

**Bestimmung von Vitamin E und Vitamin-E-Acetat
in E-Liquids mittels LC-MS/MS**

Methodenbeschreibung

BfR-VitEAc-Liquids-1.0/2020

INHALTSVERZEICHNIS

Bestimmung von Vitamin E und Vitamin-E-Acetat	1
in E-Liquids mittels LC-MS/MS	1
Methodenbeschreibung	1
BfR-VitEAc-Liquids-1.0/2020.....	1
1. Anwendungsbereich.....	3
2. Kurzbeschreibung	3
3. Chemikalien und Lösungen	3
3.1 Allgemein.....	3
3.2 Chemikalien.....	3
3.3 Lösungen.....	4
4. Geräte	5
4.1 Allgemein.....	5
5. Durchführung.....	6
5.1 Probenvorbereitung	6
6. LC-MS/MS	6
6.1 Chromatographische Trennung.....	6
6.2 MS-Bedingungen	6
6.3 Messung.....	7
7. Berechnungen	7
7.1 Kalibrierfunktion	7
7.2 Angabe der Ergebnisse	7
8. Anhang	9
8.1 LC-MS/MS Messung.....	9
8.2 Beispielchromatogramm	11

1. Anwendungsbereich

Vitamin E und Vitamin-E-Acetat sind mögliche Zusatzstoffe in E-Liquids für elektrische Zigaretten. In Deutschland ist der Zusatz von Vitaminen, damit auch von Vitamin E und Vitamin-E-Acetat, zu E-Liquids durch die Tabakerzeugnisverordnung verboten (TabakerzV, Anhang 2). Das Einhalten dieses Verbots ist insbesondere für Vitamin-E-Acetat relevant. Vitamin-E-Acetat steht mit dem Ausbruch an teils tödlich verlaufenden Lungenerkrankungen (e-cigarette, or vaping, product use-associated lung injury, EVALI) im Sommer 2019 in den USA im Zusammenhang. Dabei wurde Vitamin-E-Acetat in Lungenflüssigkeit von Patienten und Verdampferflüssigkeit in den meisten untersuchten Verdampferprodukten, in der Regel als Streckmittel in illegalen THC-Ölen, nachgewiesen (CDC, 2020).

Die Methode beschreibt die Bestimmung von Vitamin E und Vitamin-E-Acetat aus handelsüblichen E-Liquidproben im Spurenbereich. Die Nachweisgrenzen sind 0,8 pg pro mg E-Liquid für Vitamin E und 0,3 pg pro mg Liquid für Vitamin-E-Acetat.

2. Kurzbeschreibung

500 mg des E-Liquids werden in einen Messkolben eingewogen und nach Zugabe der internen Standards auf 5 mL mit Methanol aufgefüllt. Nachdem sich die Probe vollständig im Methanol gelöst hat, ist die Lösung messbereit.

Zur chromatographischen Trennung wird eine RP-LC-Säule mit einem binären Gradienten verwendet. Die Analyten werden mittels Triple Stage Quadrupole Massenspektrometrie detektiert. Die Konzentration von Vitamin E und Vitamin-E-Acetat wird über eine Matrix-Standardreihe bestimmt.

3. Chemikalien und Lösungen

3.1 Allgemein

Hinweis: Die in dieser Methode vorgesehenen Arbeiten mit gesundheitsschädlichen Chemikalien sind unter geeigneten Vorsichts- und Schutzmaßnahmen, wie Vermeidung des Hautkontaktes und Benutzung des Abzuges, durchzuführen.

Soweit nicht anders angegeben, sind analysenreine Chemikalien und für die LC-MS/MS geeignete Lösungsmittel zu verwenden. Das verwendete Wasser soll Reinstwasserqualität haben.

3.2 Chemikalien

- 3.2.1 Vitamin E (VitE), z.B. 1 mg/ml, Reinheit 96,9 % von Supelco (Bellafonte, PA, USA)
- 3.2.2 Vitamin-E-Acetat (VitEAc), z.B. 1 mg/mL \pm 5 μ g/ml in Methanol von Cerilliant (Round Rock, TX, USA)
- 3.2.3 Vitamin E-d₆ (VitE-d₆), z.B. 500 μ g/mL \pm 2,8 μ g/ml in Methanol von Cerilliant (Round Rock, TX, USA)
- 3.2.4 Vitamin-E-Acetat-d₉ (VitEAc-d₉), z.B. 1mg/mL, Reinheit \geq 99 % in Methanol von Iris Biotech (Marktredwitz, Deutschland)
- 3.2.5 Liquidmatrix (50:50 PG/VG), z.B. aus dem E-Zigaretten-Fachhandel
- 3.2.6 Ameisensäure 98 – 100%, z.B. Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
- 3.2.7 Methanol (MeOH), LC-MS Qualität, z.B. Merck LiChrosolv® (Darmstadt, Deutschland)

3.2.8 Ammoniumacetat, LC-MS Qualität, z.B. Fluka (Morris Plains, NJ, USA)

3.3 Lösungen

3.3.1 Eluenten für die Chromatographie:

- Eluent A:

385 mg Ammoniumacetat (3.2.8) werden in 1 L Wasser gelöst und 1 ml Ameisensäure zugegeben (3.2.5).

- Eluent B:

385 mg Ammoniumacetat (3.2.8) werden in Methanol (3.2.7) gelöst und 1 ml Ameisensäure zugegeben (3.2.5).

3.3.2 Interne Standardlösung

- Stammlösung (10 µg/ml):

In einen 10 ml Messkolben werden ca. 4,5 ml Methanol (3.2.7) vorgelegt. In diesen Messkolben werden mittels Kolbenhubpipette (100 µl) 50 µl der Vitamin-E-Acetat-d₉ Standardlösung (3.2.4) gegeben. Anschließend wird mittels Pasteurpipette auf Eichmarke aufgefüllt. Daraus ergibt sich eine Vitamin-E-acetat-d₉ Stammlösung von 10 µg/ml.

- Interner Standard-Mix (ISTD-Mix)

Zur Herstellung des internen Standardmixes werden in einen 10 ml Messkolben 9 ml Methanol (3.2.7) vorgelegt. Es werden mittels Kolbenhubpipette 500 µl der Vitamin E-acetat-d₉ Stammlösung hinzugefügt. Anschließend werden mittels Kolbenhubpipette 15 µl von der Vitamin E-d₆ Standardlösung (3.2.3) gegeben. Der Messkolben wird mittels Pasteurpipette bis zur Eichmarke mit Methanol (3.2.7) aufgefüllt. Daraus ergibt sich der interne Standardmix, der zu allen zu analysierenden Lösungen hinzugegeben wird.

3.3.3 Standardlösung zur Kalibration

- Stammlösungen (10 µg/ml):

In einen 5 ml Messkolben werden ca. 4,5 ml Methanol (3.2.7) vorgelegt. In diesen Messkolben werden mittels Kolbenhubpipette 50 µl der Vitamin-E-Acetat Standardlösung (3.2.2) gegeben. Anschließend wird mittels Pasteurpipette auf Eichmarke mit Methanol (3.2.7) aufgefüllt. Daraus ergibt sich eine Vitamin-E-Acetat Stammlösung von 10 µg/ml.

In einen weiteren 5 ml Messkolben werden ca. 4,5 ml Methanol (3.2.7) vorgelegt. In diesen Messkolben werden mittels Kolbenhubpipette (100 µl) 50 µl der Vitamin E Standardlösung (3.2.1) gegeben. Anschließend wird mittels Pasteurpipette auf Eichmarke mit Methanol (3.2.7) aufgefüllt. Daraus ergibt sich eine Vitamin-E Stammlösung von 10 µg/ml.

- Standard-Mix 500 ng/ml

Für den Standard-Mix werden 250 µL der Vitamin E Stammlösung und 250 µL der Vitamin-E-Acetat Stammlösung in einen 5 mL Messkolben pipettiert und mit Methanol

(3.2.7) bis zur Messmarke aufgefüllt, sodass man eine Konzentration von 500 ng/ml von beiden Analyten erhält.

- Herstellung der Kalibrierstandards mit Matrix (Kal)

Um Matrixeffekte zu kompensieren, werden Kalibrierstandards mit Zugabe der zur Probe äquivalenten Menge an analytfreier Liquid-Matrix (3.2.5) hergestellt. 500 mg Liquid-Matrix (3.2.5) werden mit einer Glaspasteurpipette in einen 5 mL Messkolben eingewogen. Bevor bis zur Messmarke mit Methanol (3.2.7) aufgefüllt wird, werden 100 µL ISTD-Mix und Standard-Mix wie in Tabelle 1 beschrieben zupipettiert.

Tabelle 1: Schema zur Herstellung der Kalibrierstandards

	Konzentration des Kalibrierstandards [ng/ml]	Volumen aus Standard-Mix [µl]
Kal_1	1,0	10
Kal_2	2,0	20
Kal_3	3,0	30
Kal_4	4,0	40
Kal_5	5,0	50
Kal_6	10,0	100
Kal_7	15,0	150
Kal_8	20,0	200
Kal_9	30,0	300
Kal_10	50,0	500

4. Geräte

4.1 Allgemein

Neben der normalen Laborausüstung werden folgende Geräte verwendet:

- 4.1.1 **diverse Kolbenhubpipetten**, z.B. von Eppendorf (Wessling-Berzdorf, Deutschland)
- 4.1.2 **Analysenwaage**, Genauigkeit: $\pm 0,1$ mg
- 4.1.3 **Reagensglasschüttler**, Vortexmischer, z.B. von Neolab Migge GmbH (Heidelberg, Deutschland)
- 4.1.4 **Glaspasteurpipetten**
- 4.1.5 **Messkolben aus Glas**, 5 ml
- 4.1.6 **LC-Probenvials** aus Braunglas, 2 ml
- 4.1.7 **LC-Säule**, z.B. von Thermo, Hypersil C18, 50 x 2,1 mm, 2,4 µm (Dreieich, Deutschland)
- 4.1.8 **LC-MS/MS-System**, z.B. von Shimadzu (Duisburg, Deutschland) und AB Sciex (Darmstadt, Deutschland)

5. Durchführung

5.1 Probenvorbereitung

500 mg Probe werden in einen 5 mL Messkolben eingewogen. Dieser wird nach Zugabe von 100 µL ISTD-Mix mit Methanol (3.2.7) bis zur Messmarke aufgefüllt. Wenn sich die Probe komplett gemischt hat, werden die Lösungen in LC-Probenvials überführt und in den Autosampler der LC platziert.

6. LC-MS/MS

6.1 Chromatographische Trennung

Die Analysen können grundsätzlich mit verschiedenen Flüssigchromatographiesystemen (LC) und Trennsäulen durchgeführt werden. Die chromatographischen Bedingungen können frei gewählt werden. Als akzeptables Kriterium für die Retentionszeit wird mindestens die doppelte Retentionszeit für das Totvolumen der Säule vorgeschlagen. Die im Anhang (8.1) aufgeführten Bedingungen unter Verwendung einer C18-Säule (4.1.7) und den unter (3.3.1) angegebenen Fließmitteln haben sich während der in-house Validierung als geeignet erwiesen, sind jedoch nur als Beispiel zu verstehen.

6.2 MS-Bedingungen

Die Analysen können mit MS/MS-Geräten verschiedener Hersteller durchgeführt werden. Im Anhang (8.1) sind beispielhaft die gerätespezifischen Bedingungen eines Messsystems aufgeführt, die sich während der in-house Validierung als geeignet erwiesen haben.

Hinweis: Für den qualitativen Nachweis sowie für die Quantifizierung ist es erforderlich, das pro Analyt mindestens zwei substanzspezifische Massenübergänge detektiert werden. Das Verhältnis aus beiden Massenübergängen soll über alle Messungen hinweg gleich bleiben.

6.3 Messung

Am Anfang und am Ende der Sequenz sollen jeweils die Kalibrierlösungen aufsteigend injiziert werden. Nach ungefähr 25 Proben sollen die Kalibrierlösungen erneut injiziert werden. Nach jeder Probe soll ein Blindwert und nach dem höchsten Kalibrierstandard (50 ng/mL) soll der Blindwert zweimal injiziert werden.

7. Berechnungen

Die quantitative Bestimmung erfolgt mittels der Kalibrierreihe mit Matrix. Die Berechnung erfolgt durch Einsetzen der Verhältnisse aus Peakflächen der Analyten zu Peakflächen des internen Standards in die Kalibrierfunktion. Dabei ist die Peakfläche von Vitamin E auf die Peakfläche von Vitamin E-d₆ und die Peakfläche von Vitamin-E-Acetat auf die Peakfläche von Vitamin-E-Acetat-d₉ zu beziehen.

7.1 Kalibrierfunktion

Gleichung 1: Kalibrierfunktion

$$f(x) = y = ax + b$$

Legende:

y	Verhältnis aus Peakflächen des Zielanalyten und des jeweiligen internen Standards
a	Steigung der Kalibrierfunktion
x	Konzentration des Zielanalyten [ng/ml] = β (Massenkonzentration)
b	Achsenabschnitt der Kalibrierfunktion

Gleichung 2: Berechnung des Gehaltes an Vitamin E bzw. Vitamin-E-Acetat in der Probe

$$\text{Gehalt} = \beta \times DF = \left[(y - b) \times \frac{1}{a} \right] \times \frac{V_{\text{Diluent}}}{m_{\text{Einwaage}}} = \beta \times 0,01$$

Legende:

β	Massenkonzentration in der Messlösung [ng/ml]
DF	Umrechnungsfaktor von ng/ml auf ng/mg
y	Peakfläche des Zielanalyten
b	Achsenabschnitt aus Matrixkalibrierung
a	Steigung aus Matrixkalibrierung
V_{Diluent}	Volumen des Diluents (Methanol (3.2.7)) [ml]
m_{Einwaage}	Masse der eingewogenen Probe [mg]

7.2 Angabe der Ergebnisse

Die Angabe der Ergebnisse erfolgt in ng/mg mit drei signifikanten Stellen. Zur Umrechnung der Konzentration in der Messlösung in ng/ml in die Konzentration im E-Liquid in ng/mg liegt bei Einhaltung des unter Kapitel 5 beschriebenen Probenaufbereitungsverfahrens der Faktor bei 0,01.

Referenzen

- CDC (2020), US Centers for Disease Control and Prevention, Outbreak of Lung Injury Associated with Use of E-cigarette, or Vaping, Products, https://www.cdc.gov/tobacco/basic_information/e-cigarettes/severe-lung-disease.html [Zugriff: 16.09.2020]
- DIN ISO 32645. (1994) Chemical Analysis; Decision limit, Detection limit and determination limit, Estimation in case of repeatability, terms, methods, evaluation. Deutsches Institut für Normung DIN.

8. Anhang

8.1 LC-MS/MS Messung

LC-MS/MS System bestehend aus

Steuersoftware (z.B. Analyst 1.7, AB Sciex)

Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (z.B. API 4000 Qtrap, AB Sciex)

LC-Anlage (z.B. Prominence Serie, Shimadzu)

LC-Pumpe (z.B. LC-20AD, Shimadzu)

Degasser (z.B. DGU-20As, Shimadzu)

Autosampler (z. B. SIL-20AC HT, Shimadzu)

Säulenofen (z. B. CTO-20AC, Shimadzu)

Bus-Schnittstelle (z.B. CBM-20A)

LC-Einstellungen

Eluent A	siehe 3.3.1
Eluent B	siehe 3.3.1
Temperatur Säule	40°C
Flussrate	300 µl/min
Injektionsvolumen	10 µL
Temperatur Autosample	15°C
Säule	z. B. Hypersil C18, 50 x 2,1 mm, 2,4 µm (Thermo Scientific, Part No.28102-052130)
Gesamtlaufzeit	10 Minuten

Gradient

Zeit [min]	% A	% B
0,0	20	80
1,0	1	99
5,0	1	99
5,5	20	80
10,0	20	80

MS/MS-Geräteeinstellungen

Ionisation	Elektrospray positiv mode (ESI +)
Ion Spray Voltage (IS)	5500 V
Temperature (TEM)	350°C
Curtain Gas (CUR)	Stickstoff, 18 psi
Collision Gas (CAD)	Medium
Ion Source Gas 1 (GS1)	Stickstoff, 55 psi
Ion Source Gas 2 (GS2)	Stickstoff, 50 psi
Interface Heater (ihe)	On
Entrance Potential (EP)	10 V

Substanzspezifische Parameter

Die Analyten werden durch Multiple Reaction Monitoring (MRM) Analysemodus detektiert. Zur Identifikation wurden drei spezifische Übergänge auf Tochterionen gewählt. Die entsprechenden Massenübergänge und die Kollisionsenergie (CE), Declustering Potential (DP) und das Collision Cell Exit Potential (CXP) sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Substanzspezifische Parameter der LC-MS/MS-Methode

Analyt	Q1 Masse [Da]	Q3 Masse [Da]	Dwell Time [ms]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
Vitamin-E-Acetat (NH ₄ -Addukt) Quantifier	490,4	207,0	70	51	31	0
Vitamin-E-Acetat	473,4	207,3	70	111	25	12
Vitamin-E-Acetat	473,4	164,9	70	111	53	8
Vitamin-E-Acetat Quantifier	431,4	165,2	70	76	27	10
Vitamin E	431,4	69,0	70	76	57	12
Vitamin E	431,4	137,0	70	76	59	24
Vitamin-E-Acetat-d ₉ (NH ₄ -Addukt) Quantifier	499,5	482,5	70	76	19	14
Vitamin-E-Acetat-d ₉ (NH ₄ -Addukt)	499,5	216,2	70	76	33	14
Vitamin-E-Acetat-d ₉ (NH ₄ -Addukt)	499,5	174,2	70	76	61	10
Vitamin E-d ₆ Quantifier	437,4	171,2	70	87	29	10
Vitamin E-d ₆	437,4	69,1	70	87	57	12
Vitamin E-d ₆	437,4	143,2	70	87	61	8

Tabelle 3: Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ) bezogen auf das E-Liquid, bestimmt in einer in-house Validierung mit der beschriebenen Methode nach DIN EN ISO 32645

Analyt	LOD [pg/mg]	LOQ [pg/mg]
Vitamin E	0,8	2,7
Vitamin-E-Acetat	0,3	1,0

8.2 Beispielchromatogramm

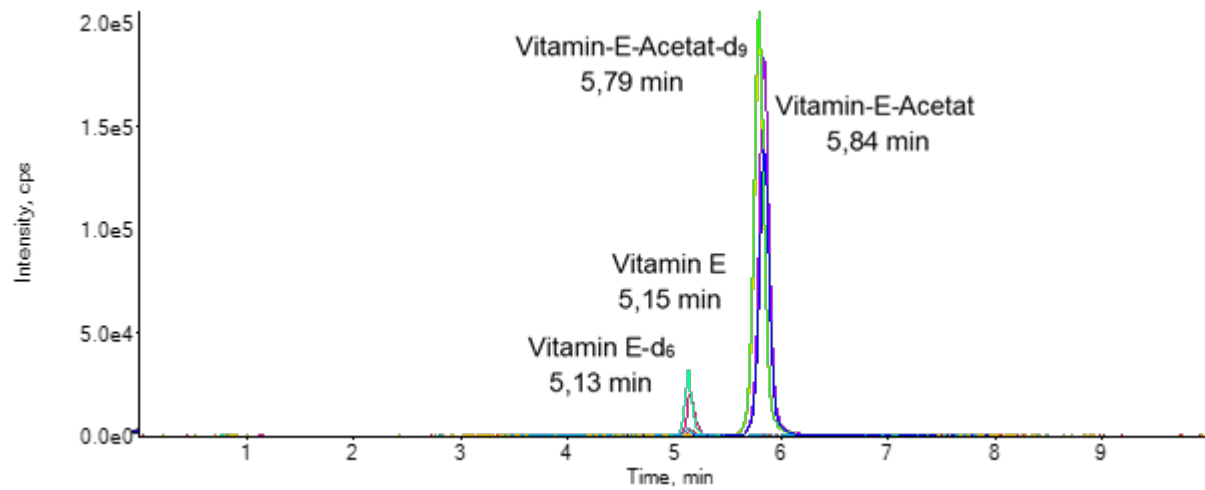


Abbildung 1: Chromatogramm eines Matrixstandards [c = 10 ng/ml], MRM