SVILUPPO DI METODI PER L'IDENTIFICAZIONE DI ALCOLICI ADULTERATI MEDIANTE GC/MS PORTATILE DA CAMPO

Introduzione

L'industria delle bevande alcoliche è il settore delle esportazioni agroalimentari europee di maggior valore (10 miliardi di euro di esportazioni, che rappresentano un'eccedenza commerciale vicina ai 9 miliardi di euro). Gli alcolici distillati sono diversi come gli Stati membri dell'UE, abbracciano 46 categorie di prodotti e includono una serie di prodotti geograficamente specifici che contribuiscono alla cultura delle loro regioni e dell'Unione europea. Lo Scotch Whisky, ad esempio, è la più grande categoria di whisky al mondo ed è venduto in quasi 200 paesi in tutto il mondo. Il valore delle esportazioni di Scotch Whisky per il 2014 è stato riportato a 3,95 miliardi di sterline, equivalenti a circa 135 sterline al secondo per la bilancia commerciale del Regno Unito. Lo Scotch Whisky e altri liquori europei sono prodotti globali premium e sono quindi un obiettivo importante per i contraffattori illegali.

La contraffazione ha un impatto sulla vendita diretta: danneggia la reputazione di marchi e categorie di liquori. Anche i problemi di sicurezza sono una preoccupazione e questi impatti sono quindi rilevanti per tutti i produttori di alcolici. I contraffattori utilizzano alcol industriale denaturato per produrre alcolici falsi e adulterati, che degradano il prodotto e possono rappresentare un rischio significativo per la salute di coloro che lo consumano. Ci sono sostanze chimiche aggiunte specificamente all'alcol denaturato per renderlo imbevibile; aggiunti in tracce, come previsto dalla legge, possono rappresentare un rischio significativo per la salute se consumati. Metiletilchetone e metanolo sono esempi di tali composti aggiunti all'alcol per prevenirne il consumo. Sono state utilizzate numerose tecniche analitiche per rilevare whisky e liquori adulterati. Questi metodi sono spesso di laboratorio e si affidano a operatori esperti per eseguire l'analisi. È stato sviluppato un metodo molto semplice utilizzando un GC/MS portatile sul campo per rilevare lo Scotch Whisky adulterato e altri prodotti alcolici. In questa nota applicativa, ci concentreremo sull'analisi di vari composti che possono aiutare nella rilevazione di Scotch Whisky adulterato. Altri marcatori nell'alcol denaturato sono unici nella loro struttura chimica e possono essere facilmente rilevati e identificati positivamente mediante GC/MS. L'intervallo di massa del Torion® T-9 (41-500 m/z) è appena al di sotto della capacità di rilevare il metanolo che viene spesso utilizzato in combinazione con altri composti come marker per l'alcol denaturato. Tuttavia, il metodo qui descritto fornisce la capacità di rilevare in modo affidabile gli alcolici adulterati senza la necessità di rilevare il metanolo, e farlo direttamente sul campo, sia in un porto di ingresso, in un magazzino di distribuzione o in un punto vendita, che può aiutare a mantenere questi pericolosi prodotti dal raggiungere il consumatore.

Per portare con successo sul campo una tecnica sofisticata come GC/MS è necessario lo sviluppo di hardware semplice e robusto, software di facile utilizzo e tecniche complementari di preparazione e introduzione del campione. Questi sistemi sono spesso affidati a non chimici che non hanno una formazione approfondita

sulla preparazione dei campioni GC/MS e sull'analisi dei dati. PerkinElmer Torion T-9 è un GC/MS completamente autonomo, robusto e portatile. Funziona a batteria, con un'alimentazione interna di gas di trasporto e un software di facile utilizzo, il sistema può essere facilmente utilizzato sul campo da un non chimico. Il successo dell'implementazione del T-9 sul campo dipende anche dallo sviluppo di un metodo di campionamento compatibile con l'attività e dalla presentazione dell'analisi dei dati dei risultati all'analista in una forma chiara e utilizzabile. In questo articolo ci concentriamo sullo sviluppo completo del metodo per rilevare e identificare rapidamente l'alcol denaturato nello Scotch Whisky e in altri liquori. Il metodo utilizza i composti in tracce aggiunti all'alcol denaturato negli intervalli di concentrazione dell'1-5% per il rilevamento e l'identificazione. Questi marcatori chimici nell'alcol denaturato sono unici nella loro struttura chimica e possono essere facilmente rilevati e identificati positivamente mediante GC/MS. L'uso di GC/MS, con la sua porzione di gascromatografia come front-end di separazione, garantisce che i composti aromatici e di sapore presenti negli alcolici non interferiscano con il rilevamento, mascherando i composti marcatori o dando luogo a false identificazioni. Poiché i contraffattori possono tentare di rimuovere chimicamente alcuni dei marcatori, abbassando ulteriormente le concentrazioni per impedire il rilevamento, l'elevata sensibilità della tecnica GC/MS garantisce un rilevamento positivo dei marcatori, anche a concentrazioni molto basse.

Sviluppo del metodo

Per l'analisi è stato selezionato un metodo GC/MS generico, sulla base dell'esperienza precedente. I parametri del metodo sono elencati nella Tabella 1. Successivamente, gli standard dei composti marcatori denaturati a concentrazioni nell'intervallo tra metà ppm e bassa percentuale sono stati aggiunti a una miscela di acqua con il 40% di etanolo. I campioni sono stati inizialmente preparati pipettando 1 ml di campione in una fiala con spazio di testa da 10 ml, che è stata poi sigillata con setto rivestito di Teflon. I campioni sono stati lasciati equilibrare per 10 minuti. I composti volatili nella miscela si partiranno tra il liquido e lo spazio di testa sopra il liquido nel contenitore sigillato. Lo spazio di testa sopra il liquido è stato campionato per periodi di tempo compresi tra 30 secondi e cinque minuti, per determinare un tempo di campionamento ottimale. La sperimentazione con i vari intervalli di concentrazione e tempi di campionamento sono fasi di ottimizzazione del metodo. La siringa di campionamento SPME Custodion™ è stata utilizzata per campionare lo spazio di testa del contenitore del campione. La fibra SPME è lunga 1 cm ed è rivestita con un materiale adsorbente. Per questa applicazione (PDMS) è stato selezionato un rivestimento in fibra per uso generico e ad ampio punto di ebollizione: polidimetilsilossano/ (DVB) divinilbenzene. Esponendo la fibra allo spazio di testa sopra il campione, i componenti volatili vengono raccolti sulla fibra per la successiva iniezione nel GC/MS.

Table 1. Method Parameters.

SPME	PDMS/DVB
GC Injector	270 °C
GC Column	MXT-5 5 m x 0.1 mm id, 0.4 um df
GC Carrier Gas	50 °C initial hold for 10s, programmed at 2 °C/s to 270 °C
GC Column Temp.	43.92
GC Run Time	2 minutes
Injection	Split 10:1
Mass Analyzer	Toroidal ion trap
Scan Range	41-500
Transfer Line	250 °C
Ionization	-70 eV in trap electron impact

È stata creata una libreria di riferimento (metodo del composto target) di composti marcatori denaturati utilizzando gli standard preparati. La libreria dei composti target è costituita dal tempo di ritenzione GC e dagli spettri di massa MS; questi due parametri vengono utilizzati per l'identificazione ortogonale, il che significa che due diverse fonti di informazioni vengono utilizzate in modo cooperativo per garantire

l'accuratezza dell'identificazione. La tabella 2 è un elenco della libreria di riferimento per i composti marcatori che possono essere trovati nei prodotti alcolici denaturati tedeschi, europei e statunitensi.

Table 2. Target List

Compound	Retention Time	CAS Number	Mass Spectrum
Isopropyl Alcohol	11.30	67-63-0	44, 45*, 47,59,61,69
Methyl ethyl ketone	16.88	78-93-3	43, 57, 72, 73*
Methyl isopropyl ketone	21.99	563-80-4	43*, 71, 86, 89
Methyl isobutyl ketone	29.42	591-78-6	43, 57, 58, 85,100,101*
Ethyl sec-amyl ketone	48.78	541-85-5	43, 57, 71, 72, 73, 99,128,129*

**Represents base peak*

Il metodo è stato testato per il rilevamento dei denaturanti aggiungendo alcol denaturato metodo europeo e tedesco in una miscela di whisky scozzese. Quando analizzati, entrambi hanno prodotto un rilevamento positivo per i composti denaturati.

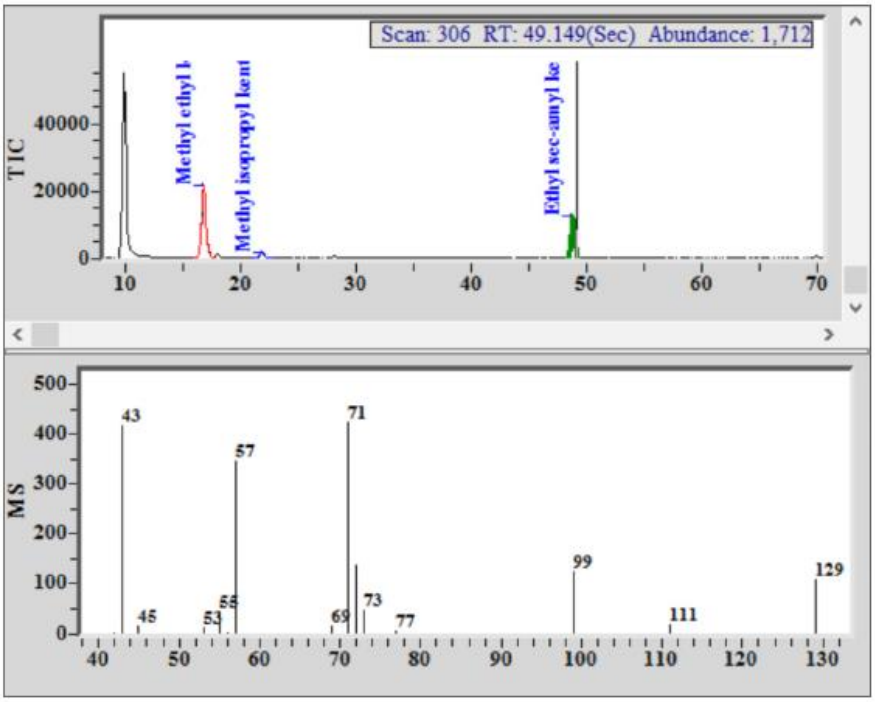

Figure 1. Chromatogram and mass spectrum, with identification of marker components in a Euro spike of a blended Scotch Whisky

I risultati GC/MS sono generalmente presentati come un elenco di composti chimici che sono stati rilevati. In laboratorio un analista sa interpretare i dati. Tuttavia, sul campo, il non specialista non saprà necessariamente che la rilevazione del metilisopropilchetone rappresenta la rilevazione dell'alcol denaturato. Il software T-9 include la capacità di contrassegnare composti specifici come pericolosi e l'uso di livelli di pericolo avvisa l'operatore che è stato rilevato uno o più marcatori di alcol denaturato. La Figura 2 è un esempio della schermata di avviso che viene visualizzata sul T-9 quando vengono rilevati uno o più composti nella libreria di destinazione.

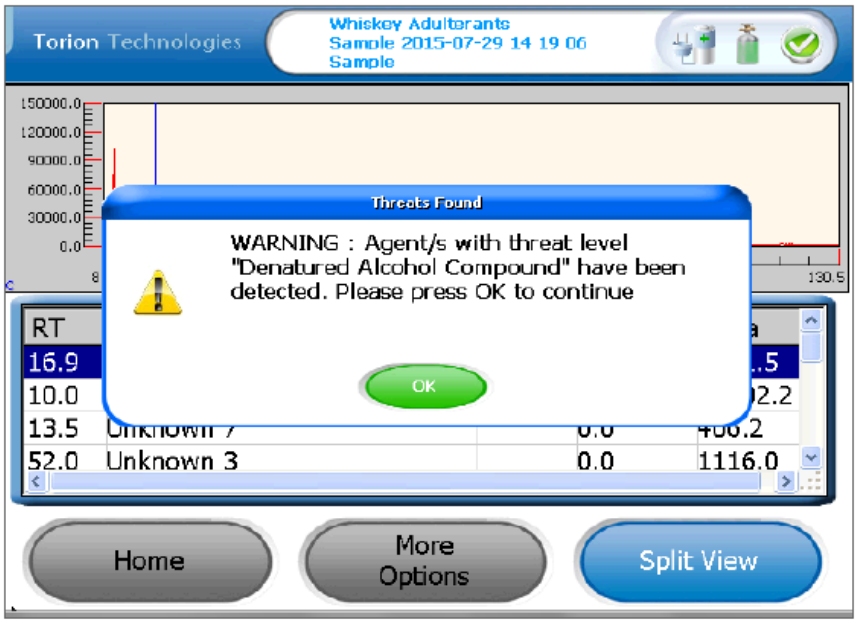

Figure 2. An example of an 'Alert' when a target compound in denatured alcohol is detected.

Convalida del metodo

Sono stati quindi eseguiti test per determinare il livello minimo di identificazione e l'intervallo dinamico di identificazione, utilizzando uno dei prodotti miscelati di Scotch Whisky. L'alcol denaturato proveniente dagli Stati Uniti è stato aggiunto al whisky a livelli che vanno dallo 0,1% (1000 ppm/v) al 10% (100.000 ppm). La scheda di sicurezza del materiale (MSDS) per il prodotto alcol denaturato elenca gli intervalli di concentrazione dei componenti come 1 – 4% per (MIBK) Metil Isobutil Chetone nel prodotto. Gli intervalli di concentrazione risultanti per il MIBK, quando si utilizza un picco di alcol denaturato dallo 0,1 al 10%, sono quindi di circa 10 – 4000 ppm/v. Il livello di identificazione più basso è stato determinato essere lo 0,25% di alcol denaturato o da 25 a 100 ppm/v di MIBK (concentrazione 1-4% nell'alcol denaturato).

Table 3. The spirit drinks employed in this study.

Qty	Spirit Drinks
2	Blended Scotch
2	Single Malt
2	Tennessee whiskey
1	Canadian whiskey
1	Irish whiskey
3	Rums (2 flavoured)
2	Vodka (1 flavoured)
1	Tequila
1	Liquor

Durante questa fase successiva di convalida del metodo, è stata sviluppata una fase di preparazione del campione semplificata. L'idea era di rendere il campionamento il più semplice ed economico possibile sul campo. L'uso delle fiale con spazio di testa da 10 ml utilizzate durante lo sviluppo iniziale del metodo sarebbe costoso e ingombrante sul campo. Le provette per autocampionatore in polipropilene (15 ml), comunemente utilizzate nei laboratori, hanno fornito un dispositivo di campionamento sul campo economico e di facile utilizzo (parte PerkinElmer n. B0193233). I tubi sono graduati in modo che la bevanda alcolica possa essere facilmente versata nel tubo, garantendo un volume accurato. L'uso dei tubi di campionamento ha eliminato la necessità di pipettare e l'uso di una pinza per sigillare la fiala, riducendo così il costo dei materiali di consumo necessari per l'analisi.

Le fasi di preparazione del campione consistono nell'aggiungere 2 ml dell'alcolico da testare alla provetta di campionamento, tappare con il tappo a vite fornito e bilanciare per cinque minuti. Dopo cinque minuti, il cappuccio viene rimosso, la siringa CUSTODION SPME inserita nello spazio di testa e tenuta saldamente contro la parte superiore del tubo. La fibra SPME viene quindi esposta allo spazio di testa per 30 secondi. Il campione, adsorbito sulla fibra SPME, viene quindi iniettato nel GC/MS per l'analisi.

Figure 3. Sampling with the CUSTODION. The SPME fibre is housed in a durable syringe that is operated like a ball point pen.

Le 15 bevande alcoliche sono state preparate utilizzando questo metodo, campionate e analizzate non adulterate con zero eventi di rilevamento di falsi positivi. L'alcol denaturato è stato quindi aggiunto alle bevande ad una concentrazione dello 0,25%. Tutti i 15 campioni sono stati quindi analizzati con un rilevamento positivo al 100%. Gli alcolici sono stati quindi addizionati con una concentrazione di alcol denaturato del 10%. Il marker denaturato MIBK è stato nuovamente rilevato positivamente. Il passaggio finale nello sviluppo del metodo è stato quello di semplificare ulteriormente la segnalazione in modo che vengano riportati solo i composti elencati nella libreria di destinazione.

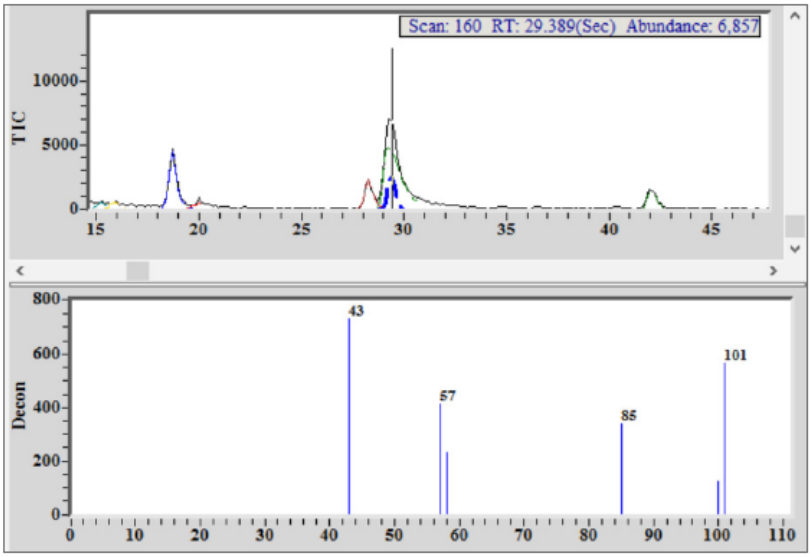

Figure 4. Chromatogram from single malt Scotch whiskey showing detection and identification of methyl isobutyl ketone (MIBK) co-eluting with a flavor/aroma compound.

Sommario

L'uso di GC/MS portatili sul campo fornisce una determinazione rapida e affidabile della presenza di alcol denaturato quando aggiunto alle bevande alcoliche per aumentare il contenuto di alcol. I limiti di rilevabilità bassi, basati sull'aggiunta dello 0,25% in volume di alcol denaturato, offre la certezza che, anche se si adottano misure per rimuovere parzialmente i marcatori di alcol denaturato, questi verranno rilevati. Va inoltre notato che il test presenta uno scenario più impegnativo di quanto ci si aspetterebbe nella pratica:

ovvero l'uso di alcol denaturato al 100% come acquavite contraffatta. Il tempo di analisi è di circa 10 minuti per campione. Il software di analisi dei dati è stato configurato per fornire risultati in un formato "non chimico" in modo che non vi siano ambiguità per l'operatore.

Ringraziamenti

Lo sviluppo iniziale del metodo è stato condotto presso lo Scotch Whisky Research Institute (SWRI), Edimburgo, Scozia. Peter Cockburn di SWRI e il dottor Andrew Hobson di Quantitech Ltd hanno contribuito allo sviluppo. Lo Scotch Whisky Research Institute è l'organizzazione di ricerca e tecnologia per l'industria del whisky scozzese. La sua missione è garantire la sostenibilità e proteggere lo Scotch whisky come prodotto globale premium. Il suo lavoro per lo sviluppo di questo metodo faceva parte del progetto EU FoodIntegrity. Il progetto ha ricevuto finanziamenti dal Settimo programma quadro dell'Unione europea per la ricerca, lo sviluppo tecnologico e la dimostrazione nell'ambito dell'accordo di sovvenzione n. 613688. Oltre a svolgere ricerche fondamentali a beneficio dell'industria, lo SWRI esegue analisi generiche sull'autenticità del whisky scozzese per conto dell'ufficio legale della Scotch Whisky Association. I loro rapporti analitici vengono utilizzati per sostenere i procedimenti giudiziari contro i contraffattori in tutto il mondo. Ogni anno analizzano circa 150 campioni di whisky sospetti provenienti da tutto il mondo.

QUANTANALITICA

Via Guido Rossa 14
23875 Osnago (LC) - Italy
Tel. +39 039 9280061
Fax. +39 039 9289636
info@quantanalitica.com
www.quantanalica.com