

Stima di ossido di etilene e cloridrina etilenica in semi di sesamo tramite il sistema GC Agilent 8890 ed MS a triplo quadrupolo 7000D

Autori

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

Abstract

Questa nota applicativa illustra l'uso del sistema GC Agilent 8890 accoppiato allo spettrometro di massa a triplo quadrupolo GC/MS Agilent 7000D per la rilevazione e quantificazione di ossido di etilene e cloridrina etilenica in campioni di semi di sesamo. Il metodo assicura la massima affidabilità dei risultati dell'analisi di routine per il settore alimentare sia per la produzione, la lavorazione, lo stoccaggio o i test commerciali di campioni di semi di sesamo che per scopi accademici. Nel corso della preparazione del campione, l'ossido di etilene residuo nel campione viene convertito in cloridrina etilenica; a tale conversione seguono l'estrazione liquido-liquido (LLE) con etilacetato e la purificazione prima dell'iniezione nel sistema GC/TQ. È stato verificato un limite di quantificazione (LOQ) di 10 ppb in matrice.

L'ossido di etilene è impiegato per sterilizzare semi oleosi e spezie durante il periodo di stoccaggio. In questi prodotti alimentari è possibile riscontrare la presenza di residui di ossido di etilene e del suo derivato cloridrina etilenica (che si forma in seguito a reazioni che avvengono durante lo stoccaggio).¹ La cloridrina etilenica può fungere da marker idoneo a confermare l'uso di ossido di etilene per la fumigazione. La valutazione della cloridrina etilenica in semi di sesamo può essere effettuata con un semplice metodo analitico GC/TQ. Applicando un fattore di conversione, tale valutazione fornisce anche la stima del contenuto effettivo di ossido di etilene presente inizialmente nel campione.

Il metodo descritto in questo lavoro è indicato per la rilevazione della cloridrina etilenica quale marker della fumigazione di oli di sesamo con ossido di etilene utilizzando il sistema GC 8890 accoppiato al sistema MS a triplo quadrupolo 7000D (con LOQ pari a 10 ng/g, valore conforme al limite massimo di residui (MRL) fissato dalla UE a 50 ng/g).²

Condizioni sperimentali

Sostanze chimiche necessarie

- Acido solforico 0,1 N (0,981 g di acido solforico disciolti in 100 mL di acqua)
- Soluzione acquosa satura di cloruro di sodio
- Acqua (Millipore, Milli-Q)
- Etilacetato (grado HPLC)
- Kit di purificazione dispersiva Agilent QuEChERS (codice 5982-0028)
- Standard di riferimento di ossido di etilene (codice Sigma-Aldrich CRM48891)
- Standard di riferimento di cloridrina etilenica (codice Merck 8.00945.0100)

Apparato necessario

In questo studio sono stati impiegati un sistema GC Agilent 8890 dotato di iniettore MMI configurato con opzione di backflush post-colonna e un sistema MS a triplo quadrupolo 7000D, un bagno a ultrasuoni, un bagno d'acqua, una centrifuga raffreddata, una centrifuga da banco e un miscelatore vortex. È stata adottata la seguente procedura:

1. Pesare 2 g di campione in un tubo per centrifuga da 50 mL.
2. Aggiungere 2 mL di acqua, 2 mL di H_2SO_4 0,1 N e 1 mL di soluzione satura di cloruro di sodio.
3. Sottoporre a sonicazione per 20 minuti.
4. Far riposare il campione in un bagno d'acqua a 50 °C per 1 ora.
5. Agitare in vortex e attendere che il campione raggiunga la temperatura ambiente.
6. Aggiungere 5 mL di etilacetato e agitare in vortex per 10 minuti.
7. Centrifugare a 8.000 rpm per 5 minuti a 5 °C.
8. Prelevare 1 mL di sopranatante e aggiungerlo a un tubo per purificazione dispersiva QuEChERS (universale) (codice 5982-0028).
9. Agitare e centrifugare a 5.000 rpm per 5 minuti.
10. Raccogliere il sopranatante in un vial e iniettarlo nel sistema GC/MS/MS.

Tabella 1. Metodo GC.

Condizioni GC	
Colonna	Agilent VF-624 ms, 60 m × 0,25 mm, 1,4 µm (codice CP9103)
Iniettore	Iniettore multimode Agilent 5190-2293, liner splitless Volume di iniezione: 2 µL
Modalità di iniezione	Splitless pulsato, 25 psi fino a 0,8 min, flusso di spurgo pari a 40 mL/min a 1,25 min
Temperatura dell'iniettore	250 °C
Forno	60 °C per 2 min, a 10 °C/min fino a 150 °C, a 40 °C/min fino a 250 °C, mantenimento 20 min
Carrier gas	Elio 99,9995% a 1,0 mL/min, modalità a flusso costante

Tabella 2. Condizioni MS del metodo MS.

Condizioni del rivelatore MSD	
Temperatura del quadrupolo	150 °C
Temperatura della sorgente ionica	El 280 °C
Temperatura transfer line	250 °C
Transizioni MRM per la cloridrina etilenica	82 → 31 (CE: 5) 80 → 43 (CE: 5) 80 → 31 (CE: 5)
Modalità EMV	Gain factor: 10
Dwell time per ogni transizione	75
Solvent delay	9,5

Risultati e discussione

La stima del valore LOQ ottenuta con il metodo di cui sopra è pari a 10 ng/g per la cloridrina etilenica in campioni di semi di sesamo; a questo livello, infatti, il picco è facilmente distinguibile dalla linea di base e dalla matrice con valori del rapporto segnale-rumore $>2,9$. In Figura 1 sono riportati le EIC del quantificatore e dei qualificatori a un arricchimento a livello LOQ. Questo LOQ soddisfa le esigenze dei clienti e i requisiti normativi relativi al limite massimo di residui (MRL) fissato dalla UE a 50 ng/g. In Figura 2 sono mostrati i valori del rapporto segnale-rumore per standard in matrice ai livelli di 10 ppb e 50 ppb.

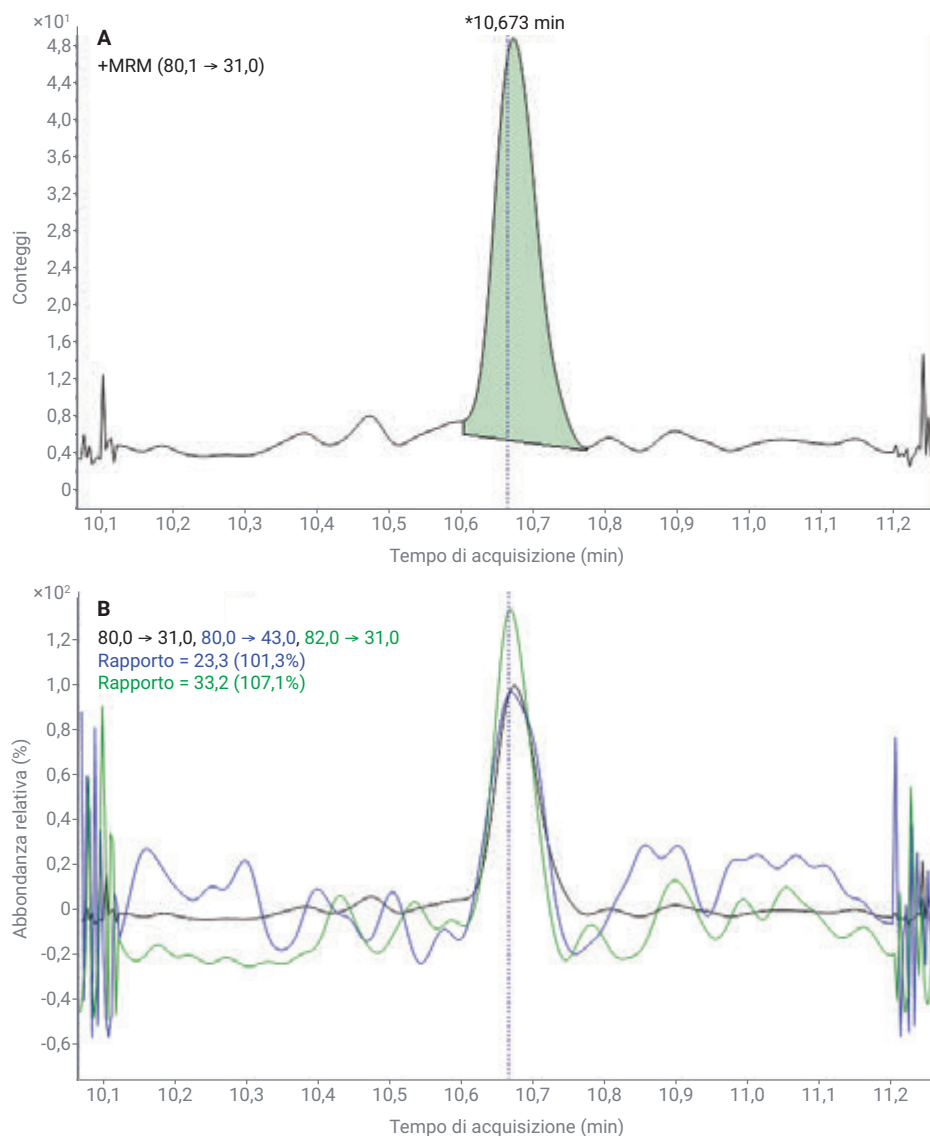


Figura 1. Un picco quantificatore e due picchi qualificatori di cloridrina etilenica al livello di arricchimento di

Calibrazione e linearità

È stato generato un grafico di linearità in matrice pre-arricchita per la risposta (area del picco) su livelli di concentrazione compresi tra 5 e 200 ng/g (Figura 4). La calibrazione è stata effettuata a sei livelli: 5, 10, 20, 50, 100 e 200 ng/g. È stata osservata una buona linearità con un coefficiente $R^2 > 0,998$.

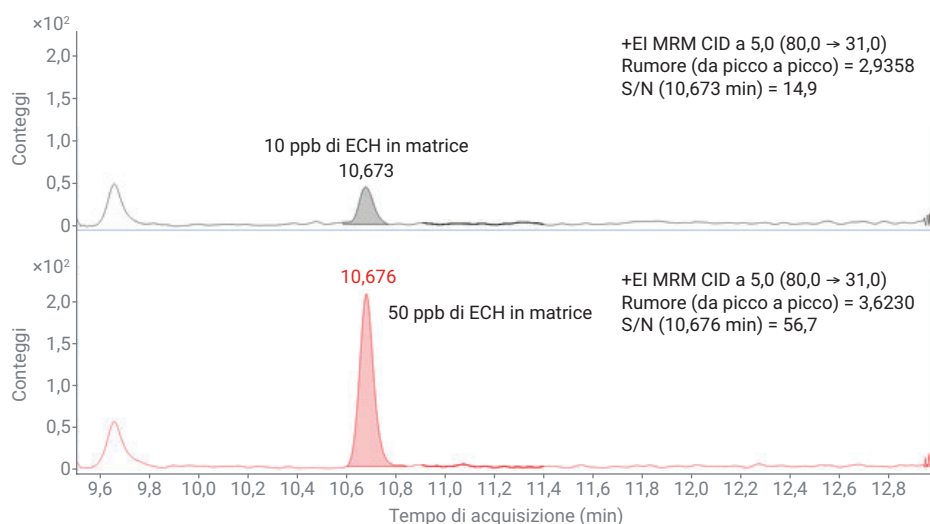


Figura 2. Sensibilità per la cloridrina etilenica: cromatogrammi MRM dell'arricchimento a 10 ng/g e dell'arricchimento a 50 ng/g.

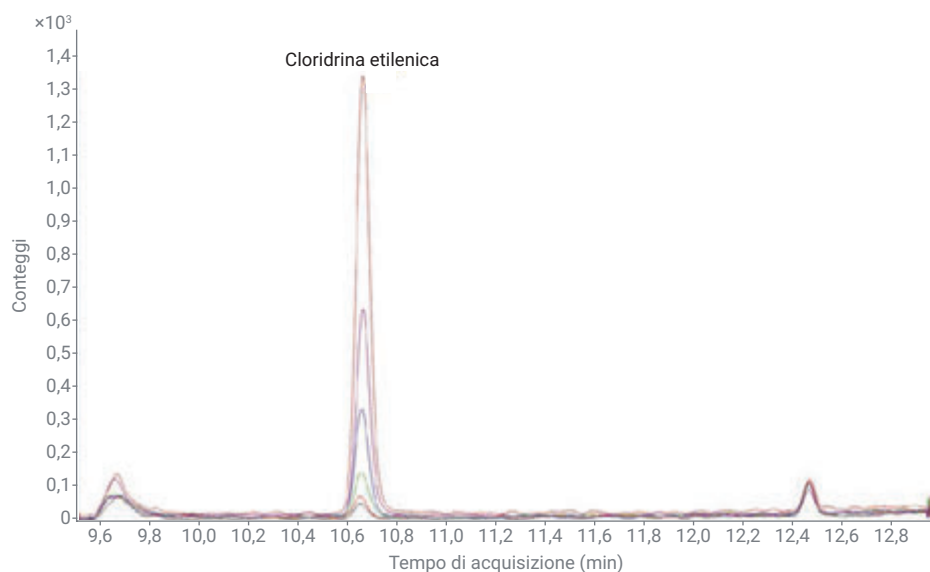


Figura 3. Sovrapposizione TIC MRM di varie concentrazioni di cloridrina etilenica in matrice nell'intervallo compreso tra 5 ppb e 200 ppb.

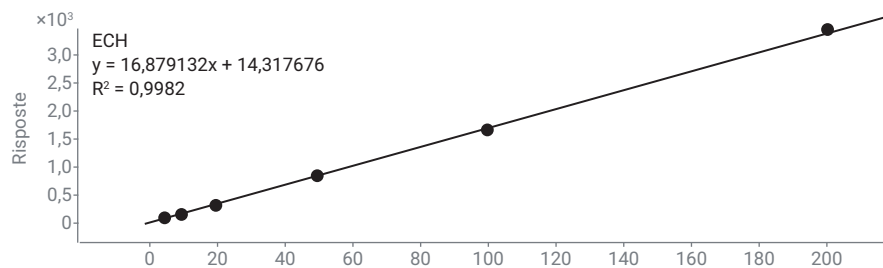


Figura 4. Grafico di calibrazione di standard di cloridrina etilenica abbinati alla matrice.

Ripetibilità

La ripetibilità dell'eluizione è stata dimostrata iniettando uno standard di cloridrina etilenica in matrice a una concentrazione pari a 50 ppb. La deviazione standard relativa per le aree dei picchi di cloridrina etilenica calcolata in base a sei iniezioni replicate di standard in matrice a 50 ppb è risultata pari a 1,73%, come mostrato in Tabella 3.

Quantificazione in campioni di semi di sesamo

Il metodo discusso è stato applicato a un campione di semi di sesamo, acquistato presso un mercato locale, ai fini dell'analisi e dello studio sui recuperi.

Studio sui recuperi

Come mostrato in Tabella 4, nella matrice in bianco di semi di sesamo non è stato individuato il picco corrispondente alla cloridrina etilenica. I recuperi di cloridrina etilenica e ossido di etilene dal campione reale di semi di sesamo sono stati calcolati utilizzando i livelli di arricchimento di 10 e 50 ppb per la cloridrina etilenica e di 10 ppb per l'ossido di etilene.

Sono stati effettuati tre studi sull'arricchimento come segue:

1. Cloridrina etilenica è stata aggiunta al campione di semi di sesamo al livello di 10 ppb.
2. Cloridrina etilenica è stata aggiunta al campione di semi di sesamo al livello di 50 ppb.
3. Ossido di etilene è stato aggiunto al campione di semi di sesamo al livello di 10 ppb. Lo scopo consisteva nel verificare l'applicabilità del metodo alla stima del contenuto di ossido di etilene nel campione. (È stato utilizzato come moltiplicatore un fattore di conversione pari a 0,55 per calcolare i risultati per il campione arricchito con ossido di etilene).² La discussione dei risultati ottenuti per il recupero percentuale è riportata in Tabella 5.

Tabella 3. RSD percentuale (CV) per lo standard abbinato alla matrice a 50 ppb di cloridrina etilenica.

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

Tabella 4. Riepilogo della quantificazione per gli studi di calibrazione (da 5 a 200 ppb), recupero dell'arricchimento (10 e 50 ppb) e ripetibilità (50 ppb).

Nome del campione	Composto	Tipo di campione	RT	Risposta	Conc. finale (ng/g)
Matrix Blank_sesame seed	Cloridrina etilenica	Campione			ND
Matrix calibration-1_5 ppb	Cloridrina etilenica	Calibrazione	10,646	115	5,97
Matrix calibration-2_10 ppb	Cloridrina etilenica	Calibrazione	10,650	165	8,9
Matrix calibration-3_20 ppb	Cloridrina etilenica	Calibrazione	10,654	324	18,32
Matrix calibration-4_50 ppb	Cloridrina etilenica	Calibrazione	10,654	856	49,85
Matrix calibration-5_100 ppb	Cloridrina etilenica	Calibrazione	10,657	1.676	98,46
Matrix calibration-6_200 ppb	Cloridrina etilenica	Calibrazione	10,657	3.449	203,5
Sesame_ECH SPK_10 ppb	Cloridrina etilenica	Campione	10,673	184	10,08
Sesame_ECH SPK_50 ppb	Cloridrina etilenica	Campione	10,676	859	50,04
Sesame_ETO SPK_10 ppb	Cloridrina etilenica	Campione	10,673	267	8,23
50 ppb spk replicate-1	Cloridrina etilenica	Campione	10,699	821	47,8
50 ppb spk replicate-2	Cloridrina etilenica	Campione	10,707	804	46,79
50 ppb spk replicate-3	Cloridrina etilenica	Campione	10,714	811	47,2
50 ppb spk replicate-4	Cloridrina etilenica	Campione	10,718	829	48,29
50 ppb spk replicate-5	Cloridrina etilenica	Campione	10,737	842	49,05
50 ppb spk replicate-6	Cloridrina etilenica	Campione	10,733	810	47,14

Tabella 5. Recupero in un campione di semi di sesamo.

Nome composto	Quantità dell'arricchimento (ng/g)	Quantità osservata (ng/g)	Quantità finale (ng/g)	Recupero (%)
Cloridrina etilenica	10	10,078	10,078	100,8
	50	50,036	50,036	100,1
Ossido di etilene	10	14,96	8,228	82,3

Conclusione

È stato sviluppato un metodo robusto e accurato per l'analisi di ossido di etilene e cloridrina etilenica in semi di sesamo. Il metodo di preparazione del campione impiega passaggi semplici e riduce il numero dei passaggi dispendiosi in termini di tempo. Il limite di quantificazione provato per il metodo è pari al livello di 10 ng/g nei campioni. Sono stati ottenuti risultati ripetibili per sei replicati di campioni arricchiti. È stato riscontrato un recupero soddisfacente alla concentrazione arricchita pari a 10 ng/g per ossido di etilene e cloridrina etilenica in campioni di semi di sesamo. Il metodo illustrato in questo studio risulta pertanto utile per l'analisi di routine di campioni di semi di sesamo fumigati con ossido di etilene nel rispetto dei limiti normativi vigenti.

Bibliografia

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