

Estimativa dos teores de óxido de etileno e etilenocloridrina em sementes de gergelim usando o GC Agilent 8890 e o Sistema MS Triplo Quadrupolo 7000D

Autores

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

Resumo

Esta nota de aplicação demonstra o uso do sistema de GC Agilent 8890 juntamente com o espectrômetro de massas triplo quadrupolo Agilent 7000D GC/MS para detectar e quantificar os teores de óxido de etileno e etilenocloridrina em amostras de sementes de gergelim. O método fornece a mais alta confiança nos resultados de análises de rotina para o setor de alimentos, seja este envolvido na produção, processamento, armazenamento ou testes comerciais de amostras de sementes de gergelim ou para fins acadêmicos. Durante o preparo de amostras, o resíduo de óxido de etileno na amostra é convertido em etilenocloridrina, que é seguida por extração líquido-líquido (LLE) com acetato de etila, e purificado antes de injetar no GC/TQ. Foi demonstrado um limite de quantificação (LOQ) de 10 ppb na matriz.

O óxido de etileno é usado para esterilizar sementes oleaginosas e especiarias durante o armazenamento. Resíduos de óxido de etileno e seu derivado, etilenocloridrina (produzida por reações durante o armazenamento), podem ser encontrados nestes gêneros alimentícios.¹ A etilenocloridrina pode ser usada como um marcador adequado para confirmar o uso de óxido de etileno para a fumigação. A etilenocloridrina pode ser avaliada em sementes de gergelim por um método analítico de GC/TQ simples. Esta avaliação também fornece a estimativa do teor de óxido de etileno real inicialmente presente na amostra usando um fator de conversão.

O método demonstrado neste trabalho é útil para detectar a etilenocloridrina como um marcador de fumigação de sementes de gergelim com óxido de etileno, usando o sistema de GC Agilent 8890 juntamente com o MS triplo quadrupolo 7000D (com 10 ng/g como o LOQ, que está em conformidade com o limite máximo de resíduo (MRL) definido pela UE em 50 ng/g).²

Ensaio

Químicos necessários

- Ácido sulfúrico 0,1 N (0,981 g de ácido sulfúrico dissolvido em 100 mL de água)
- Solução saturada de cloreto de sódio em água
- Água (Millipore, Milli-Q)
- Acetato de etila (grau HPLC)
- Kit de extração dispersiva QuEChERS Agilent (part number 5982-0028)
- Padrão de referência de óxido de etileno (part number Sigma-Aldrich CRM48891)
- Padrão de referência de etilenocloridrina (part number Merck 8.00945.0100)

Equipamento necessário

Neste estudo, foram usados um sistema de GC Agilent 8890 equipado com um injetor MMI configurado com opção de backflush pós-coluna e um MS triplo quadrupolo 7000D, um banho ultrassônico, um banho-maria, uma centrífuga fria, uma centrífuga de bancada e um agitador vórtex.

O procedimento foi o seguinte:

1. Pese 2 g de amostra em um tubo de centrífuga de 50 mL.
2. Adicione 2 mL de água, 2 mL de H_2SO_4 0,1 N e 1 mL de solução saturada de cloreto de sódio.
3. Sonique durante 20 minutos.
4. Deixe a amostra em banho-maria a 50°C por 1 hora.
5. Agite no vórtex e espere até que a amostra atinja a temperatura ambiente.
6. Adicione 5 mL de acetato de etila e agite no vórtex durante 10 minutos.
7. Centrifugue a 8000 rpm por 5 minutos a 5°C.
8. Pegue 1 mL de sobrenadante e adicione-o a um tubo para extração dispersiva QuEChERS (universal) (part number 5982-0028).
9. Agite e centrifugue a 5000 rpm por 5 minutos.
10. Colete o sobrenadante em um vial e injete no GC/MS/MS.

Tabela 1. Método de GC.

Condições do GC	
Coluna	Agilent VF-624 ms, 60 m x 0,25 mm, 1,4 µm (p/n CP9103)
Injetor	Injetor multimodal Agilent 5190-2293, liner splitless Volume de injeção: 2 µL
Modo de injeção	Splitless pulsado, 25 psi até 0,8 min, fluxo de purga 40 mL/min a 1,25 min
Temperatura do injetor	250°C
Forno	60°C por 2 min, a 10 °C/min até 150°C, a 40 °C/min até 250°C, manter por 20 min
Gás de arraste	99,9995% Hélio a 1,0 mL/min, modo de fluxo constante

Tabela 2. Condições e métodos de MS.

Condições do MSD	
Temperatura do quadrupolo	150°C
Temperatura da fonte de íons	El 280°C
Temperatura da linha de transferência	250°C
Transições MRM para a etilenocloridrina	82 → 31 (CE: 5) 80 → 43 (CE: 5) 80 → 31 (CE: 5)
Modo de EMV	Fator de ganho: 10
Mínimo de dwell time para MRM para cada transição	75
Delay de solvente	9,5

Resultados e discussão

Com o método acima, estimou-se que o LOQ era de 10 ng/g para a etilenocloridrina em amostras de sementes de gergelim, pois, nesse nível, o pico é facilmente distinguido da linha de base e da matriz com relações de sinal/ruído $>2,9$. A Figura 1 destaca os EICs quantificadores e qualificadores no nível de adição de LOQ. Este LOQ satisfaz as necessidades dos clientes e os requisitos regulatórios de MRL definidos em 50 ng/g pela UE. A Figura 2 demonstra a relação sinal/ruído para padrões de matriz de nível 10 ppb e 50 ppb.

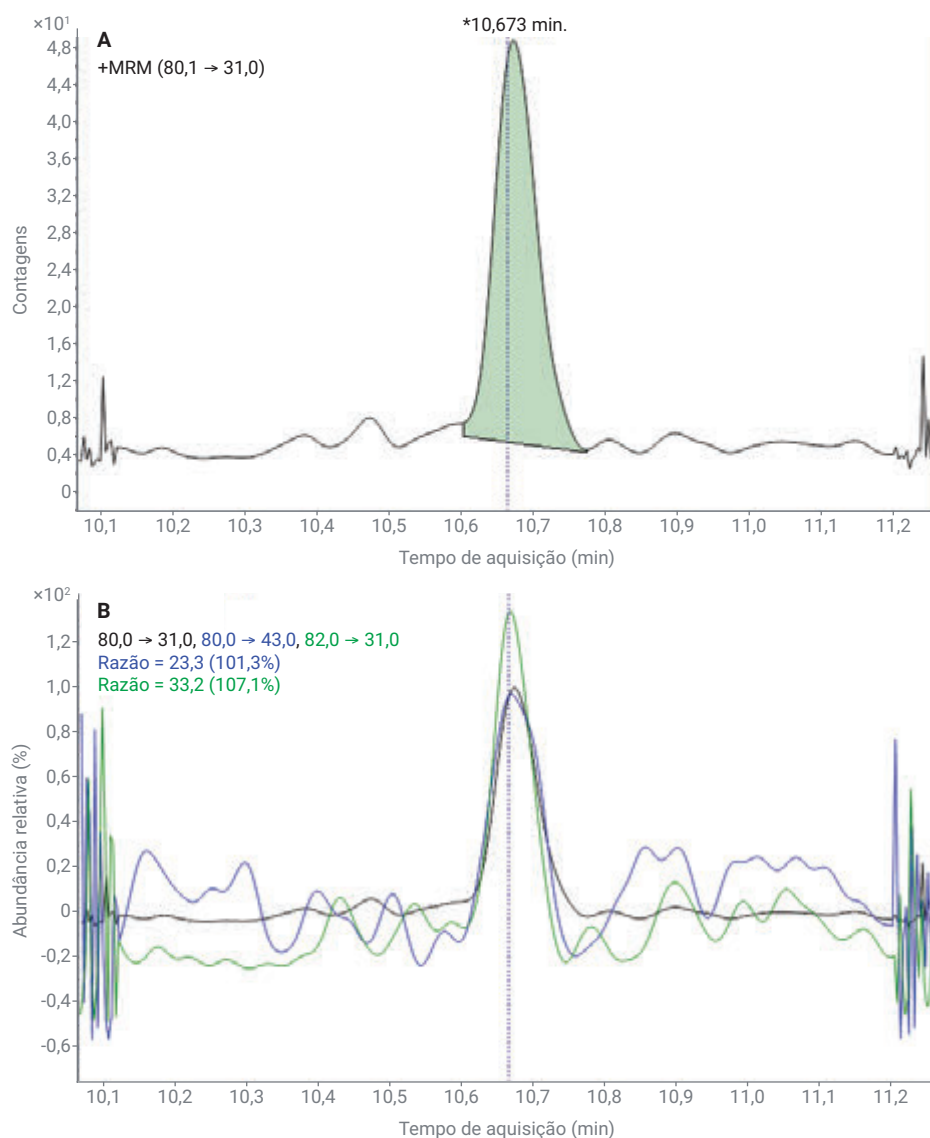


Figura 1. Um pico quantificador e dois picos qualificadores de etilenocloridrina ao nível de adição de 10 ng/g.

Calibração e linearidade

Foi gerado um gráfico de linearidade de matriz pré-adicionada para a resposta (área do pico) entre os níveis de concentração de 5 a 200 ng/g (Figura 4). A calibração foi realizada em seis níveis: 5, 10, 20, 50, 100 e 200 ng/g. Foi observada uma boa linearidade com $R^2 > 0,998$.

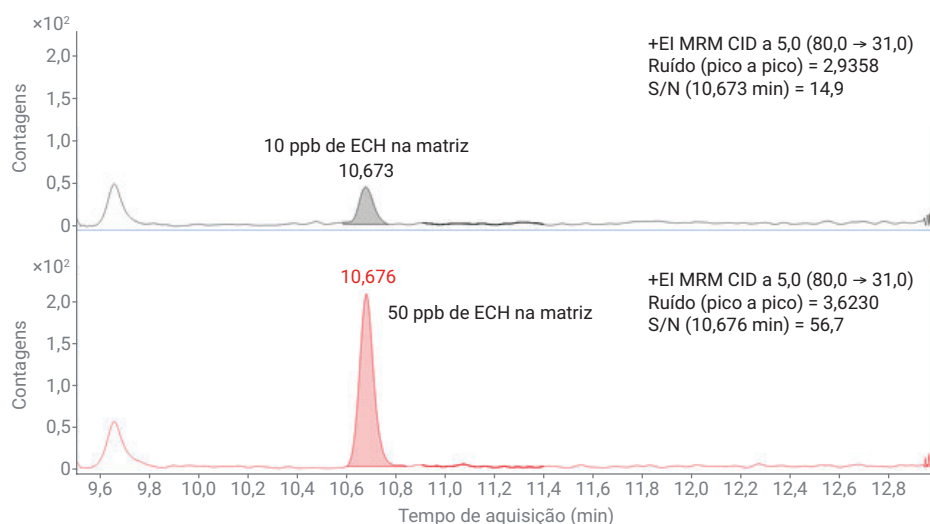


Figura 2. Sensibilidade da etilenocloridrina: Cromatogramas MRM de adição de 10 ng/g e adição de 50 ng/g.

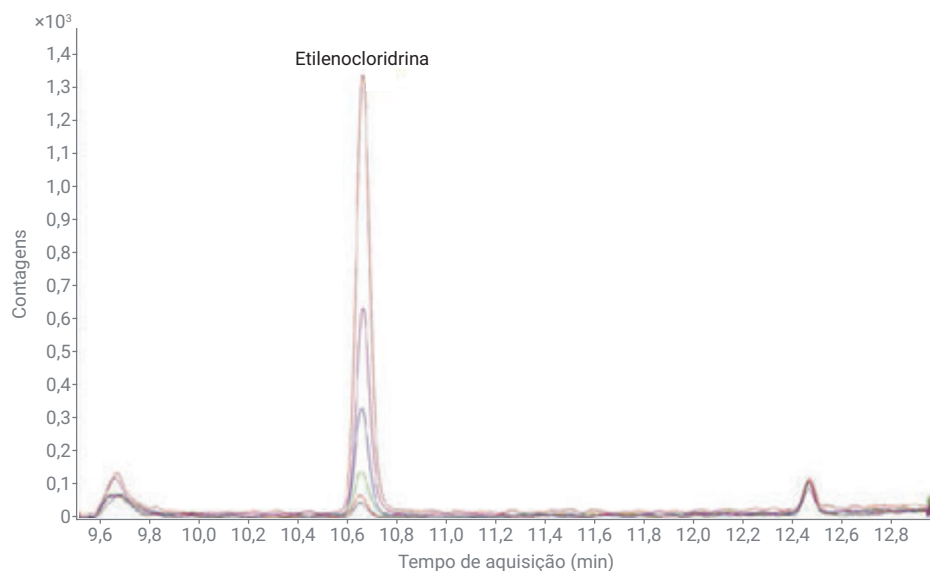


Figura 3. Sobreposição do cromatograma de íons totais do modo de MRM das várias concentrações de etilenocloridrina em uma matriz que varia de 5 ppb a 200 ppb.

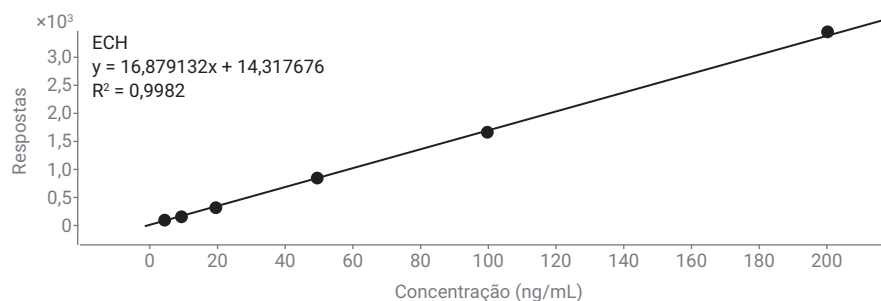


Figura 4. Gráfico de calibração dos padrões de etilenocloridrina correspondentes à matriz.

Repetibilidade

A repetibilidade da eluição foi demonstrada injetando um padrão de etilenocloridrina na matriz com uma concentração de 50 ppb. O desvio padrão relativo nas áreas de pico de etilenocloridrina, calculado com base em seis replicatas de injeções de padrão de matriz de 50 ppb foi de 1,73%, como mostrado na Tabela 3.

Quantificação em amostras de sementes de gergelim

O método discutido foi estendido à amostra de sementes de gergelim, que foi adquirida de um mercado local para a análise e o estudo de recuperação.

Estudo de recuperação

Conforme mostrado na Tabela 4, nenhum pico correspondente à etilenocloridrina foi encontrado na matriz em branco da semente de gergelim. As recuperações de etilenocloridrina e óxido de etileno da amostra de sementes de gergelim proveniente de ambiente real foram calculadas usando os níveis de adição de 10 e 50 ppb para a etilenocloridrina e 10 ppb para o óxido de etileno.

Foram realizados três estudos de adição da seguinte forma:

1. A etilenocloridrina foi adicionada na amostra de sementes de gergelim no nível de 10 ppb.
2. A etilenocloridrina foi adicionada na amostra de sementes de gergelim no nível de 50 ppb.
3. O óxido de etileno foi adicionado na amostra de sementes de gergelim no nível de 10 ppb. Isso foi feito para verificar a aplicabilidade do método para estimar o teor de óxido de etileno na amostra. (Foi utilizado um fator de conversão de 0,55 como multiplicador para calcular os resultados da amostra de adição de óxido de etileno).² Os resultados obtidos para a recuperação percentual são discutidos na Tabela 5.

Tabela 3. Porcentagem de RSD (CV) para a etilenocloridrina para o padrão correspondente à matriz de 50 ppb.

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

Tabela 4. Resumo da quantificação para calibração (5 a 200 ppb), recuperação de adição (10 e 50 ppb) e ensaio da repetibilidade (50 ppb).

Nome da amostra	Composto	Tipo de amostra	TR	Resposta	Conc. final (ng/g)
Matriz em branco_sementes de gergelim	Etilenocloridrina	Amostra			ND
Calibração de matriz-1_5 ppb	Etilenocloridrina	Calibração	10,646	115	5,97
Calibração de matriz-2_10 ppb	Etilenocloridrina	Calibração	10,650	165	8,9
Calibração de matriz-3_20 ppb	Etilenocloridrina	Calibração	10,654	324	18,32
Calibração de matriz-4_50 ppb	Etilenocloridrina	Calibração	10,654	856	49,85
Calibração de matriz-5_100 ppb	Etilenocloridrina	Calibração	10,657	1.676	98,46
Calibração de matriz-6_200 ppb	Etilenocloridrina	Calibração	10,657	3.449	203,5
Gergelim_ECH adição_10 ppb	Etilenocloridrina	Amostra	10,673	184	10,08
Gergelim_ECH adição_50 ppb	Etilenocloridrina	Amostra	10,676	859	50,04
Gergelim_ETO adição_10 ppb	Etilenocloridrina	Amostra	10,673	267	8,23
Replicata-1 adição de 50 ppb	Etilenocloridrina	Amostra	10,699	821	47,8
Replicata-2 adição de 50 ppb	Etilenocloridrina	Amostra	10,707	804	46,79
Replicata-3 adição de 50 ppb	Etilenocloridrina	Amostra	10,714	811	47,2
Replicata-4 adição de 50 ppb	Etilenocloridrina	Amostra	10,718	829	48,29
Replicata-5 adição de 50 ppb	Etilenocloridrina	Amostra	10,737	842	49,05
Replicata-6 adição de 50 ppb	Etilenocloridrina	Amostra	10,733	810	47,14

Tabela 5. Recuperação em amostra de sementes de gergelim.

Nome do composto	Quantidade de adição (ng/g)	Quantidade observada (ng/g)	Quantidade final (ng/g)	Recuperação (%)
Etilenocloridrina	10	10,078	10,078	100,8
	50	50,036	50,036	100,1
Óxido de etileno	10	14,96	8,228	82,3

Conclusão

Foi desenvolvido um método exato e robusto para a análise de óxido de etileno e etilenocloridrina em sementes de gergelim. O método de preparo de amostras usa etapas fáceis e menos demoradas. O LOQ do método é demonstrado no nível de 10 ng/g nas amostras. Foram encontrados resultados repetíveis para seis replicatas de amostras adicionadas. Houve uma recuperação satisfatória na concentração adicionada de 10 ng/g de óxido de etileno e etilenocloridrina em amostras de sementes de gergelim. Assim, o método demonstrado neste estudo mostra-se útil para a análise de rotina de amostras de sementes de gergelim fumigadas com óxido de etileno sob os limites regulatórios estabelecidos.

Referências

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