

Estimación de la cantidad de óxido de etileno y de etilenclorhidrina en las semillas de sésamo mediante los sistemas de GC Agilent 8890 y MS de triple cuadrupolo 7000D

Autores

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

Resumen

En esta nota de aplicación se presenta el uso del sistema GC Agilent 8890 junto con el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo para GC/MS Agilent 7000D para detectar y cuantificar el óxido de etileno y la etilenclorhidrina en muestras de semillas de sésamo. El método ofrece el mayor nivel de fiabilidad en los resultados de los análisis de rutina de la industria alimentaria, ya sea para la producción, el procesamiento, el almacenamiento o las pruebas comerciales de muestras de semillas de sésamo o para fines académicos. Durante la preparación de muestras, los residuos de óxido de etileno de la muestra se convierten en etilenclorhidrina y, tras una extracción líquido-líquido (LLE) con acetato de etilo, se lleva a cabo una limpieza antes de proceder a su inyección en GC/TQ. Se ha verificado un límite de cuantificación (LOQ) de 10 ppb en la matriz.

El óxido de etileno sirve para esterilizar las semillas oleaginosas y las especias durante su almacenamiento. Es posible que existan residuos de óxido de etileno y su derivado, la etilenclorhidrina (que se produce mediante reacciones durante el almacenamiento), en los productos alimentarios.¹ La etilenclorhidrina puede servir como marcador adecuado en la confirmación del uso de óxido de etileno en fumigación. Es posible evaluar la presencia de etilenclorhidrina en las semillas de sésamo mediante un método analítico de GC/TQ sencillo. Esta evaluación también facilita una estimación de la cantidad real de óxido de etileno que está presente en la muestra desde el principio mediante un factor de conversión.

El método que se ha verificado en esta obra es útil a la hora de detectar la etilenclorhidrina como marcador de la fumigación con óxido de etileno en semillas de sésamo mediante un sistema de GC 8890 junto con un sistema MS de triple cuadrupolo 7000D (con un LOQ de 10 ng/g, de conformidad con el límite máximo de residuos establecido por la UE en 50 ng/g).²

Experimento

Productos químicos necesarios

- Ácido sulfúrico 0,1 N (0,981 g de ácido sulfúrico disuelto en 100 ml de agua)
- Solución de cloruro sódico saturado en agua
- Agua (Millipore, Milli-Q)
- Acetato de etilo (de calidad HPLC)
- Kit de limpieza dispersiva QuEChERS de Agilent (referencia 5982-0028)
- Estándar de referencia de óxido de etileno (Sigma-Aldrich, referencia CRM48891)
- Estándar de referencia de etilenclorhidrina (Merck, referencia 8.00945.0100)

Instrumentos de disolución necesarios

En este estudio se utilizaron un sistema GC Agilent 8890 equipado con un inyector multimodo configurado con la opción de retroflujo postcolumna y un sistema MS de triple cuadrupolo 7000D, un baño de ultrasonidos, un baño de agua, una centrífuga en frío, una centrífuga de sobremesa y un mezclador vórtex. El procedimiento se llevó a cabo de la siguiente forma:

1. Pesado de 2 g de muestra en un tubo de centrífuga de 50 ml.
2. Incorporación de 2 ml de agua, 2 ml de H_2SO_4 0,1 N y 1 ml de solución de cloruro sódico saturado.
3. Baño de ultrasonidos durante 20 minutos.
4. Reposo de la muestra en un baño de agua a 50 °C durante una hora.
5. Agitación con vórtex hasta que la muestra alcance la temperatura ambiente.
6. Incorporación de 5 ml de acetato de etilo y agitación con vórtex durante 10 minutos.
7. Centrifugación a 8.000 rpm durante 5 minutos a 5 °C.
8. Incorporación de 1 ml de sobrenadante en un tubo de limpieza dispersiva QuEChERS (universal) (referencia 5982-0028).
9. Agitación y centrifugación a 5.000 rpm durante 5 minutos.
10. Recogida del sobrenadante en un vial e inyección en el sistema GC/MS/MS.

Tabla 1. Método de GC.

Condiciones del sistema GC	
Columna	Agilent VF-624 ms, 60 m × 0,25 mm, 1,4 µm (ref. CP9103)
Inyector	Inyector multimodo Agilent Liner con opción splitless 5190-2293 Volumen de inyección: 2 µl
Modo de inyección	Splitless pulsada, 25 psi hasta los 0,8 min, flujo de purga de 40 ml/min a 1,25 min
Temperatura del inyector	250 °C
Horno	60 °C durante 2 min, a 10 °C/min hasta 150 °C, a 40 °C/min hasta 250 °C, mantener durante 20 min
Gas portador	Helio al 99,9995 %, a un flujo constante de 1,0 ml/min

Tabla 2. Condiciones del método MS.

Condiciones de MSD	
Temperatura del cuadrupolo	150 °C
Temperatura de la fuente de iones	El 280 °C
Temperatura de la línea de transferencia	250 °C
Transiciones MRM de la etilenclorhidrina	82 → 31 (CE: 5) 80 → 43 (CE: 5) 80 → 31 (CE: 5)
Modo EMV	Factor de ganancia: 10
Tiempo de residencia de cada transición	75
Retardo del disolvente	9,5

Resultados y comentarios

Con el método mencionado anteriormente, se estimó que el LOQ de la etilenclorhidrina en las muestras de semillas de sésamo era de 10 ng/g, dado que, a este nivel, el pico se distingue fácilmente de la línea base y de la matriz con relaciones de señal a ruido $> 2,9$. En la Figura 1 se destacan los EIC cuantificador y cualificador a los niveles de marcado del LOQ. Este LOQ se ajusta a las necesidades de los clientes y a los requisitos reglamentarios del límite máximo de residuos establecido en 50 ng/g por la UE. En la Figura 2 se muestran las relaciones señal a ruido de los estándares de matriz de nivel 10 ppb y 50 ppb.

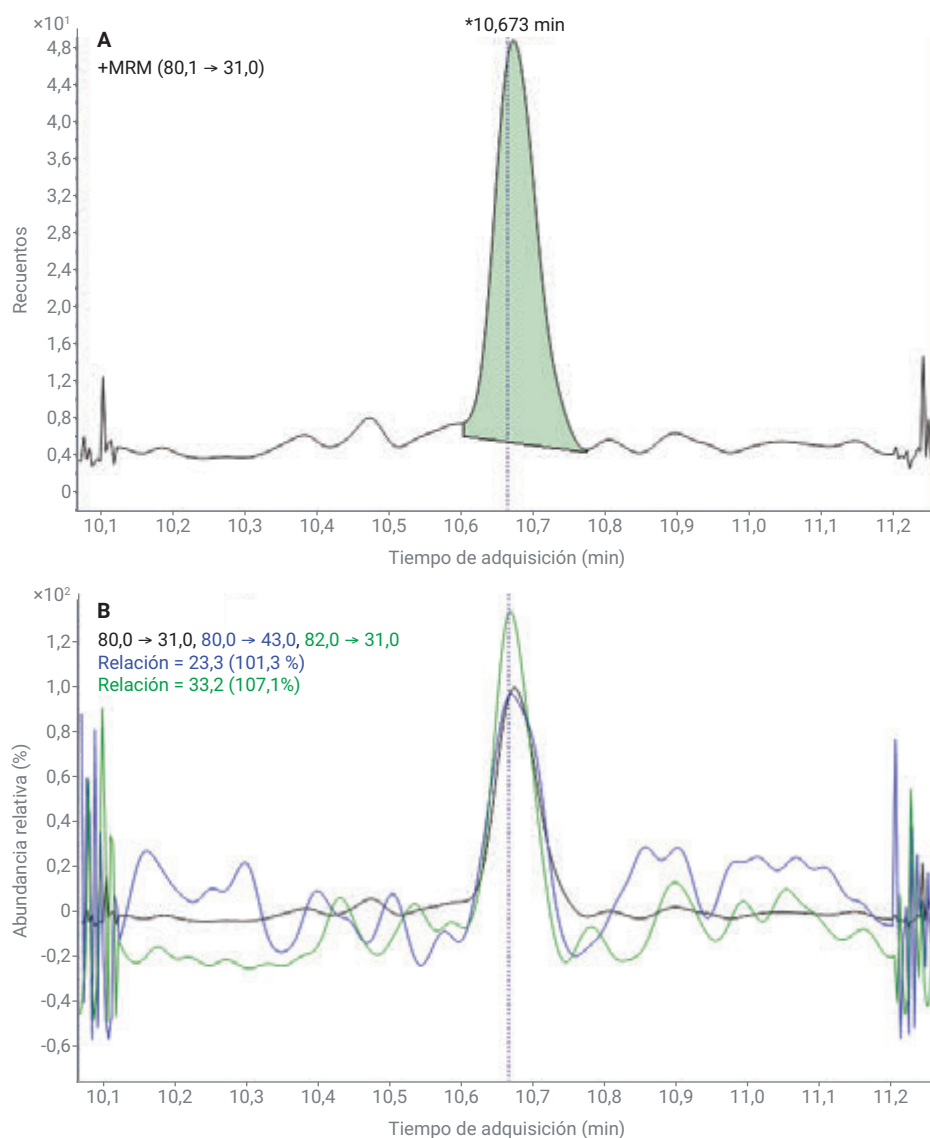


Figura 1. Un pico cuantificador y dos picos cualificadores de etilenclorhidrina al nivel de inoculación de 10 ng/g.

Calibración y linealidad

Se generó un gráfico de linealidad de la matriz antes del pico de respuesta (área del pico) en niveles de concentración que oscilaban entre los 5 y los 200 ng/g (Figura 4). Se llevó a cabo la calibración en seis niveles: 5, 10, 20, 50, 100 y 200 ng/g. Se observó una linealidad adecuada con $R^2 > 0,998$.

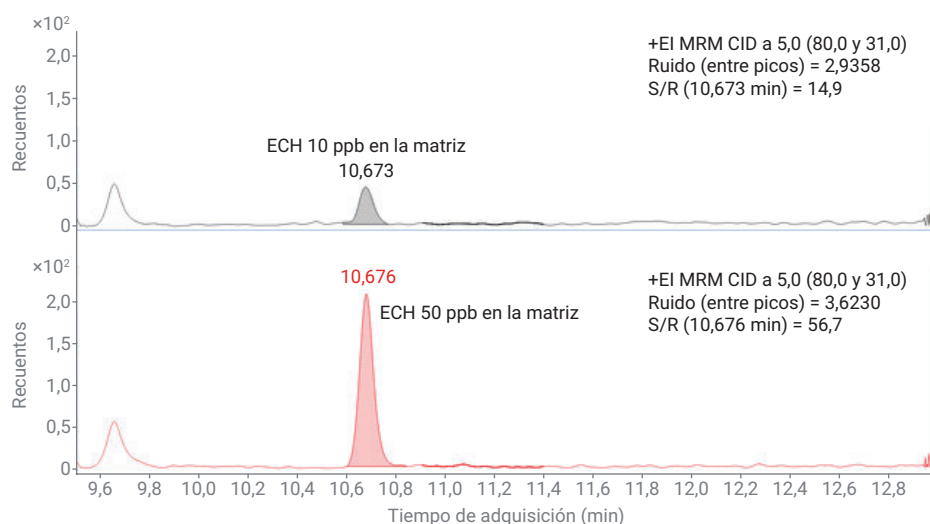


Figura 2. Sensibilidad de la etilenclorhidrina: Cromatogramas MRM de inoculación a 10 ng/g y 50 ng/g.

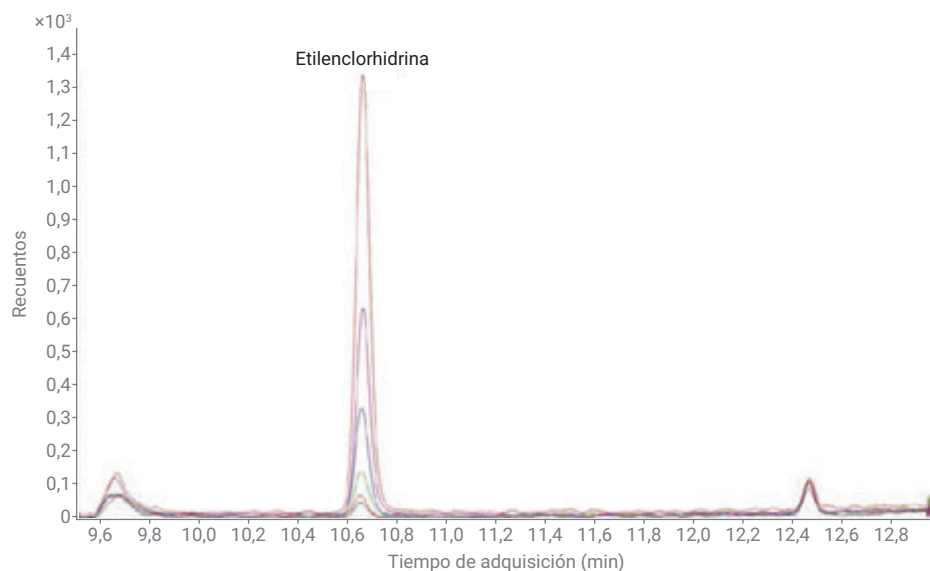


Figura 3. Superposición de MRM y cromatograma de corriente iónica total (TIC) de varias concentraciones de etilenclorhidrina en la matriz que oscilaban entre las 5 ppb y las 200 ppb.

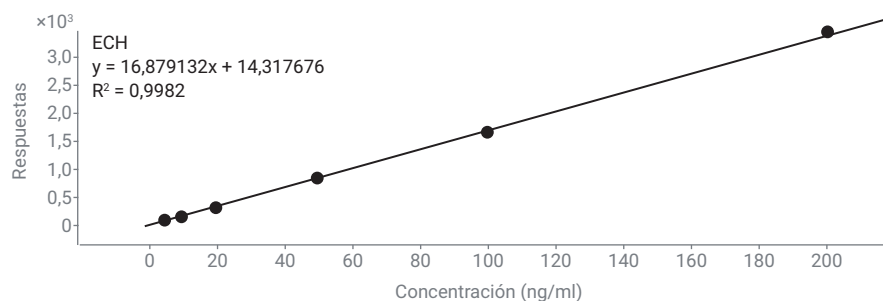


Figura 4. Gráfico de calibración de los estándares de la matriz de la etilenclorhidrina.

Reproducibilidad

Se demostró la repetibilidad de la elución mediante la inyección de un estándar de etilenclorhidrina en una matriz con una concentración de 50 ppb. La desviación relativa estándar (RSD) en las áreas de pico de la etilenclorhidrina que se calcularon en función de seis inyecciones replicadas de estándar de matriz a 50 ppb dieron como resultado el valor 1,73 %, tal y como se muestra en la Tabla 3.

Cuantificación en muestras de semillas de sésamo

El método mencionado se aplicó a una muestra de semilla de sésamo, que se había adquirido en un mercado local para el análisis y el estudio de recuperación.

Estudio de recuperación

Tal y como se muestra en la Tabla 4, no se encontró ningún pico que correspondiese a la etilenclorhidrina en la matriz blanco de la semilla de sésamo. La recuperación de etilenclorhidrina y de óxido de etileno de la muestra real de semilla de sésamo se calculó mediante las concentraciones de marcado de 10 y 50 ppb para la etilenclorhidrina y de 10 ppb para el óxido de etileno.

Se llevaron a cabo tres estudios de inoculación, tal y como se muestra a continuación:

1. La etilenclorhidrina se inoculó en la muestra de semilla de sésamo en el nivel de 10 ppb.
2. La etilenclorhidrina se inoculó en la muestra de semilla de sésamo en el nivel de 50 ppb.
3. El óxido de etileno se inoculó en la muestra de semilla de sésamo en el nivel de 10 ppb. Todo ello se llevó a cabo para comprobar la aplicabilidad del método en la estimación del contenido de óxido de etileno en la muestra. (Se utilizó un factor de conversión de 0,55 como multiplicador para calcular los resultados de la muestra con pico del óxido de etileno).² Los resultados que se obtuvieron en cuanto al porcentaje de recuperación se muestran en la Tabla 5.

Tabla 3. Porcentaje de RSD (CV) de la etilenclorhidrina para el estándar de la matriz de 50 ppb.

Área iny-1	Área iny-2	Área iny-3	Área iny-4	Área iny-5	Área iny-6	RSD (%)
821	804	811	829	842	810	1,73

Tabla 4. Resumen de cuantificación para la calibración (de 5 a 200 ppb), recuperación tras el marcado (10 y 50 ppb) y ejercicio de repetibilidad (50 ppb).

Nombre de la muestra	Compuesto	Tipo de muestra	TR	Respuesta	Conc. final (ng/g)
Blanco de matriz semilla de sésamo	Etilenclorhidrina	Muestra			ND
Calibración de la matriz-1_5 ppb	Etilenclorhidrina	Calibración	10,646	115	5,97
Calibración de la matriz-2_10 ppb	Etilenclorhidrina	Calibración	10,650	165	8,9
Calibración de la matriz-3_20 ppb	Etilenclorhidrina	Calibración	10,654	324	18,32
Calibración de la matriz-4_50 ppb	Etilenclorhidrina	Calibración	10,654	856	49,85
Calibración de la matriz-5_100 ppb	Etilenclorhidrina	Calibración	10,657	1.676	98,46
Calibración de la matriz-6_200 ppb	Etilenclorhidrina	Calibración	10,657	3.449	203,5
Sésamo_MAR EHC_10 ppb	Etilenclorhidrina	Muestra	10,673	184	10,08
Sésamo_MAR EHC_50 ppb	Etilenclorhidrina	Muestra	10,676	859	50,04
Sésamo_MAR ETO_10 ppb	Etilenclorhidrina	Muestra	10,673	267	8,23
Réplica de marcado 50 ppb-1	Etilenclorhidrina	Muestra	10,699	821	47,8
Réplica de marcado 50 ppb-2	Etilenclorhidrina	Muestra	10,707	804	46,79
Réplica de marcado 50 ppb-3	Etilenclorhidrina	Muestra	10,714	811	47,2
Réplica de marcado 50 ppb-4	Etilenclorhidrina	Muestra	10,718	829	48,29
Réplica de marcado 50 ppb-5	Etilenclorhidrina	Muestra	10,737	842	49,05
Réplica de marcado 50 ppb-6	Etilenclorhidrina	Muestra	10,733	810	47,14

Tabla 5. Recuperación en muestra de semillas de sésamo.

Nombre del compuesto	Cantidad inoculada (ng/g)	Cantidad observada (ng/g)	Cantidad final (ng/g)	Recuperación (%)
Etilenclorhidrina	10	10,078	10,078	100,8
	50	50,036	50,036	100,1
Óxido de etileno	10	14,96	8,228	82,3

Conclusión

Se ha desarrollado un método preciso y robusto para el análisis del óxido de etileno y de la etilenclorhidrina en las semillas de sésamo. El método de preparación de muestras contiene pasos sencillos y de menor duración. El LOQ del método se ha verificado al nivel de 10 ng/g en las muestras. Se confirmó la repetibilidad de los resultados en seis réplicas de muestras inoculadas. Se llevó a cabo una recuperación satisfactoria en una concentración de inoculación de 10 ng/g de óxido de etileno y de etilenclorhidrina en las muestras de semillas de sésamo. Por tanto, el método que verifica este estudio demuestra su utilidad en los análisis de rutina de las muestras de semillas de sésamo que se han fumigado con óxido de etileno de acuerdo con los límites normativos establecidos.

Referencias

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