

# Einfacher, schneller, robuster...

## Analyse von EtO und 2-CE in Sesamsamen mit GCMS/MS

Ethylenoxid (EtO) wird aufgrund seiner hohen Diffusionsfähigkeit und seiner starken Penetrationseigenschaften in der Lebensmittelindustrie häufig eingesetzt. Diese Eigenschaften machen es äußerst effektiv bei der Entwesung und/oder Desinfektion von trockenen Lebensmitteln. EtO ist jedoch hochgefährlich für den Menschen, weshalb es unerlässlich ist, die Menge an EtO in Lebensmittelmatrizen zu quantifizieren. Die Tests der EtO- und 2-CE-Spurengehalte in Sesamsamen mit dem Shimadzu GCMS-TQ8050 NX, dem Flüssigautosampler AOC-20i und dem dynamischen Headspace-Sampler HS-20NX übertrafen die aktuellen regulatorischen Grenzwerte.

Ethylenoxid (EtO, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O) ist ein farbloser, brennbarer gasförmiger Ether mit leicht süßlichem Geruch. Aufgrund der sehr stark antibakteriellen Eigenschaften wird es häufig in der Lebensmittelindustrie eingesetzt. Die hohe Diffusionsfähigkeit und starken Penetrationseigenschaften machen es sehr effektiv bei der Desinfektion von trockenen Lebensmitteln und fast zehn Mal wirksamer als Methylbromid und Phosphin.

### Äußerst giftig und stark reguliert

EtO ist aber auch stark krebserregend, erbgutverändernd und genotoxisch für Lebewesen. Infolgedessen ist es stark reguliert. So stuft die Europäische Chemikalienagentur (ECHA) EtO in die Kategorie 1B ein und listet es in der Kategorie 3 (Gesundheitsgefährdung) hinsichtlich seiner akuten Toxizität. Das US-amerikanische National Institute of Health (NIH) klassifiziert EtO als „bekanntermaßen krebserregend beim Menschen, basierend auf ausreichenden Beweisen der Karzinogenität aus Studien am Menschen, einschließlich epidemiologischer Studien und Studien zu den Mechanismen der Karzinogenese“. Die US-amerikanische Environmental Protection Agency (EPA) ist ferner zu dem Schluss gelangt, dass EtO für den Menschen über den Atemweg krebserregend ist. Deshalb es unerlässlich, die EtO-Menge in Lebensmittelmatrizen genau zu quantifizieren.

### EtO-Begasung von Sesamsamen

Rohstoffe wie Gewürze, Ölsaaten und Nüsse sind besonders anfällig für die EtO-/2-CE-Nachbegasung und weisen einen hohen Lipidgehalt sowie einen geringen Wassergehalt auf. Ein Beispiel sind Sesamsamen, bei denen die EtO-Begasung (vor allem als Schutzmaßnahme in vielen Entwicklungsländern) eingesetzt wird, um die Kontamination mit Salmonellen und anderen Fäkalbakterien zu reduzieren.

Nach der Begasung mit EtO sind Verdampfung und Reaktionen mit Matrixbestandteilen die Hauptdissipationswege von EtO in Lebensmitteln. EtO durchläuft verschiedene Reaktionen innerhalb der Matrix und erzeugt eine Reihe von Reaktionsprodukten, darunter Ethylenglykol, Diethylenglykol, 1,4-Dioxan, 2-Bromethanol und Ethylenchlorhydrin (2-CE). EtO reagiert außerdem direkt mit Matrixkomponenten wie Aminosäuren, Purinen und Fettsäuren zu Hydroxyethyladdukten. 2-CE ist das wichtigste Reaktionsprodukt von EtO und ist selbst ein extrem gefährlicher Stoff. In der Matrix reagiert



Abb. 1: Sashimi von Thunfisch mit Sesamsamen. Letztere haben das Risiko, mit EtO- und 2-CE-Spurengehalten belastet zu sein.

MRM-Übergänge						
Analyte	MRM-1	CE	MRM-2	CE	MRM-3	CE
EtO	44 > 29	6	44 > 28	6	44 > 14	18
2-CE	80 > 31	6	80 > 44	5	82 > 31	6

Tabelle 1: MRM-Übergänge von EtO und 2-CE.

Methode 1 (flüssig)	EtO und 2-CE
Methode 2 (HS)	EtO und 2-CE
Methode 3 (HS)	Nur 2-CE
Methode 4 (HS)	Nur EtO

Tabelle 2: Analytische Bedingungen: Entwickelte Injektionsmethoden.

Systemkonfiguration			
GCMS-System	GCMS-TQ8050 NX		
Flüssigsampller	AOC-20i / AOC-20s		
Headspace-Sampller	HS-20 NX (dynamischer Headspace)		
Gaschromatographieparameter			
Kapillarsäule	RTX-VMS (60 m x 0,45 mm ID x 2,55 µm df)		
Injektionsmodus	Geteilt		
Flusskontrollmodus	Säulendurchfluss		
Trärgas	Helium		
Säulendurchfluss	3 ml/min		
Teilungsverhältnis	1 : 5 bei Flüssiginjektion		
Temp.-Programm	35 °C für 5 min, 20 °C/min bis 235 °C, 235 °C für 5 min		
MS-Parameter			
Ionisationsmodus	EI		
Temp. Ionenquelle	230 °C		
Temp. Interface	230 °C		
Modus	MRM		
Headspace-Parameter und Teilungsverhältnis			
	Methode 2	Methode 3	Methode 4
Ofentemperatur	115 °C	110 °C	115 °C
Temp. der Probenleitung	120 °C	120 °C	120 °C
Temp. der Transferleitung	130 °C	130 °C	130 °C
Temp. der Kühlfalle	-10 °C	-10 °C	-10 °C
Temp. der Desorbierungsfalle	280 °C	260 °C	280 °C
Ausgleichszeit (min)	15	15	15
Druckaufbauzeit (min)	0,5	0,5	0,5
Teilungsverhältnis	20	5	20
Gesamtdurchfluss (ml)	66	21	66

■ Tabelle 3: Analytische Bedingungen für HS-GCMS-/MS-System.

2-CE mit Fettsäuren zu 2-CE-Estern. EtO, 2-CE und die verschiedenen Reaktionsprodukte werden während der Belüftung nur in begrenztem Umfang entfernt und können als Marker für EtO-Begasungen dienen.

Natürlich erfordert die EtO-Begasung eine strenge Qualitätskontrolle. Eine Vernachlässigung kann zu Fällen wie der Entdeckung 2020 in Indien führen, wo der EtO-Wert noch über den regulierten Grenzwerten von behandeltem Sesam lag.

### Verbesserung der Analysemethoden

Da EtO so nützlich und doch so toxisch für den Menschen ist, muss unbedingt sichergestellt werden, dass sich die in Lebensmitteln hinterlassenen Spuren innerhalb sicherer Leitlinien für den menschlichen Verzehr bewegen. Traditionell wurden für Labortests auf Spuren von EtO und 2-CE zwei zeitaufwendige manuelle Extraktionsmethoden angewandt: A) die QuEChERS-Metho-

de (EN15662) und B) die QuOil-Methode (CEN/TS 17062:2019 modifiziert). Beide Methoden erfordern Extraktionsverfahren mit dem einzigen Unterschied in den verwendeten Materialien. Das Verfahren hängt von der Art der Probe ab, wobei die Effizienz der Extraktion von Probe zu Probe unterschiedlich sein kann.

### Das Experiment

Die mit diesen Methoden extrahierten Lösungen wurden mittels GCMS/MS oder GC-MS/MS mit einem Flüssigsampller analysiert. Einige Matrizen erfordern eine Optimierung der Reinigungsreagenzien, was sich variabel auf die Extraktionseffizienz auswirken kann. Zur Überwindung dieser Herausforderungen wurden drei verschiedene dynamische Headspace-Methoden mit einem GCMS-TQ8050 NX-System mit einem Headspace-Sampller HS-20NX entwickelt und optimiert (Abb. 2). Dies ermöglichte eine genauere Bestimmung der vorhandenen Analyten.

Zur Identifikation wurde eine Mischung aus EtO- und 2-CE-Standards (2 ppm) im Scanmodus analysiert. Es wurden Schritte wie die Vorläuferlonenauswahl und eine Optimierung des Multiple Reaction Monitoring (MRM) bei verschiedenen Kollisionsenergien (CE) durchgeführt. Dabei wurde ein Verfahren mit segmentiertem MRM und optimalen Kollisionsenergien geschaffen. Die optimierten MRM-Übergänge der EtO- und 2-CE-Standards sind in Tabelle 1 dargestellt.

### Analytische Bedingungen

Die Beschreibung der analytischen Bedingungen für die Flüssiginjektion und drei Headspace-Methoden sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 zusammengefasst.

### Methode der Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitungen für die vier Analysemethoden sind leicht unterschiedlich und umfassen bis zu sechs Schritte. Tabelle 4 zeigt die Schritte für die EtO- und 2-CE-Extraktion aus der Probe.

### Das Ergebnis

Die Quantifizierung von EtO- und 2-CE-Spurenverunreinigungen in Sesamsamen wurde mit dem Shimadzu GCMS-TQ8050 NX, dem Flüssigauto-sampller AOC-20i und dem (dynamischen) Headspace-Sampller HS-20NX erfolgreich durchgeführt. Die verwendete Extraktionsmethode führte bei beiden Analyten zu einer guten Rückgewinnungsrate von 73 bis 102 % mit einer RSD von 2 bis 9 %. Die tiefste mögliche Quantifizierungsgrenze (LOQ) hängt von der jeweiligen Probenvorbereitungsmethode ab, lag aber in jedem Fall im Bereich von 0,5 bis 10 ppb. Die für die Sesamproben berechneten quantitativen Werte sind in Tabelle 5 aufgeführt.

© Shimadzu

Methode	Flüssiginjektion 1 EtO und 2-CE	Headspace-Methode 2 EtO und 2-CE	Headspace-Methode 3 nur 2-CE	Headspace-Methode 4 nur EtO
1	5.000 mg Sesamsamen + 10.000 µL Acetonitril für 15 min gemischt	1.000 mg Sesamsamen + 1.000 µL Acetonitril für 15 min gemischt	100 mg Sesamsamen + 1.000 µL Acetonitril für 15 min gemischt	5.000 mg Sesamsamen + 5.000 µL Acetonitril für 15 min gemischt
2	Mit 5.000 U/min für 5 min bei 10 °C zentrifugieren			
3	5.000 µL Überstand in 15-ml-Röhrchen umgefüllt	100 µL Lösung entnommen, in 20-ml-HS-Fläschchen umgefüllt		1.000 µL Lösung entnommen, in 20-ml-HS-Fläschchen umgefüllt
4	QuEChERS hinzugeben und für 5 min vortexen		Nicht erforderlich	
5	Für 5 min bei 10 °C zentrifugieren		Nicht erforderlich	
6	Entfernter Überstand kann zur GCMS-Analyse verwendet werden			

Tabelle 4: Probenvorbereitung zur Extraktion von EtO und 2-CE aus Sesam.

Methode	Flüssigkeitsinjektion		Headspace-Injektion			
	Methode 1	Methode 2	Methode 2	Methode 3	Methode 4	
	EtO	2-CE	EtO	2-CE	2-CE	EtO
LOQ-Konzentration (auf Säule)	5 ppb	5 ppb	10 ppb	10 ppb	0,5 ppb	6 ppb
LOQ-Konzentration (in Bezug auf Probe)	10 ppb	10 ppb	10 ppb	10 ppb	5 ppb	6 ppb
%RSD (n = 6)	7,7	9,4	2,1	4,9	9,1	1,7
R2	0,99889	0,99917	0,99950	0,99785	0,99974	0,99906
Probenvorbereitungszeit	35–40 min		20–25 min			
Kosten	QuEChERS erforderlich		QuEChERS nicht erforderlich			

Tabelle 5: Zusammenfassung von Vergleichsdaten.

**Fazit**

Es konnte eine einfachere, schnellere, robustere (und damit kostengünstigere) Methode zur quantitativen Analyse von EtO und 2-CE in Sesamsamen entwickelt werden. Mit einem dynamischen Headspace-basierten Modus übertrafen die erzielten Ergebnisse aktuelle regulatorische Grenzwerte und boten Vorteile

gegenüber Flüssiginjektionstechniken, einschließlich einfacherer Probenvorbereitung, geringerer Matrixinterferenz und präziserer Quantifizierung. Darüber hinaus verfügt der Shimadzu GCMS-TQ8050 NX über einen neuen, hocheffizienten Detektor und überlegene Rauschunterdrückungstechnologie für eine höhere Empfindlichkeit und zur Quantifizierung von EtO

**Autor:**  
Waldemar Weber, Shimadzu Europa

**Kontakt:**  
Shimadzu Deutschland GmbH  
Duisburg  
Tel.: +49 203/76870  
info@shimadzu.de  
www.shimadzu.de



Abb. 2: GCMS-TQ8050 NX System.