

Průzkum obsahu benzenu v nealkoholických nápojích

Survey Results of Benzene Content in Soft Drinks

Adéla GRÉGROVÁ, Helena ČÍŽKOVÁ, Aleš RAJCHL, Jitka ŠNEBERGROVÁ, Michal VOLDŘICH

Ústav konzervace potravin, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika /
Department of Food Preservation, Institute of Chemical Technology in Prague, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic
e-mail: adela.gregrova@vscht.cz

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Grégrová, A. – Čížková, H. – Rajchl, A. – Šnebergrová, J. – Voldřich, M.: Průzkum obsahu benzenu v nealkoholických nápojích. Kvasny Prum. 60, 2014, č. 1, s. 8–14

Již téměř 20 let je známo, že pokud jsou nealkoholické nápoje konzervovány kyselinou benzoovou, může tato kyselina reagovat s kyselinou askorbovou za vzniku karcinogenního benzenu. Zjištěné koncentrace benzenu ve 49 nealkoholických nápojích zakoupených v české tžní síti, analyzovaných v rámci pětiletého průzkumu, byly vždy nižší než $10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; průměrný obsah benzenu byl okolo $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Studie ukázala, že obsah benzenu není snadné předvídat. Ze sledovaných složek nápoje (benzoát, askorbová kyselina, sladidla, minerály, CO_2) byla prokázána významná pozitivní korelace pouze mezi obsahem benzenu a benzoátu. Zdá se, že více než složení ovlivňují pozitivní nálezy benzenu v nápojích vnější kontaminace surovin a podmínky skladování.

Grégrová, A. – Čížková, H. – Rajchl, A. – Šnebergrová, J. – Voldřich, M.: Survey Results of Benzene Content in Soft Drinks. Kvasny Prum. 60, 2014, No. 1, p. 8–14

For almost 20 years, it has been known that if soft drinks are preserved with benzoic acid, it reacts under certain circumstances with ascorbic acid in drinks forming carcinogenic benzene. The concentrations of benzene in 49 soft drinks analysed within the five-year survey, obtained from the Czech market, were below $10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; the average benzene content was about $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. The study showed that benzene content is not easily predictable: from the following factors of composition (benzoate, ascorbic acid, sweeteners, minerals, CO_2) the only significant positive correlation was identified between benzene and the content of benzoate. More than composition, it seems that both external contamination of raw materials and storage conditions cause positive findings of benzene.

Grégrová, A. – Čížková, H. – Rajchl, A. – Šnebergrová, J. – Voldřich, M.: Die Aufsuchung des Gehalts an Benzen in den alkoholfreien Getränken. Kvasny Prum. 60, 2014, Nr. 1, S. 8–14

Schon fast 20 Jahren ist schon bekannt, dass im Falle der Konservierung der alkoholfreien Getränken mit Benzoesäure, kann diese Säure mit Ascorbinsäure unter Ersterung des krebserzeugenden Benzen reagieren. Im Zeitraum einer fünfjährigen Untersuchung wurden in den aus dem tschechischen Marktnetzwerk stammenden 49 Proben immer niedrigere als $10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ festgestellt, der durchschnittliche Gehalt an Benzen wurde rund um $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Eine durchgeführte Studie zeigte, dass Gehalt an Benzen in den Getränken ist nicht einfach zu vorhersagen. Aus den verfolgten Getränkestoffen (Benzoate, Ascorbinsäure, Süßmittel, Minerale, CO_2) wurde nur eine bedeutende positive Korrelation zwischen dem Gehalt an Benzen und an Benzoate erwiesen. Es scheint sich vor, dass mehr als die Zusammensetzung des Benzens die externe Kontamination von Rohstoffen und Lagerbedingungen den positive Fund beeinflussen.

Klíčová slova: askorbová kyselina, benzen, benzoová kyselina, nápoje, SPME-GC/MS

Keywords: ascorbic acid, benzene, benzoic acid, beverages, SPME-GC/MS

1 ÚVOD

Od roku 1991 je známo, že pokud jsou nealkoholické nápoje konzervovány benzoovou kyselinou (benzoát sodný), reaguje tato látka za určitých podmínek s askorbovou kyselinou (vitamin C) nebo erythorbovou kyselinou (isomer vitaminu C) za vzniku karcinogenního benzenu (Nyman et al., 2008).

Askorbová kyselina interaguje s benzoovou kyselinou v přítomnosti přechodných kovů, tj. s Cu (II) a Fe (III) ionty, podle následujícího mechanismu: O_2 může být redukován pomocí askorbové kyseliny na superoxidový anion radikál, z něhož spontánně vzniká peroxid vodíku (H_2O_2); následně může askorbová kyselina redukovat peroxid vodíku za tvorby hydroxylového radikálu způsobujícího dekarboxylaci benzoátu sodného na benzen. Vznik benzenu je primárně ovlivňován pH, UV zářením a teplotou (Lachenmeier et al., 2008; Gardner a Lawrence, 1993; Adams, 1997). Naopak sladidla, např. cukr, fruktosovo-kukuřičný nebo škrobový sirup, a chelatační činidla mohou reakci inhibovat. Tvorba benzenu v nealkoholických nápojích tedy závisí na složení výrobku a podmínkách skladování (ICBA, 2006). V roce 1987 byl benzen klasifikován jako lidský karcinogen (skupina 1) (Gardner a Lawrence, 1993; IARC, 1987). Většina z denního příjmu benzenu pochází z ovzduší buď z přírodních zdrojů (lesní požáry, prosakování nafty), nebo z lidské činnosti, jako je kouření nebo výfukové plyny (Wallace et al., 1993).

Denní expozice benzenem pro nekuřáky je stanovena na 200 až $450 \mu\text{g}\cdot\text{den}^{-1}$ (WHO, 1996). Do potravin se benzen může dostat prostřednictvím následujících zdrojů: obalový materiál, skladovací prostředí, znečištění vodních zdrojů, kontaminovaný CO_2 používaný pro sycení, rozklad nebo reakce konzervačních látek, postupy vaře-

1 INTRODUCTION

Since 1991, it has been known that if soft drinks are preserved with benzoic acid (BA; sodium benzoate, SB), BA reacts under certain conditions with ascorbic acid (AA; vitamin C) or erythorbic acid (EA; vitamin C's isomer) in soft drinks forming carcinogenic benzene (Nyman et al., 2008).

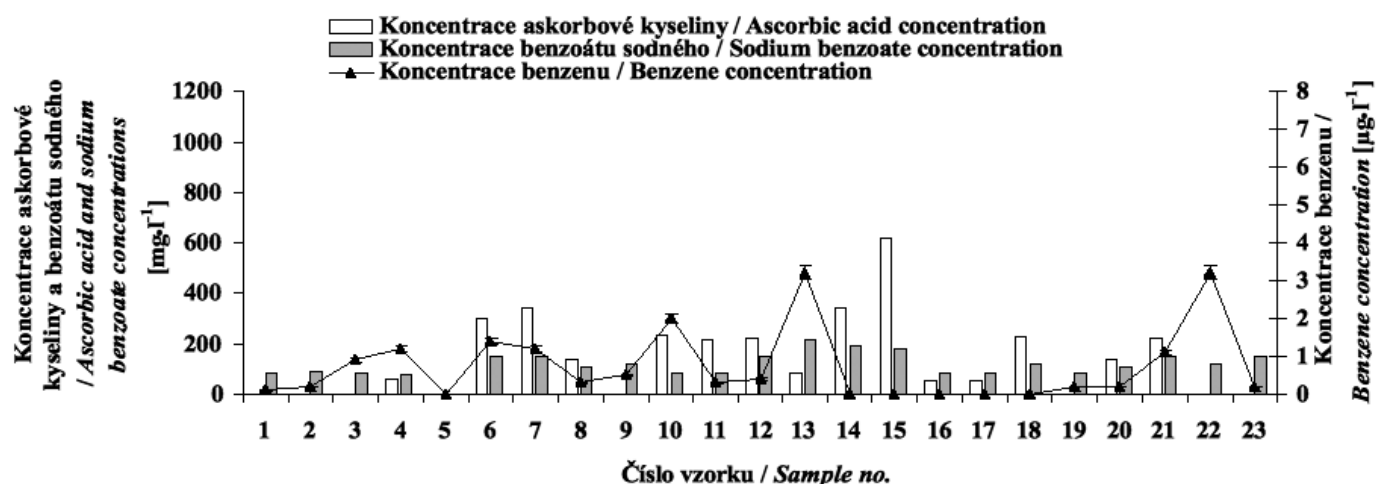
AA interacts with BA in the presence of transition-metal catalysts, i.e. Cu (II) or Fe (III) ions, under the following mechanism: O_2 can be reduced by AA to produce the superoxide anion radical, which is disproportionate to H_2O_2 ; subsequently AA can reduce H_2O_2 to generate the hydroxyl radical causing decarboxylation of sodium benzoate to benzene. The formation of benzene is primarily accelerated by pH, UV light and temperature (Lachenmeier et al., 2008; Gardner and Lawrence, 1993; Adams, 1997). On the contrary, nutritive sweeteners, e.g. sugar, high fructose corn or starch syrup, and chelating agents may inhibit the reaction. The formation of benzene in soft drinks thus depends on the product formulation and storage conditions (ICBA, 2006). In 1987, benzene was classified as a known human carcinogen (Group 1) (Gardner and Lawrence, 1993; IARC, 1987). Most of the benzene daily intake originates through the air either from natural sources (forest fires, oil seeps) or from human activities such as smoking or exhaust fumes (Wallace et al., 1993).

The daily exposure to benzene for non-smokers is assessed at 200–450 $\mu\text{g}\cdot\text{day}^{-1}$ (WHO, 1996). Into foods, benzene may be incorporated through the following sources: packaging materials, storage environments, contamination of water supplies, contaminated CO_2 used for carbonation, degradation or reaction of preservatives, cooking processes and irradiation techniques used for sterilisation (Ridgway et al., 2007; Fabietti et al., 2001).

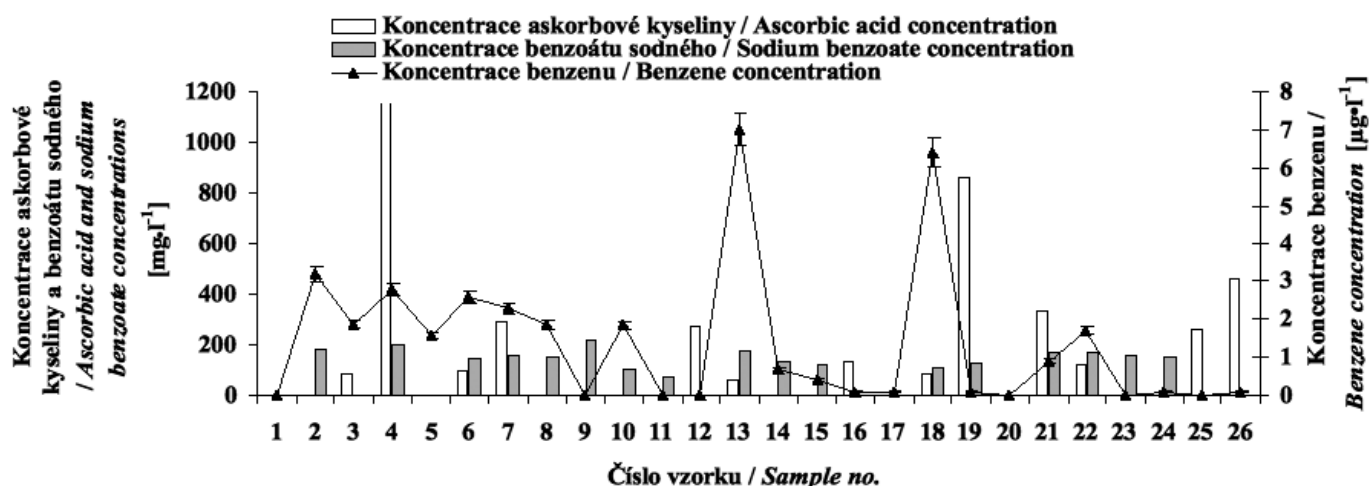
Tab. 1 Data k obsahu benzenu v nealkoholických nápojích (výzkum Amerického úřadu pro kontrolu potravin a léčiv v období od listopadu 2005 do 20. dubna 2006 a od 21. dubna 2006 do 16. května 2007) / Table 1 Data on benzene in soft drinks (Food and Drug Administration's survey of the US market from November 2005 to April 20, 2006, and from April 21, 2006 to May 16, 2007) (U.S. fda, 2007)

| Typ nápoje (produkt) / Beverage type (product) | 2006 | | | 2007 | | |
|--|------|---------------------------|---------------------------|------|---------------------------|---------------------------|
| | n | Min (µg·l ⁻¹) | Max (µg·l ⁻¹) | n | Min (µg·l ⁻¹) | Max (µg·l ⁻¹) |
| Pouze benzoát / Benzoate only | 21 | <1 | 3.5 | 5 | <1 | 1.1 |
| | 3 | >1 | | 1 | >1 | |
| | 20 | n.d. | | 11 | n.d. | |
| Benzoát a askorbová kyselina / Benzoate and ascorbic acid* | 14 | <1 | 87.9 | 13 | <1 | 88.9 |
| | 26 | >1 | | 14 | >1 | |
| | 17 | n.d. | | 16 | n.d. | |
| Pouze askorbová kyselina / Ascorbic acid only | | | | 9 | <1 | 4.8 |
| | | | | 7 | >1 | |
| | | | | 8 | n.d. | |
| Ostatní (bez aditiv jako jsou benzoát a askorbová kyselina; ale může obsahovat přírodní askorbovou kyselinu a/nebo benzoát) / Other (without additives as benzoate and ascorbic acid; but may contain natural ascorbic acid and / or benzoate) | 3 | <1 | 10.7 | 1 | <1 | 2.6 |
| | 5 | >1 | | 1 | >1 | |
| | 2 | n.d. | | | n.d. | |

n = počet výrobků; n.d. = nedetekováno; *místo kyseliny askorbové může obsahovat jiné deriváty jako jsou kyselina erythorbová nebo askorbát / n = number of the products; n.d. = not detected; *instead of ascorbic acid may contain other derivatives such as erythorbic acid or ascorbate



Obr. 1 Přehled výsledků, přítomnost benzoátu sodného, askorbové kyseliny (jak je uvedeno na etiketě) a benzenu v analyzovaných nealkoholických nápojích (2006) / Fig. 1 Overview of the results, the presence of SB, AA (as mentioned on the label) and benzene of the analysed soft drinks (2006)



Obr. 2 Přehled výsledků, přítomnost benzoátu sodného, askorbové kyseliny (jak je uvedeno na etiketě) a benzenu v analyzovaných nealkoholických nápojích (2011) / Fig. 2 Overview of the results, the presence of SB, AA (as mentioned on the label) and benzene of the analysed soft drinks (2011)

Tab.2 Přehled vzorků, 2006 (přítomnost benzoátu sodného, kyseliny askorbové a ovocného podílu uvedených na etiketě analyzovaných nealkoholických nápojů) / Table 2 Overview of the samples, 2006 (the presence of sodium benzoate, ascorbic acid and fruit aliquot part mentioned on the labels of the analysed soft drinks)

| Číslo vzorku / Sample no. | Benzoát sodný / Sodium benzoate | Askorbová kyselina / Ascorbic acid | Ovocný podíl / Fruit aliquot part (%) | Syceno / Carbonated |
|------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|--|------------------------|
| 1 | x | – | – | ano / yes |
| 2 | x | – | – | ne / no |
| 3 | x | – | – | ne / no |
| 4 | x | x | – | ne / no |
| 5 | – | – | – | ano / yes |
| 6 | x | x | 20 | ne / no |
| 7 | x | x | 20 | ne / no |
| 8 | x | x | – | ano / yes |
| 9 | x | – | – | ne / no |
| 10 | x | x | – | ne / no |
| 11 | x | – | – | ne / no |
| 12 | x | x | 25 | ne / no |
| 13 | x | x | 60 | ne / no |
| 14 | x | x | 60 | ne / no |
| 15 | x | x | 100 | ne / no |
| 16 | x | x | 5 | ne / no |
| 17 | x | x | – | ne / no |
| 18 | x | x | 60 | ne / no |
| 19 | x | – | – | ne / no |
| 20 | x | x | – | ano / yes |
| 21 | x | x | 12.5 | ne / no |
| 22 | x | x | – | ne / no |
| 23 | x | – | – | ne / no |

x znamená deklarovanou přítomnost benzoátu sodného a askorbové kyseliny; – znamená nedeklarováno / x means the declared presence of sodium benzoate and ascorbic acid; – means not declared

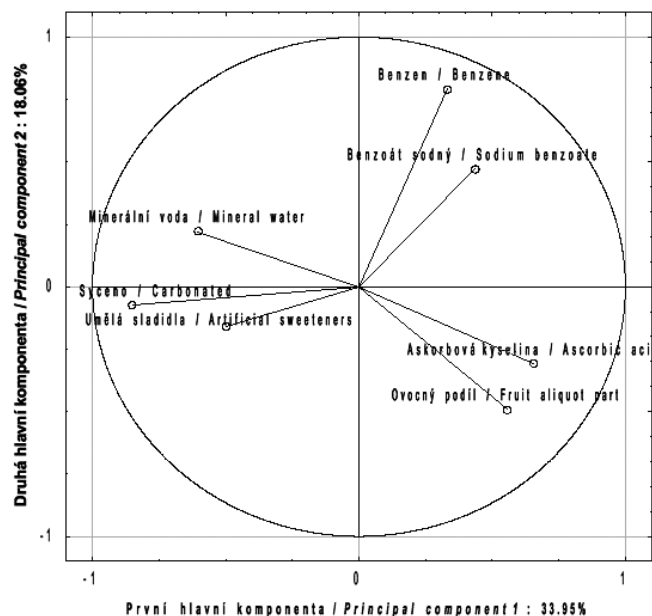
ní a ozařovací techniky využívané pro sterilaci (Ridgway et al., 2007; Fabietti et al., 2001).

Obsah benzenu v potravinách a nápojích byl již stanovován v rámci řady studií. Nejvyšší koncentrace byly nalezeny v jamajském rumu ($120 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), ozářeném hovězím mase ($19 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), vejcích ($500\text{--}1\,900 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), ústřích ($220\text{--}260 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) a rybách ($3\text{--}88 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) (Wallace et al., 1993; WHO, 1993; U.S. HHS, 1997; U.S. HHS, 2011).

Byly stanoveny následující maximální limity pro benzen jako kontaminant pitné vody: $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Evropská unie) a $10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Světová zdravotnická organizace). Nicméně, doposud nebyl určen zákonný limit pro benzen v potravinářských výrobcích a nápojích (nealkoholických nápojích) (WHO, 1996; EC, 1998).

V letech 2005–2007 byly provedeny dva velké průzkumy (Spojené státy americké), v rámci nichž bylo analyzováno téměř 200 vzorků nealkoholických nápojů (tab. 1) (U.S. FDA, 2007). U většiny vzorků byly koncentrace benzenu stanoveny nižší než $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ nebo pod mezí detekce; 93 % vzorků obsahovalo benzen v koncentracích nižších než $10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

V roce 2008 bylo analyzováno téměř 450 vzorků nealkoholických nápojů v rámci dalších dvou rozsáhlých studií (Belgie a Německo); pro většinu vzorků se koncentrace benzenu pohybovala pod limitem



Obr. 3 Analýza hlavních komponent – korelace proměnných / Fig. 3 Principal component analysis – correlation of variables

Benzene content has been determined by different studies in a variety of foods and drinks. The highest concentrations have been found in Jamaican rum ($120 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), irradiated beef ($19 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), eggs ($500\text{--}1\,900 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), oysters ($220\text{--}260 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and fish ($3\text{--}88 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) (Wallace et al., 1993; WHO, 1993; U.S. HHS, 1997; U.S. HHS, 2011).

The following maximum contaminant levels have been established for benzene in drinking water: $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (EU) and $10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (WHO). However, no legal limit has been established for benzene in food products or beverages (soft drinks) (WHO, 1996; EC, 1998).

In the years 2005 to 2007, two large studies were carried out (USA), during which almost 200 samples of soft drinks (Table 1) (U.S. FDA, 2007) were analysed. For most of the samples, benzene concentrations were found less than $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ or below the limit of detection; in 93% of the samples benzene concentrations were found below $10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

In 2008, another two large studies were carried out (Belgium and Germany), analysing almost 450 samples of soft drinks; for most samples, benzene concentration was less than $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ or below the limit of detection and only in 0.4% (2 cases) above $10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Lachenmeier et al., 2008; Poucke et al., 2008).

Tab. 3 Přehled vzorků, 2011 (přítomnost benzoátu sodného, askorbové kyseliny a ovocného podílu uvedených na etiketě analyzovaných nealkoholických nápojů) / Table 3 Overview of the samples, 2011 (the presence of SB, AA and fruit aliquot part mentioned on the labels of the analysed soft drinks)

| Číslo vzorku / Sample no. | Benzoát sodný / Sodium benzoate | Askorbová kyselina / Ascorbic acid | Ovocný podíl / Fruit aliquot part (%) | Syceno / Carbonated |
|------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|--|------------------------|
| 1 | – | – | – | ano/yes |
| 2 | x | – | – | ne/no |
| 3 | – | x | – | ne/no |
| 4 | x | x | – | ne/no |
| 5 | – | – | – | ano/yes |
| 6 | x | x | 12.5 | ne/no |
| 7 | x | x | 12.5 | ne/no |
| 8 | x | – | – | ano/yes |
| 9 | x | – | 0.5 | ano/yes |
| 10 | x | – | – | ano/yes |
| 11 | x | – | – | ano/yes |
| 12 | – | x | 10.0 | ne/no |
| 13 | x | – | – | ne/no |
| 14 | x | – | – | ne/no |
| 15 | x | – | – | ne/no |
| 16 | – | x | – | ne/no |
| 17 | – | – | – | ano/yes |
| 18 | x | x | 20 | ne/no |
| 19 | x | x | – | ne/no |
| 20 | – | – | – | ano/yes |
| 21 | x | – | 12.5 | ne/no |
| 22 | x | – | 12.5 | ne/no |
| 23 | x | – | – | ano/yes |
| 24 | x | – | – | ano/yes |
| 25 | – | x | 55 | ne/no |
| 26 | – | x | 100 | ne/no |

x znamená deklarovanou přítomnost benzoátu sodného a askorbové kyseliny; – znamená nedeklarováno / x means the occurrence of sodium benzoate and ascorbic acid; – means not declared

1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ nebo pod mezí detekce a pouze v 0,4 % (2 případy) byla stanovena nad 10 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Lachenmeier et al., 2008; Poucke et al., 2008).

Od roku 2010 nebyly provedeny žádné velké průzkumy zaměřené na nealkoholické nápoje. K dispozici jsou po roce 2010 pouze data ze studie provedené v roce 2012, která byla zaměřena na analýzu potravin a nápojů na belgickém trhu; bylo analyzováno 52 vzorků nealkoholických nápojů a zjištěné koncentrace benzenu byly v rozmezí od nedetekováno do 11,5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Vinci et al., 2012). Žádná z výše uvedených prací nezahrnovala vzorky z České republiky nebo střední a východní Evropy.

V naší studii jsme se zaměřili na trendy v posledních letech, týkající se změny receptury produktu z hlediska koncentrace prekurzorů benzenu a vyhodnocení faktorů potlačujících a podporujících vznik benzenu v nealkoholických nápojích českého původu.

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Chemikálie

Benzen (p.a., Penta), benzen- d_6 (2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v methanolu, Sigma-Aldrich, Německo), methanol, benzoát sodný standard a askorbová kyselina (p.a., Sigma-Aldrich, Německo), kyselina sírová (p.a., Lachner), L-cystein a šťavelová kyselina (p.a., Sigma-Aldrich, Německo) byly zakoupeny komerčně.

2.2 Vzorky

Bylo analyzováno dvacet tři vzorků nealkoholických nápojů v roce 2006 (tab. 2) a dvacet šest vzorků nealkoholických nápojů v roce 2011 (tab. 3). Všechny z nich pocházely z obchodní sítě v Praze a byly vyrobeny různými společnostmi. Vzorky byly skladovány při teplotě 6 °C. Všechny nápoje byly analyzovány v první čtvrtině garantované doby trvanlivosti.

Since 2010, no large studies focusing on soft drinks have been carried out. The only available data after 2010 are from a study carried out in the year 2012, which inspected food and drinks from the Belgian market; 52 soft drinks were analysed and the detected concentrations of benzene ranged from not detected to 11.5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Vinci et al., 2012). None of the studies mentioned above included samples from the Czech Republic or from the Central and Eastern Europe.

In our study, we concentrated on the trends emerging in the last years of product reformulation from the view of benzene precursors' concentrations and on the evaluation of the trigger and mitigating factors for benzene formulation in particular drinks of a Czech origin.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals

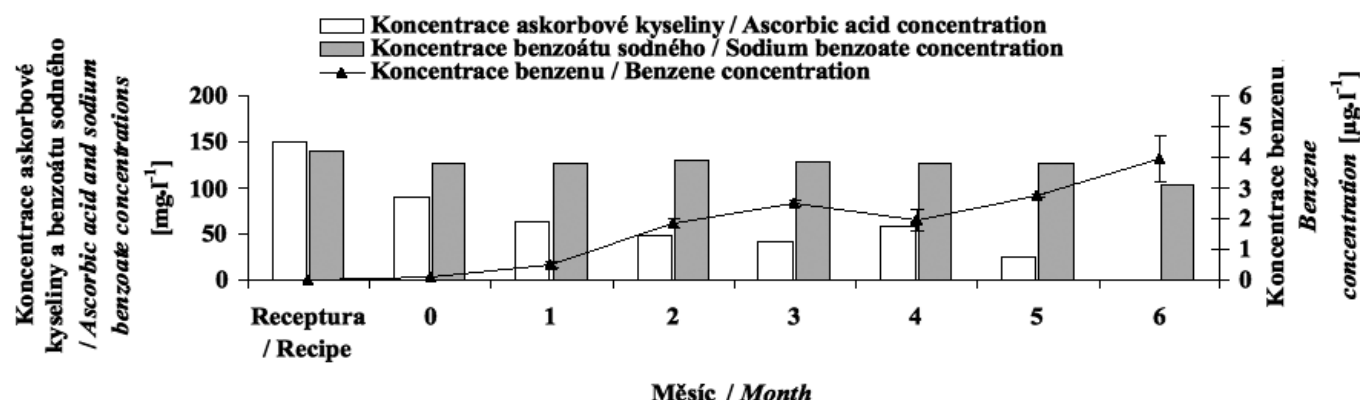
Benzene (p.a.; Penta), benzene- d_6 (2000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ in methanol; Sigma-Aldrich, Germany), methanol, SB standards and AA (p.a.; Sigma-Aldrich, Germany), sulphuric acid (p.a.; Lachner), L-cysteine and oxalic acid (p.a.; Sigma-Aldrich, Germany) were commercially purchased.

2.2 Samples

We analysed twenty-three samples of soft drinks in 2006 (Table 2) and twenty-six samples of soft drinks in 2011 (Table 3). All of them came from retails in Prague and were produced by different companies.

The samples were kept at 6 °C until analysed. All soft drinks were analysed in the first quarter of their guaranteed storage period.

A storage experiment was performed on one kind of these samples (composition: mineral water, sugar, aroma, citric acid, SB, di-



Obr. 4 Skladovací experiment nealkoholických nápojů (průměrné hodnoty ze tří nezávislých měření) / Fig. 4 Storage experiment of soft drinks (average values from three independent measurements)

Skldovací experiment byl proveden pro jeden z výše uvedených výrobků (složení: minerální voda, cukr, aroma, citronová kyselina, benzoát sodný, dimethylidikarbonát, askorbová kyselina): neotevřené komerční lahve ze tří šarží nealkoholického nápoje byly udržovány při pokojové teplotě ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) za viditelného světla (přibližně $10\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$) po dobu šesti měsíců.

2.3 Stanovení benzenu

K mikroextrakci tuhou fází (SPME) bylo využito 50/30 µm DVB/CAR/PDMS vlákno (Supelco Inc., Bellefonte, USA). Obsah benzenu byl stanoven pomocí GC 6890N s kvadrupólovým hmotnostním detektorem MS 5973 (Agilent Technologies, USA) a DB-5MS kolonou (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 µm; Agilent JW Scientific, USA).

Zásobní standardy benzenu a benzen- d_6 (oba $0,002\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) byly připraveny v methanolu. Syčené vzorky byly před analýzou odplyněny po dobu 1,5 min v ultrazvukové lázni. 5 ml z každého vzorku bylo převedeno do 10 ml vialky, do každé z nich byl přidán vnitřní standard benzen- d_6 (5 µl zásobního roztoku). Vzorky byly temperovány 10 min při teplotě 60°C ; pro vlastní extrakci bylo vlákno vsunuto do headspace prostoru vialky a vzorek byl míchán při 500 rpm po dobu 5 min při teplotě 60°C .

Separční chromatografické podmínky byly následující: počáteční teplota kolony 45°C (5 min), nárůst teploty na 200°C rychlostí $25^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (1 min). Teplota injektoru byla nastavena na 200°C (dělicí poměr 30:1), iontový zdroj a MS kvadrupól na teplotu 230°C a 150°C ; desorpce po dobu 5 min, konstantní průtok He $0,7\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Pro detekci benzenu byl využit SIM mód (m/z 78, 77 pro benzen a 84, 82 pro benzen- d_6).

2.4 Stanovení benzoové kyseliny (jako benzoátu sodného) a askorbové kyseliny (askorbové a dehydroaskorbové)

Pro stanovení benzoové kyseliny byly vzorky zředěny destilovanou vodou, filtrovány a následně nastříknuty (20 µl) do HPLC. Teplota kolony (Rezex RFQ-Fast Fruit H+ (8%, $100 \times 7,8\text{ mm}$, 8 µm, Phenomenex, Chromservis, ČR) byla udržována na 50°C . Mobilní fáze se skládala z kyseliny sírové ($0,05\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) v methanolu (10%), přičemž průtok byl $1\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Detekce probíhala při 233 nm.

Askorbová kyselina byla stanovena po zředění vzorku destilovanou vodou s L-cysteinem (0,1%) a šťavelovou kyselinou (1%) pomocí HPLC podle Rajchl et al. (2010).

Obě HPLC analýzy byly provedeny na sestavě Dionex HPLC/UV/VIS (AMEDIS, ČR).

2.5 Statistická analýza

Pro každý vzorek byly provedeny 3 stanovení a byly uvedeny průměrné hodnoty; pro vyhodnocení byly použity programy Statistica 8.0 (StatSoft ČR s.r.o., Praha, ČR) a Excel 2010 (Microsoft Corporation).

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Validace metody

Pro benzen bylo posuzováno pět validačních parametrů: relativní směrodatná odchylka měření (opakovatelnost) byla 6,3 %, linearita

methyldikarbonát, AA): unopened commercial bottles from three batches of the soft drink were held at room temperature ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) under visible light (approximately $10\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$) for six months.

2.3 Determination of benzene

SPME was carried out by a 50/30 µm DVB/CAR/PDMS fibre (Supelco Inc., Bellefonte, USA). The benzene content in soft drinks was determined by GC 6890N equipped with a quadrupole mass detector MS 5973 (Agilent Technologies, USA) and a DB-5MS column (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 µm; Agilent JW Scientific, USA).

Benzene and benzene- d_6 stock standard solutions (both $0,002\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) were prepared in methanol. The carbonated samples were degassed for 1.5 min in an ultrasonic bath prior to the analysis. 5 ml aliquot of each sample was transferred into a 10 ml vial; into each of them, the internal standard of benzene- d_6 (5 µl of stock solution) was added. The samples were equilibrated for 10 min at 60°C ; the fibre was inserted into the headspace of the vials and agitated at 500 rpm for 5 min at 60°C .

The separation chromatographic conditions were as follows: initial column temperature 45°C (5 min), increased to 200°C at $25^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (1 min). The injector (split ratio 30:1) was maintained at 200°C ; the ion source and the MS quadrupole at 230°C and 150°C , respectively; desorption time 5 min; He constant flow $0,7\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. A SIM acquisition mode (m/z 78, 77 for benzene and 84, 82 for benzene- d_6) was used for detection.

2.4 Determination of BA as SB and AA (ascorbic and dehydroascorbic)

To determine BA, the samples were diluted with distilled water, filtered and then injected (20 µl) into the HPLC. The column (Rezex RFQ-Fast Fruit H+ (8%, $100 \times 7,8\text{ mm}$, 8 µm, Phenomenex; Chromservis, CR) temperature was kept at 50°C . The mobile phase consisted of sulphuric acid ($0,05\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) in methanol (10%); the flow rate was $1\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. The detection was at 233 nm.

AA was determined after the dilution of sample in distilled water with L-cysteine (0.1%) and oxalic acid (1%) by HPLC according to Rajchl et al. (2010).

Both HPLC analyses were performed on the Dionex HPLC/UV/VIS instrument (Amedis, CR).

2.5 Statistical analysis

The tests were triplicated for each sample and the mean values are reported; for the evaluation the programs Statistica 8.0 (StatSoft CR s.r.o., Prague, CR) and Excel 2010 (Microsoft Corporation) were used.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Method validation

Five validation parameters for benzene were assessed: the relative standard deviation (repeatability) was 6.3%; the linearity was $1,0\text{--}50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; the LOD and LOQ were $0,1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ and $1,0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, respectively. The recovery of benzene obtained by spiking the drink with $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ and $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ was 91% and 98%, respectively.

byla 1,0–50 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, mez detekce (LOD) byla 0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a mez kvantifikace (LOQ) 1,0 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Výtěžnost benzenu byla zjištěna u „spikovaného“ (fortifikace vzorku standardem) nápoje s obsahem benzenu 1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ na 91 % a 98 %.

3.2 Výsledky studie

Poté, co se Americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv začal v roce 2005 zabývat opětovným výskytem benzenu v nealkoholických nápojích (Nyman et al., 2008), jsme se rozhodli prozkoumat situaci v České republice. V roce 2006 jsme analyzovali 23 vzorků z trhu (ochucené vody, ovocné a jiné nápoje), z toho 15 vzorků mělo deklarovaný obsah benzoátu a askorbové kyseliny na etiketě výrobku. Data pro výše zmíněné vzorky jsou shrnuta na obr. 1. Benzen byl identifikován v 17 vzorcích (74 %). Koncentrace benzenu u sedmi vzorků překročila přípustný limit pro vodu (1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$); v těchto případech se koncentrace benzenu pohybovala v rozmezí od 1,1 až 3,2 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; všechny tyto vzorky obsahovaly jak benzoát, tak askorbovou kyselinu. Korelace obsahu benzenu s obsahem benzoátu sodného a askorbové kyseliny ale nebyla statisticky signifikantní. Další faktory, které jsou uvedeny v literatuře jako promotory vzniku benzenu, např. přítomnost umělých sladidel, CO_2 , vyšší obsah minerálních látek v důsledku použití minerální vody nebo ovocný obsah, také nebyly potvrzeny.

Po skandálu v roce 2006 (ICBA, 2006; U.S. FDA, 2007) vyvstala otázka, zda výrobci reagovali úpravou svých receptur z pohledu eliminace přítomnosti benzenu. Což se do určité míry potvrdilo (U.S. FDA, 2007), avšak na trhu se objevili také výrobci noví a i jiní začali fortifikovat své produkty askorbovou kyselinou a ostatními nutrienty v reakci na poptávku konzumentů po zdravějších výrobcích. V roce 2011 jsme zopakovali průzkum trhu, stanovovali jsme obsah benzenu u 26 nealkoholických nápojů, z nichž 12 bylo buď nakoupených pod stejnými obchodními názvy jako v průzkumu v roce 2006, nebo byly zakoupeny výrobky s obdobným složením od stejného výrobce. Výsledky získané pro tyto vzorky jsou shrnuty na obr. 2 (označení prvních dvanácti vzorků odpovídá vzorkům na obr. 1). Devatenáct vzorků (73 %) obsahovalo detekovatelné koncentrace benzenu; jedenáct z nich bylo nad limit Evropské unie pro benzen v pitné vodě (1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) (ES, 1998), ale žádný z nich nebyl vyšší než limit Světové zdravotnické organizace (10 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) pro benzen v pitné vodě (WHO, 1996).

Shrneme-li výsledky z let 2006 a 2011, měřitelné koncentrace benzenu byly stanoveny u 73 % vzorků (36 ze 49), část z těchto vzorků (13 výrobků) však neobsahovala současně benzoát a askorbovou kyselinu, což poukazuje na jiný zdroj kontaminace benzenem. Zároveň bylo zjištěno, že u 10 % vzorků (5 ze 49) s obsahem benzoátu, askorbové kyseliny i stopových množství přechodných kovů jako katalyzátorů reakce, nebyl identifikován žádný benzen, ačkoliv s ohledem na druh a složení nápoje by jeho vznik mohl být očekáván. Grafické vyjádření statistického zpracování výsledků (analýza hlavních komponent) je zobrazeno na obr. 3. Obrázek poukazuje na korelaci mezi jednotlivými složkami a benzenem. Jediná významná pozitivní korelace byla zjištěna mezi obsahem benzenu a obsahem benzoátu sodného. Zdá se, že více než složení způsobují pozitivní nálezy benzenu vnější kontaminace surovin a podmínky skladování (čas, teplota, UV záření), což koresponduje s literaturou (Nyman et al., 2010).

Skutečnost, že všechny komerční vzorky zahrnuté do průzkumu byly analyzovány v první čtvrtině jejich garantované doby trvanlivosti, by mohla být důvodem ke vzniku relativně zanedbatelných koncentrací benzenu. Proto jsme se rozhodli otestovat vliv podmínek skladování na obsah benzenu a ve spolupráci s jedním z největších tuzemských výrobců byly provedeny neurychlené skladovací experimenty zaměřené na tvorbu benzenu. Kinetika tvorby benzenu během 6 měsíců v nápojích obsahujících oba prekurzory a mineralizovanou vodu je znázorněna na obr. 4. Za optimálních podmínek (Cu a Fe ionty z minerální vody, UV záření, pokojová teplota) byl pozorován nárůst koncentrace benzenu z nuly na téměř 4 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

4 ZÁVĚR

Koncentrace benzenu ve všech 49 reálných vzorcích byla nižší než 10 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, výsledky průzkumu odpovídají celosvětové situaci. Přestože od roku 2006 někteří výrobci zodpovědně minimalizovali přítomnost benzenu ve svých nápojích díky přeformulování receptur výrobků, průměrný obsah benzenu zůstává stejný okolo

3.2 Study results

After the U.S Food and Drug Administration began to investigate in 2005 the reoccurrence of benzene in soft drinks (Nyman et al., 2008), we decided to explore the situation in the Czech Republic. In 2006, we analysed 23 samples from the market, flavoured water, fruit and other drinks), of which 15 samples had benzoate and AA marked on the label. The data found for these samples are summarized in Fig. 1. Benzene was identified in 17 samples (74%). The concentrations of benzene for seven samples exceeded the limit allowed for water (1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), in these cases, the concentration ranged from 1.1 to 3.2 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, all samples contained both benzoate and AA. But the correlation of benzene content with sodium benzoate and AA concentrations was not statistically significant. Other factors, which are mentioned in the literature as benzene formation promoters, e.g. presence of artificial sweeteners, CO_2 , higher mineral content due to the use of mineral water or fruit content, were not confirmed either.

After the benzene scandal in 2006 (ICBA, 2006; U.S. FDA, 2007), a question was raised if the producers reformulated the product from the point of view of the benzene presence elimination. This was to some extent confirmed (U.S. FDA, 2007), however, also new manufactures emerged on the market and others started to fortify their products with AA and other nutrients in response to consumer requests for healthier products. In 2011, we repeated market survey, we determined benzene content of 26 soft drinks, of which 12 were either purchased under the same trade names as in the survey in 2006 or were products of a similar composition from the same producer. The results obtained for these samples are summarized in Fig. 2 (numbers correspond of the first twelve samples correspond to those given in Fig. 1). Nineteen samples (73%) contained detectable concentrations of benzene; eleven of them were above the EU limit for benzene content in drinking water of 1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (ES, 1998), but none of them was above the 10 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ WHO limit for benzene in drinking water (WHO, 1996).

To summarise the results, in the years 2006 and 2011, measurable concentrations of benzene were found in 73% of the samples (36 from 49), however part of these samples (13 products) did not contain both benzoate and AA, which implies another source of contamination. At the same time, it was found that 10% of the samples (5 from 49), containing benzoate, AA and trace amounts of transition metals as catalysts, did not contain any benzene, although with regard to the type and composition of drink, benzene formation could be expected. In the Fig. 3, a graphical processing of the statistical analysis results (principal component analysis) is shown. The graph shows the correlation between the individual constituents and benzene. The only significant positive correlation was identified between benzene and the sodium benzoate content. More than composition, it seems that both external contamination of raw materials and storage conditions (time, temperature, UV light exposition) cause positive findings of benzene, which corresponds with Nyman (Nyman et al., 2010).

The fact that all commercial samples in the survey were analysed in the first quarter of their guaranteed storage period could be the reason of the relatively negligible levels of benzene. We therefore decided to test the influence of storage conditions on benzene levels, and in cooperation with one of the local biggest producers, we carried out not-accelerated storage experiments focusing on benzene formation. The kinetics of benzene formation within 6 months in beverages containing both precursors and mineralized water is shown in Fig. 4. The rise of benzene concentration from zero to almost 4 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ under the optimal formation conditions (Cu and Fe ions from mineral water, UV light, room temperature) was observed.

4 CONCLUSION

The concentrations of benzene in all 49 real samples were below 10 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; the survey results correspond to the global situation. Although since 2006 some producers have minimized the presence of benzene in their beverages by reformulating their products, the average benzene content stays similar at about 1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. The study showed that benzene content is not easily predictable, but when the precursors are present in the product there is always a high probability of benzene formation. Although in comparison with another sources of exposure benzene intake from soft drinks is negligible; producers can be recommended to

1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Studie ukázala, že obsah benzenu není snadné předvídat, ale pokud jsou prekursor přítomny ve výrobku, existuje vždy vysoká pravděpodobnost vzniku benzenu. Ačkoliv ve srovnání s jinými zdroji expozice je příjem benzenu z nealkoholických nápojů zanedbatelný, lze výrobcům doporučit provádět specifické testy skladovatelnosti pro každý produkt s obsahem jak přírodních kyselin benzoové a askorbové, tak v případě jejich použití jako aditiva.

PODĚKOVÁNÍ

Projekt byl financován z účelové podpory na specifický vysokýšolský výzkum MŠMT (MSM6046137305). Autoři děkují Ing. Liškové a Ing. Šrámkové ze společnosti Poděbradka, a.s. za poskytnuté vzorky a konzultaci naměřených výsledků.

Autoři by také rádi vyjádřili své upřímné díky zesnulému panu profesorovi Michalovi Voldřichovi za jeho rady, podporu a inspiraci nejen v rámci této práce.

LITERATURA / REFERENCES

- Adams, J. B., 1997: Food additive-additive interactions involving sulphur dioxide and ascorbic and nitrous acids: a review. *Food Chem.*, 59(3): 401–409.
- EC, 1998 [online]: Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:330:0032:0054:EN:PDF> [cit. 2013-3-20].
- Fabietti, F., Delise, M., Bocca, A. P., 2001: Investigation into benzene and toluene content of soft drinks. *Food Control.*, 12(8): 505–509.
- Gardner, L. K., Lawrence, G. D., 1993: Benzene Production from Decarboxylation of Benzoic Acid in the Presence of Ascorbic Acid and a Transition-Metal Catalyst. *J. Agric. Food Chem.*, 41(5): 693–695.
- IARC, 1987 [online]: Overall Evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42, IARC Monographs on the Evaluation of the carcinogenic risks to humans, Supplement 7. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/suppl7/suppl7.pdf> [cit. 2013-3-20].
- ICBA, 2006 [online]: Guidance Document to Mitigate the Potential for Benzene Formation in Beverages. <http://www.britishtsoftdrinks.com/PDF/IBCA%20final%20220606.pdf> [cit. 2013-4-5].
- Lachenmeier, D. W., Reusch, H., Sproll, C., Schoeberl, K., Kuballa, T., 2008: Occurrence of benzene as a heat-induced contamination of carrot juice for babies in a general survey of beverages. *Food Addit. Contam.* 25(10): 1216–1224.
- mze ČR, 2008 [online]: Vyhláška č. 4/2008 Sb. ze dne 3. ledna 2008, kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extračních rozpouštědel při výrobě potravin. http://eagri.cz/public/web/ws_content?contentKind=regulation§ion=1&id=65967&name=4/2008 [cit. 2013-4-5].
- Nyman, P. J., Diachenko, G. W., Perfetti, G. A., McNeal, T. P., Hiatt, M. H., Morehouse, K. M., 2008: Survey Results of Benzene in Soft Drinks and Other Beverages by Headspace Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 56(2): 571–576.
- Nyman, P. J., Wamer, W. G., Begley, T. H., Diachenko, G. W., Perfetti, G. A., 2010: Evaluation of Accelerated UV and Thermal Testing for Benzene Formation in Beverages Containing Benzoate and Ascorbic Acid. *J. Food Sci.*, 75(3): 263–267.
- Poucke, Ch. V., Detavernier, Ch., Bocxlaer, J. F. V., Vermeulen, R., Peteghem, C. V., 2008: Monitoring the Benzene Contents in Soft
- Drinks Using Headspace Gas Chromatography–Mass Spectrometry: A Survey of the Situation on the Belgian Market. *J. Agric. Food Chem.*, 56(12): 4504–4510.
- Rajchl, A., Voldřich, M., Čížková, H., Hronová, M., Ševčík, R., Dobáš, J., Pivoňka, J., 2010: Stability of nutritionally important compounds and shelf life prediction of tomato ketchup. *J. Food Eng.*, 99(4): 465–470.
- Ridgway, K., Lalljie, S. P. D., Smith, R. M., 2007: Use of in-tube sorptive extraction techniques for determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in soft drinks. *J. Chromatogr. A.*, 1174(1–2): 20–26.
- Vinci, R. M., Jaccxsens, L., Loco, J. V., Matsiko, E., Lachat, C., de Schaetzen, T., Canfyn, M., Overmeire, I. V., Kolsteren, P., de Meulenaer, B., 2012: Assessment of human exposure to benzene through foods from the Belgian market. *Chemosphere*, 88(8): 1001–1007.
- Wallace, L., Pellizzari, E., Gordon, S., 1993: A linear model relating breath concentrations to environmental exposures: application to a chamber study of four volunteers exposed to volatile organic chemicals. *J. Expos. Anal. Environ. Epidemiol.*, 3(1): 75–102.
- WHO, 1993 [online]: International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 150. Benzene. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc150.htm> [cit. 2013-4-10].
- WHO, 1996 [online]: Benzene in Drinking Water. Background Document for Development of WHO Guidelines for Drinking Water Quality. http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/benzene.pdf [cit. 2013-4-10].
- U.S. HHS, 1997 [online]: Toxicological profile for benzene. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp3.pdf> [cit. 2013-4-15].
- U.S. HHS, 2011 [online]: Report on Carcinogens. 12th ed. <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/twelfth/roc12.pdf> [cit. 2013-4-15].
- U.S. FDA, 2007 [online]: Data on Benzene in Soft Drinks and Other Beverages. <http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/ChemicalContaminants/ucm055815.htm> [cit. 2013-4-15].

Do redakce došlo / Manuscript received: 8. 8. 2013
Přijato k publikování / Accepted for publication: 3. 11. 2013

PIVOVARSKÝ KALENDÁŘ 2014

cena 200 Kč včetně DPH

CHMELAŘSKÁ ROČENKA 2014

cena 200 Kč včetně DPH

Objednávky: Irena Boudová, boudova@beerresearch.cz, tel. 224 900 146
Množstevní slevy na obě ročenky