

Technical Report

高速スキャン四重極型質量分析計を接続した包括的2D GCによるティーツリー精油の分析

Comprehensive 2D GC with Rapid-Scanning Quadrupole Mass Spectrometry for the Analysis of Tea Tree Essential Oil

Simona Salivo¹, Peter Q. Tranchida¹, Paola Dugo^{1,2}, Luigi Mondello^{1,2}

Abstract:

本研究の目的は、包括的2次元ガスクロマトグラフィー (GC×GC) と質量分析計を組み合わせ、新しいティーツリー精油と酸化した古い精油 (1984年頃) の化学プロファイルの定性解析を行うことである。使用した高速スキャン四重極型MSシステムは、GC×GCの高速ピークに対しても十分な数のスペクトルを取得でき (20/s)、信頼性の高い同定が可能だった。新ティーツリー精油は、比較的、アレルギーを生じにくいことが明らかになったが、一方、古い精油で (長期保存中に) 生成された酸化生成物はアレルゲン物質と考えられているものであった。

Keywords: 包括的2Dガスクロマトグラフィー、ティーツリー精油、質量分析

1. はじめに

商業ベースのティーツリー精油 (TTO) は、オーストラリア産のティーツリー (*Melaleuca alternifolia*, フトモ科) の葉を水蒸気蒸留して生産されている。ティーツリー精油の組成は大きく見ると約50%がモノテルペン炭化水素で、残りの約50%の含酸素モノテルペンだが、これは、気候や蒸留時の条件、葉の鮮度などに応じて大きく変動する。TTOには、化粧品の成分、感染症の治療薬、あるいは防腐剤などさまざまな用途がある。蒸留されたばかりの新鮮なTTOは比較的反アレルギー性の低いものであるが、長期に保存している間に酸化生成物が作られ、これがアレルゲンになる可能性が指摘されている。このため、2008年、欧州の消費者製品科学委員会 (SCCP) はティーツリー油に関する意見書を公表した。

TTOの組成は酸素の影響を大きく受ける。実際、 α -テルピネン、 γ -テルピネン、およびテルピノレンの量は減少するのに対し、 p -シメンは大きく増加することがある。また、酸化生成物としてよく知られているアスカリドールや1,2,4-トリヒドロキシメンタンの2つはアレルゲンの可能性がある。

SCCPのティーツリー油の見解書では、分解生成物の測定と同定は難しいと結論付け、また12か月間の実際使用時における安定性保証試験においても、1,2,4-トリヒドロキシメンタンは検出可能なレベルでは存在しなかったと報告されている。

GC-MSは非常に有用なツールであるが、ピーク検出ができるかどうかは、試料の複雑さが関係してくる。実際、化合物数が100を超える精油を完全に分離させるのは困難な作業で、多くの微量物質が検出できないことがある。こうした問題に対処できるのが包括的2次元GC (GC×GC) である。

2. 実験

2-1. 試薬および材料

GC×GC-quadMS分析に先だって、TTOはエタノールで希釈した (1:10, v/v)。

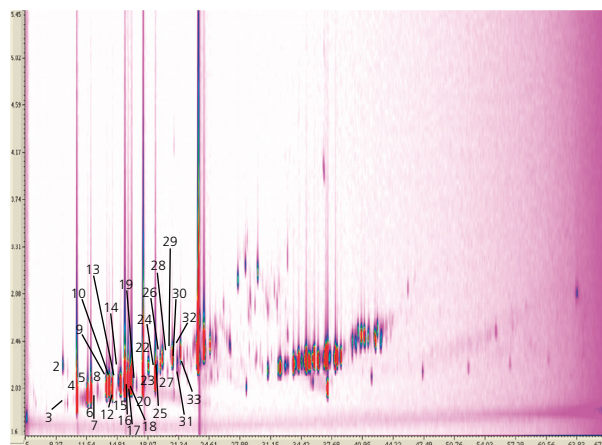


Fig. 1 新ティーツリー油のGC×GC-quadMSクロマトグラム (ピーク同定結果についてはTable 1を参照)

2-2. 装置構成およびカラム

- AOC-20i スプリット-スプリットレスオートインジェクタ
- GC-2010 ガスクロマトグラフ (GC2)
- Zoex 社製 2 段階ループ型低温モジュレータ
- GCMS-QP2010 Ultra
- 1D カラム: SLB-5ms 30 m × 0.25 mm I.D. × 0.25 μm *d*_f カラム
[Silphenylene Polymer、極性的には poly (5 % diphenyl / 95 % methylsiloxane) と同等]
(Supelco、ミラノ、イタリア)
- 2D カラム: Supelcowax-10 1 m × 0.1 mm I.D. × 0.1 μm *d*_f
[100 % ポリ (エチレングリコール)]

2-3. クロマトグラフ法

GC×GC–quadMS 分析

GC1 オープン	: 50 °C → (3 °C/min) → 280 °C
GC2 オープン	: 80 °C → (3 °C/min) → 280 °C (10 min)
キャリアガス	: ヘリウム
注入口圧力	: 133 kPa (定線速度モード)
注入口モード	: スプリット (1:100)、1 μL
モジュレーション周期	: 6 秒

GC×GC–quadMS 分析

GC オープン	: 50 °C → (3 °C/min) → 280 °C
キャリアガス	: ヘリウム
注入口圧力	: 37.1 kPa
線速度	: 37.4 cm/s
注入口モード	: スプリット (1:50)、1 μL

2-4. ソフトウェア

- GCMSsolution version 4.0

2-5. 2D ソフトウェア

- ChromSquare version 2.0

2-6. 検出

GC×GC–quadMS 分析

MS イオン化法	: EI
スキャン速度	: 10,000 u/s
質量範囲	: 40–400 <i>m/z</i>
収集速度	: 20 Hz
イオン源温度	: 250 °C
インターフェース温度	: 280 °C

GC×GC–quadMS 分析

スキャン速度	: 1,666 u/s
質量範囲	: 40–400 <i>m/z</i>
収集速度	: 4 Hz

3. 結果および考察

GC×GC–quadMS 法は、新ティーツリー精油と古ティーツリー精油の定性的比較を目的として開発された。ラップアラウンドを減らすために、GC2 のオープン温度は、GC1 のより 30 °C 高く設定した。使用したインレット圧力により生じる第 1 および第 2 次元の線速度は、それぞれ約 10.4 および 114 cm/s で、使用した MS サンプルリング周波数 (20 Hz) で、各ピークに対し、同定に必要な十分な数のスペクトルが得られた。また、1D ピークについては最低 2 ~ 3 回のモジュレーションが行えた。

新 TTO 試料に対する GC×GC–quadMS クロマトグラムを Fig. 1 に示す。2D クロマトグラムの先頭部分 (1 ~ 33 の化合物で定義される) は単純なパターンを示したが、その一方、中央部分は複雑であった。中央部の拡大図を Fig. 2 に示す。

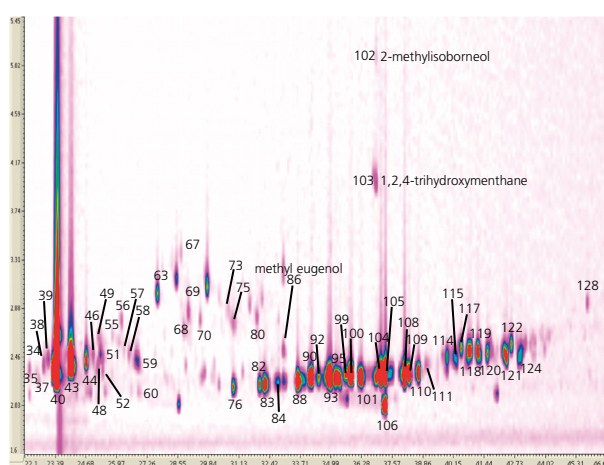


Fig. 2 新ティーツリー油の GC×GC–quadMS クロマトグラムの拡大図 (ピーク同定結果については Table 1 を参照)

全体で、マススペクトルのライブラリ検索により 90 成分が同定された (データベースのスペクトル類似度が 80 % 未満のものは除外) (Table 1)。まず、GC–MS ソフトウェア付属の自動ライブラリ検索フィルター機能を利用して、類似度が 90 % (実験スペクトルと対比) を下回る結果を除外し、61 ピークが得られた。残り 29 成分 (ピーク 102 を除く) は、ライブラリで類似度 80 ~ 89 % で同定された。従来の GC–MS 測定では、前述の MS フィルターにより 61 の TTO 成分が同定された (Table 1)。

こうした GC×GC–quadMS 法を用いることで、多数の酸化生成物が特定できた。1,2,4-トリヒドロキシメンタン (ピーク 103) は従来の GC–quadMS 分析では同定できなかった化合物である。その理由は、i) この化合物は存在していたと思われるが、GC–quadMS 分析法の LOD を下回る量であった [GC×GC–quadMS 分析でも、S/N 比 (最大モジュレーションのピークを考慮して計測) は 7 程度しかなかった]、ii) 近接して溶出したオーバーラップ成分に隠されていたと思われる。

ピーク 102 (2-メチルイソボルネオール) は、S/N 比が小さく、ライブラリの類似度も比較的小さかった (77 %)。この成分の同定は、古 TTO で強いピークとして現れていたため、2D での保持位置を比較することで確認できた。メチルオイゲノール (ピーク 86) は、TTO 中には少量しか存在していないが、発がん性が疑われている成分である。GC–quadMS の測定では 88 % のスペクトル類似度で同定されたが、GC×GC–quadMS では信号強度が約 4 倍となり、大幅な改善が得られている。

古TTO試料のGC×GC–quadMSクロマトグラムの拡大図をFig. 3に示す。全体で108成分が同定された (Table 1)。

先頭部分の定性的なプロファイルは新TTO試料のプロファイルと非常に似ていたが、 α -テルピネン (ピーク15)、 γ -テルピネン (ピーク20)、およびテルピノレン (ピーク23) の相対存在量は大幅に減少している。その代わりに、古TTOでは p -シメン (ピーク16) が、ほぼ2倍になっている。この結果は、TTO中のモノテルペン炭化水素の分布は、 O_2 、高温、および光のある環境下で劇的に変化するという事実とよく一致している。 p -シメンはTTOの酸化の程度を示す指標として用いられることが多く、また1,2,4-トリヒドロキシメンタンは p -シメンの量と比例して増加することが示されている。テルピネン-4-オール (ピーク40) は、TTOの主要成分だが、古精油中にも多く存在している。また、両方の試料においてメチルオイゲノールに対してよく似たピーク面積が確認された。さらに1,2,4-トリヒドロキシメンタンの量は、古TTOで顕著に高くなっていた。その他の酸化生成物である $trans$ -アスカリドールグリコール (ピーク63) は、古精油でより多く存在していた。ピーク65 (cis -アスカリドールグリコール) も両方の試料で存在していたが、信頼性のある同定ができたのは古試料の方だけであった。最後に、アスカリドールエポキシド (ピーク55) はどちらの試料でも少ししか存在していなかったが、ライブラリとの良好なマッチングで同定された。

4. まとめ

このテクニカルレポートに報告した結果は、GC×GCと高速スキャンquadMSとを組み合わせることで、複雑な成分を持つ試料の定性分析が可能であることを示している。GC×GC–quadMS法は、TTO試料の高分解での分離および区別が可能であることを示した。さらに、この方法の持つ高い感度 (5～10倍程度) により、

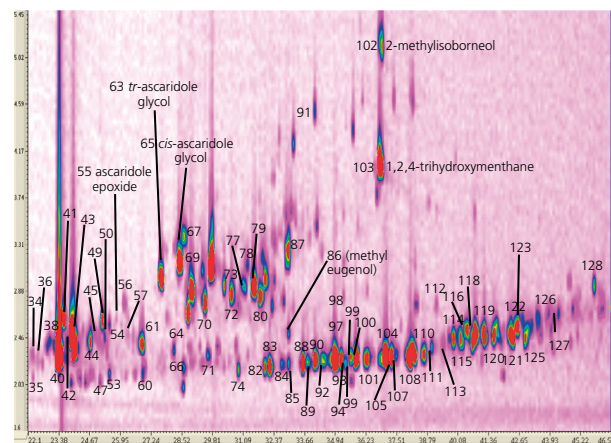


Fig. 3 古ティーツリー精油のGC×GC–quadMSクロマトグラムの拡大図 (ピーク同定結果についてはTable 1を参照)

多くの微量成分の検出が可能になっている。

新TTO試料および長期保存の古TTO試料で、アレルギー抗原となる可能性のある多数の物質が同定された。特に、GC–quadMSでは、これらの成分が検出できなかったことから、これまで存在していないとしていた報告が誤っている可能性も考えられる。

Table 1 ティーツリー油の試料で同定された化合物 MS% = スペクトル類似度 (カッコ内の値はGC–quadMSでの結果)

ピーク番号／化合物	新TTOのMS%	古TTOのMS%	ピーク番号／化合物	新TTOのMS%	古TTOのMS%
1. 6-methyl-3,5-heptadien-2-one	—	86	20. γ -terpinene	94 (89)	96 (95)
2. cis -3-hexen-1-ol	98 (94)	96 (95)	21. 1,2-diacetyltethane	—	88
3. 3-methyloctane	94	—	22. $trans$ -sabinene hydrate	93 (93)	92 (94)
4. nonane	85	98 (89)	23. terpinolene	96 (96)	98 (96)
5. α -thujene	98 (99)	96 (99)	24. p -cymene	96 (95)	82 (81)
6. α -pinene	95 (97)	97 (98)	25. linalool	98 (98)	98 (97)
7. camphene	90 (97)	94 (97)	26. cis -sabinene hydrate	92 (96)	90 (94)
8. sabinene	97 (97)	91 (98)	27. verbenene	81	—
9. β -pinene	96 (97)	97 (97)	28. fenchyl alcohol	95 (97)	90 (97)
10. myrcene	98 (97)	97 (96)	29. cis - p -menth-2-ene-1-ol	95 (98)	96 (98)
11. 2,3,6-trimethyl-1,5-heptadiene	—	93	30. 1-terpineol	92 (96)	95 (98)
12. 2-undecene	81	—	31. 1,3-cyclohexadiene	90	—
13. cis -3-hexenyl acetate	98 (93)	96 (91)	32. $trans$ - p -menth-2-ene-1-ol	96 (95)	90 (94)
14. α -phellandrene	98 (97)	97 (97)	33. cis -limonene oxide	84 (83)	81
15. α -terpinene	92 (96)	97 (97)	34. camphene hydrate	92 (95)	81 (81)
16. p -cymene	94 (98)	94 (81)	35. cis -pinene hydrate	80	80
17. limonene	98 (95)	98 (97)	36. carvone oxide	—	80
18. 1,8-cineole	97 (92)	98 (92)	37. cis -8-hydroxylinalool	83	—
19. $trans$ - β -ocimene	95 (98)	92 (96)	38. γ -terpineol	93 (94)	95 (93)

39. borneol	89 (89)	—	85. longicyclone	—	87
40. terpinene-4-ol	90 (91)	94 (97)	86. methyl eugenol	94 (88)	92
41. <i>p</i> -cymen-8-ol	—	96 (94)	87. isocaulalol	—	81
42. cryptone	—	86	88. α -gurjunene	96 (96)	96 (96)
43. α -terpineol	96 (97)	98 (97)	89. γ -maaliene	—	91 (90)
44. <i>trans</i> -piperitol	95 (92)	94 (94)	90. β -caryophyllene	97 (97)	97 (97)
45. dehydrosesquicineole	—	80	91. carvone hydrate	—	82
46. 1- <i>p</i> -Menthene-9-al	83	—	92. aromadendrene	93 (92)	92 (97)
47. 3,6-dimethyl-1,5-heptadiene	—	87	93. 9-epi-(E)-caryophyllene	91 (98)	91 (97)
48. santene	83	—	94. selina-5,11-diene	—	90 (92)
49. 4,6-dimethyl-2-octanone	80	83	95. germacrene D	90 (91)	—
50. dehydrolinalool	—	85	96. hydroxy citronellal	—	80
51. <i>trans</i> -geraniol	85 (90)	—	97. 6,7-epoxide citral	—	81
52. isoascaridole	88 (88)	—	98. valerena-4,7(11)-diene	—	91 (89)
53. 3-methyl-3-cyclohexen-1-ol	—	83	99. α -humulene	96 (97)	96 (96)
54. 6-methyl-5-hepten-2-one	—	86	100. allo-aromadendrene	97 (90)	97 (96)
55. limonene epoxide	84	80	101. γ -gurjunene	87	93 (87)
56. ascaridole epoxide	90	92	102. 2-methylisoborneol	77	85
57. β -sanatolol	81	80	103. 1,2,4-trihydroxymenthane	90	93 (93)
58. nerol	90 (86)	—	104. viridiflorene	97 (96)	97 (94)
59. piperitone	88 (92)	—	105. bicyclogermacrene	96 (97)	92 (89)
60. apo vertenex	80	—	106. bicycloelemene	95	—
61. carvenone	—	93 (95)	107. β -vetispiene	—	84
62. <i>trans,trans</i> -2,4-dodecadial	—	85	108. γ -cadinene	95 (94)	97 (91)
63. <i>trans</i> -ascaridole glycol	90 (91)	91 (91)	109. zonarene	93 (91)	—
64. 5-hydroxy-isobornyl isobutanoate	—	82	110. <i>trans</i> -cadin-1(2),4-diene	97 (95)	92 (95)
65. <i>cis</i> -ascaridole glycol	—	90	111. α -calacorene	92 (97)	96 (99)
66. iso-thujyl acetate	—	85	112. 1(2H)-naphthalenone, 5-ethyl-3,4-dihydro-	—	80
67. carvacrol	85 (86)	96	113. caryophyllene oxide	—	80
68. 2,5-dimethyl-2,4-hexadiene	81	—	114. viridiflorol	93 (93)	92 (95)
69. 1,3-dioxolane, 2,2-dimethyl-4,5-di-1-propenyl-	84	85	115. palustrol	92	90
70. <i>cis</i> -linalool oxide	82	83	116. ledol	—	90 (91)
71. laciniata furanone E	—	80	117. isospathulenol	95 (96)	—
72. <i>p</i> -menth-6-en-2,3-diol	—	82	118. globulol	96 (92)	96 (93)
73. <i>cis</i> -piperitol	80 (81)	82	119. pogostol	86	88
74. β -cubebene	—	94 (98)	120. rosifolol	83	84 (83)
75. diepoxide allocimene	84	—	121. 1-epi-cubenol	95 (97)	86 (85)
76. α -cubebene	94 (98)	—	122. spathulenol	90	93
77. menthone	—	80	123. bicyclo[7.2.0]undecan-3-ol <11,11-dimethyl-, 4,8-bis(methylene)->	—	86
78. dihydro-linalool acetate	—	82			
79. 4-methyl-dec-3-en-5-ol	80	82	124. cubenol	94 (97)	—
80. 1,4-cineole	80	83	125. torreyol	—	92
81. α -methylenedodecanal	—	80	126. hydroxycaryophyllene	—	90
82. isodene	93 (99)	93 (98)	127. cedrol	—	80 (82)
83. α -copaene	94 (94)	94 (93)	128. 8- α -acetoxylemol	83	82
84. β -elemene	95 (94)	93 (96)	129. flourensadiol	—	80