

Bestimmung von Ethylenoxid und Ethylenchlorhydrin in Sesamsamen mit dem Agilent 8890 GC-System und dem 7000D Triple-Quadrupol-MS-System

Autoren

Praveen Arya, Vivek Dhyani
und Dr. Samir Vyas
Agilent Technologies, Inc.

Zusammenfassung

Diese Application Note zeigt die Anwendung des Agilent 8890 GC-Systems zusammen mit dem Agilent 7000D GC/MS Triple-Quadrupol-MS zum Nachweis und zur Quantifizierung von Ethylenoxid und Ethylenchlorhydrin in Sesamsamen-Proben. Die Methode liefert zuverlässige Ergebnisse bei Routineanalysen in der Nahrungsmittelindustrie, egal ob bei der Produktion, Verarbeitung, Lagerung oder kommerziellen Testung von Sesamsamen oder für akademische Zwecke. Bei der Probenvorbereitung wird der Ethylenoxid-Rückstand in der Probe zu Ethylenchlorhydrin umgewandelt. Anschließend erfolgt eine Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) mit Ethylacetat und eine Reinigung, bevor die Probe in das GC/TQ-System injiziert wird. Es wurde eine Quantifizierungsgrenze (LOQ) von 10 ppb in der Matrix gezeigt.

Ethylenoxid wird zur Sterilisierung von Ölsaaten und Gewürzen während der Lagerung verwendet. In diesen Lebensmitteln können Rückstände von Ethylenoxid und seinem Derivat Ethylenchlorhydrin (das durch Reaktionen während der Lagerung entsteht) vorkommen.¹ Ethylenchlorhydrin eignet sich als Marker zur Bestätigung einer Begasung mit Ethylenoxid. Das Ethylenchlorhydrin in Sesamsamen kann durch eine einfache analytische GC/TQ-Methode bestimmt werden. Diese Bestimmung ermöglicht mithilfe eines Umrechnungsfaktors auch die Beurteilung des anfangs tatsächlich in der Probe vorhandenen Ethylenoxids.

In dieser Arbeit erwies sich diese Methode als geeignet, um mithilfe des 8890 GC-Systems zusammen mit dem 7000D Triple-Quadrupol-MS Ethylenchlorhydrin als Marker für eine Ethylenoxid-Begasung von Sesamsamen nachzuweisen (mit 10 ng/g als LOQ, ausreichend zur Bestimmung des von der EU festgelegten Rückstandshöchstwerts (MRL) von 50 ng/g).²

Experimentelles

Erforderliche Chemikalien

- 0,1 N Schwefelsäure (0,981 g Schwefelsäure, gelöst in 100 ml Wasser)
- Wässrige gesättigte Natriumchloridlösung
- Wasser (Millipore Milli-Q)
- Ethylacetat (HPLC-Reinheitsgrad)
- Agilent QuEChERS Dispersions-Aufreinigungskit (Bestellnummer 5982-0028)
- Ethylenoxid-Referenzstandard (Sigma-Aldrich, Bestellnummer CRM48891)
- Ethylenchlorhydrin-Referenzstandard (Merck, Bestellnummer 8.00945.0100)

Erforderliche Geräte

In dieser Studie wurden ein Agilent 8890 GC-System, ausgestattet mit einem MMI-Einlass und konfiguriert mit einer nachgelagerten Backflush-Option, ein 7000D Triple-Quadrupol-MS, ein Ultraschall-Reinigungsbad, ein Wasserbad, eine Kühlzentrifuge, eine Tischzentrifuge und ein Vortexmischer verwendet. Folgendes Verfahren wurde durchgeführt:

1. 2 g abgewogene Probe in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen geben.
2. 2 ml Wasser, 2 ml 0,1 N H_2SO_4 und 1 ml gesättigte Natriumchloridlösung hinzugeben.
3. 20 Minuten im Ultraschallbad behandeln.
4. Die Probe 1 Stunde lang bei 50 °C in einem Wasserbad ruhen lassen.
5. Vortexen und warten, bis die Probe Raumtemperatur erreicht.
6. 5 ml Ethylacetat hinzugeben und 10 Minuten lang vortexen.
7. Bei 8000 U/min 5 Minuten lang bei 5 °C zentrifugieren.
8. 1 ml des Überstands abnehmen und zu einem QuEChERS Dispersions-Aufreinigungsröhrchen (universal) (Bestellnummer 5982-0028) hinzugeben.
9. Schütteln und bei 5000 U/min 5 Minuten lang zentrifugieren.
10. Den Überstand in ein Probenröhrchen überführen und in das GC/MS/MS-System injizieren.

Tabelle 1. GC-Methode.

GC-Bedingungen	
Säule	Agilent VF-624 ms, 60 m × 0,25 mm, 1,4 µm (Best.-Nr. CP9103)
Einlass	Agilent Multimode-Einlass 5190-2293, Splitless-Liner Injektionsvolumen: 2 µl
Injektionsmodus	Gepulst splitlos, 25 psi bis 0,8 min, Purge-Fluss 40 ml/min bei 1,25 min
Einlass-temperatur	250 °C
Ofen	60 °C (für 2 min); bei 10 °C/min bis 150 °C, bei 40 °C/min bis 250 °C, Haltezeit 20 min
Trärgas	99,9995 % Helium mit 1,0 ml/min, konstanter Flussmodus

Tabelle 2. MS-Methode MS-Bedingungen.

MSD-Bedingungen	
Quadrupoltemperatur	150 °C
Ionenquellentemperatur	EI 280 °C
Transferleitungstemperatur	250 °C
MRM-Übergänge für Ethylenchlorhydrin	82 → 31 (CE: 5) 80 → 43 (CE: 5) 80 → 31 (CE: 5)
EMV-Modus	Gain-Faktor: 10
Verweilzeit für jeden Übergang	75
Solvent Delay	9,5

Ergebnisse und Diskussion

Mit der oben beschriebenen Methode ergab sich eine LOQ für Ethylenchlorhydrin in Sesamsamen-Proben von 10 ng/g, da sich bei dieser Konzentration der Peak leicht von der Basislinie und der Matrix mit Signal/Rausch-Verhältnissen von $> 2,9$ unterscheiden ließ. In Abbildung 1 sind die Quantifizierungs- und Qualifizierungs-EIC bei Anreicherung mit der LOQ-Konzentration dargestellt. Diese LOQ entspricht sowohl dem Kundenbedarf als auch den gesetzlichen Bestimmungen für den MRL, der von der EU auf 50 ng/g festgelegt wurde. Abbildung 2 zeigt das Signal/Rausch-Verhältnis für Matrixstandards mit 10 ppb und 50 ppb.

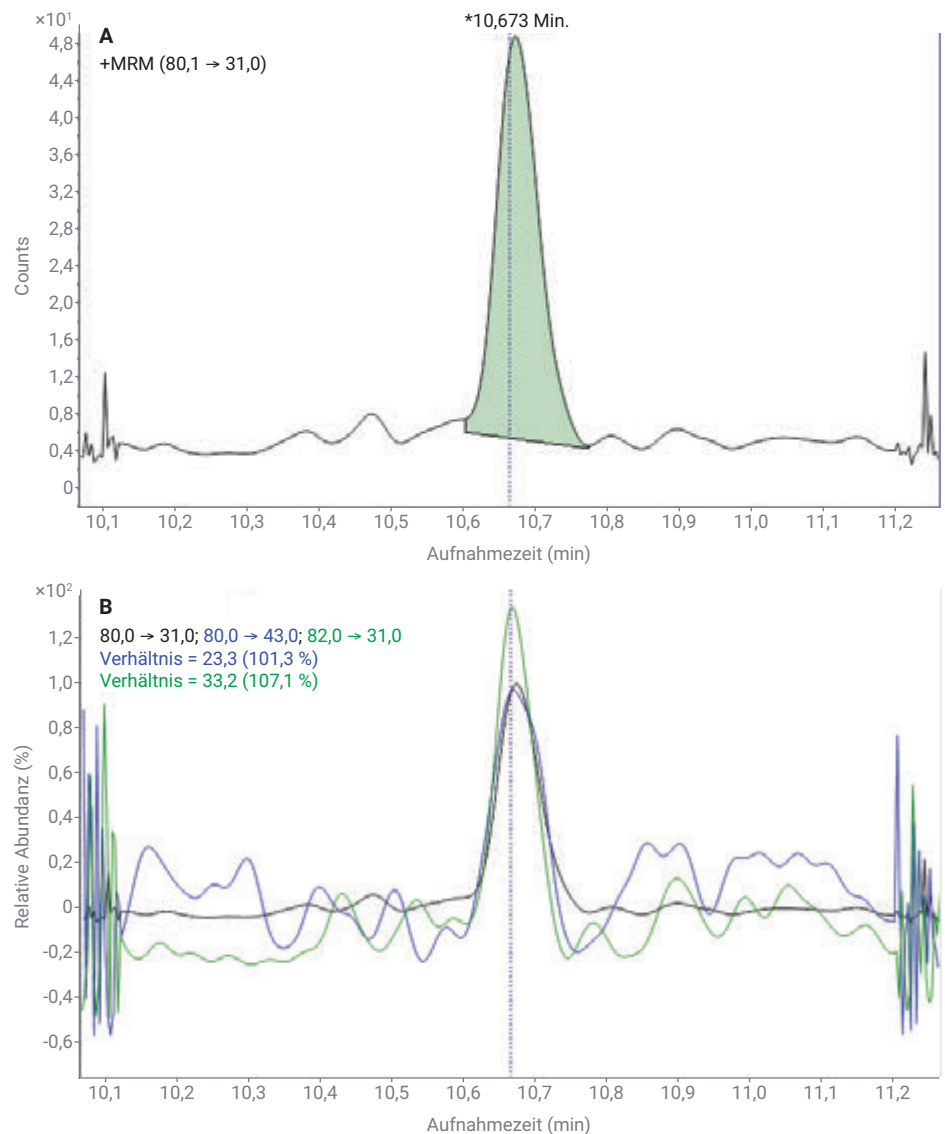


Abbildung 1. Ein Quantifizierungs- und zwei Qualifizierungs-Peaks von Ethylenchlorhydrin in der mit 10 ng/g angereicherten Probe.

Kalibrierung und Linearität

Es wurde ein Matrix-Linearitätsdiagramm für die Response (Peakfläche) im Bereich der zuvor zugesetzten Konzentrationsniveaus von 5 bis 200 ng/g erstellt (Abbildung 4). Die Kalibrierung erfolgte bei sechs Konzentrationsniveaus: 5, 10, 20, 50, 100 und 200 ng/g. Es zeigte sich eine gute Linearität mit $R^2 > 0,998$.

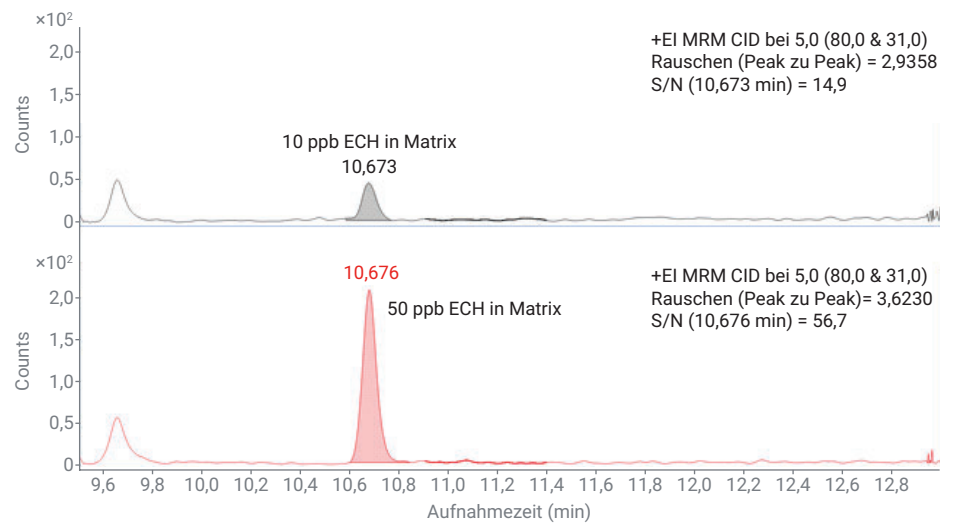


Abbildung 2. Empfindlichkeit von Ethylenchlorhydrin: MRM-Chromatogramme der mit 10 ng/g und 50 ng/g dotierten Proben.

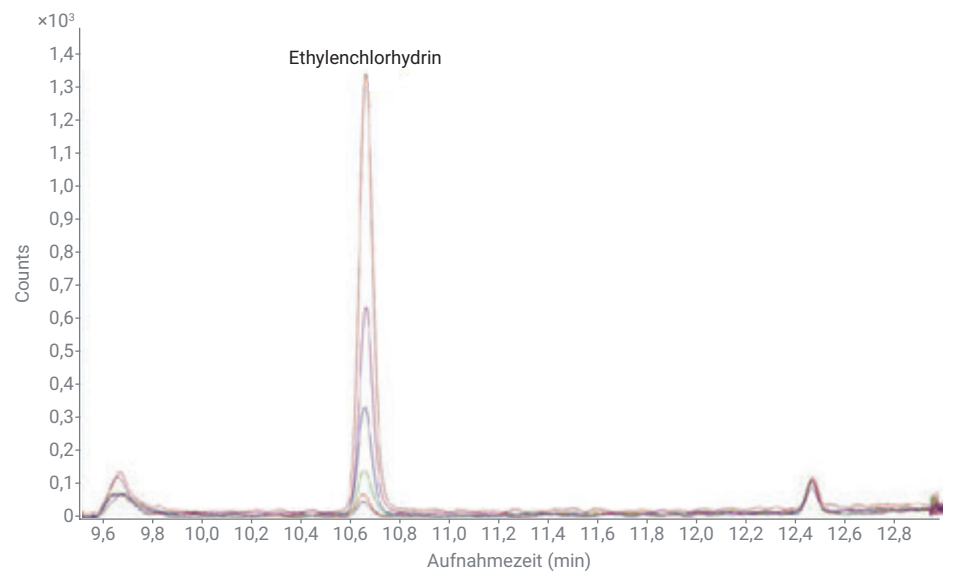


Abbildung 3. Überlagerte MRM-Darstellung verschiedener Ethylenchlorhydrin-Konzentrationen im Totalionen-Chromatogramm in einer Matrix im Bereich von 5 ppb bis 200 ppb.

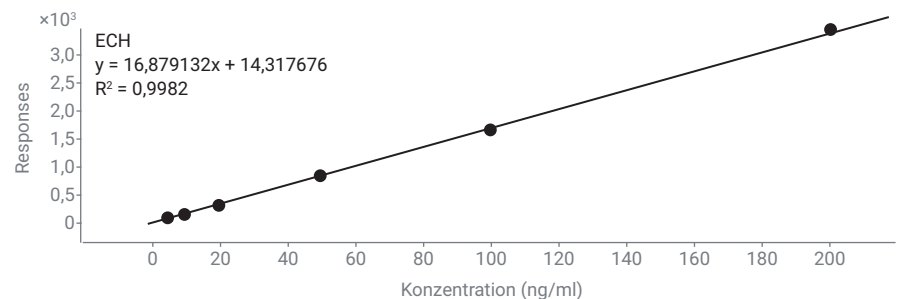


Abbildung 4. Kalibrierungsdiagramm für Ethylenchlorhydrin mit matrixangepassten Standards.

Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit der Elution wurde nachgewiesen, indem Ethylenchlorhydrin-Standards mit einer Konzentration von 50 ppb in der Matrix injiziert wurden.

Die relative Standardabweichung der Ethylenchlorhydrin-Peakflächen, die auf Basis von sechs Wiederholungsinjektionen eines Matrixstandards mit 50 ppb berechnet wurde, betrug 1,73 % (siehe Tabelle 3).

Quantifizierung in Sesamsamen-Proben

Die besprochene Methode wurde auch bei der Sesamsamen-Probe angewendet, die auf einem lokalen Markt für die Analyse und Wiederfindungsstudie erworben wurde.

Wiederfindungsstudie

Wie in Tabelle 4 ersichtlich wurde in der Blind-Matrix der Sesamsamen kein Peak gefunden, der Ethylenchlorhydrin entspricht. Die Wiederfindung von Ethylenchlorhydrin und Ethylenoxid aus der realen Sesamsamen-Probe wurde mithilfe von Dotierungsleveln von 10 und 50 ppb für Ethylenchlorhydrin und 10 ppb für Ethylenoxid berechnet.

Folgende drei Anreicherungsstudien wurden durchgeführt:

1. Die Sesamsamen-Probe wurde mit Ethylenchlorhydrin in einer Konzentration von 10 ppb angereichert.
2. Die Sesamsamen-Probe wurde mit Ethylenchlorhydrin in einer Konzentration von 50 ppb angereichert.
3. Die Sesamsamen-Probe wurde mit Ethylenoxid in einer Konzentration von 10 ppb angereichert. Dieses Vorgehen erfolgte, um die Eignung der Methode zur Beurteilung des Ethylenoxidgehalts in der Probe zu prüfen. (Zur Berechnung der Ergebnisse der mit Ethylenoxid angereicherten Probe wurde ein Umrechnungsfaktor von 0,55 als Multiplikationsfaktor verwendet).² Die für die prozentuale Wiederfindung erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 3. Prozentuale relative Standardabweichung (CV) für Ethylenchlorhydrin für den 50-ppb-matrixangepassten Standard.

Fläche Inj-1	Fläche Inj-2	Fläche Inj-3	Fläche Inj-4	Fläche Inj-5	Fläche Inj-6	% RSD
821	804	811	829	842	810	1,73

Tabelle 4. Zusammenfassung der Quantifizierung für die Kalibrierung (5 bis 200 ppb), Dotierungswiederfindung (10 und 50 ppb) und Reproduzierbarkeitsstudie (50 ppb).

Probenname	Verbindung	Probentyp	RT	Response	Endkonz. (ng/g)
Matrix-Blindwert_Sesamsamen	Ethylenchlorhydrin	Probe			ND
Matrix-Kalibrierung-1_5 ppb	Ethylenchlorhydrin	Kalibrierung	10,646	115	5,97
Matrix-Kalibrierung-2_10 ppb	Ethylenchlorhydrin	Kalibrierung	10,650	165	8,9
Matrix-Kalibrierung-3_20 ppb	Ethylenchlorhydrin	Kalibrierung	10,654	324	18,32
Matrix-Kalibrierung-4_50 ppb	Ethylenchlorhydrin	Kalibrierung	10,654	856	49,85
Matrix-Kalibrierung-5_100 ppb	Ethylenchlorhydrin	Kalibrierung	10,657	1676	98,46
Matrix-Kalibrierung-6_200 ppb	Ethylenchlorhydrin	Kalibrierung	10,657	3449	203,5
Sesam_ECH SPK_10 ppb	Ethylenchlorhydrin	Probe	10,673	184	10,08
Sesam_ECH SPK_50 ppb	Ethylenchlorhydrin	Probe	10,676	859	50,04
Sesam_ETO SPK_10 ppb	Ethylenchlorhydrin	Probe	10,673	267	8,23
50 ppb Dotierungsreplik-1	Ethylenchlorhydrin	Probe	10,699	821	47,8
50 ppb Dotierungsreplik-2	Ethylenchlorhydrin	Probe	10,707	804	46,79
50 ppb Dotierungsreplik-3	Ethylenchlorhydrin	Probe	10,714	811	47,2
50 ppb Dotierungsreplik-4	Ethylenchlorhydrin	Probe	10,718	829	48,29
50 ppb Dotierungsreplik-5	Ethylenchlorhydrin	Probe	10,737	842	49,05
50 ppb Dotierungsreplik-6	Ethylenchlorhydrin	Probe	10,733	810	47,14

Tabelle 5. Wiederfindung in Sesamsamen-Probe.

Verbindung	Zugesetzte Menge (ng/g)	Beobachtete Menge (ng/g)	Finale Menge (ng/g)	Wiederfindung (%)
Ethylenchlorhydrin	10	10,078	10,078	100,8
	50	50,036	50,036	100,1
Ethylenoxid	10	14,96	8228	82,3

Schlussfolgerung

Es wurde eine präzise und robuste Methode für die Analyse von Ethylenoxid und Ethylenchlorhydrin in Sesamsamen entwickelt. Die Probenvorbereitungsmethode verwendet einfache und weniger zeitaufwändige Schritte. Die LOQ der Methode wurde mit einer Konzentration von 10 ng/g in den Proben bestimmt. Bei sechs Replikaten angereicherter Proben wurden reproduzierbare Ergebnisse gefunden. Bei Sesamsamen-Proben, die mit Ethylenoxid und Ethylenchlorhydrin in einer Konzentration von 10 ng/g angereichert wurden, wurde eine zufriedenstellende Wiederfindung erreicht. Demnach eignet sich die in dieser Studie gezeigte Methode für die Routineanalyse von mit Ethylenoxid begasten Sesamsamen-Proben unterhalb der festgelegten behördlichen Grenzwerte.

Literaturverweise

1. Tateo, F.; Benoni, M. Determination of Ethylene Chlorohydrin as Marker of Spices Fumigation with Ethylene Oxide. *JFCA* **2006**, 19, 83–87.
2. Procedure for Control of Contamination of Salmonella, Residues of Pesticides Including Ethylene Oxide (EO) in Sesame Seeds for Export to EU Countries. Indian Oil Seeds and Produce Export Promotion Council.
http://www.iopepc.org/misc/2020/Procedure_1.pdf