

包括的二次元ガスクロマトグラフィー (GC x GC) と高分解能質量分析計による エッセンシャルオイルの分析



著者

Nick Harden, Sofia Nieto,
Scott Hoy, Kai Chen, and
Matthew Curtis
Agilent Technologies, Inc.

概要

エッセンシャルオイルなどの複雑なサンプルの分析には、包括的二次元ガスクロマトグラフィー (GC x GC) が最適です。GC x GC では二次元での高度なクロマトグラフィー分離が可能です。GC x GC と高分解能精密質量測定を組み合わせることで、同定できる成分数が増え、結果の信頼性が向上します。

この研究では、リバースフローモジュレータ (RFM) - GC x GC と高分解能四重極飛行時間型 (GC/Q-TOF) 質量分析計を組み合わせたエッセンシャルオイルの分析ワークフローを確立しました。

はじめに

エッセンシャルオイルの一般的な分析の目的は、匂い、香り、品質に影響する化学組成を特定することです。また、これらの分析は真偽の評価や混入物の特定にも役立ちます。

エッセンシャルオイルは、植物サンプルからの蒸留や低温圧搾により得られる揮発性成分と半揮発性成分の複雑な混合物であり¹、質量スペクトルやリテンションインデックス (RI) が非常に類似した異性体が含まれることがよくあります。このため、シングルカラムでのエッセンシャルオイルの分離は、個々の成分の同定では不十分な場合があります。エッセンシャルオイルの組成は複雑であるため、高度なクロマトグラフィー技術と選択性の向上が常に求められています。したがって、このサンプルマトリックスに適したクロマトグラフィー分離を達成するには、GC x GC アプローチが適しています。

GC x GC では、1 次カラムからの溶出液を頻繁に収集し、選択性の異なる 2 次カラムに再注入され、直交的な分離が実行されます。これは、これら 2 つのカラムの間に配置されているモジュレータで行われます。GC x GC 分離用のモジュレータは通常、熱または流量ベースです。一次元目での各分離ピークを 3 回もしくはそれ以上サンプリングすることが理想的で、これには二次元目の高速分離が必要で²。このため、GC x GC 分離手法と組み合わせる MS としては、データ取り込みが高速で高品質なスペクトルを取得できる TOF アナライザが最適です。対照的に、スキャン質量アナライザが最高速度（通常は約 20 Hz）でデータを取り込むと、スペクトルの歪みによりライブラリー一致率が低下する可能性があります。

フローモジュレーションは、GC x GC 分離で冷媒が不要になるコスト効率の高い手法です。RFM は通常、水素炎イオン化検出器 (FID) と組み合わせ使用され、炭化水素やポリマーの分析、および香料/香気アプリケーションなどでよく使用されます³。RFM と MS 検出器を組み合わせることで、化合物同定の効率と信頼性を上げることができます。ただし、この手法には、MS の最適なキャリアガス流量範囲が狭い（一般的に 1 ~ 2 mL/min）という大きな課題もあります。

この研究の主な目的は、RFM と高分解能精密質量 GC/Q-TOF システムを組み合わせた GC x GC メソッドによるエッセンシャルオイルの分析ワークフローを開発することでした。まず、ディーゼルを用いてこの GC x GC 設定を開発および最適化しました。ディーゼルは複雑ですが十分に研究されているサンプルです。複雑なエッセンシャルオイルデータを比較するための GC x GC の統計的解析およびアプローチも実施しました。

実験方法

データ取り込み

サンプルは Agilent 8890 GC で GC x GC 構成と RFM を用いて分離し、高分解能精密質量 Agilent 7250 GC/Q-TOF MS と FID を用いて分析しました。非極性の 1 次カラムと極性の 2 次カラムを組み合わせた「通常の」カラムセットを使用しました。このセットの構成は、20 m × 0.1 mm、膜厚 0.1 μm の Agilent DB-1ms カラム（100 % ジメチルポリシロキサン）と 5 m × 0.25 mm、膜厚 0.15 μm の Agilent DB-17ms カラム（50 %-フェニル）-メチルポリシロキサンと同等）です。

MS への流量を減らし、FID を 2 台目の検出器として構成に追加するには、2 次カラムの末端をスプリッタに接続し、そこでカラム流量を分岐する必要があります。各構成のメリットと限界を明らかにするため、2 種類のスプリッタ（パージ付きとパージなし）を検討しました。パージ付きスプリッタの場合、カラム流量は 2 台の検出器の間で分岐する前にメークアップ流量と混合されます。これに対してパージなしスプリッタは、2 台の検出器に接続されている 2 台のリストリクタの間でカラム溶出物を分岐するときに、メークアップ流量を使用しません。メソッドの最適化とトラブルシューティングのために、2 台目の FID（モニターもしくはベント）チャンネルを追加しました。

表 1 に、パージ付きスプリッタ構成を用いた最適な機器パラメータを示します。これは取り込みソフトウェアでの設定が簡単のため推奨されます。

表 1. データ取り込みパラメータ

パラメータ	設定値
MS	Agilent 7250 GC/Q-TOF システム
GC	Agilent 8890 GC システム
注入口/ライナ	MMI, Agilent 5190-2294 : 990 µL (スプリット、ストレート、ウール、ウルトラライナート)
注入モード	スプリット、250:1
注入量	0.5 µL
注入口温度	300 °C
カラム 1 と流量	Agilent DB-1ms, 20 m × 0.1 mm, 0.1 µm (127-0122), 0.2 mL/min
カラム 2 と流量	Agilent DB-17ms, 5 m × 0.25 mm, 0.15 µm (122-4711), 10 mL/min
モジュレータ (ベント) FID への リストリクタ	Agilent 不活性化フューズドシリカ、0.4 m × 0.05 mm (160-2655-1)
Q-TOFへのパージ付きスプリッター ストリクタおよび流量	Agilent 不活性化フューズドシリカ、0.6 m × 0.12 mm (CP801206), 1.3 mL/min
検出器 FID へのパージ付き スプリッターストリクタ	Agilent 不活性化フューズドシリカ、1.05 m × 0.25 mm (CP802505)
モジュレーション遅延	0.51 分
モジュレーションサイクル	5.1 秒
注入時間	0.125 秒
キャリアガス	ヘリウム
オープン温度プログラム	45 °Cで1 分間、3 °C /min で 285 °Cまで昇温、3 分 間保持
トランスファーライン温度	305 °C
イオン源温度	300 °C
四重極温度	150 °C
コリジョンセルガスフロー	N ₂ 1 mL/min + He 4 mL/min
イオン化エネルギー	70 eV
イオン化電流	5 µA
スペクトル採取レート	50 Hz
質量範囲	m/z 45 ~ 650
FID 温度	300 °C
FID H ₂ 流量	30 mL/min
FID 空気流量	400 mL/min
FID メークアップ流量 (N ₂)	検出器 FID : 15 mL/min モニター (ベント) FID : 25 mL/min

データ処理

データは高分離能 7250 GC/Q-TOF システムで、50 Hz のデータレートで取り込みました。化合物の同定には、Agilent MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェアバージョン 12.1 の Unknowns Analysis ツールと GC Image ソフトウェアバージョン 2024 R1、および NIST23 EI ライブラリを使用しました。化合物同定の信頼性を上げるために、線形リテンションインデックス (LRI) を使用しました。Agilent Mass Profiler Professional (MPP) ソフトウェアバージョン 15.1 で統計解析を実施しました。

結果と考察

GC x GC 構成の選択性と最適化

GC x GC の実行時に十分なモジュレーション率を達成するには、2 次カラムでの分離が高速であることが必要です。これには通常、比較的短い 2 次カラムを使用する必要がありますが、GC x GC RFM 構成ではこれにより、MS に適さない高流量が発生します。このため、2 次カラムからの流量を MS チャンネルと FID チャンネルの間で分岐するためのパージ付きスプリッターあるいはパージなしスプリッターが使用されます。

この点を考慮して、最初にディーゼルサンプルを使用して GC x GC RFM メソッドを開発および最適化しました。成分の適切なクロマトグラフィー分離が得られ、MS への最適なキャリアガス流量を確保できる構成を確認するために、カラム長や内径が異なるいくつかの構成を検討しました。図 1 ~ 4 に、最も実用的な 2 つの構成を示します。いずれのアプローチでも、MS に加えて 2 つの FID チャンネルを (ベント/モニターおよび検出器として) 使用します。GC x GC と RFM での分析時にモニター FID チャンネルの追加は必須ではありませんが、初期メソッドの設定、最適化、トラブルシューティングには非常に重要です。具体的には、モニター FID チャンネルをこの設定で構成しておく、モジュレータのサンプルループの過充填によるブレイクスルーを検出でき、それに応じてカラム/リストリクタのパラメータ、モジュレーションおよび注入時間を調節することができます。GC x GC と RFM を構成する際に考慮すべきもう 1 つの重要な点は、MS リストリクタの一部がオープンで加熱され、別の部分がトランスファーラインで加熱されるということです。それぞれの加熱部分を、その熱源に従って構成する必要があります。MS へのリストリクタの寸法は、特に MS へのトランスファーラインの温度と流量に合わせて選択する必要があります。MS と 2 台目の検出器の間で流量を分岐する場合は、MS へ一定の流量を維持する必要があります。正しく設定すると、MS と 2 台目の検出器の間の流量のスプリット比が安定し、オープン温度プロファイルの影響を受けにくくなります。

パージなしスプリッターを用いた構成を図 1 に示します。適切に設定するには、代表的な複合カラム 2 の出口セグメントを、MS および FID 検出器のリストリクタにより生み出される背圧と同等の背圧で、取り込みソフトウェアを使用して構成する必要があります。このため、MS および検出器 FID のリストリクタは別々に設定されません。

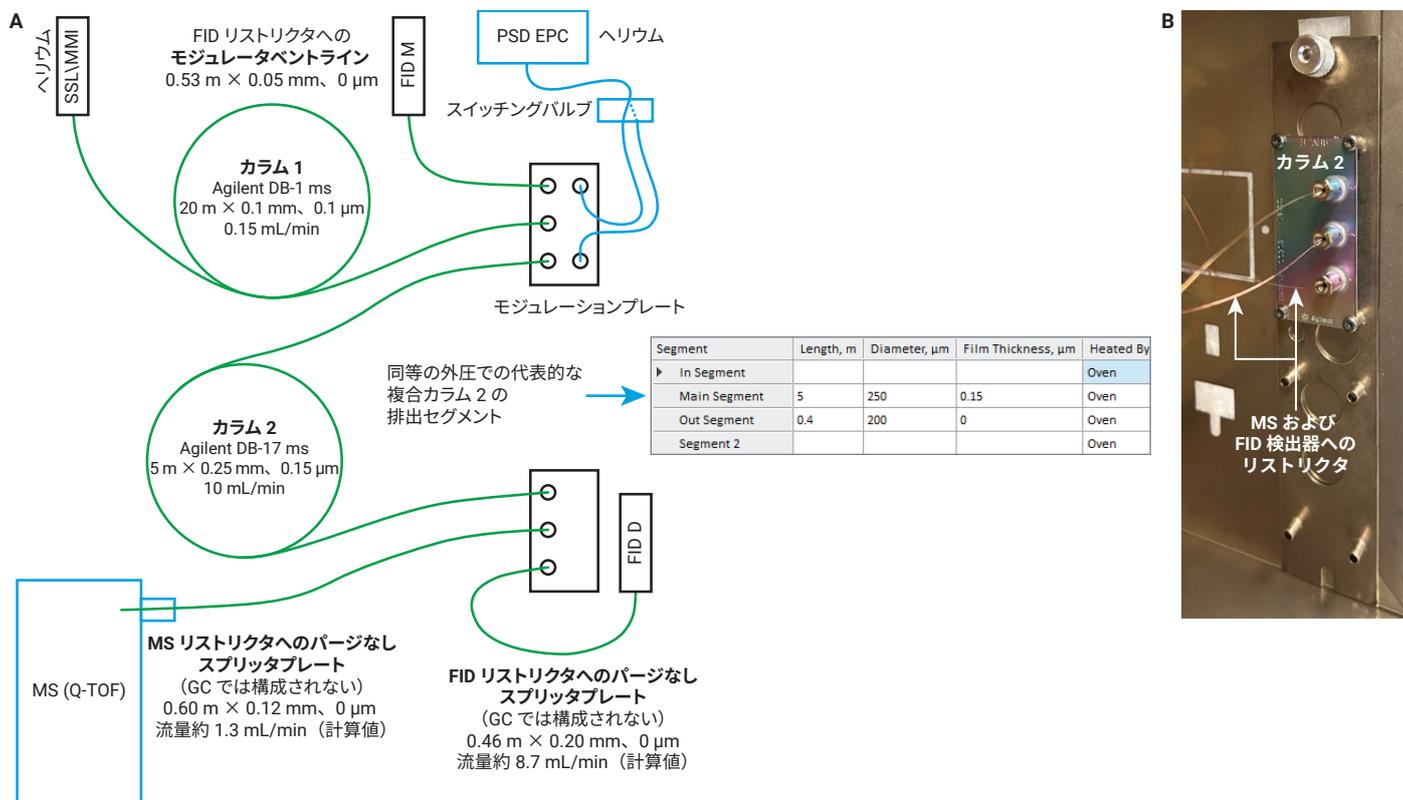


図 1. パージなし (2 ウェイ) スプリッタを含む GC x GC RFM 設定。(A) パージなしスプリッタ構成の図。(B) パージなしスプリッタプレートの写真。RFM は GC オープンのもう一方の側面に取り付けられています。

図 2 に、この構成で得られたディーゼルの GC x GC クロマトグラムを示します。このメソッドを使用すると、ほとんどの場合で、ディーゼル脂肪酸群の良好な分離が得られました。ただし、三環芳香族化合物は 6.3 秒のモジュレーションサイクルではラップアラウンドされました (次のモジュレーションサイクルまで 2 次カラムから溶出しませんでした)。その原因はオープン時の昇温が 2.5 °C /min と低速であったためです。

パーズ付きスプリッタを用いた構成を図 3 に示します。この設定で使用する 3 種類のリストリクタ (MS、ベント、検出器 FID 用) はすべて、取り込みメソッドで構成する必要があります。

パーズ付きスプリッタ構成によるディーゼル分離を図 4 に示します。また、この 3 ウェイスプリッタ構成を使用した場合、ディーゼル炭化水素 (単環芳香族、二環芳香族、三環芳香族、およびパラフィンやナフタレンなど) で優れた分離能を示しました。オープンの昇温速度を 4.5 °C /min に上げると、三環芳香族の大きなラップアラウンドは見られませんでした。

モニター FID チャネルでは、パーズ付きとパーズなしのいずれのスプリッタでもピークは出現しませんでした。これはモジュレータの構成が適切であることを示しています。3 ウェイスプリッタ構成のモニター FID チャネルで確認されたクリーンなクロマトグラム例を図 5 に示します。

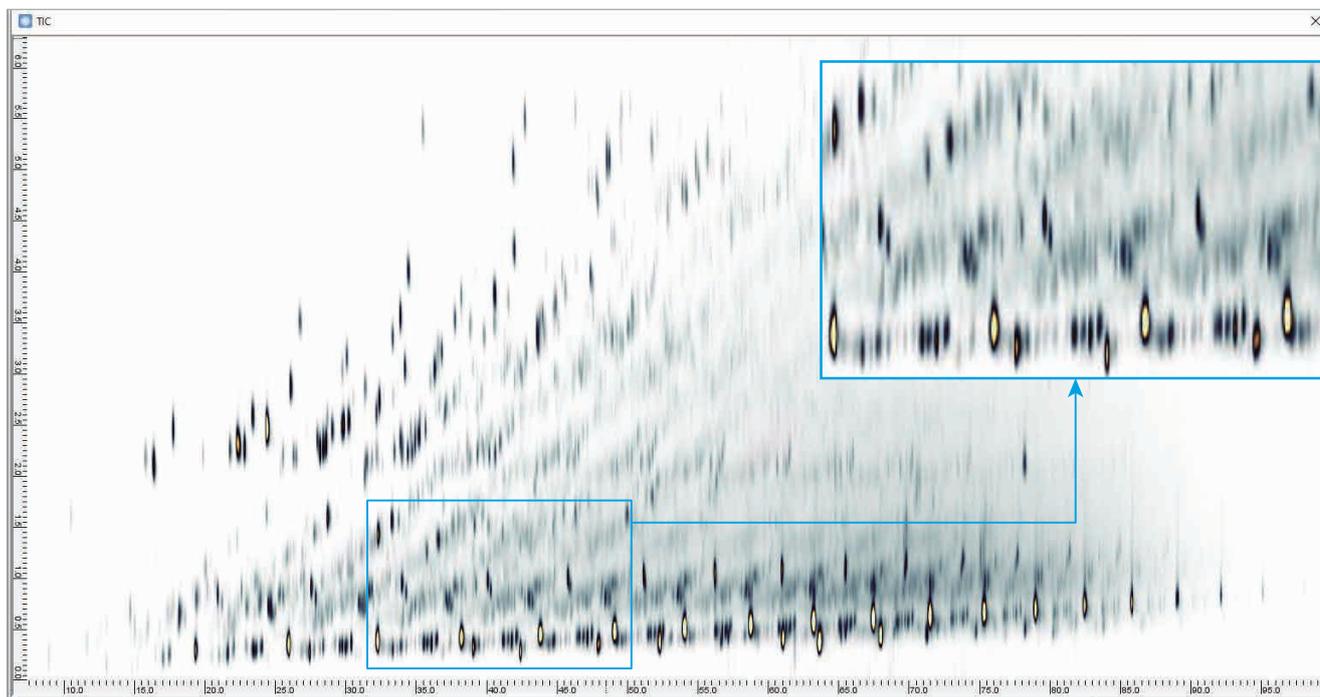


図 2. パージなしスプリッタ設定によるディーゼル分離。モジュレーションサイクルは 6.3 秒、オープン温度は 40 °C を 6 分間、昇温速度は 2.5 °C/min です。

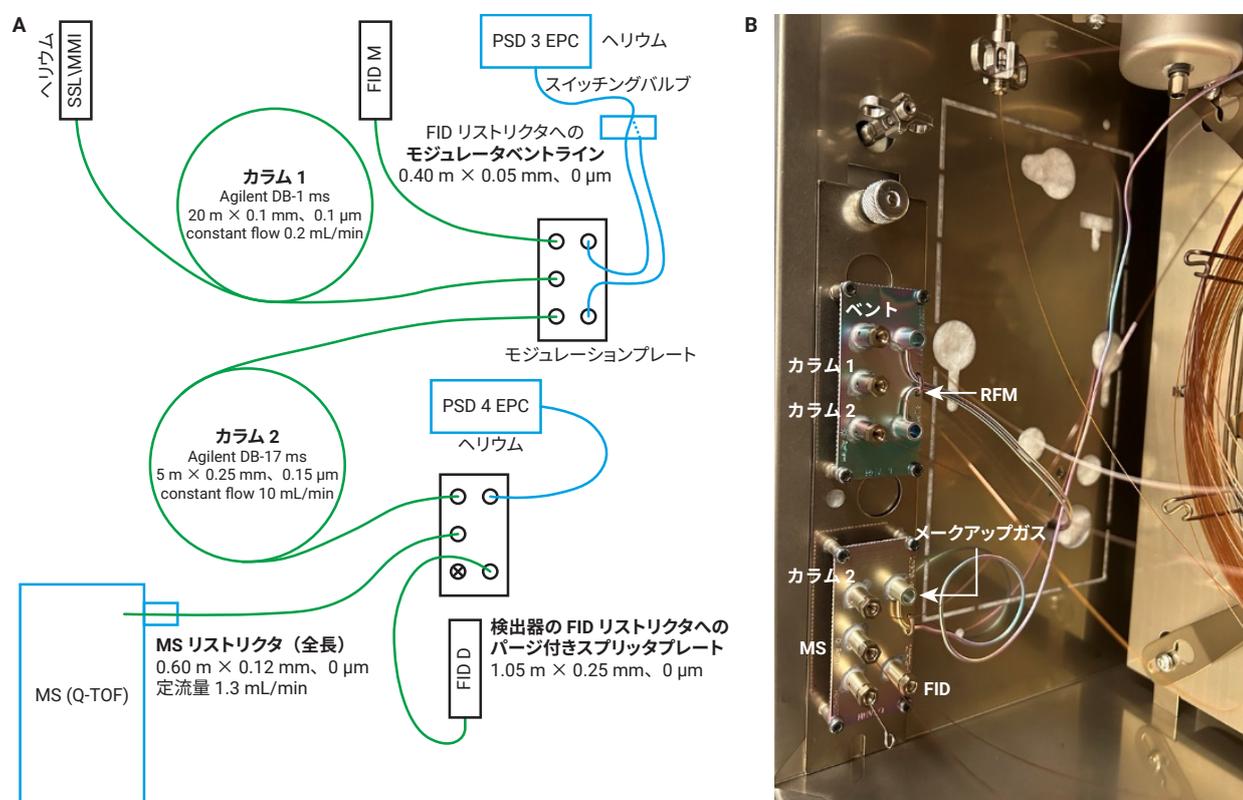


図 3. パージ付きスプリッタを含む GC x GC RFM 設定。(A) パージ付き (3 ウェイ) スプリッタ構成を使用する場合の GC x GC の図。(B) GC オープン、パージ付きスプリッタ、リバースフローモジュレーションプレートの写真

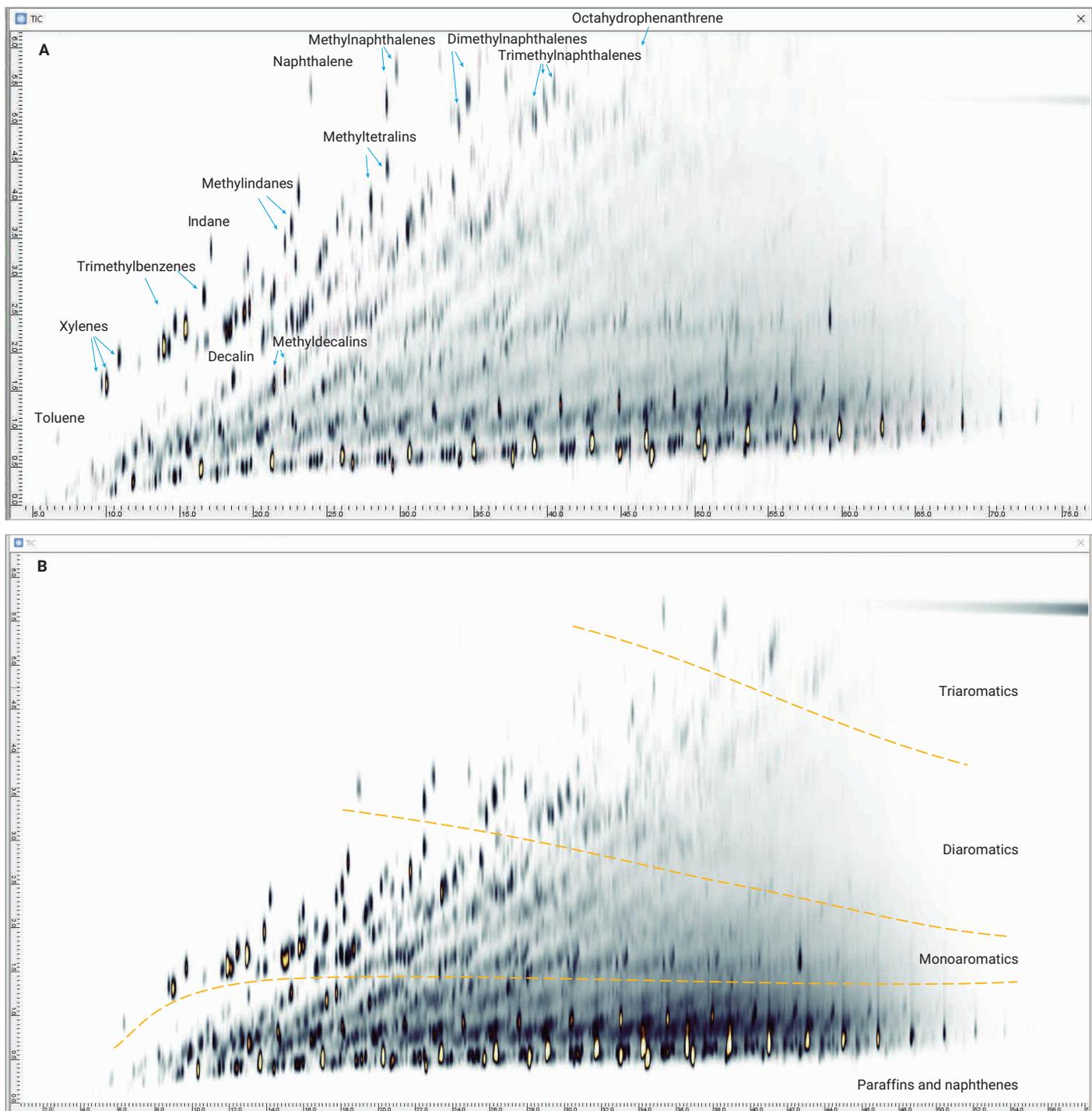


図 4. パージ付きスプリッタ設定によるディーゼル分離。モジュレーションサイクルは 6.3 秒、オープンの昇温速度は (A) が 3 °C/min、(B) が 4.5 °C/min です。

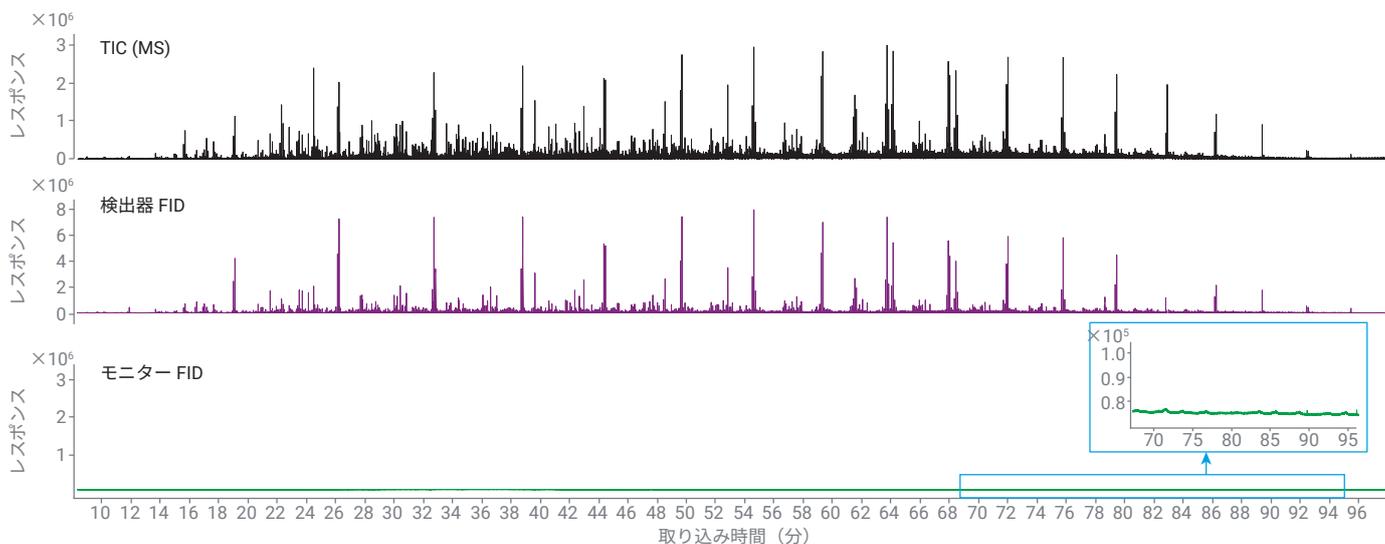


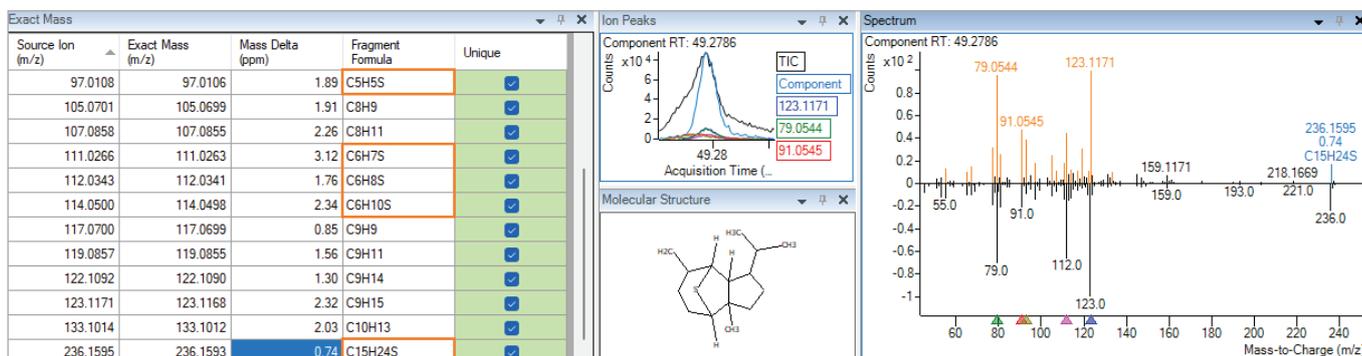
図 5. ディーゼルの例：GC/Q-TOF MS チャンネルからのトータルイオンクロマトグラム (TIC)、および末端検出器チャンネルとモニター FID チャンネルからの FID 信号

エッセンシャルオイルの組成を同定および比較するためのワークフロー

(Sigma-Aldrich より購入した) ジンジャーとジュニパーベリーのエッセンシャルオイルを、GC x GC RFM 構成のページなし/ページ付きスプリッタを用いて、GC/Q-TOF システムで分析しました。いずれの方法でも GC x GC 分離の結果は同等でした。エッセンシャルオイルの化学組成を特定するため、Unknowns Analysis ソフトウェアで NIST23 ライブラリと LRI マッチングを用いて化合物を同定しました。

化合物同定の信頼性を上げるため、Unknowns Analysis の ExactMass ツールを使用しました。このツールは、ライブラリヒットに基づいて、可能な限り小さな質量誤差範囲内で、デコンボリューションされたスペクトルから正確な質量フラグメントを割り当てることができます。このアプローチは、偽陽性が得られた場合の化合物 ID の特定/不特定確認に役立ちます (図 6)。

A α-Mintsulfide Library match score: 90.4, RI Δ 13, m/z match ✓



B n-Propylcyclohexane
Library match score: 78.2, RI Δ 5, m/z mismatch ❌

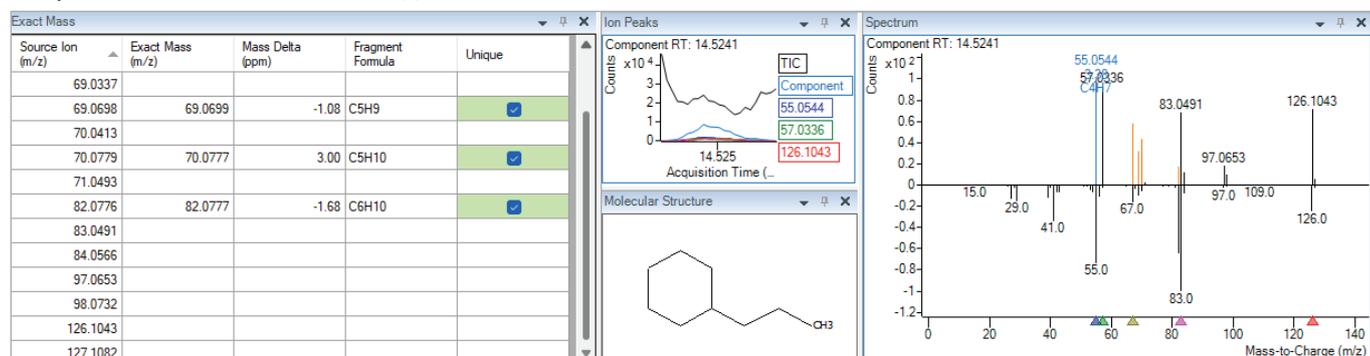


図 6. Unknowns Analysis ツールでの正確な質量情報を用いた化合物 ID の確認。Unknowns Analysis の ExactMass ツールでライブラリヒットの特定/不特定を判定できます。(A) はヒット、(B) は非ヒットです。これは、ライブラリヒットの元素組成を考慮しながら、スペクトル中の多くの精密質量フラグメントイオンに組成式を割り当てられるかどうかに基づいて決定されます。パネル A のオレンジ色の長方形では、ヘテロ原子である硫黄を含むフラグメント組成式アノテーションが表示されています。

いくつかのフラグメント組成式アノテーション (図 6A のライブラリヒットにオレンジ色の長方形で表示) には、ヘテロ原子 (この場合は硫黄) が含まれています。割り当てられたフラグメント組成式にヘテロ原子が存在するということは、同定された化合物の元素組成が正確である可能性が高いということであり、この点も重要です。

2D プロットに化合物の化学物クラスをマッピングすることで、エッセンシャルオイル中の化合物をさらに同定しやすくなりました。この GC x GC データの視覚化には、GC Image ソフトウェアを使用しました (図 7)。図 7A のとおり、化合物クラスが 2D プロットで明確にクラスターリングされており、一次元目と二次元目の特定の座標 (リテンションタイム) が化合物構造のさらなる手がかりを提供しています。

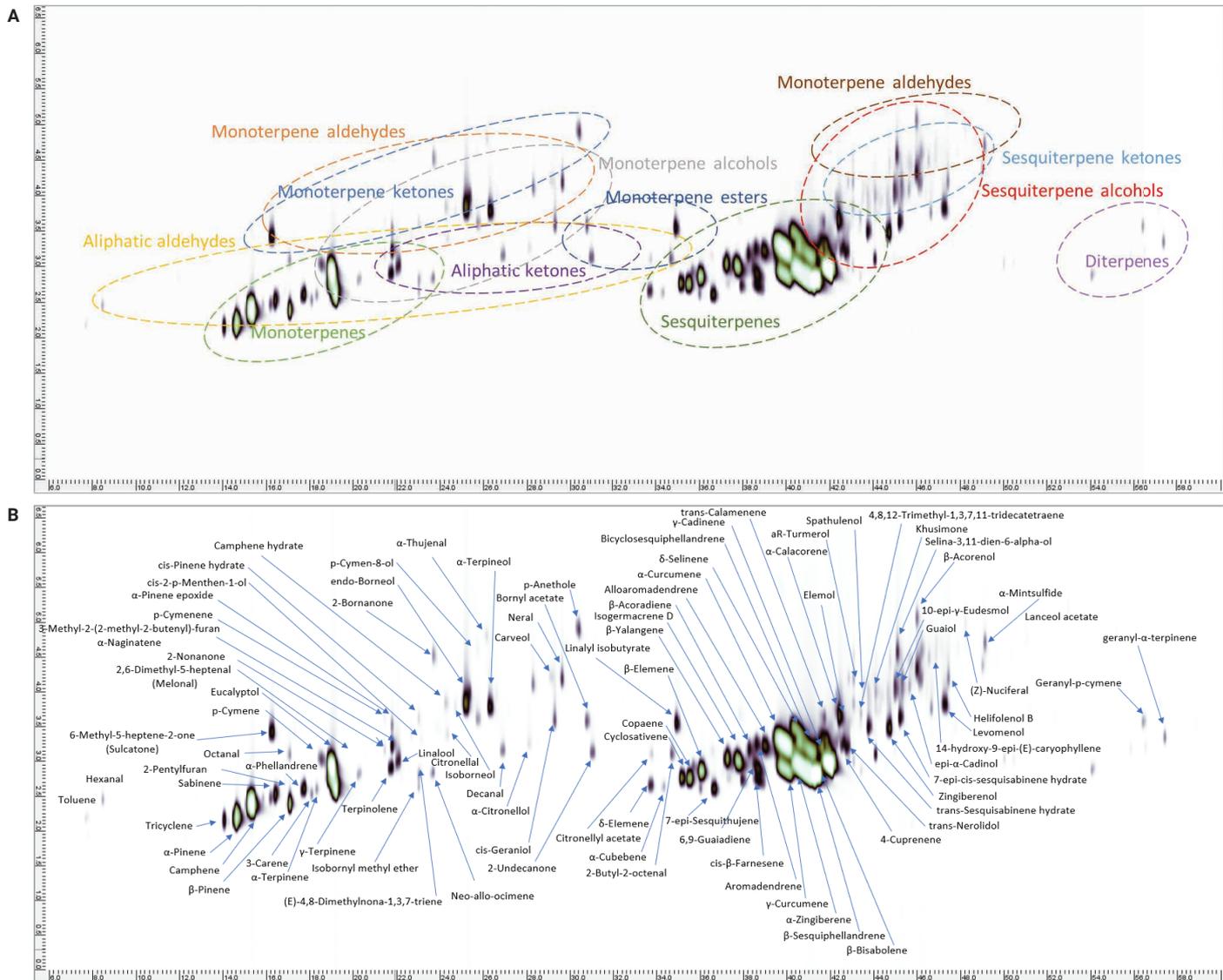


図 7. ジンジャーオイルサンプルの 2D クロマトグラムへのマッピング。(A) は化合物クラス、(B) は個々の成分を示します。モジュレーションサイクルは 6.7 秒、オープンの昇温速度は 2.5 °C/min です。

2D クロマトグラムでは、同じ垂直線上の化合物が一次元目で共溶出しています。したがって、二次元目でさらなるクロマトグラフィー分離を実行したり、別の極性カラムを使用したりしないと、これらの化合物を正確に同定することは困難です。このようなケースの例を図 8 に示します。この

図は（同じモジュレーション期間からの）3 種類のテルペノイドとそのデコンボリュートしたスペクトルを示しており、信頼性の高いライブラリ照合が可能です。

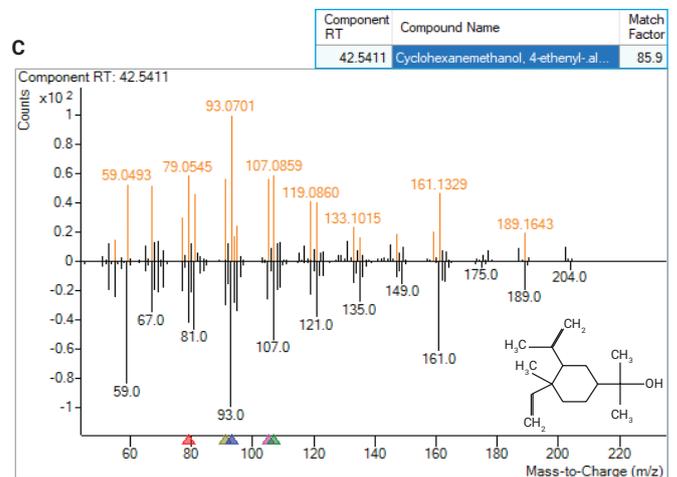
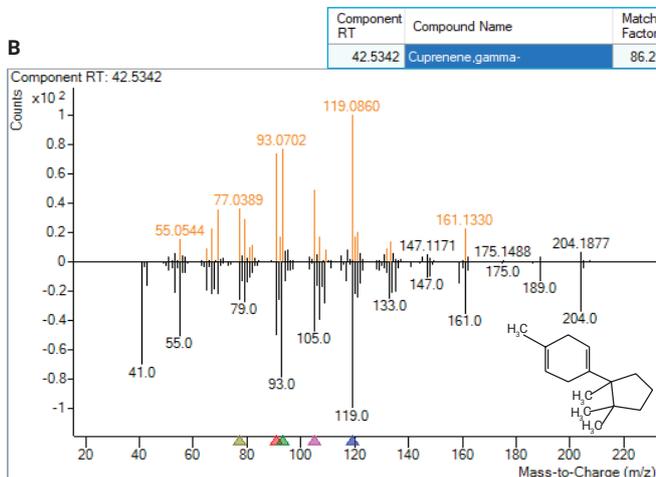
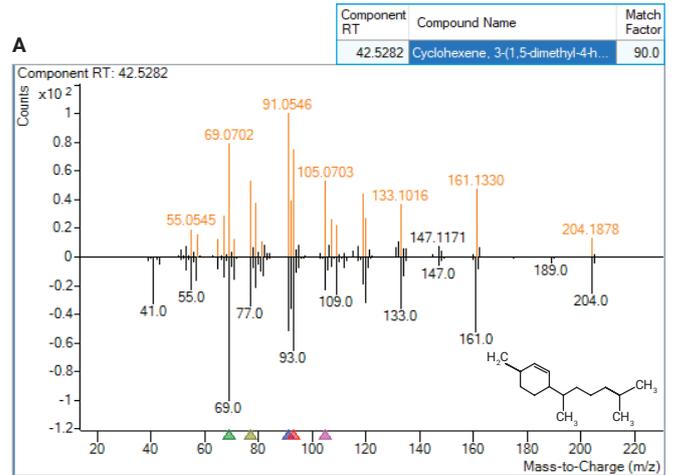
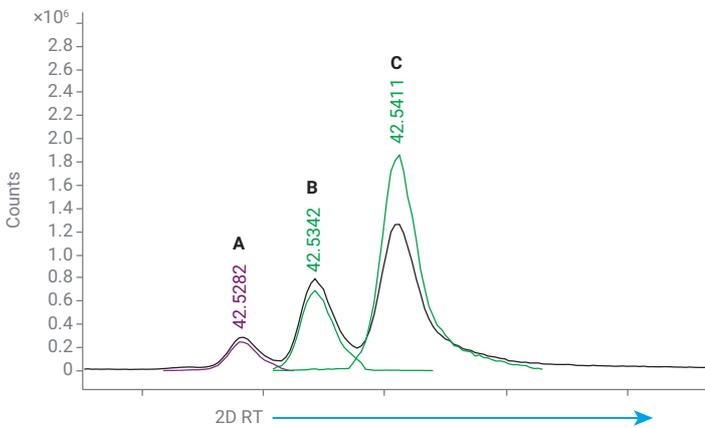


図 8. 二次元目の同じモジュレーションからのジンジャーオイルテルペノイドの分離 (A、B、C)

エッセンシャルオイルサンプルで同定された化合物クラスには、脂肪族アルデヒド/ケトン、モノテルペンおよびモノテルペンアルデヒド/ケトン/アルコール/エステル、セスキテルペンおよびセスキテルペンアルコール/ケトン、ジテルペンなどがあります。

また、この最新のアプローチでは、エッセンシャルオイルの主要成分（アルファジネギベレンなど）と微量成分（アルファ-ミントスルフィドなど）を 1 回の分析で正確に同定できました。

また GC x GC 技術の分離能により、二次元目が存在してデータ処理が複雑化しても、統計解析を行うことができました。統計解析を実行するため、化合物のアノテーションを Unknowns Analysis から化合物変換

フォーマット (CEF) ファイルとしてエクスポートし、MPP ソフトウェアにインポートしました。同じ成分ピークの複数のモジュレーションから生成された重複する成分 ID は、MPP のアライメント実行時に自動的にマージされます。

ジンジャーオイルとジュニパーベリーオイルの組成を比較するため、主成分分析 (PCA) を行いました (図 9)。ジンジャーオイルとジュニパーベリーオイルのサンプルでは、明確なクラスタリングが見られます。

図 10 のボルケーノプロットは、約 150 種類の同定された化合物について、ジンジャーオイルとジュニパーベリーオイルの間で差があることを示しています。

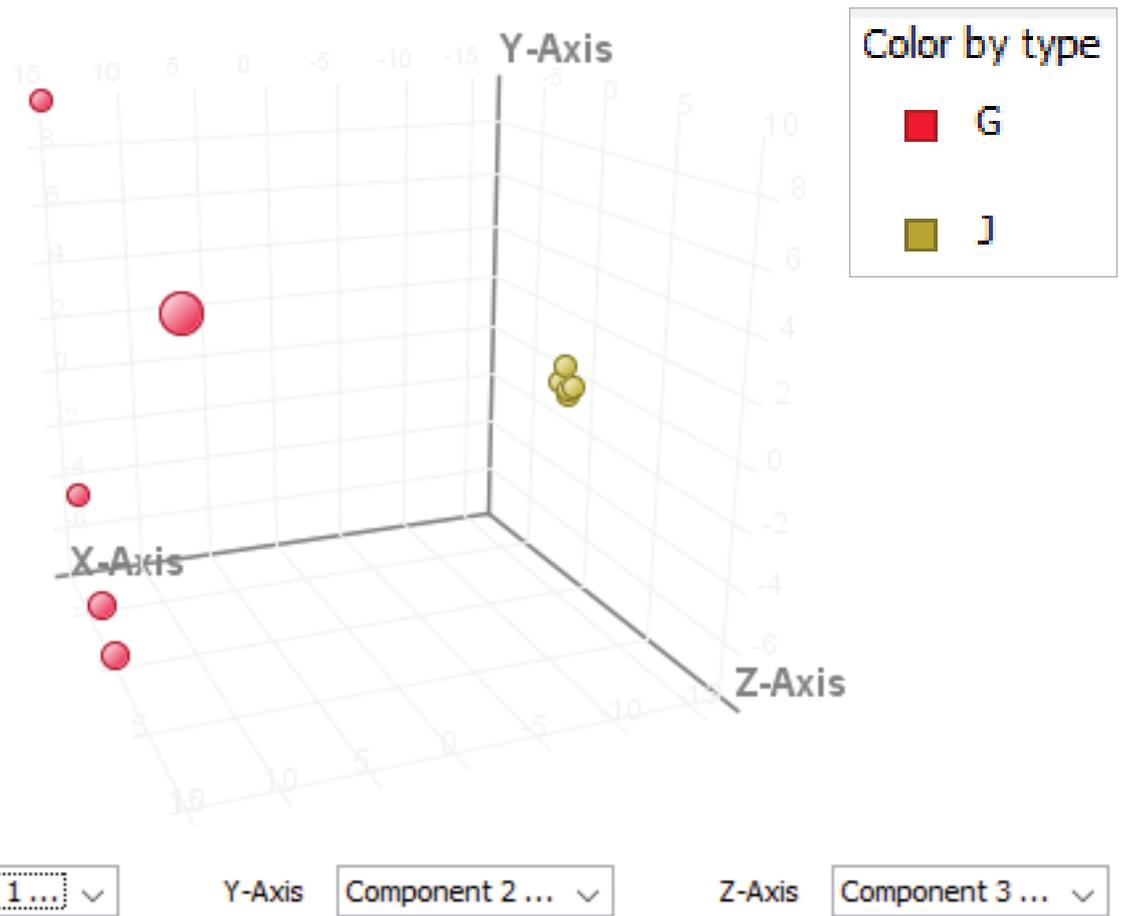


図 9. ジンジャーオイルサンプル (G) とジュンパーベリーオイルサンプル (J) の明確なクラスタリングを示す PCA プロット

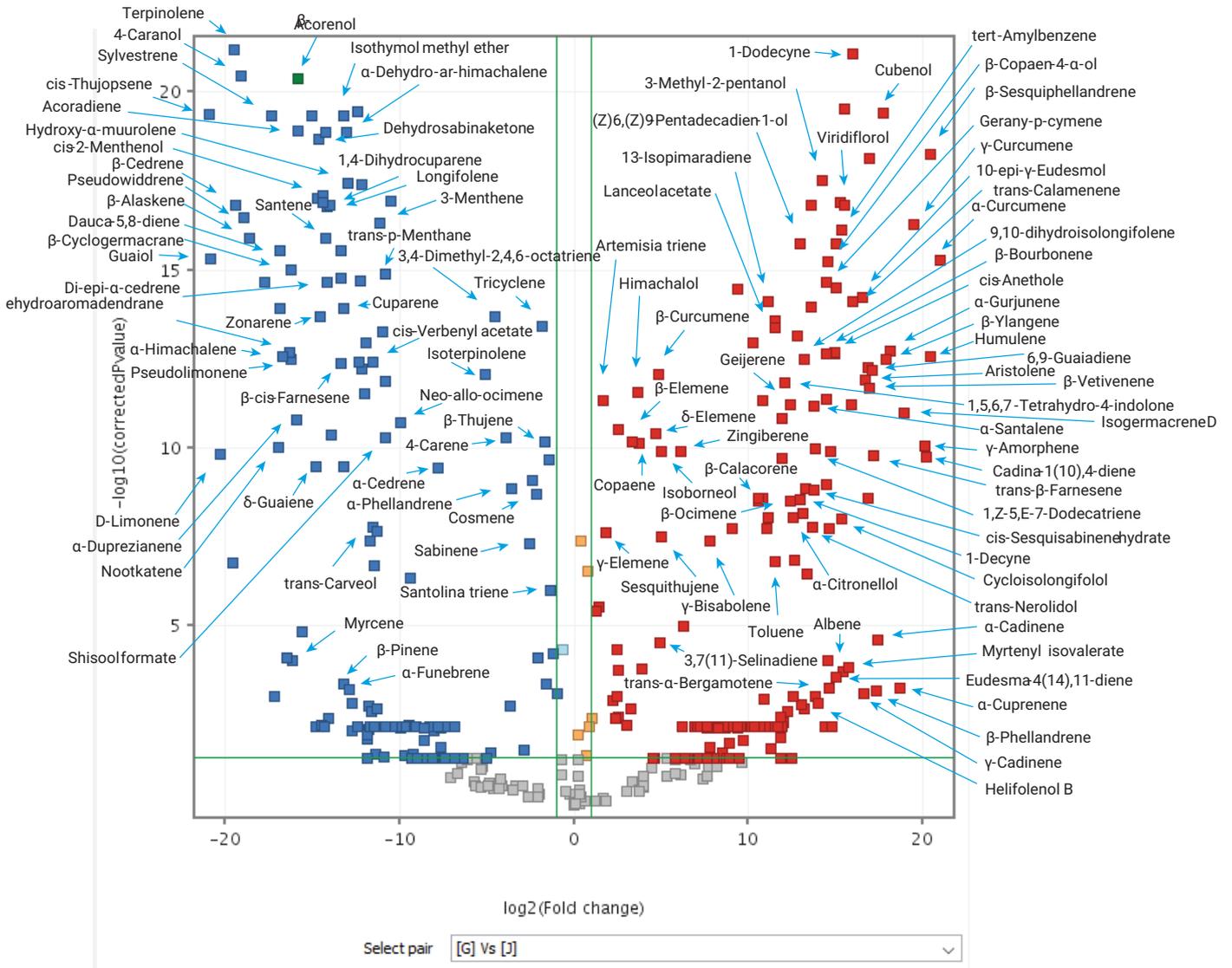


図 10. ジンジャーオイルとジュニパーベリーオイルの組成を比較するボルケーノプロット。FC 2、p 値 < 0.05 を使用しています。

結論

このアプリケーションノートでは、いくつかの包括的な GC x GC 構成とリバースフローモジュレータ (RFM)、および Agilent 7250 GC/Q-TOF の高分解能システムを用いたエッセンシャルオイルの分析メソッドを開発しました。メソッド最適化には、ディーゼルサンプルを使用しました。GC x GC で分離されたエッセンシャルオイルの成分は、Unknowns Analysis ツールで確実に同定されました。Agilent Mass Profiler Professional (MPP) ソフトウェアにより、これらのエッセンシャルオイル間の化学組成の違いを特定できました。

参考文献

1. International Organization for Standardization. ISO 9235:2013, Aromatic Natural Raw Materials - Vocabulary; ISO: Geneva, Switzerland, **2013**. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:9235:ed-3:v1:en>.
2. Murphy, R. E.; Schure, M. R.; Foley, J. P. Effect of Sampling Rate on Resolution in Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* **1998**, 70(8). DOI: 10.1021/ac971184b.
3. Agilent リバースフローモジュレータ. キャピラリ・フロー・テクノロジー; アジレント・テクノロジー技術概要, 資料番号 5994-0157JAJP, **2018**.

謝辞

このアプリケーションノートの作成には、GC Image、LLC よりご提供いただいた GC Image GCxGC Edition ソフトウェアを使用しました。心より感謝申し上げます。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

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。

DE-003420

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2025

Printed in Japan, January 30, 2025

5994-8029JAJP