

## QuEChERS 抽出と GC/MS/MS を用いた スパイスおよび油糧種子中の エチレンオキシドと 2- クロロエタノールの 評価

Agilent 8890/7010 トリプル四重極 GC/MS システム



### 著者

Praveen Arya, Soma  
Dasgupta, Vivek Dhyani  
Agilent Technologies, Inc.

### 概要

このアプリケーションノートでは、Agilent 8890 GC システムと Agilent 7010 GC/MS トリプル四重極質量分析システムを組み合わせ、亜麻仁、クミンパウダー、赤唐辛子パウダーなどの食品に含まれるエチレンオキシド (EtO) と 2- クロロエタノール (2-CE) を同時に検出、定量する方法について説明します。サンプル前処理を QuEChERS 抽出と分散クリーンアッププロセスを使用して行った後、液体注入によって GC/MS/MS に注入しました。マトリックス内で、両方の化合物に対して 10 ppb の定量限界 (LOQ) を達成しました。両方の化合物の平均回収率は 75 ~ 86 % でした。

## 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。エチレンクロロヒドリン (2-CE) は、EtO と食品中に存在する塩素イオンとの反応によって生成される誘導体です。EtO は発がん性および毒性があるため、欧州連合 (EU) では使用が禁止されています。

従来、EtO から 2-CE への酸性変換を含む EtO (EtO および 2-CE) の分析方法が開発されてきました。これらのメソッドは時間がかかり、労力が大きく、有害な溶剤を大量に必要とします。EtO は揮発性があるため、サンプル前処理が極めて重要です。EU Reference Laboratories (EURL) は 2020 年 12 月、ゴマ種子中の EtO および 2-CE の分析に、QuEChERS 抽出とそれに続く GC/MS/MS 分析を使用する単成分残留分析法を推奨しました。

本検討で採用したメソッドでは、8890 GC システムへのサンプル導入に自動液体サンブラを使用し、7010 GC/MS トリプル四重極質量分析システムと組み合わせて用います。

表 1. GC/TQ パラメータ

パラメータ	設定値
<b>GC/MS/MS メソッドパラメータ</b>	
GC	G4513 オートサンブラ搭載 Agilent 8890 GC
質量分析計	Agilent 7010 トリプル四重極質量分析システム
分析カラム	Agilent J&W DB-VRX カラム (60 m x 0.25 mm, 1.4 µm)
カラム流量	ヘリウム: 1.0 mL/min, 定流量
注入モード	パルススプリット (4:1)
注入量	2 µL
注入プログラム	90 °C で開始 (0.8 分間保持)、450 °C /min で 250 °C まで昇温、10 分間保持
オープンプログラム	40 °C で開始 (1 分間保持)、10 °C /min で 160 °C まで昇温、その後 30 °C /min で 245 °C まで昇温、5 分間保持
MS パラメータ	イオン化モード: EI、イオン源温度: 230 °C、四重極温度 (Q1 および Q2): 150 °C
<b>MRM トランジション</b>	
EtO	44 & 14 (CE:20) 44 & 28 (CE:5) 44 & 29 (CE:5)
2-CE	80 & 31 (CE:5) 80 & 43 (CE:5) 82 & 31 (CE:5)

## 実験方法

### 標準液の調製

EtO は揮発性が高いため、標準溶液は低温 (< 10 °C) で調製しました。希釈剤として、アセトニトリルを使用前に少なくとも 15 分間冷凍庫 (-20 °C) で冷却しました。低温の分析標準溶液を冷却したアセトニトリルで希釈し、濃度がそれぞれ 1 mg/mL の EtO および 2-CE の標準原液を調製しました。

標準原液をアセトニトリルでさらに希釈して、EtO および 2-CE の濃度が 10 µg/mL の作業用標準溶液を作成しました。すべての標準溶液 (2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100、200 ng/mL) は、原液をアセトニトリルで希釈して新たに調製しました。亜麻仁、クミンパウダー、赤唐辛子パウダーのマトリックス適合標準は、各マトリックスの抽出物に必要な量の溶液を後添加することによって調製しました。すべての原液は分析前の劣化を避けるために -20 °C の温度で保存しました。

### サンプル調製

亜麻仁、クミンパウダー、赤唐辛子パウダーの均質化されたサンプルを、EN 15662 の手順に従って QuEChERS 抽出手順で処理しました (図 1)。各サンプルについて約 2.00 ± 0.01 g を計量し、50 mL 遠心管に入れました。遠心管に冷水 10 mL を加えた後、キャップをして 1 分間ボルテックスで混合してサンプルを確実に水和させ、さらに冷アセトニトリル 10.0 mL を加え、セラミックホモジナイザーを 2 個使用して抽出効率を高めました。遠心分離チューブの蓋を閉め、10 分間よく振とうしました。QuEChERS 抽出塩 (MgSO<sub>4</sub> 4 g、NaCl 1 g、クエン酸ナトリウム 1 g、クエン酸 2 ナトリウム 1.5 水和物 0.5 g) を加え、チューブをさらに 3 分間振とうしました。その後、サンプルを 6,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。上層のアセトニトリル層 (6.0 mL) を QuEChERS 分散キット 15 mL チューブ (PSA 150 mg、C18EC 150 mg、MgSO<sub>4</sub> 900 mg) に移しました。このチューブを 30 秒間ボルテックスした後、5,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。遠心分離後、分析用に上清を GC パイアルに移しました。

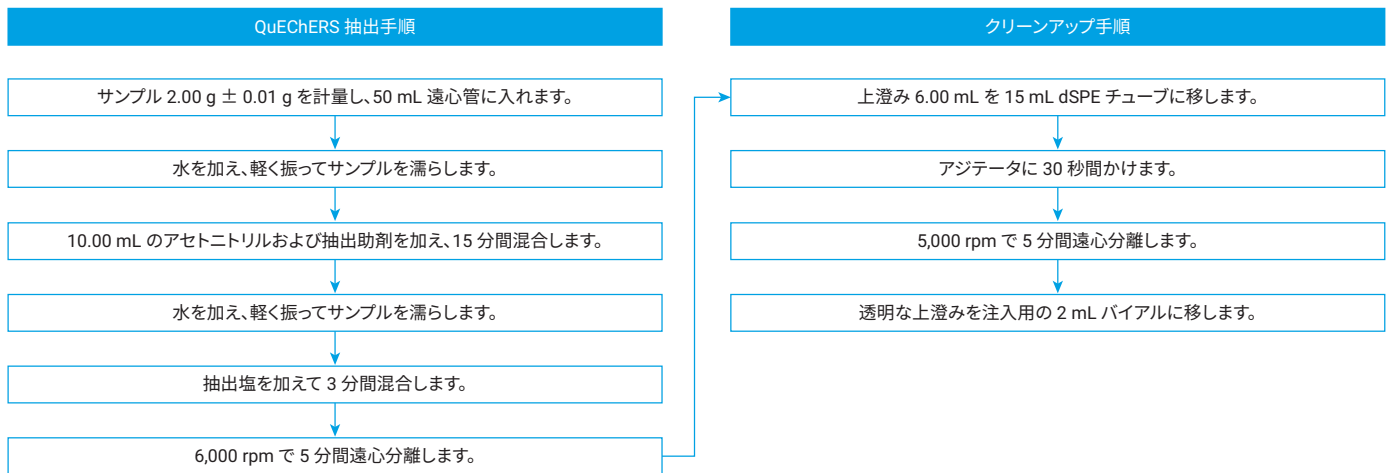


図 1. サンプルの抽出およびクリーンアップの QuEChERS ワークフロー

## 結果と考察

### キャリブレーション

溶媒中の濃度 2、5、10、20、50、100 ng/mL で、EtO および 2-CE のマトリックスキャリブレーションを実施しました。亜麻仁、クミンパウダー、赤唐辛子パウダーの添加後マトリックス抽出物でも同様のキャリブレーションを行いました。 $R^2 > 0.99$  という優れた値が得られました。

図 8 と 9 はそれぞれアセトニトリル中の EtO と 2-CE の直線性を示しています。図 10 と 11 はそれぞれ亜麻仁マトリックス中の EtO と 2-CE の直線性を示しています。

### 標準の面積再現性

マトリックス抽出物に 10 ppb 濃度の EtO と 2-CE 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 および 2-CE の % RSD データは、亜麻仁、クミンパウダー、および赤唐辛子パウダーの 10 ppb マトリックス標準の 6 回の反復注入のピーク面積から計算します。

### 回収率

EtO と 2-CE は、亜麻仁、クミンパウダー、赤唐辛子パウダーのサンプルに 20 ng/g と 50 ng/g の濃度で添加しました。添加後のマトリックススペースのキャリブレーションによる定量化により、許容可能な回収率が得られました。結果を表 3 に示します。

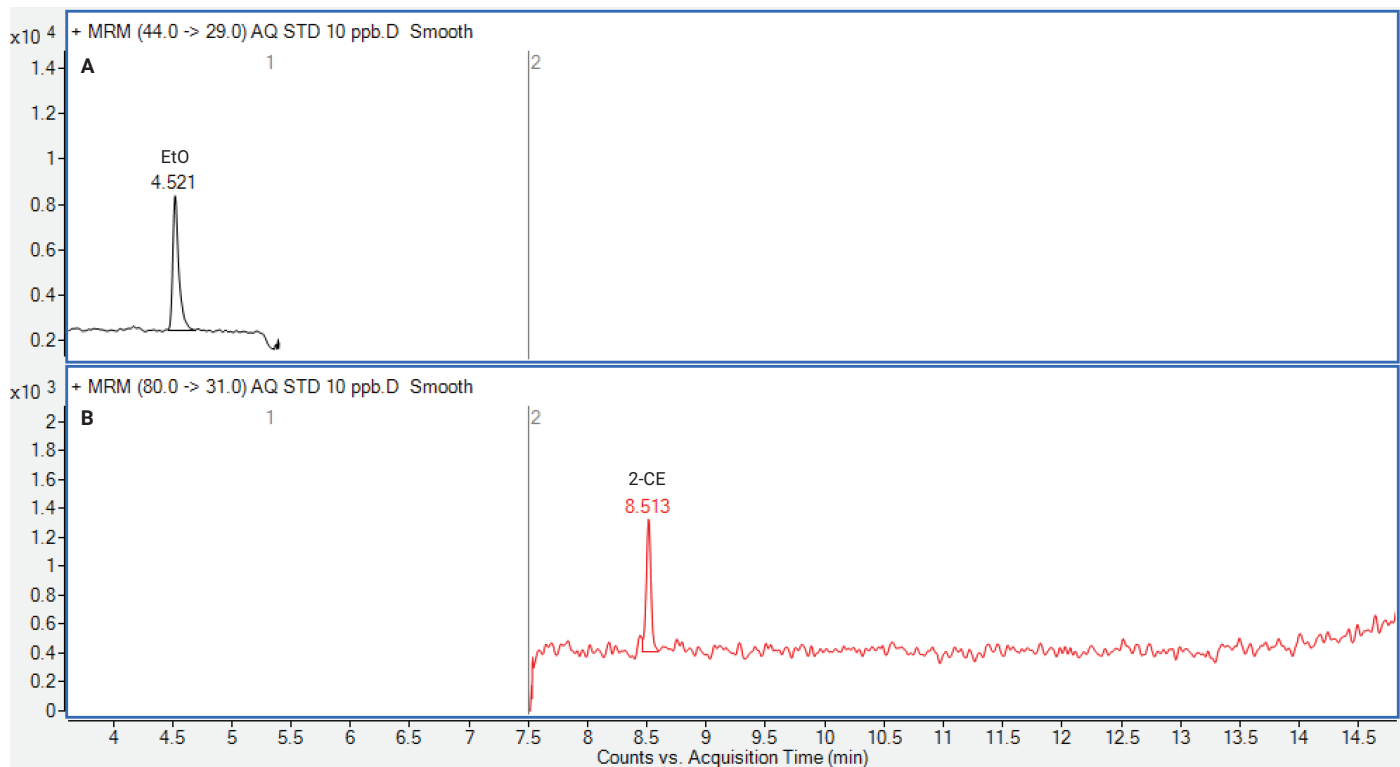


図 2. (A) 10 ng/mL レベルの EtO と (B) 10 ng/mL レベルの 2-CE のクロマトグラム

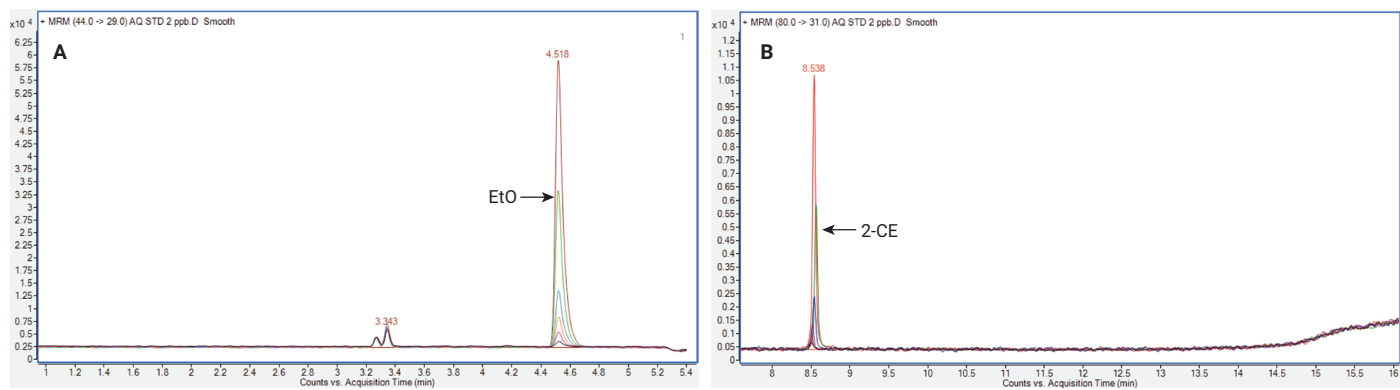


図 3. 2 ng/mL から 100 ng/mL までの一連の標準溶液からのクロマトグラムの重ね表示。(A) EtO および (B) 2-CE

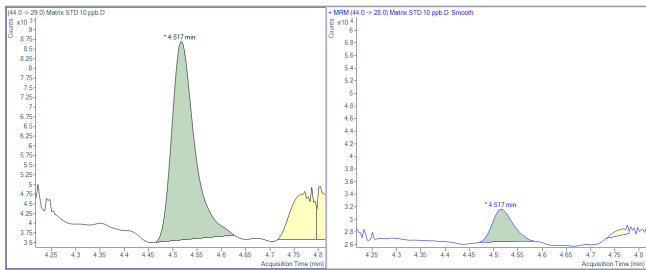


図 4. 亜麻仁中の 10 ng/g マトリックス標準における EtO の定量イオンと確認イオンのピーク

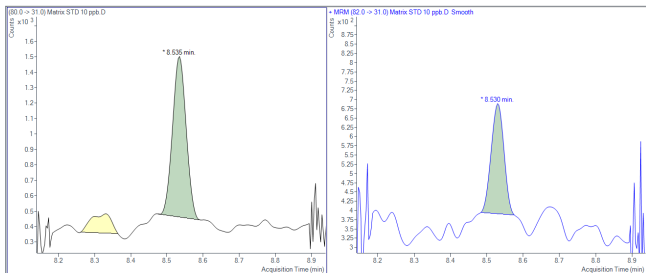


図 5. 亜麻仁中の 10 ng/g マトリックス標準における 2-CE の定量イオンと確認イオンのピーク

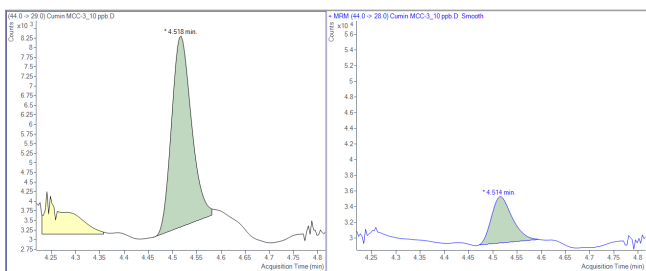


図 6. クミンパウダー中の 10 ng/g マトリックス標準における EtO の定量イオンと確認イオンのピーク

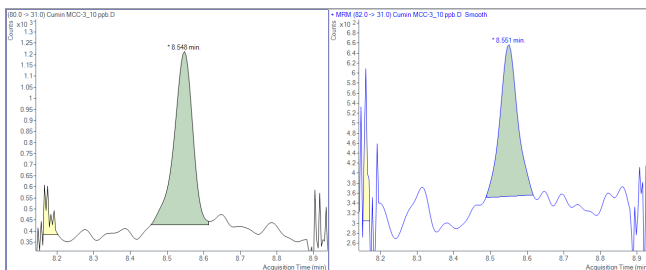


図 7. クミンパウダー中の 10 ng/g マトリックス標準における 2-CE の定量イオンと確認イオンのピーク

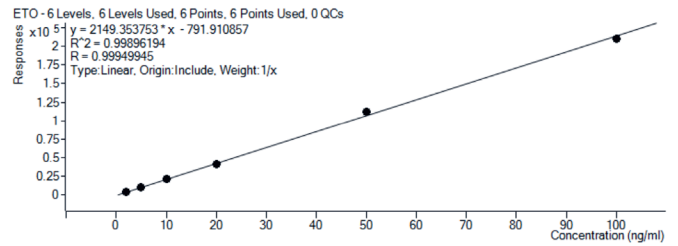


図 8. アセトニトリル中の EtO の検量線 ( $R^2 > 0.998$ )

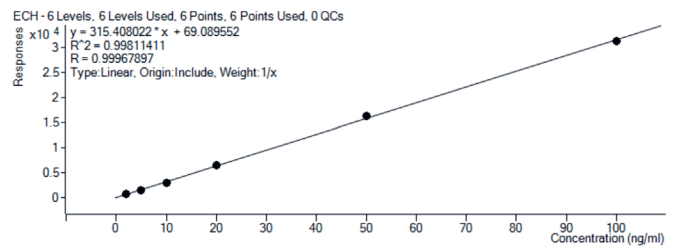


図 9. アセトニトリル中の 2-CE の検量線 ( $R^2 > 0.998$ )

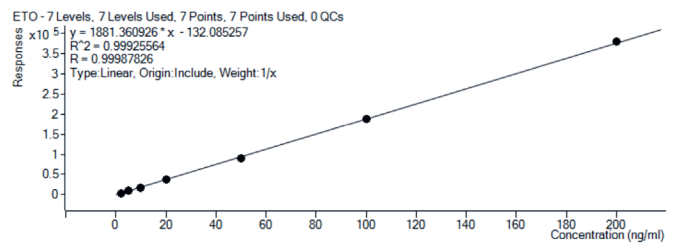


図 10. 亜麻仁中の EtO の検量線 ( $R^2 > 0.999$ )

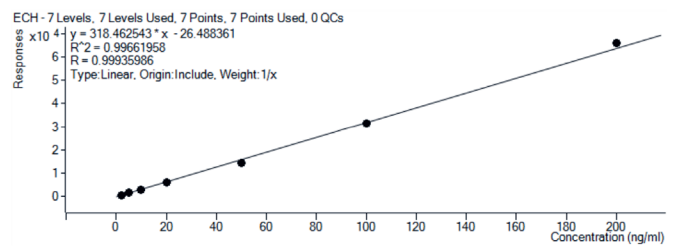


図 11. 亜麻仁中の 2-CE の検量線 ( $R^2 > 0.996$ )

表 2. 亜麻仁、クミンパウダー、赤唐辛子パウダーの 10 ppb マトリックス標準の 6 回の反復に対する標準面積の再現性

注入回数 (繰り返し回数)	EtO (ピーク面積)			2-CE (ピーク面積)		
	亜麻仁	クミンパウダー	赤唐辛子パウダー	亜麻仁	クミンパウダー	赤唐辛子パウダー
	10 ng/mL					
注入 1 回目	2,266	2,193	3,135	1,065	893	735
注入 2 回目	2,264	2,205	3,445	1,049	1,035	910
注入 3 回目	2,545	2,179	3,425	1,129	1,125	880
注入 4 回目	2,562	2,162	3,440	993	1,048	755
注入 5 回目	2,392	2,228	3,385	1,236	1,168	845
注入 6 回目	2,526	2,135	3,335	1,100	979	785
平均値	2,426	2,184	3,361	1,095	1,041	818
SD	138.32	32.76	118	83.04	99.01	70.68
RSD (%)	5.70	1.50	3.51	7.58	9.51	8.64

表 3. それぞれ 20 ng/g および 50 ng/g レベルで添加された亜麻仁およびクミンパウダー中の EtO および 2-CE の回収率

食品マトリックス	EtO			2-CE		
	スパイク濃度 (ng/g)	得られた濃度の平均 (ng/g)	回収率 (%)	スパイク濃度 (ng/g)	得られた濃度の平均 (ng/g)	回収率 (%)
亜麻仁	20	15.12	75.6	20	15.84	79.2
クミンパウダー	50	39.02	78.0	50	43.29	86.6
赤唐辛子パウダー	50	38.52	77.04	50	42.47	84.9

## 結論

亜麻仁、クミンパウダー、赤唐辛子パウダー中の EtO および 2-CE の分析に、QuEChERS 抽出とそれに続く GC/MS/MS 分析を使用し、単一残留物分析法に関する EURL の要件を満たす正確かつ堅牢なメソッドを開発しました。このメソッドの LOQ が、試験を行ったすべてのマトリックスに対して 10 ng/g となることが実証されました。EtO および 2-CE の 10 ng/g 濃度レベルでのマトリックススペースの標準の 6 回の繰り返し分析で、再現性のある結果が得られました。試験を行ったすべてのマトリックスにおいて、20 ng/g および 50 ng/g の添加濃度レベルで EtO と 2-CE の両方について優れた回収率が得られました。以上から本検討を通じて、微量レベルの EtO および 2-CE を対象に食品サンプルの日常的な分析を行うために開発された本メソッドの有用性が実証されました。

## 参考文献

1. Dunkelberg, H. Carcinogenic Activity of Ethylene Oxide and Its Reaction Products 2-Chloroethanol, 2-Bromoethanol, Ethylene Glycol, And Diethylene Glycol. I. Carcinogenicity of Ethylene Oxide in Comparison with 1,2-Propylene Oxide after Subcutaneous Administration in Mice. *Zentralblatt Fur Bakteriologie Mikrobiologie Und Hygiene. 1. Abt. Originale B Hygiene* **1981**, 174, 383–404. (PubMed)
2. Tateo, F.; Bononi, M. Determination of Ethylene Chlorohydrin as Marker of Spices Fumigation with Ethylene Oxide. *Journal of Food Composition and Analysis* **2006**, 19, 83–87.
3. Regulation (EU) 2015/868 of 26 May 2015 Amending Annexes II, III and V to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as Regards Maximum Residue Levels for 2,4,5-T, Barban, Binapacryl, Bromophos-Ethyl, Camphechlor (Toxaphene), Chlorbufam, Chloroxuron, Chlozolate, Dnoc, Di-Allate, Dinoseb, Dinoterb, Dioxathion, Ethylene Oxide, Fentin Acetate, Fentin Hydroxide, Flucycloxuron, Flucythrinate, Formothion, Mecarbam, Methacrifos, Monolinuron, Phenothrin, Protham, Pyrazophos, Quinalphos, Resmethrin, Tecnazene and Vinclozolin in or on Certain Products. *Off. J. Eur. Union L.* **2015**, 145, 1–71.
4. Regulation (EC) No 149/2008 of 29 January 2008 Amending Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council by Establishing Annexes II, III and IV Setting Maximum Residue Levels for Products covered by Annex I thereto. *Off. J. Eur. Union L.* **2008**, 58, 1–398.
5. EURL-SRM - Analytical Observation Report: Analysis of Ethylene Oxide and Its Metabolite 2-Chloroethanol by the QuOil or the QuEChERS Method and GC-MS/MS. December **2020**.

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタマコンタクトセンター

**0120-477-111**

[email\\_japan@agilent.com](mailto: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。

DE-000364

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, September 3, 2024

5994-7720JAJP