

Technical Report

オフラインLC-GC×GC-MS: 精油の精密分析への強力な手法

Off-line LC-GC×GC-MS: A Powerful Approach for Highly Detailed Analysis of Essential Oils

Mariosimone Zoccali¹, Peter Q. Tranchida¹, Paola Dugo^{1,2}, Luigi Mondello^{1,2}

Abstract:

本レポートでは、高速液体クロマトグラフィーと包括的2次元ガスクロマトグラフィー–四重極型質量分析 (GC×GC–quadMS) をオフラインで組み合わせ、オレンジ精油の精密な定性分析を行ったので報告する。具体的にはシリカカラムを用い、精油成分を炭化水素と含酸素化合物の2つのグループに分離させた後、HPLC画分の容積を減らしてから、クライオモジュレーションを施したGC×GC–quadMSで分析を行った。

Keywords: 包括的2次元ガスクロマトグラフィー、四重極型質量分析、LC–GC

1. はじめに

精油は、直接蒸留、水蒸気蒸留もしくは乾留、または室温での機械的処理（コールドプレス式の柑橘油など）を用いて製造される。精油は、揮発物質を主成分とする混合物であり、経済的にも極めて重要で、食品、化粧品、タバコをはじめ、医薬品、防虫剤、香料など一連の工業製品に利用されている。一般に精油の揮発性画分は、モノ-およびセスキテルペン炭化水素の他に酸化誘導体、脂肪族アルデヒド、アルコールおよびエステルから構成されている。精油の揮発性画分の定性分析によく使われる技術はGC–MSである。同定処理は、通常、線形保持指標 (LRI) 情報を用いたMSスペクトルライブラリ自動検索が用いられる。

一般的によく使用されるGCキャピラリー（たとえば、30 m × 0.25 mm I.D. × 0.25 μm *d*_i）と四重極型または飛行時間型のシングルMSを組み合わせたシステムは、精油の揮発性物質を完全またはそれに近いレベルで分析するためのツールとして十分な機能を有しているのは言うまでもない。

また、伝統的なMDGCは、高分離ターゲット分析をする際の優れた選択肢である。しかし、複雑な試料（成分数が200以上）をノンターゲットに完全に分離させたい場合は、包括的GC (GC×GC) 法が最適な選択だと言える。GC×GCでの分離は連続した2つのカラムで行われ、2つのカラムの中間に移送システム（モジュレータ）が配置される。モジュレータ（通常は低温）の役割は、1次元目からクロマトグラフのバンドを「カット」して、2次元目に再注入することである。

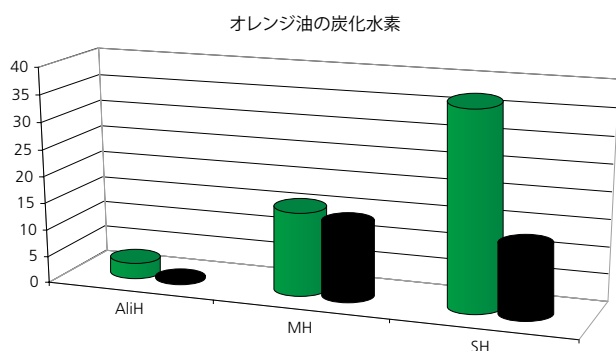


Fig. 1 GC×GC–quadMSおよびGC–quadMS実験で同定されたオレンジ油に含まれる多数の炭化水素のグラフ
左列 (緑) はGC×GC–quadMS分析によるもの

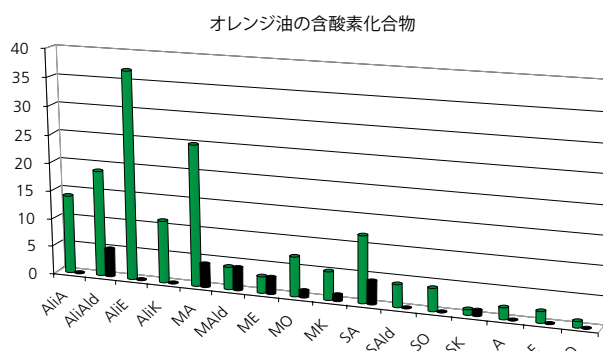


Fig. 2 GC×GC–quadMSおよびGC–quadMS実験で同定されたオレンジ油に含まれる多数の含酸素化合物のグラフ
左列 (緑) はGC×GC–quadMS分析によるもの

GC×GCは1次元GCに比べ、主に以下のような長所がある。
 (I) 分離能力の向上、(II) 選択性の改善、(III) バンド圧縮による感度向上、(IV) 同族化合物のパターン形成。精油分析で起きる可能性のある主問題として、1つまたは複数の化合物成分が、残りの全成分と比べても多く含まれていた時、モジュレータのオーバーロードを引き起こすことがあげられる。本研究では、精油分析にLC-GCを利用することを考えていた。具体的には、1次元目で炭化水素と含酸素化合物という2つの画分に精油を分離させた。そして、これら2つの画分を収集、容積を減らし、オフラインGC×GC-quadMS装置に注入した。

2. 実験

2-1. LCのプレセパレーション

分析に用いたLC×GCシステム（島津製作所製）は次の構成である。

(1) LCシステムに、CBM-20A通信バスモジュール、LC-30AD並列デュアルプランジャ型送液ポンプ2台、DGU-20A脱気ユニット、SPD-M20Aフォトダイオードアレイ検出器、CTO-20Aカラムオープン、およびSIL-30ACオートサンプラを装備。データ取得にはLCsolutionソフトウェアを使用した。

(2) AOC-5000オートインジェクタに、移送デバイスとして専用のデュアルサイドポートシリッジを装備（本調査では使用せず）。LC画分の収集は、移送ライン（LC検出器の出口とシリッジを接続）のシリッジ側からの接続を外して行った。

2-2. LC条件

100 mm × 3 mm I.D. × 5 μm d_p カラム（SUPELCOSIL LC-Si、Supelco、イタリア、ミラノ）を次のグラジエント条件で使用（流量：0.35 mL/min）：0～4.5分間（100 % ヘキサン）、4.5～6分間 100 % MTBE（分析終了まで）。注入量：20 μL。

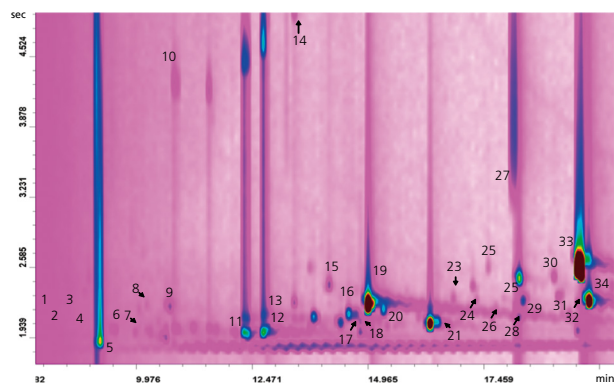


Fig. 3 オレンジ油に含まれる含酸素化合物のGC×GC-quadMS分析に関するクロマトグラムの拡大図A

2-3. LC画分

炭化水素の収集時間は1.5～3分（525 μL）、含酸素化合物は7.3～14分（2345 μL）であった。GC×GC-quadMSへの注入においては、画分の容量をあらかじめ100 μLまで減らした（窒素流下で処理）。

2-4. GC×GC-quadMS分析

GC×GC-quadMS分析は、GC-2010ガスクロマトグラフおよびGCMS-QP2010 Ultra四重極型質量分析計（島津製作所製）で構成されたGC×GC-MSシステムを用いて行った。一次カラムSLB-5 ms 30 m × 0.25 mm I.D. × 0.25 μm d_f カラム（Supelco）は、SGE SilTiteミニユニオン（SGE、オーストラリア、ビクトリア州リングウッド）を用いて空カラム（1.5 m × 0.18 mm I.D.でダブルループを形成）に接続された。空カラムは、別のユニオン（SGE）で、Supelcowax-10（100 % ポリエチレングリコール）1 m × 0.10 mm I.D. × 0.10 μm d_f カラム（Supelco）に接続された。モジュレーションは、ループ型クライオモジュレータ（Zoex社、米国、テキサス州ヒューストン）を用い、5秒ごとに行った。ホットパルス（400 °C）幅は400 msで行った。GC条件：温度プログラムは50～250 °Cを3 °C/min。キャリアガスであるヘリウムを初期圧力173.5 kPa（定線速度）で供給。注入温度：250 °C。

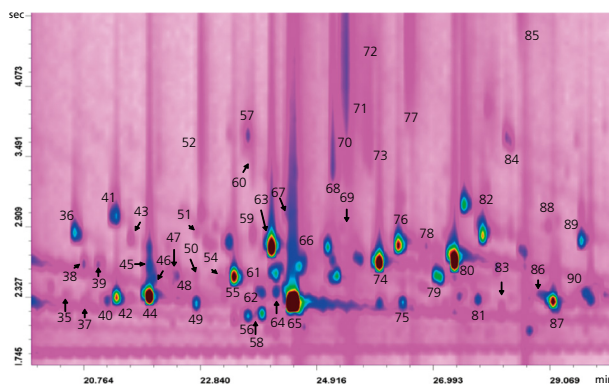


Fig. 4 オレンジ油に含まれる含酸素化合物のGC×GC-quadMS分析に関するクロマトグラムの拡大図B

モノテルペン炭化水素に対する注入モードと注入量：

スプリット（1:150）、0.4 μL

セスキテルペン炭化水素に対する注入モードと注入量：

スプリット（1:20）、1.0 μL

含酸素化合物に対する注入モードと注入量：

スプリット（1:20）、1.0 μL

2-5. MSパラメータ

試料分析はスキャンモードで行い、質量範囲：40～360 m/z 、データサンプリング周波数：33 Hz、インターフェイスおよびイオン源温度：それぞれ250℃および200℃。MSイオン化モード：EI。データ収集にはGCMSsolutionを使用、2次元表示ソフトウェアとしてChromSquare ver. 2.0を使用。

2-6. GC-quadMS分析

GC-quadMS分析は、GC-2010ガスクロマトグラフおよびGCMS-QP2010 Ultra四重極型質量分析計で構成されたGCMS-QP2010システムを用いて行った。カラム：SLB-5ms 30 m × 0.25 mm I.D. × 0.25 μm d_f 。GCオープン温度プログラム：50～250℃を3℃/min。キャリアガスであるヘリウムを初期圧力26.7 kPa（定線速度）で供給。注入温度：250℃。注入モードと注入量：スプリット（1:50）、0.5 μL 。

2-7. MSパラメータ

試料分析はスキャンモードで行い、質量範囲：40～360 m/z 、データサンプリング周波数：2 Hz、インターフェイスおよびイオン源温度：それぞれ250℃と200℃。MSイオン化モード：EI。

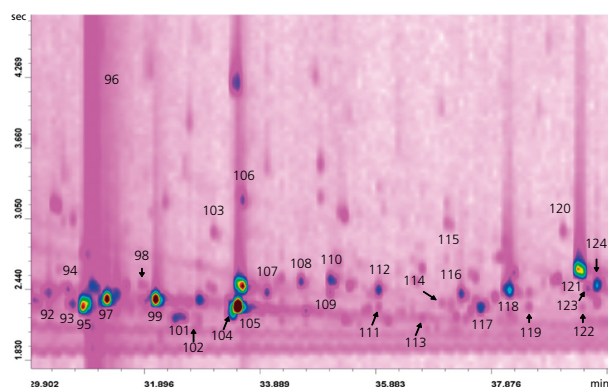


Fig. 5 オレンジ油に含まれる含酸素化合物のGC×GC-quadMS分析に関するクロマトグラムの拡大図C

3. 結果および考察

3-1. GC-quadMS分析

2種類のコールドプレスオレンジ精油の試料（以下、オレンジI/II）それぞれを、通常の無極カラムを用いて3回連続して定性的GC-qMS分析を行った。同定したオレンジ油の分析物の総数は50である。ピーク割り当てに用いたのは、MSデータベースによるマススペクトル類似度とLRIデータである（実験値とMSデータベース値との比較）。

ここでは同定されたレベルに対し、次の3つのカテゴリに分類をした（すべての実験で共通）。(I)「reliably」：MSデータベースでの類似度は90%以上で、実験によるLRI値はデータベース値との比較で±5 LRIユニットウィンドウの範囲内にある。(II)「presumably」：MSデータベースでの類似度は90%以上であるか、あるいは実験によるLRI値が±5 LRIユニットウィンドウの範囲内にある。ただし、類似度でのマッチングが80%未満あるいはLRI値が±10 LRIユニットの範囲外にある化合物は「presumably」とは同定しない。(III)「tentatively」：MSデータベースでの類似度は75%を上回り、実験によるLRI値はデータベース値との比較で±15 LRIユニットレンジの範囲内にある。オレンジ油の化合物は、その大部分がreliablyに同定されたが、9つは類似度が90%を下回っていた（presumablyに同定）。

50の分析物はすべてオレンジ油において報告があり^[1,2]、これらが属する化学基は次のように分かれていた。(14) モノテルペンおよび(13) セスキテルペン炭化水素 (MH-SH)、(8) モノテルペンおよびセスキテルペンアルコール (MA-SA)、(9) 脂肪族およびモノテルペンアルデヒド (AlAld-MAld)、(2) モノテルペンおよびセスキテルペンケトン (MK-SK)、(3) モノテルペンエステル (ME)、およびモノテルペン酸化物 (MO)。オレンジ油中で最も豊富な化合物はリモネンであり、その比率は90%を上回っている^[1,2]。

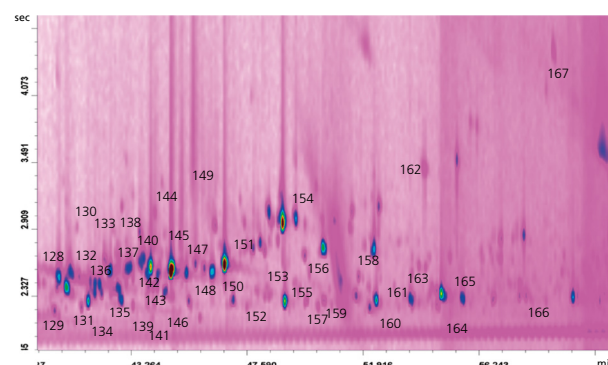


Fig. 6 オレンジ油に含まれる含酸素化合物のGC×GC-quadMS分析に関するクロマトグラムの拡大図D

3-2. オレンジ油の炭化水素

この節で示すデータは、Fig. 1のグラフに示したものである。GC×GC-quadMS分析では全部で56の炭化水素の名前が特定されたが（GC-quad-MSでは27）、そのうち18は、筆者らの知る限り、同種の試料で過去に報告されていないものであった。MHの分析に関しては、全部で16の分析物が同定され、そのうち14はreliablyで、2つはtentativelyであった（ β -フェランドレン、(Z)- β -オシメン）。

この2つの揮発性物質の類似度が低かった理由については（どちらのケースも82%）、いずれも溶出位置がリモネンの尾部であり、2次元カラムでこの干渉を分離できなかったためと考えられる。次いで、SHでは37の分析物が同定され、そのうち29はreliablyであり、7はpresumablyで、1つがtentativelyであった。奇妙なことに、ただ1つのSHの α -セリネン（化合物44）が同定されたのはGC-quadMS分析だけであった。現時点において、唯一、考えられる理由は1次元と2次元の両方での共溶出である。

つまり、 α -セリネンが多量に存在するバレンセンのピークの右肩で部分的にオーバーラップしていた。AliHに関していえば、良好なレベルで3つ同定された。炭化水素は5つ見つかったが、2つの試料の一方のみでの検出だった。

3-3. オレンジ油の含酸素化合物

含酸素化合物に対していえば、本レポートで報告した手法の分析能力の高さが示された。この節で説明するデータをFig. 2のグラフに示す。GC×GC–quadMSでは全部で162の含酸素化合物の名前が特定された（GC–quadMSでは23）。含酸素化合物画分の複雑さが明確にわかるオレンジIの2次元クロマトグラムの4か所の拡大部をFig. 3～6に示す。

2つの試料のいずれか一方のみで検出された含酸素化合物は8種類あった。エチルヘキサナート、イソブチルイソバレラート、*n*-ブチルクロナートおよびゲラニルブチラートはオレンジIで同定されたのに対して、ノニロール、 δ -テルピネオール、リナロールプロピオナートおよびビフェニル（生体異物の一種）はオレンジIIでのみ同定された。2D平面には約300の化合物が現れているが、測定された多くの化合物は同定できなかった（同定できるレベルに届かなかった）。同定できなかった理由として、次の要素が関与している。（I）信号強度が低い、（II）MSデータベースで正しいスペクトル情報が欠落している。

GC×GC–quadMS法で検出された化合物クラスのうちGC–quadMS法では現れなかったものが多い。AliA（14化合物）、AliE（37化合物）、AliK（11化合物）、SAId（4化合物）およびSO（4化合物）などである。他の化合物グループについても、AliAId（19対5）、MA（25対4）、MO（7対1）、MK（5対1）、およびSA（12対4）のように、GC×GC–quadMS法で同定された分析物の方が多かった。等しい数の成分が検出されている化合物クラスもMAId（4）、ME（3）、SK（1）の3つがあった。筆者らの知る限りにおいて、同定された含酸素化合物のうち91は、オレンジ油では過去に報告がなかったものである。これらの成分についても、reliably、presumably、およびtentativelyとしてそれぞれ、25、47、および19の分析物が同定された。

まとめると、オフラインLC–GC×GC–quadMSのアプローチでは合計219の分析物が同定できたのに対し、GC–quadMSで割り当てられたのは50の成分であった。同定レベルIについて言えば、GC×GC–quadMSおよびGC–quadMSを用いて同定できたのは、それぞれ128および41であった。128化合物のうち、筆者らの知る限りにおいて、その38は過去に報告されていないものであった。

4. まとめ

結論として、本レポートで報告したオフラインLC–GC×GC–quadMS法は、精油を精密に分析する際の強力なツールと考えられ、新たな分析の扉を開いたと考えている。実際、筆者らの知る限り、これだけ多数のオレンジ油分析物（特に含酸素化合物）を同定（もしくは検出）したとする単独の研究報告は過去にはない。このような精密な分析結果が、様々な種類の精油に対して間違いなく得られるだろう。また、オフラインまたはオンライン方式のLC+GC×GC–MSシステムは、他のタイプの試料の分析でも非常に興味深い結果をもたらしてくれる可能性がある。

参考文献

- [1] G. Dugo *et al.* in: G. Dugo, L. Mondello (Eds.), *Citrus Oils*, CRC, 2011.
- [2] G. Dugo *et al.* in: G. Dugo, A. Di Giacomo (Eds.), *Citrus*, Taylor & Francis, 2002.