul tempo di ritenzione e sul confronto con gli spettri di massa in archivio. La quantificazione si basa sull'intensità dello ione principale utilizzando una calibrazione a quattro punti ed il metodo con lo standard interno.

4. APPARECCHIATURE E VETRERIA

- 4.1. Le adeguate apparecchiature da laboratorio
- 4.2. Matracci volumetrici con tappi in vetro
- 4.3. Fiale da 20 ml con spazio di testa e tappi in vetro a strozzatura
- 4.4. Spettrometro di massa Finnigan Trace GC- DSQ- con auto-campionatore Combipal con spazio di testa configurazione (GC210 o 212)
- 4.5. Colonna capillare: Restek RTX-1 60m * 1µm df * 0,25 mm ID
- 4.6. Generatore di acqua ultra pura: Millipore MilliQ (PW202 o 203)
- 4.7. Siringhe graduate Hamilton (10, 25 e 50 µl)
- 4.8. Siringa digitale Hamilton da 25 µl
- 4.9. Bilancia analitica (AB201, 202 o 203)

5. REAGENTI E SOLUZIONI

5.1. REAGENTI

- 5.1.1. Acqua ultra pura raffreddata a 4°C
- 5.1.2. Benzene (CHBEN92)
- 5.1.3. Benzene-d6 (CHBEN91)
- 5.1.4. Metanolo, grado purgato e trap (CHMET05)
- 5.1.5. Idrossido di sodio (CHSOH04)
- 5.1.6. Cloruro di sodio (CHSOC05)

5.2. SOLUZIONI

Utilizzare solo matracci volumetrici con tappi in vetro (4.2)

5.2.1. Soluzione madre di benzene da 1000 mg/l (codice soluzione SL-045-01)

Pesare un matraccio vuoto ed asciutto da 50 ml con tappo con una precisione pari a 0,1 mg (**m1**) sulla bilancia analitica (AB201).

Versare 25 ml di metanolo (5.1.4) nel matraccio volumetrico; successivamente spostare il matraccio sulla bilancia e sottrarre la tara. Utilizzando una pipetta pasteur, aggiungere +/- 50 mg di benzene (5.1.2) e determinarne il peso corretto. (**m2**). Controllare che il benzene sia aggiunto direttamente al metanolo (senza contatto con la superficie interna). Portare a volume fino alla tacca con metanolo.

Determinare il peso del matraccio con la soluzione ed il tappo con una precisione pari a 0,1 mg (**m2**).

La concentrazione esatta dello standard utilizzato viene calcolata come segue:

CONSIGLIO INTERNAZIONALE DELLE ASSOCIAZIONI DI BEVANDE

WASHINGTON, DC · BRUXELLES · TOKYO

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

In cui

C1 è la concentrazione della soluzione stoccata di benzene (mg/l)

m1 è la massa del matraccio vuoto (g)

m2 è la massa del benzene (mg)

m3 è la massa del matraccio pieno (g)

0,7915 è la densità del metanolo (20°C)

La soluzione rimane stabile per 3 mesi se stoccata a -18°C al buio. Stoccare la soluzione in un matraccio color ambra.

5.2.2. Soluzione madre di controllo del benzene da 1000 mg/l (codice soluzione SL-045-02)

Preparare una soluzione madre di controllo del benzene indipendente da 1000 mg/l utilizzando la stessa procedura descritta nel paragrafo 5.2.1.

La soluzione rimane stabile per 3 mesi se stoccata a -18°C al buio. Stoccare la soluzione in un matraccio color ambra.

5.2.3. Soluzione esaminata aggiuntiva di benzene da 2 ppm (codice soluzione SL-045-03)

Pesare un matraccio vuoto ed asciutto da 50 ml con tappo con una precisione pari a 0,1 mg (**m4**).

Versare +/- 45 ml di metanolo nel matraccio. Utilizzando una siringa da 0,25 ml aggiungere 0,1 ml di soluzione madre di benzene 1000 mg/l (5.2.1.) Registrare il peso della soluzione aggiunta (**m5**). Portare a volume fino alla tacca con metanolo e determinare il peso del matraccio pieno con tappo. (**m6**).

La concentrazione esatta dello standard utilizzato viene calcolata come segue:

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

In cui

C2 è la concentrazione della soluzione aggiuntiva esaminata del benzene

m4 è la massa del matraccio vuoto (g)

m5 è la massa della soluzione madre di controllo di benzene aggiunta 1000 mg/l (mg)

m6 è la massa del matraccio pieno (g)

C1 è la concentrazione della soluzione stoccata di benzene 1000 mg/l (5.2.1)

La soluzione rimane stabile per 3 mesi se stoccata a -18°C al buio. Stoccare la soluzione in un matraccio color ambra.

5.2.4. Soluzione aggiuntiva di controllo del benzene da 2 ppm (codice soluzione SL-045-04)

Pesare un matraccio vuoto ed asciutto da 50 ml con tappo con una precisione pari a 0,1 mg (**m7**).

Versare +/- 45 ml di metanolo nel matraccio. Utilizzando una siringa da 0,25 ml aggiungere 0,1 ml di soluzione madre di benzene 1000 mg/l (5.2.2.) Registrare il peso della soluzione aggiunta (**m8**). Portare a volume fino alla tacca con metanolo e determinare il peso del matraccio pieno con tappo. (**m9**).

La concentrazione esatta dello standard utilizzato viene calcolata come segue:

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

In cui

C3 è la concentrazione della soluzione aggiuntiva di controllo del benzene

m7 è la massa del matraccio vuoto (g)

m8 è la massa della soluzione madre di controllo di benzene aggiunta 1000 mg/l (mg)

CONSIGLIO INTERNAZIONALE DELLE ASSOCIAZIONI DI BEVANDE

WASHINGTON, DC · BRUXELLES · TOKYO

m9 è la massa del matraccio pieno (g)

Ccontr è la concentrazione della soluzione stoccata di benzene 1000 mg/l (5.2.2)

La soluzione rimane stabile per 3 mesi se stoccata a -18°C al buio. Stoccare la soluzione in un matraccio color ambra.

5.2.5. Soluzione madre dello standard interno da 1000 ppm (codice soluzione SL-045-05)

Pesare un matraccio vuoto ed asciutto da 50 ml con tappo con una precisione pari a 0,1 mg (m10) sulla bilancia analitica. Versare +/- 25 ml (5.1.5) di metanolo nel matraccio.

Pesare e versare ± 50 mg di benzene-d6 (5.1.3) nel matraccio e prendere nota del peso esatto (m11). Portare a volume fino alla tacca con metanolo e chiudere il matraccio. Controllare che il benzene sia aggiunto direttamente al metanolo (senza contatto con la superficie interna).

Determinare il peso del matraccio con la soluzione ed il tappo con una precisione pari a 0,1 mg (m12).

La concentrazione esatta dello standard utilizzato viene calcolata come segue:

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

In cui

C4 è la concentrazione della soluzione madre dello standard interno

m9 è la massa del matraccio vuoto con il tappo (g)

m11 è la massa del matraccio vuoto con il tappo (g)

m10 è la massa dello standard interno (mg)

0,7915 è la densità del metanolo (20°C)

La soluzione rimane stabile per 3 mesi se stoccata a -18°C al buio. Stoccare la soluzione in un matraccio in vetro ambra a 18°C al buio.

5.2.6. Soluzione aggiuntiva dello standard interno da 1 ppm (codice soluzione SL-045-06)

Versare ± 40 ml di metanolo (5.1.5) nel matraccio da 50 ml. Iniettare 50 µl di soluzione madre dello standard interno (5.2.5) utilizzando una siringa da 0,25 ml sotto la superficie del metanolo. Portare a volume fino alla tacca con metanolo. La soluzione rimane stabile per 3 mesi se stoccata a -18°C al buio. Stoccare la soluzione in un matraccio in vetro ambra a 18°C al buio.

5.2.7. Standard di calibrazione VOC (0,4 – 4 ppb) e standard di controllo 1 ppb

Tutti gli standard di calibrazione sono stati preparati con acqua pura raffreddata (5.1.1)

Preparare lo standard di calibrazione come segue:

5.2.7.1. 0,4 ppb: Pesare e versare +/- 3,5 g di NaCl (5.1.6) in una fiala 20 ml con spazio di testa. Pipettare 10 ml di acqua ultra pura raffreddata.

Aggiungere 10 µl di soluzione aggiuntiva di standard interno (5.2.6) utilizzando una siringa digitale da 25 µl (4.8).

Aggiungere 2 µl di soluzione aggiuntiva esaminata di benzene 2 ppm (5.2.3) con una siringa da 10 µl.

Chiudere immediatamente la fiala con un tappo magnetico a strozzatura.

CONSIGLIO INTERNAZIONALE DELLE ASSOCIAZIONI DI BEVANDE

WASHINGTON, DC · BRUXELLES · TOKYO

5.2.7.2. 1 ppb: Pesare e versare +/- 3,5 g di NaCl (5.1.6) in una fiala 20 ml con spazio di testa. Pipettare 10 ml di acqua ultra pura raffreddata. Aggiungere 10 µl di soluzione aggiuntiva di standard interno (5.2.6) utilizzando una siringa digitale da 25 µl (4.8). Aggiungere 5 µl di soluzione aggiuntiva esaminata di benzene 2 ppm (5.2.3) utilizzando una siringa da 25 µl . Chiudere immediatamente la fiala con un tappo magnetico a strozzatura.

5.2.7.3. 2 ppb: Pesare e versare +/- 3,5 g di NaCl (5.1.6) in una fiala 20 ml con spazio di testa. Pipettare 10 ml di acqua ultra pura raffreddata. Aggiungere 10 µl di soluzione aggiuntiva di standard interno (5.2.6) utilizzando una siringa digitale da 25 µl (4.8).

Aggiungere 10 µl di soluzione aggiuntiva esaminata di benzene 2 ppm (5.2.3) utilizzando una siringa da 25 µl . Chiudere immediatamente la fiala con un tappo magnetico a strozzatura.

5.2.7.4. 4 ppb: Pesare e versare +/- 3,5 g di NaCl (5.1.6) in una fiala 20 ml con spazio di testa. Pipettare 10 ml di acqua ultra pura raffreddata. Aggiungere 10 µl di soluzione aggiuntiva di standard interno (5.2.6) utilizzando una siringa digitale da 25 µl (4.8). Aggiungere 20 µl di soluzione aggiuntiva esaminata di benzene 2 ppm (5.2.3) utilizzando una siringa da 25 µl . Chiudere immediatamente la fiala con un tappo magnetico a strozzatura.

5.2.7.5. Contr 1 ppb: Pesare e versare +/- 3,5 g di NaCl (5.1.6) in una fiala 20 ml con spazio di testa. Pipettare 10 ml di acqua ultra pura raffreddata. Aggiungere 10 µl di soluzione aggiuntiva di standard interno (5.2.6) utilizzando una siringa digitale da 25 µl (4.8). Aggiungere 5 µl di soluzione aggiuntiva esaminata di benzene 2 ppm (5.2.4) utilizzando una siringa da 25 µl . Chiudere immediatamente la fiala con un tappo magnetico a strozzatura.

5.2.8. Idrossido di sodio al 30%

Pesare +/- 60 g di idrossido di sodio (5.1.5) in un beaker in vetro pulito ed aggiungere 200 ml di acqua ultrapura.

Sciogliere l'idrossido di sodio e permettere il raffreddamento a temperatura ambiente.

6. STOCAGGIO DEL CAMPIONE

I campioni devono essere stoccati a 4°C al buio.

7. PROCEDURA

7.1. Pre-trattamento dei campioni

Per i campioni gassati, aggiungere 1 ml di idrossido di sodio al 30% in una fiala da 40 ml e riempire la fiala completamente con il campione. Chiudere la fiala con un setto PTFE con tappo a vite

I campioni non gassati non sono pre-trattati.

7.2 Preparazione del campione e della soluzione in bianco

Pesare e versare +/- 3,5 g di NaCl (5.1.6) in una fiala 20 ml con spazio di testa. Pipettare 10 ml di campione in una fiala da 20 ml con spazio di testa (4.3). Aggiungere 10 µl di soluzione

CONSIGLIO INTERNAZIONALE DELLE ASSOCIAZIONI DI BEVANDE

WASHINGTON, DC · BRUXELLES · TOKYO

aggiuntiva di standard interno (5.2.6) utilizzando una siringa digitale da 25 µl (4.8). La fiala sarà chiusa con tappo magnetico a strozzatura con un setto in silicone/PTFE.

Per la preparazione della soluzione in bianco, trattare 10 ml di acqua ultrapura come il campione.

7.2. Preparazione dell'auto-campionatore con spazio di testa.

Posizionare le fiale sul vassoio dell'auto-campionatore Combipal con spazio di testa. Le fiale sono state analizzate nel seguente ordine:

soluzione in bianco – standard di calibrazione – soluzione in bianco – standard di controllo 1 ppb – campioni – standard di controllo 1 ppb

Ogni 10 campioni viene analizzato uno standard di controllo da 1 ppb. Precisare sul software Cycle Composer quali fiale sono state analizzate ed avviare l'auto-campionatore. Avviare la trap di crio-raffreddamento una volta che è terminato il tempo di termo-statizzazione.

7.3. Software Excalibur

Completare la tabella dei campioni conformemente ai campioni da analizzare.

Identificare le soluzioni in bianco ed i campioni come sconosciuti e gli standard di calibrazione come standard.

Utilizzare i nomi dei file corretti per salvare i dati. Utilizzare il campo nome del campione per descrivere precisamente il campione. Selezionare il metodo corretto per il gascromatografo. Il parametri relativi al gascromatografo sono descritti nell'Allegato 2. Salvare ed aprire la tabella relativa ai campioni.

7.4. Calibrazione

7.5.1. Frequenza di calibrazione

Per lo meno una volta la settimana deve essere analizzata una curva di calibrazione completa.

Ogni giorno deve essere analizzato uno standard di calibrazione da 1 ppb.

7.5.2. Tipo di calibrazione

Per il calcolo viene utilizzata una curva di calibrazione lineare che utilizzi lo standard interno.

$Y = aX + b$ in cui

Y = fattore di risposta relativa calcolato per A_s/A_i

In cui A_s = area del benzene nel campione

A_i = area dello standard interno nel campione

X = concentrazione di benzene nel campione

a = pendenza della curva di regressione (dY/dX)

b = retta intersecante

8. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

8.1. Identificazione e quantificazione

L'identificazione dei componenti si basa sui tempi di ritenzione e sul confronto con gli spettri di massa già in archivio. La Tabella 1 contiene i tempi di ritenzione indicativi dei componenti.

CONSIGLIO INTERNAZIONALE DELLE ASSOCIAZIONI DI BEVANDE

WASHINGTON, DC · BRUXELLES · TOKYO

Questi tempi di ritenzione variano leggermente in seguito all'invecchiamento della colonna e devono essere corretti.

La quantificazione dei componenti viene fatta automaticamente dal software utilizzando la regressione lineare con compensazione dello standard interno. Per i campioni gassati, viene utilizzato un fattore di correzione pari a 1.025 per calcolare il risultato finale (che tenga conto del NaOH).

Non è permessa la sottrazione dei valori in bianco dai risultati relativi ai campioni.

Tabella 1: Tempi di ritenzione indicativi dei componenti da quantificare.

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

8.2. Report dei risultati

I risultati sono espressi in $\mu\text{g/l}$. Risultati inferiori a $0,5 \mu\text{g/l}$ sono precisati in '<0,5 $\mu\text{g/l}$ '.

9. RIFERIMENTI

- Metodo EPA 5021A. Composti organici volatili in diverse matrici di campioni che utilizzano analisi di equilibrio con spazio di testa.
- Metodo EPA 8260B Composti organici volatili con gascromatografia/spettrometria di massa.
- Metodo EPA 524.2 Misurazione dei composti organici purgabili in acqua per gascromatografica con colonna capillare/spettrometria di massa.

CONSIGLIO INTERNAZIONALE DELLE ASSOCIAZIONI DI BEVANDE

WASHINGTON, DC · BRUXELLES · TOKYO

Allegato 1: Parametri relativi all'auto-campionatore Combipal con spazio di testa

Nome del metodo: VOC-25min-benz

Temperatura di incubazione: 60 °C

Tempo di incubazione: 25 min

Temperatura siringa: 90 °C

Velocità agitatore: 500 giri al minuto

Tempo accensione agitatore: 2 sec

Tempo spegnimento agitatore: 5 sec

Velocità di riempimento: 250 µl/sec

Velocità di iniezione: 15µl/sec

Durata funzionamento GC: 30 min

Allegato 2: Parametri GC/MS

Nome del metodo: VOC-20-benzene

Parametri MS:

Tempo di acquisizione: 16 min

Temperatura fonte: 280 °C

Modalità scansione: Scala completa

Velocità scansione: 750 amu/s

Range di scansione: 40-250 amu

Parametri GC:

Metodo nel forno:

Temperatura iniziale: 40 °C

Tempo iniziale: 5 min

Velocità 1: 5 °C/min

Temp 1: 90 °C

Tempo di attesa 1: 0 min

Velocità 2: 80 °C/min

Temp 2: 300 °C

Tempo di attesa 2: 5 min

Metodo di iniezione:

Temperatura di iniezione: 230 °C

Modalità: Splitless

Tempo splitless: 6 min

Flusso split: 25 ml/min

Metodo di flusso:

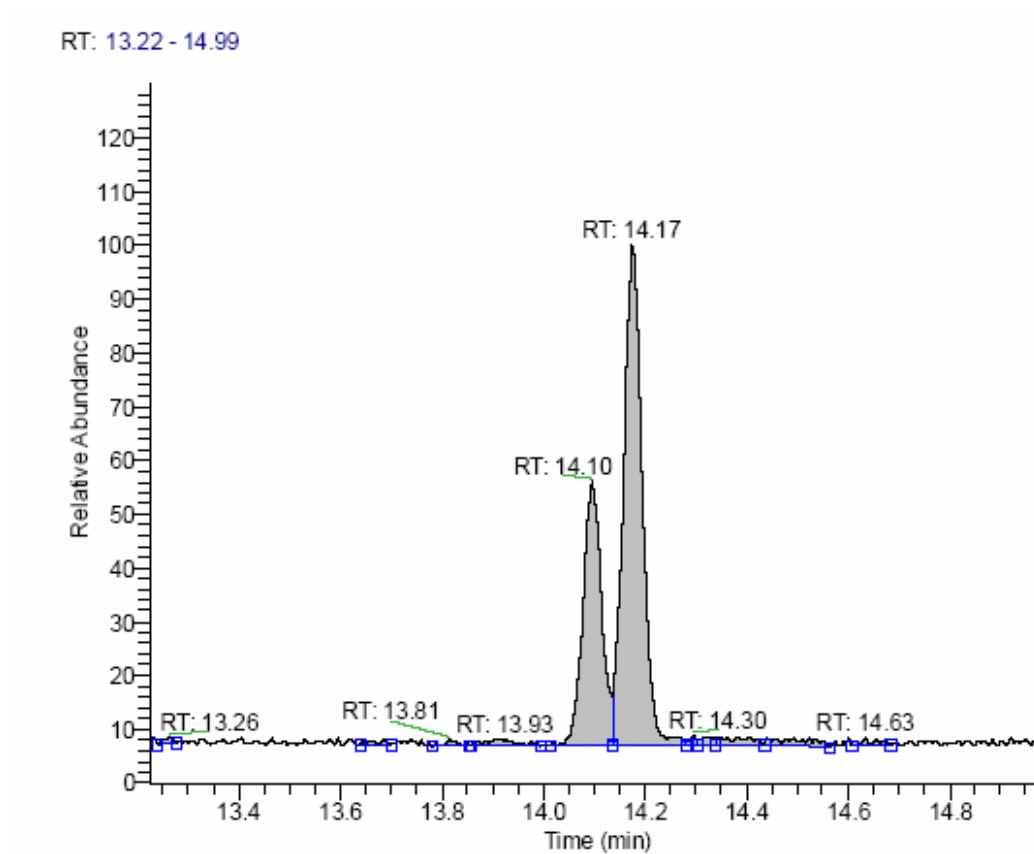
Modalità: Flusso costante

Flusso: 1 ml/min

CONSIGLIO INTERNAZIONALE DELLE ASSOCIAZIONI DI BEVANDE

WASHINGTON, DC · BRUXELLES · TOKYO

Allegato 3: Esempio di cromatogramma



CONSIGLIO INTERNAZIONALE DELLE ASSOCIAZIONI DI BEVANDE

WASHINGTON, DC · BRUXELLES · TOKYO

2. Purga/quantificazione GCMS di tracce di livelli di benzene nelle bevande analcoliche gassate e nei succhi

Sintesi:

A. Parametri per gli strumenti operativi

Per le analisi sono stati utilizzati tre strumenti di purga e trap GM/MS

1. Concentratore di purga e trap Agilent 6890/5973 #1 GC/MS, Velocità Tekmar e auto-campionatore di purga e trap Solatek Tekmar .
2. Concentratore di purga e trap Agilent 6890/5973 #2 GC/MS, EST Encon e auto-campionatore di purga e trap EST Archon 5100 .
3. Concentratore di purga e trap Agilent 6890/5973 #3 GC/MS, Velocity Tekmare auto-campionatore di purga e trap Archon (OI 4552) .

1. 6890/5973 #1

Una colonna da 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m HP-5MS (Agilent 19091S-433) viene mantenuta a 45 °C per 2 minuti e successivamente la temperatura viene aumentata di 10 °C/al minuto fino a raggiungere i 65 °C, aumentata poi di 25°C per volta fino a 250°C e mantenuta a 250°C per 5 minuti.

La porta di iniezione è settata a 225°C con un rapporto di split 50:1 ed un 4 mm ID split/splitless liner. Viene alimentato nel Velocity il gas del carrier regolato su EPC 6890. Torna poi al 6890 attraverso la linea di trasferimento riscaldata che è collegata all'uscita del GC.

La colonna è utilizzata nella modalità pressione costante a 12,33 psig con velocità nominale del flusso pari a 0,8 mL/minuto. Il saver del gas è impostato a 20 mL/minuto dopo 2 minuti di funzionamento. La colonna termina nello splitter Agilent microfluidics che trasferisce circa il 20% dell'effluente della colonna ad un μ ECD Agilent. Non sono stati raccolti dati ECD per l'analisi. Lo splitter presenta un'alimentazione del gas pari a 3,8 psig, aumentando l'uscita della colonna a più 3,8 psig rispetto alla pressione atmosferica.

La linea di trasferimento MSD è stata settata a 280°C, il Quad MS a 150°C e la Fonte MS a 230°C. L'offset del moltiplicatore elettronico corrisponde a 106 volt e la tensione del moltiplicatore a 1694 volt. E' stato utilizzato un file di accordo di ATUNE. Per l'analisi è stato utilizzato il monitoraggio selettivo degli ioni. Sono stati monitorati gli ioni m/z 77, 78 nel caso del benzene e 82, 84 nel caso dello standard interno d⁶-benzene nella modalità a bassa risoluzione. Il tempo di sosta degli ioni è di 100 minuti.

Sono stati monitorati, per il Benzene, lo ione target m/z 78, ione qualificativo 77, e per il d⁶-benzene, lo ione target m/z 84 e lo ione qualificativo 82 da 3,23 a 3,65 minuti. I tempi di ritenzione sono 3,45 minuti per il benzene e 3,43 minuti per il d⁶-benzene.

CONSIGLIO INTERNAZIONALE DELLE ASSOCIAZIONI DI BEVANDE

WASHINGTON, DC · BRUXELLES · TOKYO

Nella modalità soil è stato utilizzato un concentratore di purga e trap Velocity XPT Tekmar con un auto-campionatore Solatek. In questa modalità i campioni sono stati purgati nell'auto-campionatore in una fiala di campione da 40 mL (I-Chem Certified 200 series, Fisher Scientific 05-719-102). Il gas di purga viene trasportato verso la testa del trap del concentratore attraverso la linea di trasferimento SilcoSteel.

Viene utilizzato un trap Supelco modello J o BTEX (Supelco 21064). Si tratta di un tubo di acciaio inossidabile da 1/8", 25 cm di lunghezza con 7,7 cm di Carbpak C e 1,2 cm di Carbpak B. Le condizioni analitiche il concentratore/auto-campionatore di purga e trap sono le seguenti: Le condizioni analitiche sono impostate nel software Teklink di Tekmar che attiva il campionatore e il GC/MS quando comincia il ciclo di desorbimento.

Variabile	Valore	Variabile	Valore
Temperatura acqua di risciacquo	90 °C	Flusso pre-purga	40 mL/min
Temperatura contenitore campione	40 °C	Riscaldatore campione	Off
Temperatura ago campione	50 °C	Durata pre-riscaldamento campione	1,00 min
Temperatura linea di trasferimento	150 °C	Temperatura pre-riscaldamento	40 °C
Temperatura valvola soil	125 °C	Temperatura di purga	0 °C (impostazione di default)
Tempo stabilizzazione termica del campione	0,50 min	Flusso di purga	40 mL/min
Volume risciacquo ago	15 mL	Durata asciugatura purga	0,50 min
Durata stabilizzazione termica ago	1,00 min	Temperatura asciugatura purga	20 °C
Durata pre-riscaldamento campione	1,00 min	Flusso asciugatura purga	50 mL/min
Agitazione pre-riscaldamento	Off	Avvio GC	Avvio del Desorb.
Modalità agitazione pre-riscaldamento	Rotazione	Temperatura pre-riscaldamento desorb.	250 °C
Velocità agitazione pre-riscaldamento	5	Drenaggio Desorb.	On
Durata purga	11,00 min	Durata desorb.	2,00 min
Agitazione purga	Off	Temperatura desorb.	250 °C
Modalità agitazione purga	Agitazione	Flusso desorb.	0 ml/min (impostazione di default)
Velocità agitazione purga	5	Durata cottura	4 min

CONSIGLIO INTERNAZIONALE DELLE ASSOCIAZIONI DI BEVANDE

WASHINGTON, DC · BRUXELLES · TOKYO

Temperatura forno valvola	150 °C	Temperatura cottura	260 °C
Temperatura linea di trasferimento	150 °C	Temperatura cottura flusso di asciugatura	300 °C
Temperatura montaggio campione	90 °C	Flusso di cottura	400 ml/min
Temperatura purga pronta	35 °C	Temperatura focus	-150 °C
Temperatura standby flusso di asciugatura	200 °C	Durata iniezione	1,00 min
Flusso di standby	20 mL/min	Temperatura di iniezione	180 °C
Durata pre-purga	0,50 min	Temp. standby	100 °C

Tabella 1. Impostazioni Velocità e Solatek Tekmar

CONSIGLIO INTERNAZIONALE DELLE ASSOCIAZIONI DI BEVANDE

WASHINGTON, DC · BRUXELLES · TOKYO

2. 6890/5973 #2

Una colonna da 60 m x 0,25 mm x 1,4 µm DB-624 (Agilent 122-1364) è stata mantenuta a 40 °C per 2 minuti, aumentando poi la temperatura di 10°C al minuto fino a 180 °C, e poi di 40°C al minuto fino a 250 °C e mantenuta a 250 °C per 2 minuti. La porta di iniezione è stata impostata a 200°C con un rapporto split 40:1. Viene alimentato nel Velocity il gas del carrier regolato a EPC 6890. Torna poi al 6890 attraverso la linea di trasferimento riscaldata che è collegata all'uscita del GC.

Si è avuto qualche problema con i picchi ghost/carryover del campione a causa della lunghezza della colonna. Lo strumento è stato configurato per un'altra analisi che utilizza la stessa colonna. Si consiglia di utilizzare una colonna a film sottile non più lunga di 30 m per l'analisi del benzene. La colonna è utilizzata nella modalità a pressione costante a 16,65 psig con velocità nominale del flusso pari a 1,0 mL/minuto. Il saver del gas è impostato a 20 mL/minuto dopo 2 minuti di funzionamento.

La linea di trasferimento MSD è stata settata a 280°C, il Quad MS a 150°C e la Fonte MS a 230°C. L'offset del moltiplicatore elettronico corrisponde a 106 volt e la tensione del moltiplicatore a 1670 volt. E' stato utilizzato un file tune di ATUNE. Il ritardo del solvente era di 10 minuti.

Per l'analisi è stato utilizzato il monitoraggio selettivo degli ioni. Sono stati monitorati gli ioni m/z 77, 78 per il benzene e 84, 82 e per lo standard interno d⁶-benzene. Il tempo di sosta per questi ioni è di 85 ms.

Il Benzene, Rt 11,3 minuti, è stato rilevato utilizzando lo ione target m/z 78, lo ione qualificante 77. Invece lo standard interno d⁶-benzene è stato rilevato utilizzando lo ione standard 84 e lo ione qualificante 82. Lo spettrometro di massa è stato utilizzando l'alta risoluzione.

Il concentratore di purga e trap Encon con l'auto-campionatore Archon 5100 è stato utilizzato nella modalità soil. Il gas di purga viene trasportato verso la testa del trap del concentratore attraverso la linea di trasferimento SilcoSteel. Encon utilizzava un trap Type K o Vocarb 3000 (PTS Catalogo E70300-K03). Si tratta di un tubo in acciaio inossidabile da 1/8" e 25 cm di lunghezza con 10 cm Carbopak B, 6 cm Carboxen 1000 e 1 cm Carboxen 1001.

Variabile	Valore	Variabile	Valore
Flusso di standby	On	Scarico	On
Bypass gas di cottura	On	Antischiuma	Cont
Tempo totale GC	0 minuti	Forno valvola	130 °C
Linea di trasferimento	130 °C	MoRT Pronto	40 °C
Cottura MoRT	260 °C	Purga pronta	35 °C
Tempo purga	11 minuti	Tempo asciugatura purga	1 minuto

CONSIGLIO INTERNAZIONALE DELLE ASSOCIAZIONI DI BEVANDE

WASHINGTON, DC · BRUXELLES · TOKYO

Flusso di purga	40 mL/minuto	Flusso desorb.	0 ml/min (impostazione di default)
Temperatura pre-riscaldamento	40 °C	Tempo di pre-riscaldamento	0,5 minuto
Pre-riscaldamento desorb.	245 °C	Temperatura desorb.	250 °C
Tempo desorb.	2 minuto	Cottura	260 °C
Tempo di cottura	10 minuti		

Tabella 2. Impostazioni Encon e Archon

3. 6890/5973 #3

Una colonna da 20 m x 0,18 mm x 1 µm DB-624 (Agilent 122-1324) è stata mantenuta a 40 °C per 3 minuti, aumentando poi la temperatura di 10°C al minuto fino a 210 °C, e poi di 40°C al minuto fino a 210 °C e mantenuta a 250 °C per 0,33 minuti. La porta di iniezione è stata impostata a 200°C con un rapporto split 50:1. Viene alimentato nel Velocity il gas del carrier regolato a EPC 6890. Torna poi al 6890 attraverso la linea di trasferimento riscaldata che è collegata all'uscita del GC.

La colonna è utilizzata nella modalità pressione costante a 16,53 psig con velocità nominale del flusso pari a 0,8 mL/minuto. La gas saver era spento.

La linea di trasferimento MSD è stata settata a 280°C, il Quad MS a 150°C e la Fonte MS a 230°C. L'offset del moltiplicatore elettronico corrisponde a 106 volt ed la tensione del moltiplicatore a 1176 volt. E' stato utilizzato un file tune di ATUNE. Il ritardo del solvente era di 4,5 minuti.

Per l'analisi è stato utilizzato il monitoraggio selettivo degli ioni. Sono stati monitorati gli ioni m/z 77, 78 per il benzene ed 84, 82 e per lo standard interno d⁶-benzene. L'MSD è stato impostato a bassa risoluzione ed il tempo di sosta di questi ioni era di 85 minuti.

Il Benzene, Rt 5,19 minuti è stato rilevato ed il quantitativo quantificato utilizzando lo ione target m/z 78. Il d⁶-benzene, Rt 5,16 minuti è stato rilevato utilizzando lo ione target m/z 84.

Il concentratore di purga e trap Encon con l'auto-campionatore Archon è stato utilizzato nella modalità soil. Il gas di purga viene trasportato verso la testa del trap del concentratore attraverso la linea di trasferimento SilcoSteel. Il Velocity utilizzava un trap Type K, o Vocarb 3000. Si tratta di un tubo in acciaio inossidabile da 1/8" e 25 cm di lunghezza con 10 cm Carboxen B, 6 cm Carboxen 1000 e 1 cm Carboxen 1001.

CONSIGLIO INTERNAZIONALE DELLE ASSOCIAZIONI DI BEVANDE

WASHINGTON, DC · BRUXELLES · TOKYO

Variabile	Valore	Variabile	Valore
Temperatura forno valvola	150	Temperatura asciugatura purga	40
Temperatura linea di trasferimento	150	Flusso asciugatura purga	200 mL/min
Temperatura montaggio campione	90	Avvio GC	Avvio del Desorb.
Temperatura purga pronta	40	Temperatura pre-riscaldamento desorb.	245
Temperatura standby flusso di asciugatura	175	Drenaggio Desorb.	ON
Flusso di standby	0 mL/min	Tempo desorb.	2 min
Tempo pre-purga	0,5 min	Temperatura desorb.	250
Flusso pre-purga	40 mL/min	Flusso desorb.	0 ml/min (impostazione di default)
Riscaldatore campione	OFF	Tempo di cottura	2 min
Tempo pre-riscaldamento campione	1 min	Temperatura cottura	270
Temperatura pre-riscaldamento	40	Temperatura cottura flusso di asciugatura	300
Tempo purga	11 min	Flusso di cottura	400 mL/min
Temperatura di purga	0 °C (impostazione di default)	Temperatura focus	-150
Flusso di purga	40 mL/min	Tempo di iniezione	1 min
Tempo asciugatura purga	1 min	Temperatura di iniezione	180
Tipo di campione	Soil	Volume campione	5 mL
Fattore di diluizione	0	Volume di risciacquo	0 °C (impostazione di default)
# di risciacqui	0	Standard 1	SI'
Standard 2	NO	Agitazione pre-riscaldamento campione	NO
Agitazione	NO	Tempo agitazione W.	0 °C (impostazione di default)
Tempo di deposito W.	0	Lavaggio siringhe	0 °C (impostazione di default)

CONSIGLIO INTERNAZIONALE DELLE ASSOCIAZIONI DI BEVANDE

WASHINGTON, DC · BRUXELLES · TOKYO

Modalità di funzionamento:	A distanza	Timer del ciclo	0 °C (impostazione di default)
Timer ausiliario	0	Collegamento a metodo #	#0

Tabella 3. Impostazioni Velocity e Archon

CONSIGLIO INTERNAZIONALE DELLE ASSOCIAZIONI DI BEVANDE

WASHINGTON, DC · BRUXELLES · TOKYO

B. Calibrazione degli strumenti

Reagenti e standard (d⁶ benzene ISTD)

Le informazioni relative alla calibrazione si riferiscono al GC/MS #1 con Velocity e Solatek Tekmar.

0,9251 g di 5,023 mg/mL di benzene in metanolo sono stati pesati in un matraccio da 50 mL e portati a volume fino alla tacca con metanolo (117.448 µg/L benzene). La soluzione è stata diluita in serie con un rapporto 1:10 utilizzando una pipetta di vetro da 5 mL Classe A e matracci da 50 mL in modo da ottenere soluzioni pari a 11.745 µg/L di benzene, 1.174 µg/L di benzene e 117 µg/L di benzene. Quantitativi di tali soluzioni sono state aggiunte a 10 mL di acqua deionizzata purgata in fiale EPA da 40 mL conformemente alla Tabella 5 per realizzare gli standard di calibrazione.

Sono state utilizzate siringhe da microlitro Hamilton Serie 800 per aggiungere gli standard di calibrazione alle fiale EPA contenenti acqua o il campione. Le siringhe sono citate nella Tabella 4.

Volume della siringa	Numero del modello	Numero di catalogo 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

Tabella 4. Siringhe utilizzate per aggiungere soluzioni standard alle fiale

0,9712 g di 2,015 mg/mL di benzene in metanolo sono stati pesati in un matraccio da 50 mL e portati a volume fino alla tacca con metanolo (49.460 µg/L benzene). La soluzione è stata diluita con un rapporto 1:5 con una pipetta in vetro da 20 mL Classe A ed un matraccio volumetrico per ottenere una soluzione pari a 9892 µg/L di d⁶-benzene da utilizzarsi come standard interno. E' stato seguito il metodo dell'auto-campionamento di purga e trap per iniettare 5 µL di standard interno in ognuna delle fiale EPA prima della purga.

Questa soluzione di d⁶-benzene è stata utilizzata solo per il GC/MS #1. L'auto-campionatore Solatek è riuscito ad iniettare 5 µL di soluzione standard interna. L'altro auto-campionatore utilizzato (Archon) per queste analisi è riuscito ad iniettare quantitativi pari a 1 e 2 µL rispettivamente di soluzione di standard interno e soluzioni richieste di d⁶-benzene a concentrazioni diverse. L'Archon ha lavato l'ISTD nel campione con 10 mL di acqua di risciacquo.

CONSIGLIO INTERNAZIONALE DELLE ASSOCIAZIONI DI BEVANDE

WASHINGTON, DC · BRUXELLES · TOKYO

Uno dei serbatoi dello standard sul Solatek è stato riempito con una porzione di soluzione di standard interno. Prima di procedere alla purga, la valvola di iniezione è stata caricata 5 µL di soluzione di d⁶-benzene che è stata poi aggiunta alla fiala EPA con 10 mL di acqua di risciacquo.

µL of 117 µg/L Benzene	Standard Conc µg/L	Cal Level	µL of 1,174 µg/L Benzene	Standard Conc µg/L	Cal Level	µL of 11,745 µg/L Benzene	Standard Conc µg/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 µg/L d ⁶ -Benzene									
	5	4.90	All						

Tabella 5. Preparazione degli standard per realizzare 10 ml di standard e campioni di calibrazione

Oltre a questi standard di calibrazione, sono stati aggiunti 5 e 50 µL della soluzione di benzene da 1.174 µg/L a quantitativi pari a 10 mL di acqua deionizzata e purgata. Si tratta delle soluzioni utilizzate per procedere alla verifica della calibrazione dei campioni da 0,59 e 5.87 µg/L di benzene.

Infine è stato preparato un campione di controllo da una fonte di benzene indipendente per verificare che lo strumento fornisca dati coerenti. 100 µL di soluzione contenente 2000 µg/mL di benzene in metanolo è stata aggiunta a 100 mL di acqua deionizzata e purgata.

5 µL di 2000µg/L di soluzione di benzene sono stati aggiunti a 10 mL di acqua deionizzata e purgata in una fiale EPA ottenendo 1,0 µg/L di benzene. Questo standard di controllo è stato considerato un campione sconosciuto per la verifica della calibrazione e per garantire che tutti gli strumenti utilizzati nel processo permettessero di ottenere risultati coerenti.

Il Concentratore di purga e trap Agilent 6890/5973 #1 GC/MS, Velocity Tekmar e l'auto-campionatore di purga e trap Solatek Tekmar sono stati calibrati con questi standard. La ChemStation è stata calibrata utilizzando un fit lineare del rapporto di risposta rispetto al rapporto di quantità. Nella ChemStation è stato impostato che la concentrazione dello standard interno di d⁶-benzene corrispondesse a 1,0 µg/L per tutti i campioni. Così il rapporto di quantità per ogni livello di calibrazione visualizzato è risultato corrispondente alla concentrazione di benzene per quel livello.

E' stata allegata una lista degli standard di calibrazione acquistati. Tutti sono contenuti in 1 ml di soluzione in un'ampolla sigillata.

- 1 – Standard Benzene: Supelco 40004, 5023 µg/mL benzene in metanolo
- 2- standard d⁶-benzene : Supelco 48940, 2.015 mg/mL benzene in metanolo
- 3- Controllo dello standard del benzene campione: Restek 30249, 2000 µg/mL benzene

CONSIGLIO INTERNAZIONALE DELLE ASSOCIAZIONI DI BEVANDE

WASHINGTON, DC · BRUXELLES · TOKYO

Calibrazione degli strumenti

Sono stati realizzati campioni di calibrazione e di verifica aggiungendo quantitativi microlitro di standard desunto dalla Tabella 5 ad 10 mL di acqua purgata e deionizzata in fiale EPA da 40 mL. Il Solatek ha aggiunto 5 µL di soluzione di standard interni. Per altri strumenti la concentrazione dello standard d⁶-benzene dovrà essere modificata per adattarsi alle dimensioni della soluzione ISTD che l'auto-campionatore è in grado di iniettare nei campioni. La Tabella 5 vale per la diluizione degli standard di calibrazione del benzene.

La Tabella 6 mostra i dati relativi alla calibrazione per il GC/MS di purga e trap 6890/5973/VelocityEngine/Solatek. Ricordare che l'effettiva concentrazione del d⁶-benzene corrisponde a 4,9 µg/L mentre nella ChemStation è stato impostato 1 µg/L per correggere il rapporto di quantità in modo che si conformi alla concentrazione del benzene.

Il primo e l'ultimo campione nei cicli di calibrazione erano rappresentati da acqua purgata deionizzata utilizzata per controllare il background dello strumento. Una sequenza tipica in queste analisi comincia con il bianco dell'acqua, un campione di verifica del benzene da 5,87 µg/L e successivamente con i campioni sconosciuti con campione di verifica da 0,59 o da 5,87 µg/L ogni 8-10 campioni sconosciuti. La Figura 1 mostra il grafico di calibrazione della ChemStation.

E' stato creato il grafico che segue in Excel sfruttando i dati della ChemStation.

Nome	Benzene Area	Benzene Conc µg/L	d6 Benzene Area	d6 Benzene Area	Benzene Livelli riscontrati 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

Tabella 6. Dati relativi alla calibrazione per standard di benzene da 0,12 a 11,74 µg/L

CONSIGLIO INTERNAZIONALE DELLE ASSOCIAZIONI DI BEVANDE

WASHINGTON, DC · BRUXELLES · TOKYO

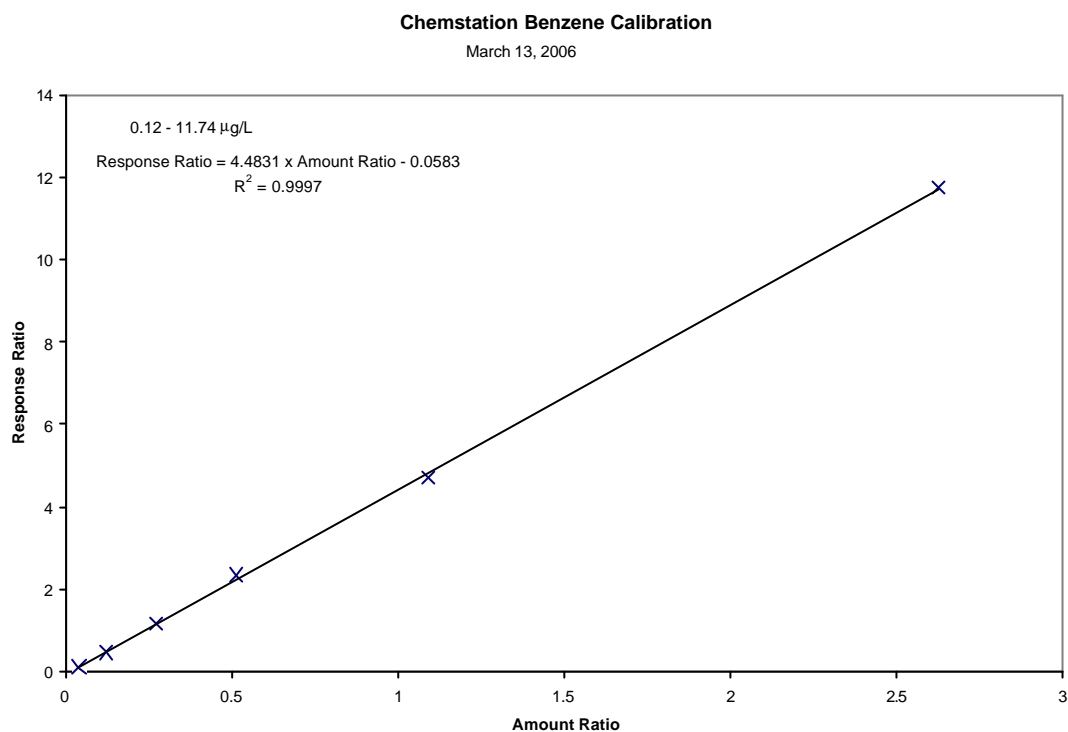


Figura 1 Curva di calibrazione della ChemStation per standard di benzene da 0,12 a 11,74 µg/L

Il produttore della soluzione standard di d^6 -benzene garantisce una purezza pari al 99,9%. 4,9 µg/L di standard interno di d^6 -benzene potrebbero contenere fino ad un massimo di 0,004 µg/L di benzene. Inoltre lo spettro di massa del d^6 -benzene nella library NIST presenta un piccolo quantitativo di m/z 78 e 77.

CONSIGLIO INTERNAZIONALE DELLE ASSOCIAZIONI DI BEVANDE

WASHINGTON, DC · BRUXELLES · TOKYO

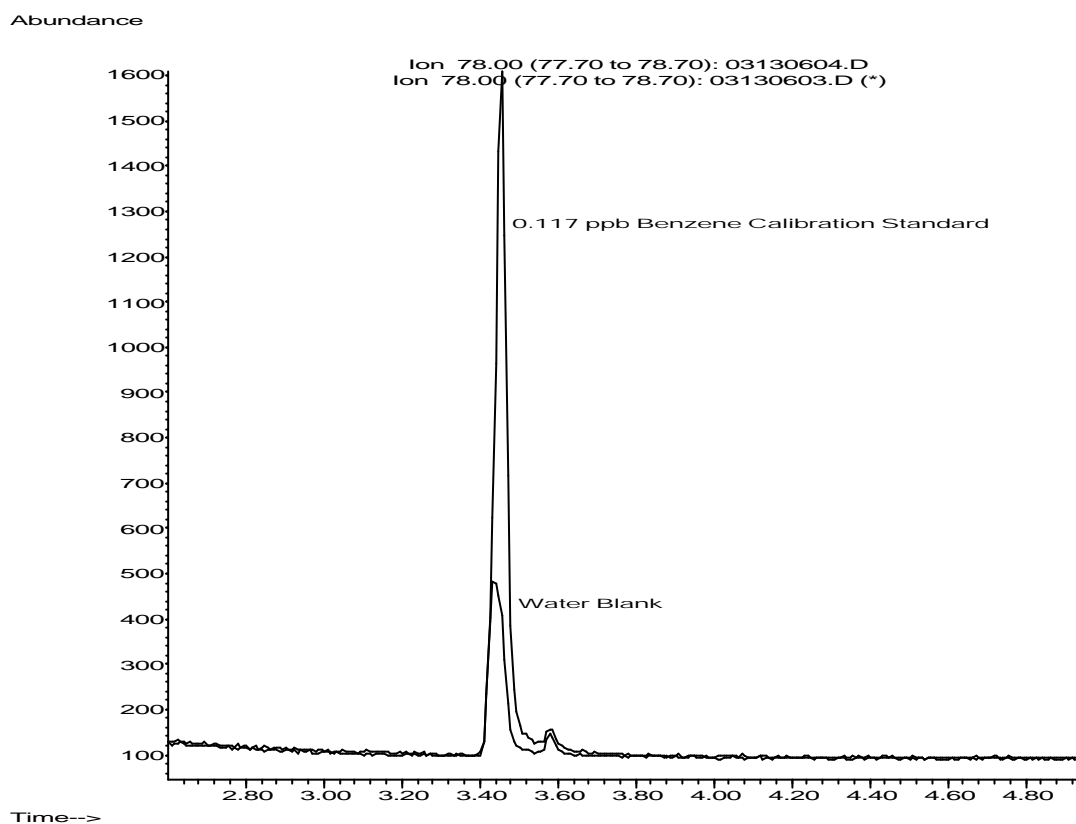


Figura 2. Cromatogrammi ionici sovrapposti del ciclo a vuoto e di 12 µg/L di benzene

Preparazione del campione

10 mL di campione (più 10 mL di acqua di risciacquo) sono stati purgati direttamente in fiale EPA da 40 mL. I campioni sono stati pipettati in sei fiale e le fiale chiuse per l'analisi.

Le bevande gassate (CDS) tendenzialmente sperimentano un breakout di CO₂ quando aperte e nel corso del campionamento per pipettamento. E' inevitabile così come una perdita (anche se non determinata) di composti volatili. Il breakout della CO₂ può essere ridotto al minimo raffreddamento i CSD in frigorifero per la notte o in un secchiello di ghiaccio per diverse ore prima di aprire il contenitore. Evitare di scuotere il contenitore prima dell'apertura. Pre-inumidire l'interno della pipetta con un piccolo quantitativo del campione ed eliminandolo sarà successivamente possibile ridurre la perdite causate dal gorgogliamento. Riempire e scaricare la provetta lentamente per ridurre la fuoriuscita di CO₂. Permettendo al campione di scorrere lungo la parete interna di un matraccio da 40 mL si riducono le perdite di CO₂ e composti volatili.

Commento:

I succhi che contengono polpa o altri ingredienti solidi non potranno essere analizzati utilizzando il metodo di purga e trap per via dell'ostruzione delle valvole e delle linee di campionamento.

Questi campioni sono stati analizzati con un GC/MS con spazio di testa.