

Agilent 8890GC および 7000D トリプル 四重極 MS システムによるゴマ種子中の エチレンオキシドとエチレンクロロヒドリンの 推定

著者

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

概要

本アプリケーションノートでは、Agilent 8890 GC システムと Agilent 7000D GC/MS トリプル四重極質量分析装置を組み合わせ、ゴマ種子サンプル中のエチレンオキシドとエチレンクロロヒドリンを検出・定量する方法について説明します。このメソッドにより、ゴマ種子サンプルの製造、加工、保管、商用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、極めて信頼性の高い結果を得られます。GC/TQ 注入のサンプル前処理として、サンプル中のエチレンオキシド残留物をエチレンクロロヒドリンに変換したのち、酢酸エチルで液液抽出（LLE）によるクリーンアップを行います。10 ppb の定量下限（LOQ）がマトリックス中で示されました。

エチレンオキシドは、貯蔵中のオイルシードや香辛料を殺菌するために使用されます。これらの食品には、エチレンオキシドとその誘導体であるエチレンクロロヒドリン（貯蔵中の反応によって生成される）の残留物が含まれていることがあります¹。エチレンクロロヒドリンは、燻蒸にエチレンオキシドが使用されていることを確認するためのマーカーとして適しています。ゴマ種子のエチレンクロロヒドリンは、簡単な GC/TQ 分析メソッドで評価できます。この評価では、換算係数の使用により、最初にサンプルに存在した実際のエチレンオキシドの推定も可能です。

本検討で実証したメソッドは、8890 GC システムと 7000D トリプル四重極 MS を組み合わせ使用して、ゴマ種子のエチレンオキシドによる燻蒸のマーカーとしてのエチレンクロロヒドリンを検出する際に有効です（定量下限は 10 ng/g で、EU が定める 50 ng/g の MRL に適合しています）²。

実験

試薬

- 0.1 N 硫酸 (0.981 g の硫酸を 100 mL の水に溶解)
- 飽和塩化ナトリウム水溶液
- 水 (Millipore、Milli-Q)
- 酢酸エチル (HPLC グレード)
- Agilent QuEChERS 分散クリーンアップキット (部品番号 5982-0028)
- エチレンオキシド参照標準 (Sigma-Aldrich、部品番号 CRM48891)
- エチレンクロロヒドリン参照標準 (Merck、部品番号 8.00945.0100)

機器

本検討では、ポストカラムバックフラッシュオプションで構成された MMI 注入口付きの Agilent 8890GC システム、7000D トリプル四重極 MS、超音波洗浄器、ウォーターバス、低温遠心分離機、卓上遠心分離機、およびボルテックスミキサーを使用しました。手順は次のとおりです。

1. サンプルを 2 g 計量し、50 mL 遠心管に入れます。
2. 2 mL の水、2 mL の 0.1 N H₂SO₄、および 1 mL の飽和塩化ナトリウム溶液を追加します。
3. 20 分間超音波処理します。
4. サンプルを 50 °C のウォーターバスに 1 時間静置します。
5. ボルテックス攪拌し、サンプルが室温に下がるまで待ちます。
6. 5 mL 酢酸エチルを加えて 10 分間ボルテックス攪拌します。
7. 8,000 rpm で 5 分間、5 °C で遠心分離します。
8. 上清を 1 mL 取り、分散型 QuEChERS クリーンアップチューブ (ユニバーサル) (部品番号 5982-0028) に加えます。
9. 振とうし、5,000 rpm で 5 分間遠心分離します。
10. バイアルに上清を採取し、GC/MS/MS に注入します。

表 1. GC メソッド

GC 分析条件	
カラム	Agilent VF-624 ms、 60 m × 0.25 mm, 1.4 μm (部品番号 CP9103)
注入口	Agilent マルチモード注入口 (MMI) 5190-2293、スプリットレスライナ 注入量:2 μL
注入モード	パルスドスプリットレス、 0.8 分まで 25 psi、 1.25 分まで 40 mL/min のバージ流量
注入口温度	250 °C
オープン	60 °C で 2 分間、 10 °C/min で 150 °C まで、 40 °C/min で 250 °C まで、 20 分間保持
キャリアガス	99.9995 % ヘリウム、1.0 mL/min、 定流量モード

表 2. MS メソッド MS 条件

MSD 条件	
四重極温度	150 °C
イオン源温度	El 280 °C
トランスファライン温度	250 °C
エチレンクロロヒドリンの MRM トランジション	82 & 31 (CE: 5) 80 & 43 (CE: 5) 80 & 31 (CE: 5)
EMV モード	ゲイン係数 : 10
各トランジションのドウェルタイム	75
溶媒ディレイ	9.5

結果と考察

上記のメソッドでは、このレベルでのゴマ種子サンプル中のエチレンクロロヒドリンの定量下限は 10 ng/g と推定されました。ピークはベースラインやマトリックスと簡単に区別でき、S/N 比は 2.9 を超えました。図 1 は、定量下限レベルのスパイクでの定量イオンと定性イオンの EIC を示しています。この定量下限は、顧客のニーズに応え、EU が定めた MRL の規制要件 50 ng/g を満たすものです。図 2 に、10 ppb および 50 ppb レベルのマトリックス標準の S/N 比を示します。

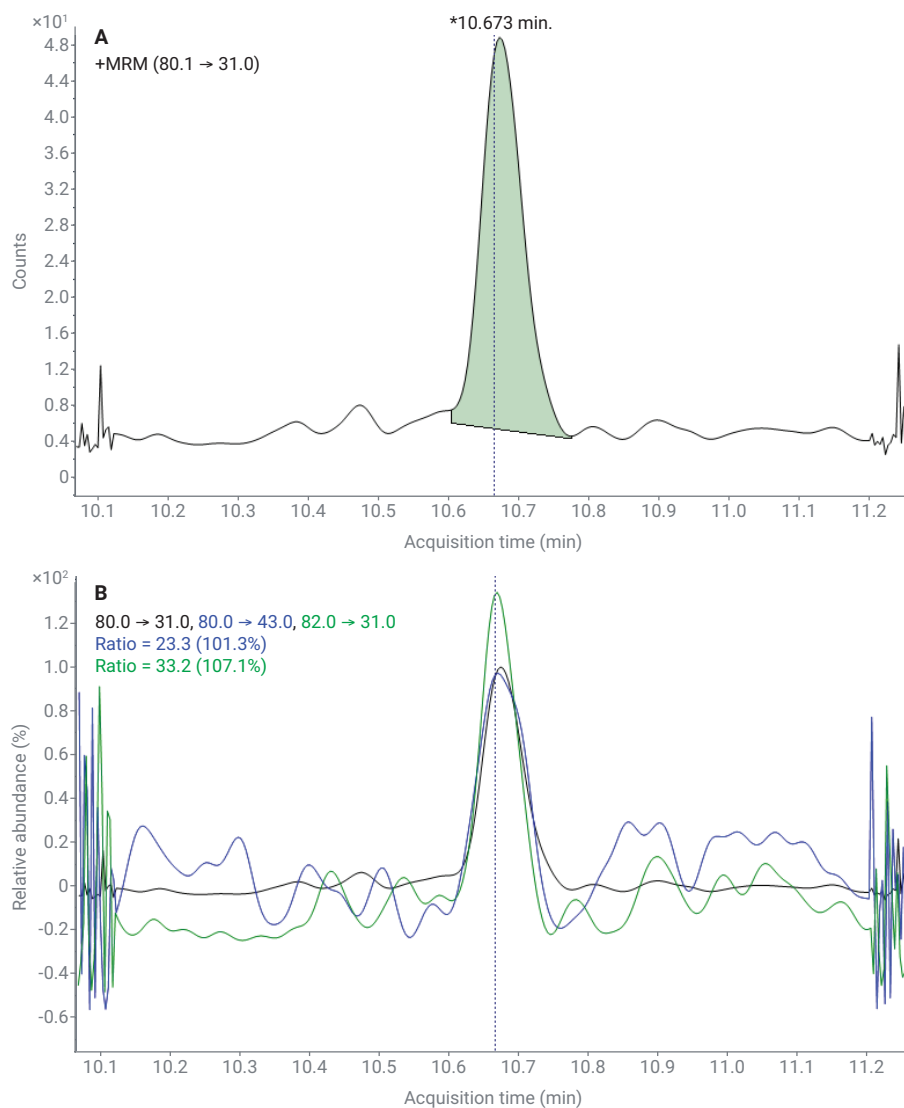


図 1. 10 ng/g スパイクレベルでのエチレンクロロヒドリンの定量イオンと 2 つの定性イオンのピーク

キャリブレーションおよび直線性

5 ～ 200 ng/g の濃度レベルにわたるレスポンス（ピーク面積）について、プレススパイクしたマトリックスの直線性プロットを作成しました（図 4）。キャリブレーションは、5、10、20、50、100、200 ng/g の 6 つの濃度で実行しました。R² > 0.998 の良好な直線性が得られました。

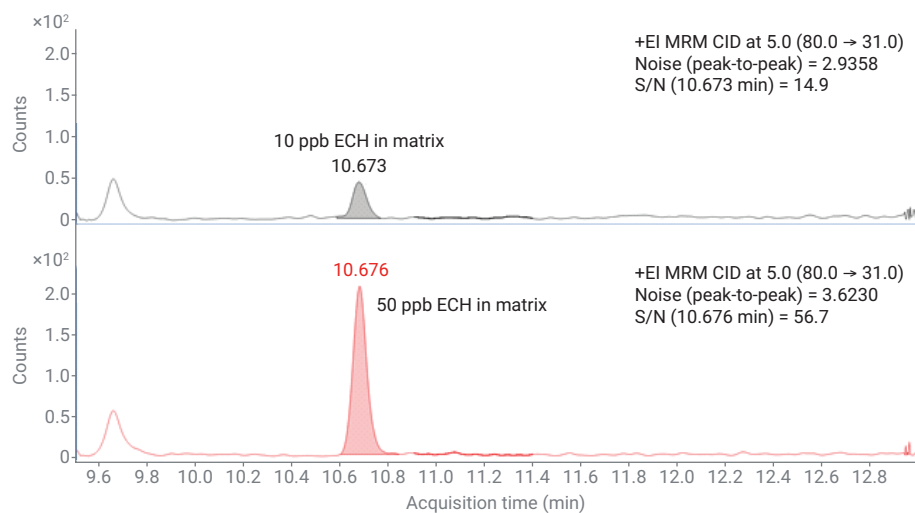


図 2. エチレンクロロヒドリンの感度：10 ng/g スパイクと 50 ng/g スパイクの MRM クロマトグラム

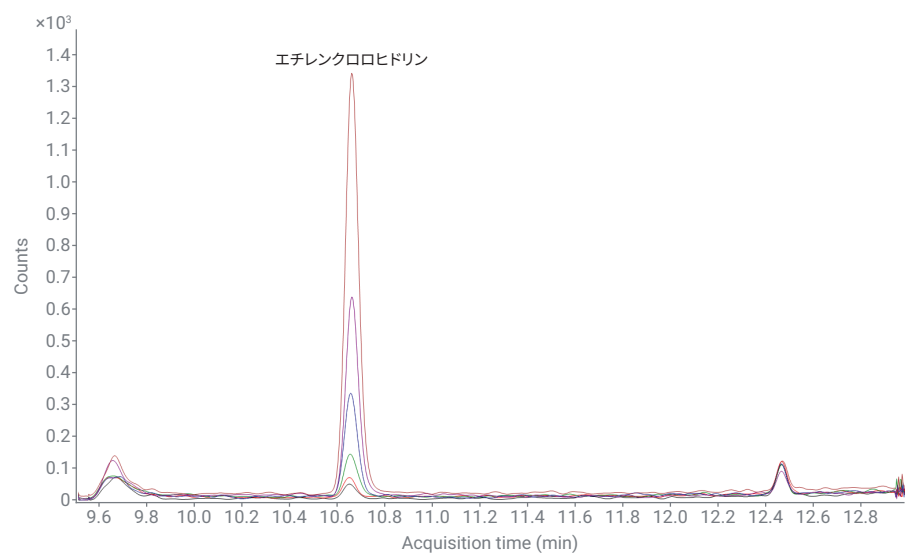


図 3. 5 ppb から 200 ppb の範囲のマトリックス中のさまざまな濃度のエチレンクロロヒドリンの TIC MRM 重ね表示

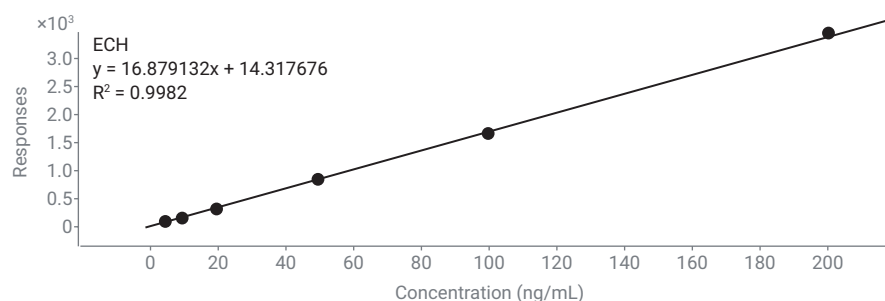


図 4. エチレンクロロヒドリンのマトリックス適合標準の検量線

再現性

再現性は、50 ppb 濃度のマトリックスにエチレンクロロヒドリン標準を注入することで実証しました。表 3 に示すように、50 ppb マトリックス標準の 6 回の繰り返し注入に基づいて計算したエチレンクロロヒドリンのピーク面積の相対標準偏差は 1.73 % でした。

ゴマ種子サンプルの定量

このメソッドを、地域の市場で購入したゴマ種子サンプルに適用し、分析と回収について検討しました。

回収率の検討

表 4 に示すように、ゴマ種子のブランクマトリックスにはエチレンクロロヒドリンに対応するピークは見られませんでした。実際のゴマ種子サンプルからのエチレンクロロヒドリンとエチレンオキシドの回収率は、エチレンクロロヒドリンでは 10 および 50 ppb、エチレンオキシドでは 10 ppb のスパイクレベルを用いて算出しました。

次のような 3 つのスパイク実験を実施しました。

- 1. ゴマ種子サンプルに 10 ppb レベルでエチレンクロロヒドリンを添加する。
- 2. ゴマ種子サンプルに 50 ppb レベルでエチレンクロロヒドリンを添加する。
- 3. ゴマ種子サンプルに 10 ppb レベルでエチレンオキシドを添加する。この目的は、サンプル中のエチレンオキシド含有量を推定する方法の適用性を確認することです（換算係数 0.55 を乗数として使用して、エチレンオキシドのスパイクサンプルの結果を計算しました）²。回収率について得られた結果を表 5 に示します。

表 3. 50 ppb マトリックス適合標準のエチレンクロロヒドリンの %RSD (CV)

面積 注入-1	面積 注入-2	面積 注入-3	面積 注入-4	面積 注入-5	面積 注入-6	%RSD
821	804	811	829	842	810	1.73

表 4. キャリブレーション (5 ~ 200 ppb)、添加回収率 (10 および50 ppb)、および再現性実験 (50 ppb) の定量の概要

サンプル名	化合物	サンプルの種類	RT	レスポンス	最終濃度 (ng/g)
Matrix Blank_sesame seed	エチレンクロロヒドリン	サンプル			ND
マトリックスキャリブレーション-1 5 ppb	エチレンクロロヒドリン	キャリブレーション	10.646	115	5.97
マトリックスキャリブレーション-2 10 ppb	エチレンクロロヒドリン	キャリブレーション	10.650	165	8.9
マトリックスキャリブレーション-3 20 ppb	エチレンクロロヒドリン	キャリブレーション	10.654	324	18.32
マトリックスキャリブレーション-4 50 ppb	エチレンクロロヒドリン	キャリブレーション	10.654	856	49.85
マトリックスキャリブレーション-5 100 ppb	エチレンクロロヒドリン	キャリブレーション	10.657	1,676	98.46
マトリックスキャリブレーション-6 200 ppb	エチレンクロロヒドリン	キャリブレーション	10.657	3,449	203.5
Sesame_ECH SPK_10 ppb	エチレンクロロヒドリン	サンプル	10.673	184	10.08
Sesame_ECH SPK_50 ppb	エチレンクロロヒドリン	サンプル	10.676	859	50.04
Sesame_ETO SPK_10 ppb	エチレンクロロヒドリン	サンプル	10.673	267	8.23
50 ppb spk レプリケート-1	エチレンクロロヒドリン	サンプル	10.699	821	47.8
50 ppb spk レプリケート-2	エチレンクロロヒドリン	サンプル	10.707	804	46.79
50 ppb spk レプリケート-3	エチレンクロロヒドリン	サンプル	10.714	811	47.2
50 ppb spk レプリケート-4	エチレンクロロヒドリン	サンプル	10.718	829	48.29
50 ppb spk レプリケート-5	エチレンクロロヒドリン	サンプル	10.737	842	49.05
50 ppb spk レプリケート-6	エチレンクロロヒドリン	サンプル	10.733	810	47.14

表 5. ゴマ種子サンプルの回収率

化合物名	スパイク量 (ng/g)	観測量 (ng/g)	最終量 (ng/g)	回収率 (%)
エチレンクロロヒドリン	10	10.078	10.078	100.8
	50	50.036	50.036	100.1
エチレンオキシド	10	14.96	8.228	82.3

結論

ゴマ種子中のエチレンオキシドとエチレンクロロヒドリンを分析するための正確かつ堅牢なメソッドを開発しました。サンプル前処理メソッドは簡単で、時間短縮が可能です。このメソッドの定量下限は、サンプル中で 10 ng/g レベルと実証されています。スパイクしたサンプルの繰り返し分析を 6 回行い、再現性の高い結果が得られました。ゴマ種子サンプル中のエチレンオキシドとエチレンクロロヒドリンのスパイク濃度 10 ng/g で、十分な回収率が得られました。したがって、本検討で実証したメソッドは、規制の MRL に適応する、エチレンオキシドで燻蒸されたゴマ種子サンプルのルーチン分析に有用であることが実証されました。

参考文献

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

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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おりません。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。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2021
Printed in Japan, August 11, 2021
5994-3805JAJP
44419.2179050926