

SPME-GC/MS と多変量解析による 劣化した天然ゴムの臭気成分の差異解析



Authors

加賀美智史
穂坂明彦
野原健太
中村貞夫

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

近年、材料や化成品業界において、製品からの異臭が原因となるトラブルが、解決すべき喫緊の課題と捉えられ、その対策として臭気の原因となる化合物を迅速かつ正確に絞り込むことが要求されています。GC/MS による定性分析で一般的に用いられる NIST MS ライブライアリでは、あらゆる臭気成分がカバーされている訳ではないため、その解析結果から成分を絞り込むのはかなり困難です。アジレントの「GC/MS 用異臭分析データベース」は臭気化合物に特化して収載した MS スペクトルライブライアリです。本アプリケーションノートでは劣化した天然ゴムを試料として、複雑なマトリックス中においても高感度に化合物の検出が可能な SPME - GC/MS と上記データベースを用いた異臭原因化合物の絞り込みを目的とし検討を行いました。また多変量解析ソフトウェアである Mass Profiler Professional (MPP)による統計解析を組み合わせることで、迅速かつ再現性に優れた臭気原因化合物の絞り込みが可能でした。

Key word : SPME、材料、異臭、MPP、主成分分析、階層型クラスター分析、
統計解析

1 はじめに

近年、オフフレーバー(異臭)が原因となるトラブルは食品や飲料などに留まらず、材料や化成品においても解決すべき問題の一つとして捉えられています。異臭の事案が発生した際には、第一に、迅速かつ正確に臭気物質を特定することが重要であり、それによって混入経路の推測ならびに対策を講じることが可能となります。臭気成分の分析には測定対象となる試料中に夾雜成分を多く含むことや目的成分が多岐に渡ることから、高い分離能力と定性能力を持つガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)が広く用いられています。また成分によっては人間の嗅覚閾値が低く、微量であっても強い臭気を感じるものがあるため、より高感度な分析が求められます。さらに測定するサンプルの形態が固体や液体と様々であり、それらを簡便にGCに導入する前処理装置が求められています。このような背景から、固相マイクロ抽出法(Solid Phase Micro Extraction; SPME)法が簡便で高い試料濃縮が行えるGC/MSへの試料導入法として広く普及しています。測定で得られたクロマトグラム上の各ピークの定性には、NISTやWileyなどの市販のライブラリ検索により行われるのが一般的ですが、目的とする臭気成分以外の化合物も多くリストされるため、この中から臭気成分を迅速かつ正確に絞り込むことは重要な課題です。この課題に応える技術として、アジレントでは臭気物質に特化したマススペクトルライブラリ

「GC/MS用異臭分析データベース」を無償提供しています。このデータベースは約500種類の臭気物質の基本情報(マススペクトル、CAS No.、分子式、分子量)の他、「においの種類」や「嗅覚閾値」など、臭気分析において重要な情報も収載しています。さらに各種の自動解析ソフトウェアと組み合わせることで、複雑なクロマトグラムから迅速に臭気物質に関する情報を抽出することも可能です。

天然ゴムはシスポリイソプレンを基本単位とした高分子化合物であり、タイヤやベルト、ホースなど多岐にわたる用途で使用されています。しかし、一般的な合成ゴムと異なり天然由来の樹液を用いるために、タンパク質や植物性代謝物などを含み、独特な臭気を持つことが知られています。異臭のトラブルでは製造ラインにおける機械や包装容器などを始め、周囲の化成品の劣化などを起因とした移り香が原因となる場合もあり、劣化による臭気の変化を検出できる分析法ならびに解析方法を確立することは重要です。そこで本アプリケーションノートでは、天然ゴムの正常品と劣化品を試料とし、高感度な分析が可能なSPME-GC/MSで得られたクロマトグラムをGC/MS用異臭分析データベース、および多変量解析ソフトウェアであるMass Profiler Professionalを用いて解析することで、劣化した天然ゴムの臭気成分の特定を行いました。

2 分析条件

22 mLバイアルに入れた天然ゴム(WAKI, GB896 #180)をそれぞれ空気雰囲気(コントロール○、試料1●)、窒素雰囲気(試料2▲)、酸素雰囲気(試料3■)の4種類に分類しました(n=4)。試料1-3について一般的に報告されている天然ゴムの耐熱温度(120°C)で24時間加熱を行いました。加熱後のサンプルをSPME法で抽出を行い、GC/MSにより測定しました。測定には多機能オートサンプラー(MPS2、ゲステル社製)付きのGC/MS(アジレント 5977B MSD)を用い、SPMEファイバーは分子量が小さい化合物も高感度な捕集が可能な三層タイプ(PDMS/DVB/Carboxen 2、50/30 μm, MERCK社製)を用いました。各試料約1 gをバイアルに採取し、60°Cで10分間の予備加熱・攪拌、60°Cで20分間SPMEで揮発成分を抽出しました。データ解析はマススペクトルライブラリにNIST2017およびGC/MS用異臭分析データベースを用いました。

GERSTEL MPS2(多機能オートサンプラー)

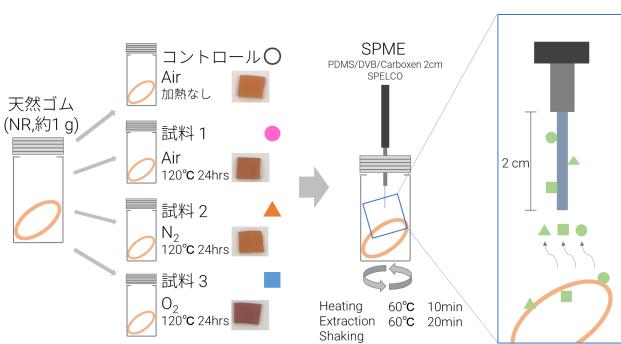
| | |
|-----------|------------------------------|
| 注入モード | 固相マイクロ抽出(SPME) |
| SPMEファイバー | PDMS/DVB/Carboxen (50/30 μm) |
| サンプル抽出条件 | 60°C / 20分(攪拌あり) |
| サンプル脱着時間 | 8分 |

Agilent 7890B GC

| | |
|-------------|--|
| 注入口 | スプリット/スプリットレス |
| 注入モード | スプリットレス (パージ100 mL/min, 注入後2分) |
| 注入口温度 | 250°C |
| ガスセーバ | オン(20 mL/min, 注入後) |
| ライナー | Ultra Inert Liner(straight, 0.75 mm) (p/n 5190-4048) |
| キャリアガス | He(低流量モード 1.1077 mL/min) |
| ベンゾチアゾールカラム | 17.967分でリテンションタイムロック DB-WAX UI(p/n 122-7032UI) |
| オーブン | 30 m, 0.250 mm, 0.25μm 40°C(3 min)–10°C/min–250°C(10 min) |

Agilent 5977B MSD InertPlus(四重極型質量分析計)

| | |
|-----------|------------------------------|
| イオン化法 | 電子イオン化法(EI) |
| イオン源 | エクストラクタイオニン源 |
| トランസファーイン | 230°C |
| イオン源温度 | 250°C |
| 四重極温度 | 150°C |
| 電子エネルギー | 70eV |
| 測定モード | Scan(Scan range; m/z 29–550) |
| ゲイン係数 | 1 |



天然ゴムの熱劣化条件とSPMEによる揮発性成分の濃縮

3 結果および考察

正常品と劣化品から得られたトータルイオンカレントクロマトグラム(TIC)を図1に示しました。まず、n-アルカン(C4-20)から算出したリテンションインデックス(RI)とともに、コントロール試料のデータに対してNIST2017ライブラリを用いて自動検索を行ったところ1,647成分がヒットしましたが、これらの中から臭気の原因となる化合物を特定することは困難でした。これに対しGC/MS用異臭分析データベースを用いた検索では、「ゴム臭」として登録されているベンゾチアゾールなど、臭気物質であることが確認されている125成分がヒットし、原因物質の絞り込みが可能でした。

コントロールと劣化品(試料1-3)の比較解析をMPP(Mass Profiler Professional)を用いて行いました。この解析では、少なくとも1種類の試料において4回の繰り返し測定

にて全ての試料で検出され、一元配置分散分析(one-way ANOVA)で統計的有意差($p<0.05$)が認められた化合物に対して、主成分分析を行いました。主成分分析のスコアによる判別を行った結果を図2に示しました。この結果、コントロールと試料1-3を判別することができました。第一主成分の軸は、コントロール(○)のスコアが -11.2 ± 0.2 (n=4, Mean \pm S.E.M.*)であったのに対し、加熱処理を行った試料1-3はそれぞれ 4.09 ± 0.04 (Air ●), 2.07 ± 0.12 (N2 ▲), 4.93 ± 0.07 (O2 ■)であり、加熱による劣化が説明変数と考えられました。第二主成分の軸は、コントロール(○)のスコアが -0.970 ± 0.060 であったのに対し、加熱処理を行った試料1-3はそれぞれ 2.25 ± 0.05 (Air ●), 4.76 ± 0.17 (N2 ▲), -6.03 ± 0.24 (O2 ■)で、窒素の含有量が説明変数と考えられました。

*S.E.M (Standard Error of the Mean ,標準誤差)：得られた平均値のばらつきの大きさ・推定精度を表す指標

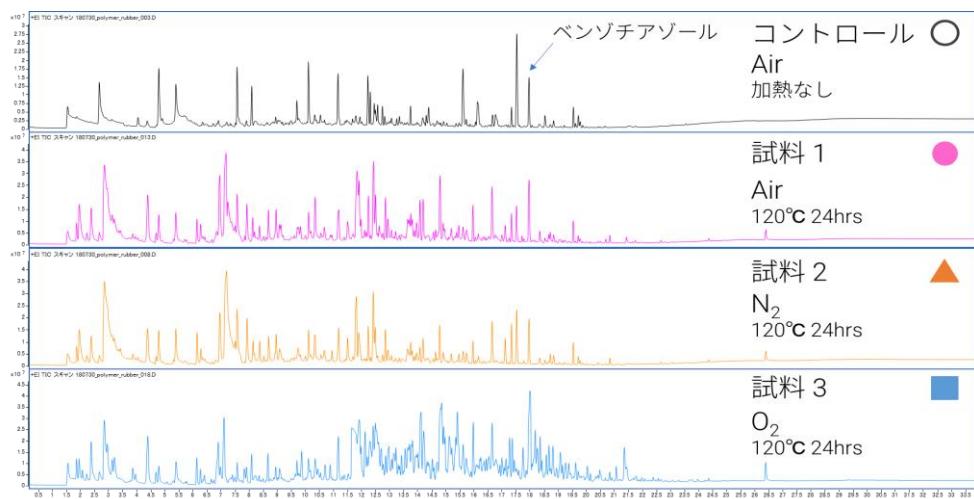


図1 各試料から得られたトータルイオンカレントクロマトグラム

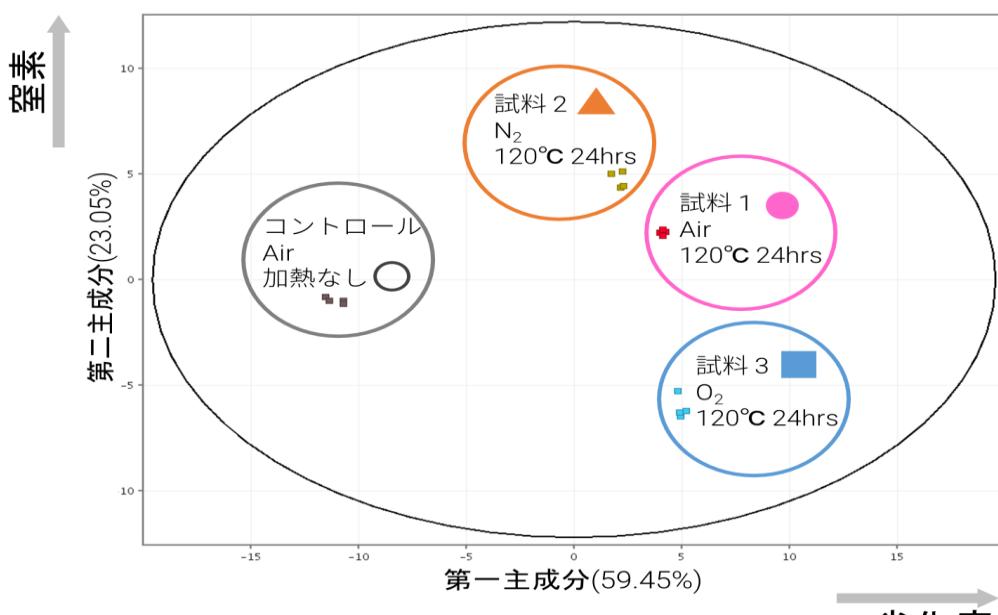


図2 MPPによるPCA解析の結果

解析に用いた試料は、加熱温度と酸素濃度によって、各条件で化合物のアバンダンス変化が認められました。そこで4種類の試料の中で化合物のアバンダンスの変動傾向を明らかにするため階層型クラスター分析を行いました。その結果を図3に示します。先のOne-way ANOVAで統計的有意差($p<0.05$)が認められた66化合物は、階層型クラスター分析のデンドログラムの類似度から、大別して7パターンに分類することができました。

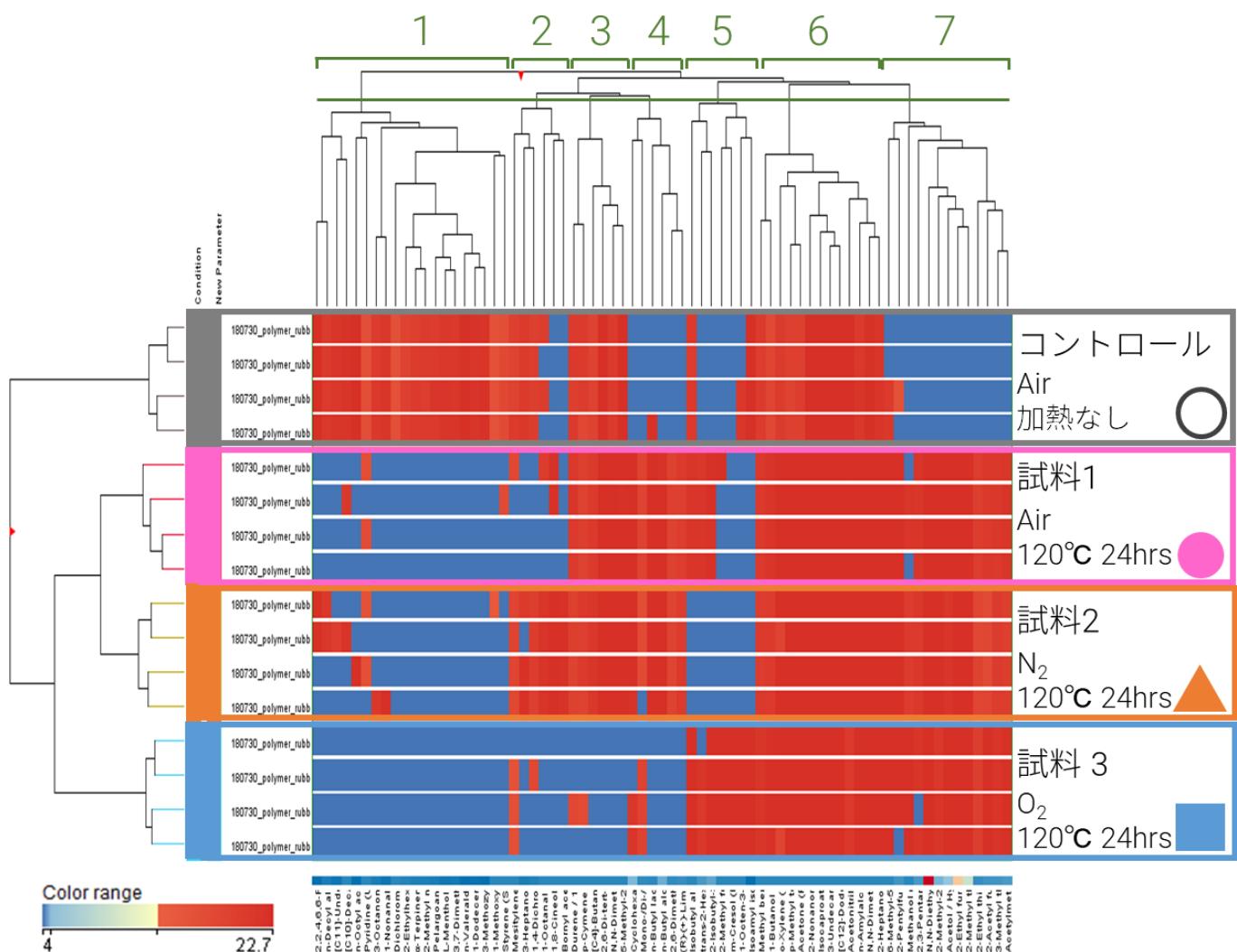


図3 階層型クラスター分析のヒートマップ

7パターンに分類した化合物のうち、5と7の変動のグループに着目し、それらの各試料における平均アバンダンスの変動を図4に、化合物名と各試料でのアバンダンスを表1に示しました。グループ5については、トランス-2-ヘキセナール(アーモンド様臭)と2-イソブチル-3-メトキシピラジン(ピーマン様臭)が含まれ、試料1,3の酸素存在下のサンプルに特徴的な化合物でした。これらは天然ゴムに含まれるタンパク質や糖などの非ゴム成分が酸化、分解によって生じたものと考えられます。

グループ7は加熱したサンプルに特徴的な化合物のクラスタであり、チオフェン系の化合物であることが確認できました。ゴムの製造過程では一般的に機械的強度を高めるために架橋反応を促進する加硫促進剤が使用されています。加熱処理でこれらの架橋構造が切断されることで、チオフェン系化合物が生成されたと考えられました。

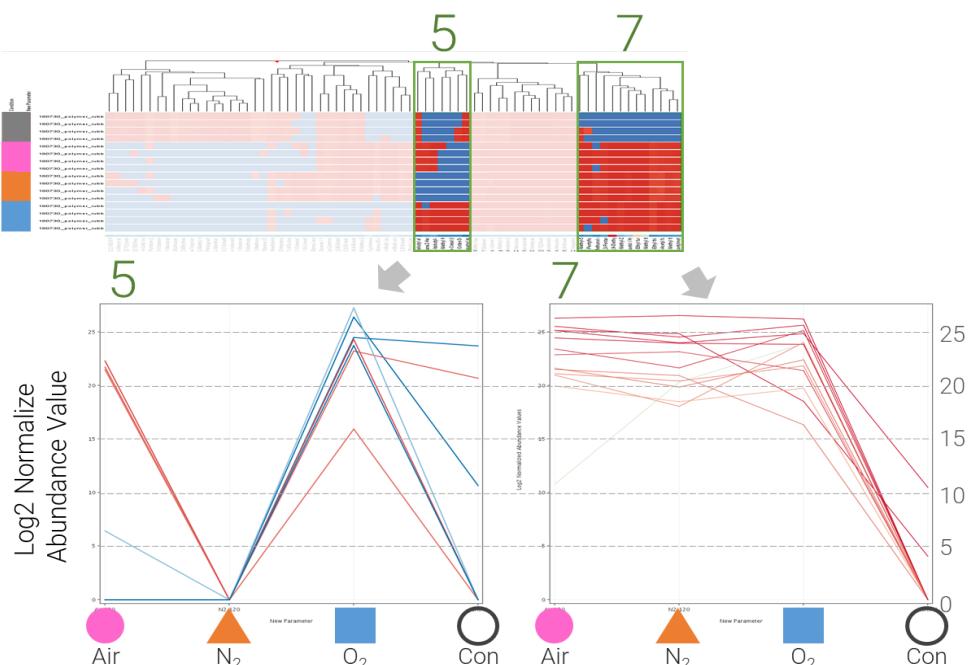


図4 各化合物の平均アバンダンスの変動

表1 化合物名と各試料における平均アバンダンス

| Group | Compound | Abundance Value(Log 2) | | | |
|-------|---|------------------------|----------|----------|----------|
| | | 試料1(Air) | 試料2(N2) | 試料3(O2) | control |
| 5 | 1-Octen-3-ol (Matsutake, Mushroom, Grass) | 0 | 0 | 26.4±0.1 | 10.7±6.2 |
| | Isoamyl isovalerate (Fruit) | 0 | 0 | 24.5±0.0 | 23.7±0.1 |
| | Isobutyl aldehyde (Sour, Burnt) | 21.8±0.1 | 0 | 23.3±0.1 | 20.7±0.2 |
| | trans-2-Hexenal (Soy milk, Almond) | 21.5±0.1 | 0 | 15.9±5.3 | 0 |
| | 2-Isobutyl-3-methoxypyrazine (Green pepper) | 22.3±0.2 | 0 | 24.3±0.0 | 0 |
| | 2-Methyl furan (Solvent, Thinner) | 6.4±6.4 | 0 | 27.3±0.0 | 0 |
| 7 | m-Cresol (Disfection odor, Iodine) | 0 | 0 | 23.7±0.1 | 0 |
| | 6-Methyl-5-heptene-2-one (Fruit, Fresh) | 25.2±0.1 | 24.0±0.1 | 24.9±0.0 | 10.5±6.0 |
| | 2-Pentylfuran / 2-Amylfuran (Fruit, Sweet) | 25.1±0.1 | 24.9±0.1 | 18.5±6.2 | 4.1±4.1 |
| | 2-Ethyl furan (Solvent, Thinner) | 25.6±0.0 | 24.5±0.1 | 25.7±0.0 | 0 |
| | Methanol (Alcohol) | 10.8±6.2 | 20.4±0.1 | 23.9±0.2 | 0 |
| | Acetol / Hydroxyacetone (Fermentation, Cheese) | 23.4±0.1 | 21.7±0.1 | 25.2±0.0 | 0 |
| | 2-Methyl-2-pentenal (Pungent, Fermentation) | 22.9±0.1 | 23.2±0.1 | 21.4±0.1 | 0 |
| | 2-Methyl thiophene (Burnt rubber, Gasoline) | 24.5±0.0 | 24.0±0.1 | 23.9±0.0 | 0 |
| | 2-Ethyl thiophene (Burnt rubber) | 20.0±0.1 | 18.5±0.2 | 19.8±0.1 | 0 |
| | 2,3-Pentanedione(Characteristic odor, Fruit) | 21.5±0.1 | 21.0±0.1 | 16.4±5.5 | 0 |
| | 3-Methyl thiophene (Burnt rubber, Gasoline) | 21.1±0.1 | 20.4±0.1 | 21.8±0.0 | 0 |
| | 2-Acetyl furan (Solvent) | 21.0±0.1 | 18.1±0.2 | 24.0±0.1 | 0 |
| | Acetyl methyl carbinol / Acetoin (Butter, Cheese) | 21.6±0.1 | 19.9±0.1 | 22.4±0.1 | 0 |
| | N,N-Diethyl formamide(Amine-like odor) | 26.3±0.3 | 26.6±0.0 | 26.2±0.0 | 0 |

4まとめ

本アプリケーションノートでは正常品と劣化品の天然ゴムを試料として、SPME-GC/MSによる試料測定、「GC/MS用異臭分析データベース」と多変量解析ソフトウェアであるMPPによる解析を組み合わせた異臭原因化合物の絞り込みを試みました。

まず正常品から得られたクロマトグラムで、上記データベースを用いた化合物検索を行った結果、「ゴム臭」として登録されているベンゾチアゾールなど、臭気物質であることが確認されている成分がヒットしていました。本データベースに収載されている「においの種類」は、臭気原因化合物の絞り込みにおいて有効な情報であると言えます。続いて正常品と劣化品でデータベース検索を行い、ヒットした成分について、MPPを用いた統計解析を行いました。主成分分析では、酸素濃度(窒素濃度)と加熱(劣化)を説明変数として試料の判別を行うことができました。階層型クラスター分析でこれら説明変数となる化合物のアバンダנס変化に着目した結果、タンパク質や糖などの酸化、分解によって生じた成分や、製造過程に用いられる加硫化剤を起因とした成分など、特徴的な臭気を持つ化合物を絞り込むことができました。

参考文献

- 野原健太　臭いの測定法と消臭・脱臭技術　事例集
No 1974 工業技術情報協会 2018年 第2章 第3節 オフフレーバーメソッドの開発
- 森本昌明ら　臭気を提言した天然ゴムおよびその製造方法 JP5312439B2

Information

「GC/MS用異臭分析データベース」は以下のリンクから弊社GC/MSユーザー様のみ、無償でダウンロードいただけます。

<https://www.chem-agilent.com/contents.php?id=1004528>

詳しくはお問い合わせください。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カストマーコンタクトセンタ

0120-477-111

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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2017

Printed in Japan, October 31, 2018

GC-MS-201810KG-001

