

HS-GC/MS/MS による食品中のエチレンオキシドとエチレンクロロヒドリンの評価

Agilent 8890 GC および 7010B トリプル四重極 GC/MS システムと Agilent CTC PAL3 ヘッドスペースサンブラ



著者

Praveen Arya and
Vivek Dhyani
Agilent Technologies, Inc.

概要

本アプリケーションノートでは、Agilent 8890 GC システムに Agilent 7010B トリプル四重極 GC/MS と Agilent CTC PAL3 ヘッドスペースサンブラを組み合わせて、ゴマ種子および黒コショウサンプル中のエチレンオキシド (ETO) とエチレンクロロヒドリン (ECH) を検出・定量する方法について説明します。

このメソッドにより、食品サンプルの製造、加工、保管、委託試験といった食品業界のルーチン分析のほか、学術的目的においても、信頼性の高い結果を得られます。

これはサンプル前処理を伴わない自動分析ソリューションです。サンプルはヘッドスペースバイアルに直接採取し、ヘッドスペースサンブラでインキュベーションして、バイアルの気相を GC/MS/MS システムに注入しました。5 ppb の定量下限 (LOQ) がマトリックス中で示されました。

はじめに

ETO は、サルモネラ菌などの細菌や昆虫を除去し、食品を殺菌するために使用されます。ECH は、食品中に存在する塩素イオンと ETO が反応して生成される誘導体です。ETO は発がん性と毒性があるため、欧州連合では使用が禁止されています。

食品中の ETO と ECH の分析には多様なメソッドがありますが、いずれもサンプル前処理に時間がかかり、高濃度のマトリックスを GC/MS/MS システムに導入します。消耗品が高マトリックス濃度サンプルに汚染され、寿命が短くなります。

このアプリケーションノートでは、採用したメソッドで GC/MS/MS システムへのサンプル導入にヘッドスペースサンブラを使用した例について紹介します。ヘッドスペースサンブラによって手間のかかるサンプル前処理が不要になります。また、7010B トリプル四重極 GC/MS と CTC PAL3 サンブラを組み合わせた 8890 GC システムを用いることで、ゴマ種子や黒コショウなどのマトリックスに含まれる低濃度の ETO と ECH を検出・定量できます。

実験

分析条件

このメソッドで使用する HS-GC/MS/MS パラメータの概要を表 1 に示します。

マトリックス標準キャリブレーション

ETO と ECH の標準を混合して、500 ng/mL の濃度の原液（トルエン溶液）としました。この溶液から、6 種類の濃度（10～500 ng/mL）の標準溶液をトルエンで調製しました。ブランクサンプルマトリックスから、100 mg を 20 mL ヘッドスペースバイアルに採取しました。次に、50 µL の 10 ng/mL 標準溶液をバイアルに追加し、すぐにキャップをしました。これにより、5 ng/g 濃度のマトリックス標準溶液が生成されます。同様に、10、25、50、100、250 ng/g の濃度でマトリックス標準溶液を調製しました。すべての標準を冷蔵庫に保管しました。

サンプル

100 mg のサンプルを採取して、20 mL ヘッドスペースバイアルに追加しました。次に、50 µL のトルエンを追加し、バイアルにキャップをしました。

表 1. HS-GC/MS/MS パラメータ

HS パラメータ	
モデル	Agilent CTC PAL3 ヘッドスペースサンブラ 120 cm
インキュベーション温度	140 °C
インキュベーション時間	20 分
シリンジ温度	150 °C
抽出中の攪拌	あり、250 rpm
注入量	2.0 mL
注入流量	30 mL/min
GC パラメータ	
注入口温度	250 °C
注入口ライナ	Agilent 注入口ライナ、ダイレクト、内径 1.5 mm (部品番号 18740-80200)
注入口セプタム	Agilent 注入口セプタム、11 mm (部品番号 8010-0239)
カラム	Agilent J&W DB-VRX (部品番号 122-1564)
カラム流量	1 mL/min
スプリット比	10
オープンプログラム	35 °C、4 分間 15 °C /min で 150 °C まで、1 分間保持 40 °C /min で 240 °C まで、7 分間保持
トランスファーライン温度	240 °C
コリジョンガス	アルゴン、0.5 mL/min
クエンチガス	ヘリウム、2.25 mL/min
カラムナット	Agilent カラムナット、セルフタイト (部品番号 G3440-81011 および G3440-81013)
MS パラメータ	
イオン源温度	230 °C
Q1 および Q1 温度	150 °C
溶媒待ち時間	4.5 分
ETO の MRM トランジション	44 & 29 (CE:5) 44 & 28 (CE:5) 44 & 14 (CE:20)
ECH の MRM トランジション	80 & 31 (CE:5) 80 & 43 (CE:5) 82 & 31 (CE:5)
ゲイン係数	20

結果と考察

マトリックス標準における定量ピークと確認ピーク

マトリックス標準における定量ピークと確認ピークを図 1～4 に示します。黒コショウマトリックスおよびゴマ種子マトリックスに含まれる LOQ レベル濃度の ETO および ECH の定量ピークと確認ピークに、優れたピーク形状が得られました。

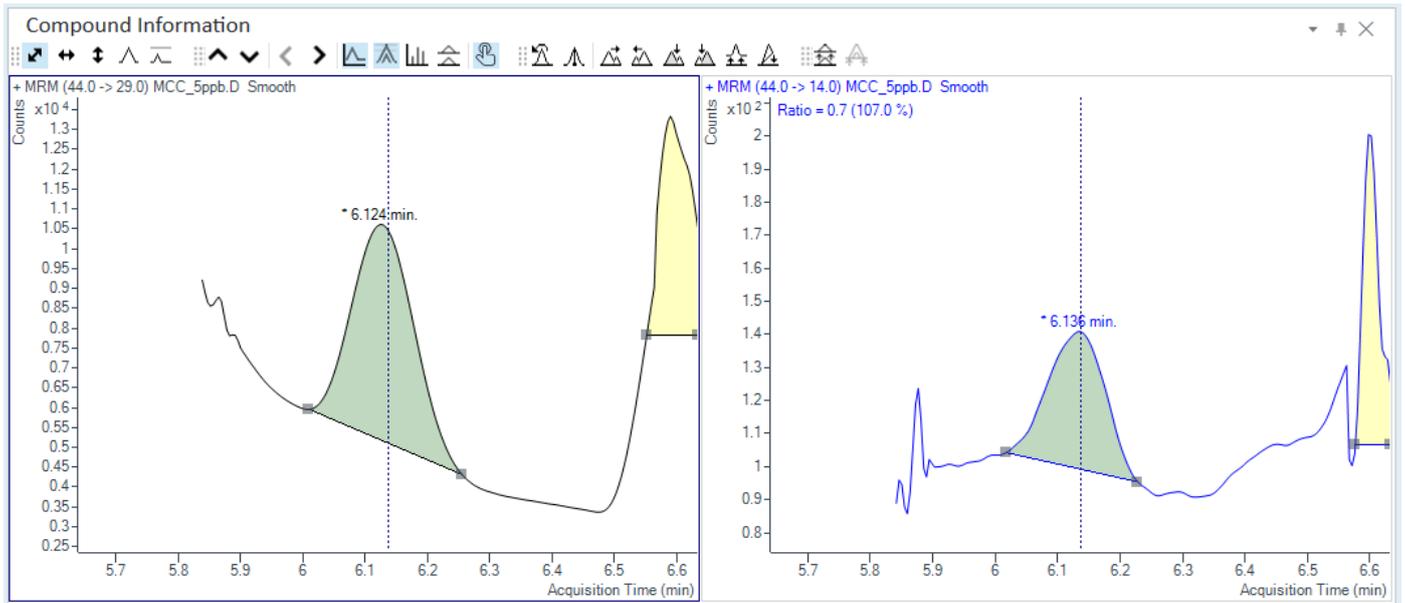


図 1. 黒コショウ中の 5 ng/g マトリックス標準における ETO の定量ピークと確認ピーク

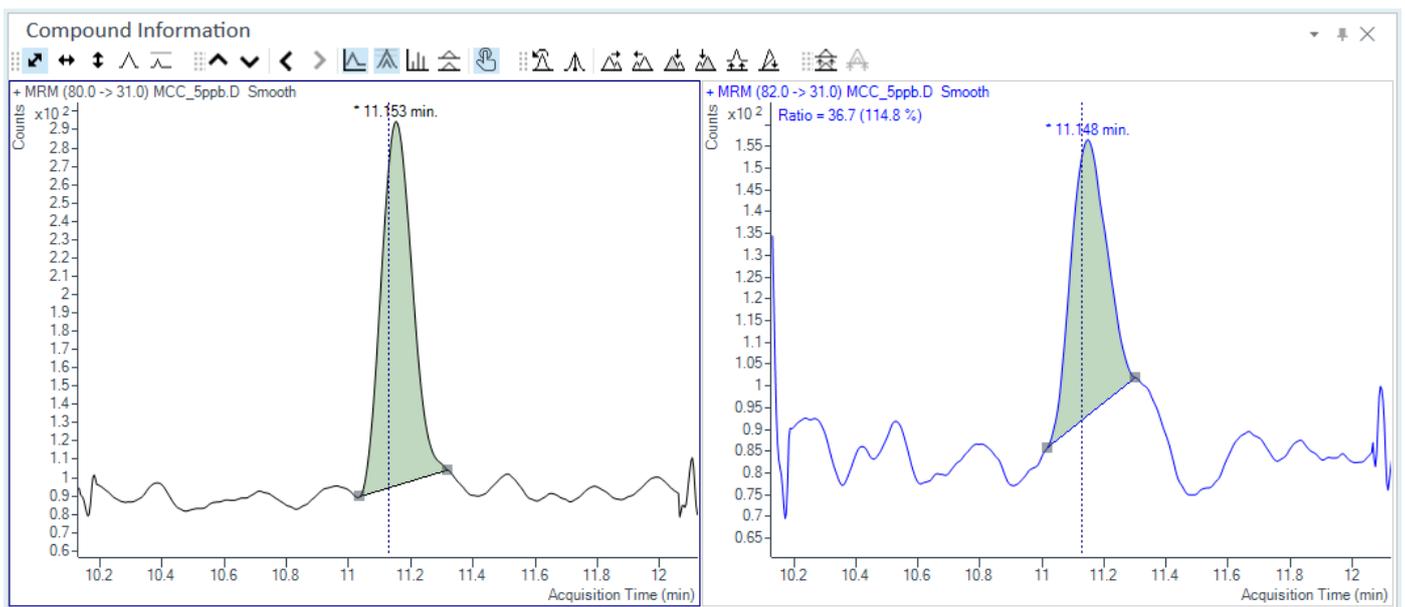


図 2. 黒コショウ中の 5 ng/g マトリックス標準における ECH の定量ピークと確認ピーク

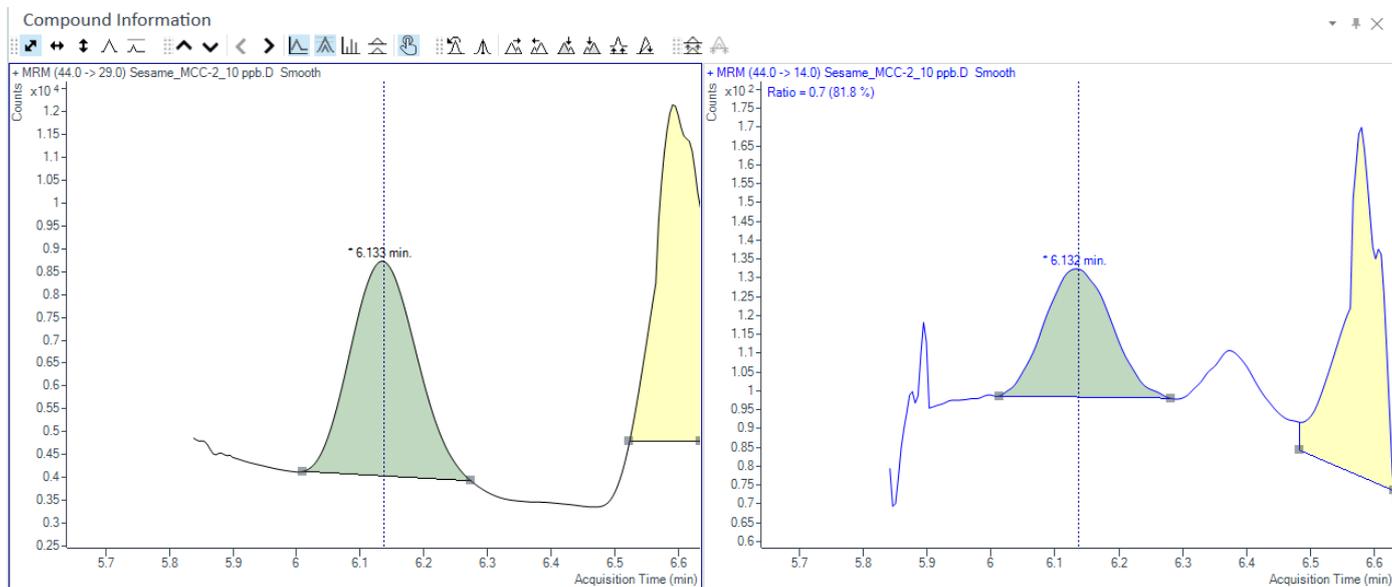


図 3. ゴマ種子中の 10 ng/g マトリックス標準における ETO の定量ピークと確認ピーク

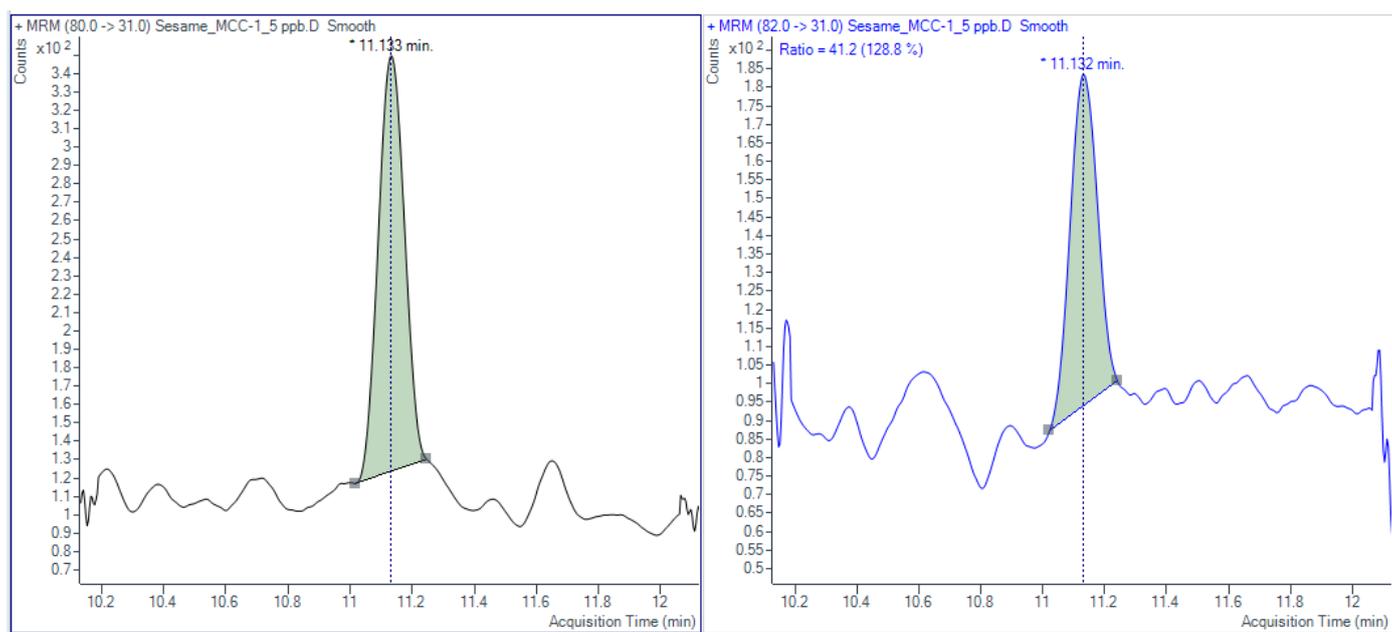


図 4. ゴマ種子中の 5 ng/g マトリックス標準における ECH の定量ピークと確認ピーク

検量線

各マトリックス（黒コショウおよびゴマ種子）に対し、5、10、25、50、100、250 ng/g の濃度で ETO と ECH のマトリックス検量線をプロットしました。6 点の検量線で優れた R^2 値が得られました。図 5 と 6 はそれぞれ黒コショウ中の ETO と ECH の直線性を示しています。図 7 と 8 はそれぞれゴマ種子中の ETO と ECH の直線性を示しています。

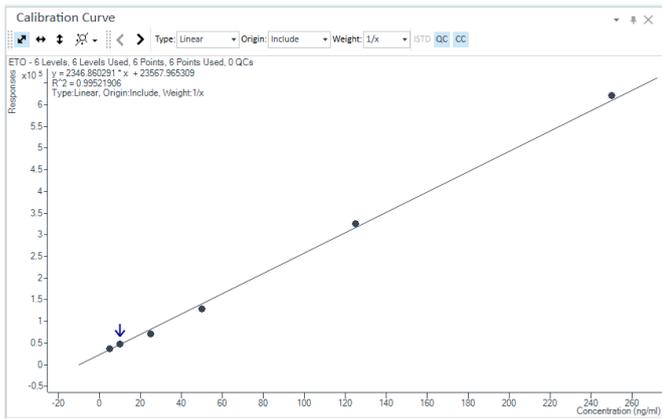


図 5. 黒コショウ中の ETO の検量線。 $R^2 > 0.995$

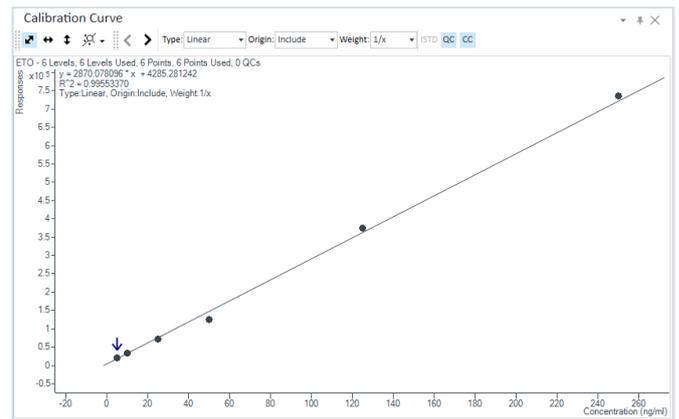


図 7. ゴマ種子中の ETO の検量線。 $R^2 > 0.995$

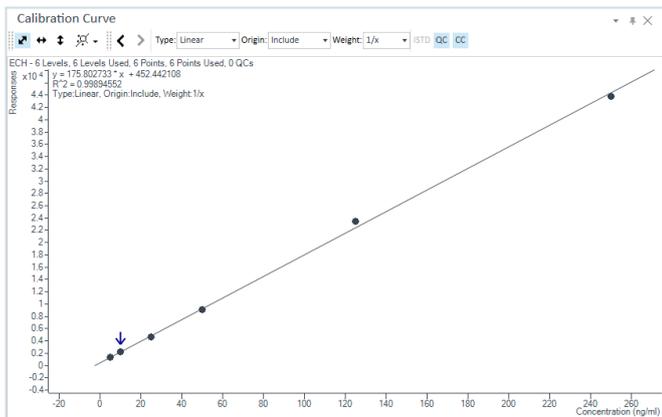


図 6. 黒コショウ中の ECH の検量線。 $R^2 > 0.998$

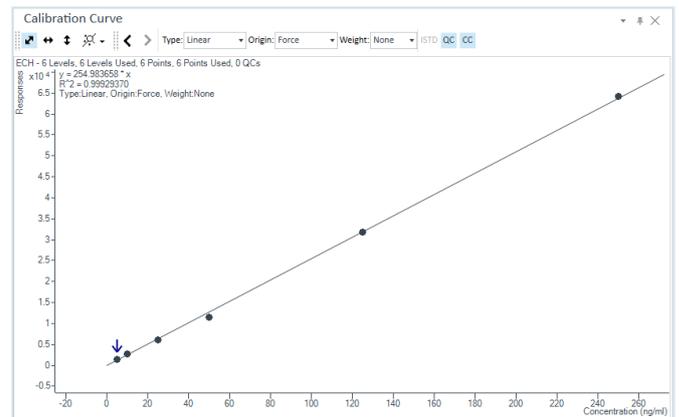


図 8. ゴマ種子中の ECH の検量線。 $R^2 > 0.999$

標準の面積再現性

マトリックスに 50 ppb 濃度の ETO と ECH を注入することで、再現性のある溶出が得られました。表 2 に示すように、ETO と ECH の %RSD は、黒コショウ中の 50 ppb マトリックス標準の 3 回の繰り返し分析によるピーク面積から計算しました。

表 2. 黒コショウ中の 50 ppb マトリックス標準に対する 3 回の繰り返し分析における標準の面積再現性

サンプル名	ETO 面積	ECH 面積
繰り返し 1	138680	10326
繰り返し 2	138513	10666
繰り返し 3	135403	10497
%RSD	1.34 %	1.62 %

回収率

ETO と ECH はそれぞれ 10 ng/g と 50 ng/g の濃度で黒コショウおよびゴマ種子サンプルにスパイクしました。マトリックス検量線による定量により、優れた回収率が得られました。図 9、10、11、12 に結果を示します。

Sample							ETO Met..	ETO Results					Qualifier (44.0 -> 14.0) R.L.
?	▼	Data File	Type	Level	Acq. Date-Time	Dil.	Exp. Conc.	RT	Resp.	Calc. Conc.	Final Conc.	Accuracy	Ratio
!	▼	Black Pepper Powder Blank.D	Sample		6/29/2022 2:54 PM	1.0		6.150	19302	0.0000	0.0000		0.5
		Matrix rep 50 ppb-1.D	Sample		7/1/2022 11:33 AM	1.0		6.159	138680	49.0494	49.0494		0.6
		Matrix rep 50 ppb-2.D	Sample		7/1/2022 12:04 PM	1.0		6.164	138513	48.9783	48.9783		0.7
		Matrix rep 50 ppb-3.D	Sample		7/1/2022 12:35 PM	1.0		6.159	135403	47.6530	47.6530		0.7
		Black pepper powder spike L1.D	Sample		6/29/2022 6:46 PM	1.0		6.155	46096	9.5991	9.5991		0.8
		Black pepper powder spike L2.D	Sample		6/29/2022 7:17 PM	1.0		6.164	133516	46.8488	46.8488		0.8
!	▼	Blank-5.D	Sample		6/30/2022 2:01 PM	1.0		6.594	0				

ETO recovery at 10 ppb spike level (L1) = 95.99%
 ETO recovery at 50 ppb spike level (L2) = 93.68%

図 9. 黒コショウ中の ETO の回収率

Sample							ECH Met..	ECH Results					Qualifier (82.0 -> 31.0) R.L.
?	▼	Data File	Type	Level	Acq. Date-Time	Dil.	Exp. Conc.	RT	Resp.	Calc. Conc.	Final Conc.	Accuracy	Ratio
!	▼	Black Pepper Powder Blank.D	Sample		6/29/2022 2:54 PM	1.0		11.129	506	0.3023	0.3023		
		Matrix rep 50 ppb-1.D	Sample		7/1/2022 11:33 AM	1.0		11.141	10326	56.1635	56.1635		33.8
		Matrix rep 50 ppb-2.D	Sample		7/1/2022 12:04 PM	1.0		11.145	10666	58.0945	58.0945		30.6
		Matrix rep 50 ppb-3.D	Sample		7/1/2022 12:35 PM	1.0		11.141	10497	57.1366	57.1366		31.0
		Black pepper powder spike L1.D	Sample		6/29/2022 6:46 PM	1.0		11.153	2314	10.5894	10.5894		32.9
		Black pepper powder spike L2.D	Sample		6/29/2022 7:17 PM	1.0		11.145	9507	51.5020	51.5020		33.3
!	▼	Blank-5.D	Sample		6/30/2022 2:01 PM	1.0							

ECH recovery at 10 ppb spike level (L1) = 100.6%
 ECH recovery at 50 ppb spike level (L2) = 103%

図 10. 黒コショウ中の ECH の回収率

Sample							ETO Met..	ETO Results					Qualifier (44.0 -> 14.0) R..
①	▼	Data File	Type	Level	Acq. Date-Time	Dil.	Exp. Conc.	RT	Resp.	Calc. Conc.	Final Conc.	Accuracy	Ratio
	▼	Sesame Blank.D	Sample		7/1/2022 6:30 PM	1.0		6.137	9652	1.8699	1.8699		0.7
	▶	Sesame_MCC-1_5 ppb.D	Cal	1	7/1/2022 8:20 PM	1.0	5.0000	6.133	20620	5.6913	5.6913	113.8	0.9
		Sesame_MCC-2_10 ppb.D	Cal	2	7/1/2022 9:03 PM	1.0	10.0000	6.133	33932	10.3295	10.3295	103.3	0.7
		Sesame_MCC-3_25 ppb.D	Cal	3	7/1/2022 9:46 PM	1.0	25.0000	6.137	71518	23.4253	23.4253	93.7	1.0
		Sesame_MCC-4_50 ppb.D	Cal	4	7/1/2022 10:18 PM	1.0	50.0000	6.137	125171	42.1194	42.1194	84.2	0.7
		Sesame_MCC-5_125 ppb.D	Cal	5	7/1/2022 10:49 PM	1.0	125.0000	6.137	374278	128.9139	128.9139	103.1	0.7
		Sesame_MCC-6_250 ppb.D	Cal	6	7/1/2022 11:20 PM	1.0	250.0000	6.137	734779	254.5206	254.5206	101.8	0.7
		Sesame spike_L1.D	Sample		7/2/2022 12:23 AM	1.0		6.137	32260	9.7470	9.7470		0.8
		Sesame spike_L2.D	Sample		7/2/2022 12:54 AM	1.0		6.137	120763	40.5833	40.5833		0.7

ETO recovery at 10 ppb spike level (L1) = 97.47%
 ETO recovery at 50 ppb spike level (L2) = 81.17%

図 11. ゴマ種子中の ETO の回収率

Sample							ECH Met..	ECH Results					Qualifier (82.0 -> 31.0) R..
①	▼	Data File	Type	Level	Acq. Date-Time	Dil.	Exp. Conc.	RT	Resp.	Calc. Conc.	Final Conc.	Accuracy	Ratio
	▼	Sesame Blank.D	Sample		7/1/2022 6:30 PM	1.0							
	▶	Sesame_MCC-1_5 ppb.D	Cal	1	7/1/2022 8:20 PM	1.0	5.0000	11.133	1325	5.1968	5.1968	103.9	41.2
		Sesame_MCC-2_10 ppb.D	Cal	2	7/1/2022 9:03 PM	1.0	10.0000	11.141	2783	10.9139	10.9139	109.1	30.4
		Sesame_MCC-3_25 ppb.D	Cal	3	7/1/2022 9:46 PM	1.0	25.0000	11.141	6053	23.7394	23.7394	95.0	34.7
		Sesame_MCC-4_50 ppb.D	Cal	4	7/1/2022 10:18 PM	1.0	50.0000	11.145	11413	44.7597	44.7597	89.5	31.0
		Sesame_MCC-5_125 ppb.D	Cal	5	7/1/2022 10:49 PM	1.0	125.0000	11.145	31701	124.3245	124.3245	99.5	33.2
		Sesame_MCC-6_250 ppb.D	Cal	6	7/1/2022 11:20 PM	1.0	250.0000	11.141	64121	251.4714	251.4714	100.6	31.4
		Sesame spike_L1.D	Sample		7/2/2022 12:23 AM	1.0		11.149	2656	10.4150	10.4150		31.4
		Sesame spike_L2.D	Sample		7/2/2022 12:54 AM	1.0		11.149	10957	42.9728	42.9728		30.4

ECH recovery at 10 ppb spike level (L1) = 104.1%
 ECH recovery at 50 ppb spike level (L2) = 85.94%

図 12. ゴマ種子中の ECH の回収率

結論

黒コショウおよびゴマ種子サンプル中の ETO と ECH の分析のために、正確で堅牢なメソッドを開発しました。この手法ではサンプルを PAL3 ヘッドスペースサンプラで直接処理するため、サンプル前処理が不要になります。マトリックス濃度の高いサンプルをトリプル四重極 GC/MS システムに導入しないため、消耗品の寿命が大幅に向上します。このメソッドの LOQ は、ゴマ種子と黒コショウサンプルでは 5 ng/g であることが示されています。黒コショウサンプル中に 50 ng/g の濃度でスパイクした ETO と ECH を 3 回繰り返し分析したところ、再現性の高い結果が得られました。黒コショウマトリックスとゴマ種子マトリックスにおいて、10 ng/g および 50 ng/g のスパイク濃度レベルで優れた回収率が得られました。以上のことから、微量レベルの ETO と ECH を対象に食品サンプルのルーチン分析用に開発された本メソッドの有用性が、このアプリケーションノートで実証されました。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE88867644

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022, 2023

Printed in Japan, May 5, 2023

5994-5378JAJP

参考文献

- Zhang, J.; Zhang, Y. Determination of Ethylene Oxide and Ethylene Chlorohydrin in Medical Devices Using the Agilent 8890 GC and 7697A Headspace Sampler. Agilent Technologies application note, publication number 5994-2183EN, **2020**.
- Fully Automated Cryogen-Free Analysis of Ethylene Oxide and 2-Chloroethanol in Contaminated Sesame Seeds Using Headspace-Trap with Multi-Step Enrichment (MSE) GC-MS. Markes International application note 281.
- EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides, European Commission. EURL-SRM Analytical Observations Report. Analysis of Ethylene Oxide and its Metabolite 2-Chloroethanol by the QuOil or the QuEChERS Method and GC-MS/MS. Version 1.1, December **2020**. https://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/srm/EurlSrm_Observation_EO_V1.pdf.