

ヘッドスペースと GC/MSD を用いた 大麻中のテルペンと テルペノイド含有量の分析

7967A-8890 GC-5977 MSD

著者

Abbey Fausett,
Applications Chemist,
Agilent Technologies, Inc

はじめに

テルペンとテルペノイドは、植物種によって生成される化合物であり、自然環境に広く存在しています。この化合物の多くは花粉媒介者を引き寄せ、害虫を寄せ付けず、成長周期全体を通して適応を手助けします。¹ 化学的な観点から見れば、テルペンは炭素および水素原子で構成されており、構成単位はイソプレン (C_5H_8) サブユニットです。テルペノイドは、化学構造中に酸素を含む分子の大分類の総称です。このアプリケーションノートでは、両方の分類の化合物をテルペンと一般化して述べていますが、これらは広範囲で見ると分類の異なる 2 つの化合物です。

テルペンには特有の香りがあり、歴史的にさまざまな植物源から分離されて幅広い商業分野または治療分野で用いられてきました。² D-リモネンは、柑橘類の香りのするパーソナルケア製品または消毒剤の一般的な成分であり、ユーカリプトルは多くの治療薬中のミントのような香りに使用され、リナロールはラベンダーの香りのする製品の花の香りの主な成分です。テルペンは、大麻植物によって生成される他の物質とともに、関心の対象になっています。テルペンは通常、大麻を医療用または嗜好用に消費する人々の間で、その効果を高めるために販売されているためです。

テルペンのプロファイリングから得られた情報は、植物を商品化する最適な方法を決定するのに役立つと同時に、栽培者にとって特定の植物を栽培して管理するための貴重なフィードバックとなります。Agilent 5977A シリーズシングル四重極質量選択検出器とサンプル導入用の Agilent 7697A ヘッドスペースサンブラを含む、Agilent 8890 GC システムは、指定したサンプル中のテルペンを簡単に分離、同定、および定量できます。さらに、高度な操作経験、メンテナンス追跡、およびオンボード診断も提供しており、タッチスクリーンインターフェースまたは内蔵ブラウザインターフェースを通してアクセスできます。

実験方法

データの生成には、マルチモード注入口（MMI）、水素炎イオン化検出器（FID）、9 mm エクストラクタレンズ付き 5977 シングル四重極質量選択検出器（SQ-MSD）、および 7697A ヘッドスペースサンブラで構成される Agilent 8890 ガスクロマトグラフシステムを使用しました。データの取り込みと分析は、GC/MS MassHunter および未知化合物同定用の NIST 17 リファレンスライブラリを用いて実施しました。使用した 8890 GC は高速オープン（240 V）用に構成していますが、この実験では高度なオープン性能は必要ありません。

Restek 大麻テルペン標準を購入してイソプロパノールで希釈しました（Millipore-Sigma、> 99.5 %）。表 1 に、このメソッド開発で使用した消耗品を示します。大麻サンプルは完全蒸発手法（FET）³に従って分析し、20 mL バイアルはそれぞれ約 25 mg の粉碎した大麻の花を含むように調製しました。

複数のカラムケミストリの性能を評価しましたが、最終的には Agilent DB-HeavyWAX を使用しました。通常、WAX カラムは香料および香水業界で使用されていますが⁴、許容できる最大オープン温度により制限を受けています。HeavyWAX は Agilent WAX ポートフォリオに新しく加わった製品であり、以前の WAX オプション以上に最大動作温度が拡張されています。⁵テルペン分析の FET メソッドには溶媒が含まれていないため、分析の際にはヘッドスペースバイアル中の空気がサンプルとともに注入されます。HeavyWAX カラムは、同様の条件下でシロキサンベースのケミストリと比較して、ブリードのレベルが大幅に低くなっていました。

8890 GC では、バックフラッシュやポストカラムスプリットのような機能を追加する、キャピラリー・フロー・テクノロジー（CFT）デバイスが使用できます。8890 GC は、ニューマティクス切り替えデバイス（PSD）をパージ付きスプリッタに接続して構成し、カラムからの溶出物を FID と MSD の間でそれぞれ 3:1 の比で

分割しました。パージ付きスプリッタに含まれている CFT カリキュレータで計算を支援することができますが、データ収集に使用したリストリクタの正確なサイズを図 1 に示します。表 2、3、および 4 に、詳細の機器設定値を示します。

表 1. テルペン分析に使用した消耗品

説明	部品番号	他社製品の部品番号
大麻テルペン標準		Restek : 34095、34096
20 mL クリンバイアル/キャップ	5188-2753	
高性能グリーン注入口セプタム（緑色）	5183-4761	
ウール入りウルトライナート低圧力損失注入口ライナ	5190-2295	
Agilent DB-HeavyWAX カラム	122-7133	
エクストラクタライオン源用大口径レンズ（9 mm）	G3870-20449	

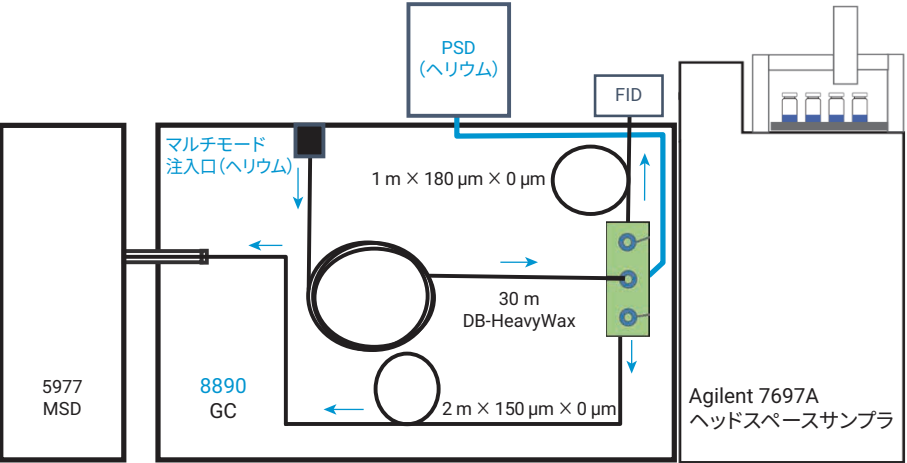


図 1. テルペン分析における検出器スプリットのカラム構成

表 2. テルペン分析における Agilent 8890 ガスクロマトグラフ条件

Agilent 8890A GC パラメータ	
注入口タイプ	MMI
注入口モード	スプリット、100:1
注入口温度	175 °C
注入口圧力	25.8 psi
セブタムパージ	3 mL/min
ガスセーバ	20 mL/min (3 分後)
PSD 圧力	4.85 psi
PSD パージフロー	5 mL/min
MSD トランスファライン	275 °C
GC 分析時間	17.1 分
キャリアガス	ヘリウム
カラム 1	Agilent DB-HeavyWAX、122-7133
カラムサイズ	30 m × 250 µm × 0.5 µm
カラムモード	1.95 mL/min、定流量
オープン平衡化時間	2.5 分
オープンプログラム	50 °C (0.75 分間保持)
5 °C/min で昇温	80 °C (0 分間保持)
30 °C/min で昇温	240 °C (5 分間保持)
FID 温度	300 °C
FID 空気	400 mL/min
FID 水素	30 mL/min
FID メークアップ (N ₂)	15 mL/min

表 3. 分析における Agilent 5977A (エクストラクタ) 条件

MSD 条件	Agilent 5977-SQMSD
イオン源	エクストラクタ、9 mm レンズ
高真空ポンプ	パフォーマンスターボ
モード	スキャン
範囲	45 ~ 450 <i>m/z</i>
スレッシュホールド	50
チューンアルゴリズム	Etune
イオン源温度	325 °C
四重極温度	200 °C

表 4. 分析における Agilent 7697A ヘッドスペース サンプラ条件

ヘッドスペース条件	Agilent 7697A - HSS
加圧ガス	ヘリウム
ループサイズ	1 mL
オープン温度	110 °C
ループ温度	120 °C
トランスファライン温度	150 °C
バイアル平衡化時間	10 分
注入時間	0.5 分
充填圧力	20 psi
ループ最終圧力	12 psi
ループ平衡化時間	0.1 分

Restek 参照標準をイソプロパノールで希釈して標準溶液を前処理してから、シリンジを用いてヘッドスペースバイアルに移し、分析を実施しました。分離および再現性に対する溶媒の影響を考察するために、2 つの前処理メソッドを評価しました。最初のメソッドでは、濃度が同じで容量が異なる (0.1 ~ 1,000 µL) 標準を各バイアルに添加し、2 番目のメソッドでは、濃度が異なる固定容量の標準を各バイアルに添加しました。

ヘッドスペースバイアルに添加した溶媒の量はクロマトグラフィーに影響を与えており、容量を変えた前処理手法では顕著なリテンションタイムのシフトが観察されました。一定量で複数の濃度の標準を用いて同じキャリブレーション範囲を評価した場合、リテンションタイムは安定していました。結果的に、各ヘッドスペースバイアルで 10 µL の標準を目標にして、新しい標準溶液を前処理しました。

多数のテルペンリストには、モノテルペンと呼ばれるいくつかの構造異性体が含まれています。これらの化合物は分子式が C₁₀H₁₆ であり、他のフラグメントに加えて *m/z* 93、121、136 の主要なフラグメントが含まれています。このようにパターンが類似しているため、ライブラリスpekトルのみを用いた同定は困難になります。標準の非極性カラムでは多数のモノテルペンが完全に特性解析されており、特定のリテンションインデックス (RI) 値が得られています。この値は、一連の直鎖アルカンに対してリテンションタイムを比較した値です。⁶DB-HeavyWAX では、参照に対するリテンションインデックスはまだ確立されていません。この実験では、単一成分の参照標準を購入して分析し、溶出順序を同定しました。表 5 に、化合物名、ベンダー、および部品番号を示します。

表 5. DB-HeavyWAX でのモノテルペンの同定に使用した個別の成分標準

化合物名	ベンダー	部品番号
γ-テルピネン	Supelco	CRM40431
テルピノレン	Supelco	CRM40929
β-ピネン	Supelco	CRM40433
+3-カレン	Supelco	CRM40416
α-テルピネン	Supelco	CRM40443
α-ピネン	Supelco	CRM40339

結果と考察

使用可能な直線範囲を決定するために、5 ~ 2,500 ng の範囲の 9 点による検量線を前処理して分析しました。20 mL バイアルを 10 µL の調製済み標準溶液で前処理してから、蓋をしてヘッドスペースオートサンブラにロードしました。キャリブレーション質量は、5、10、25、50、100、250、500、1,000、および 2,500 ng です。図 2 に、クロマトグラムの例を示します。また、表 6 に、定量範囲、関連情報、および曲線の精度を示します。

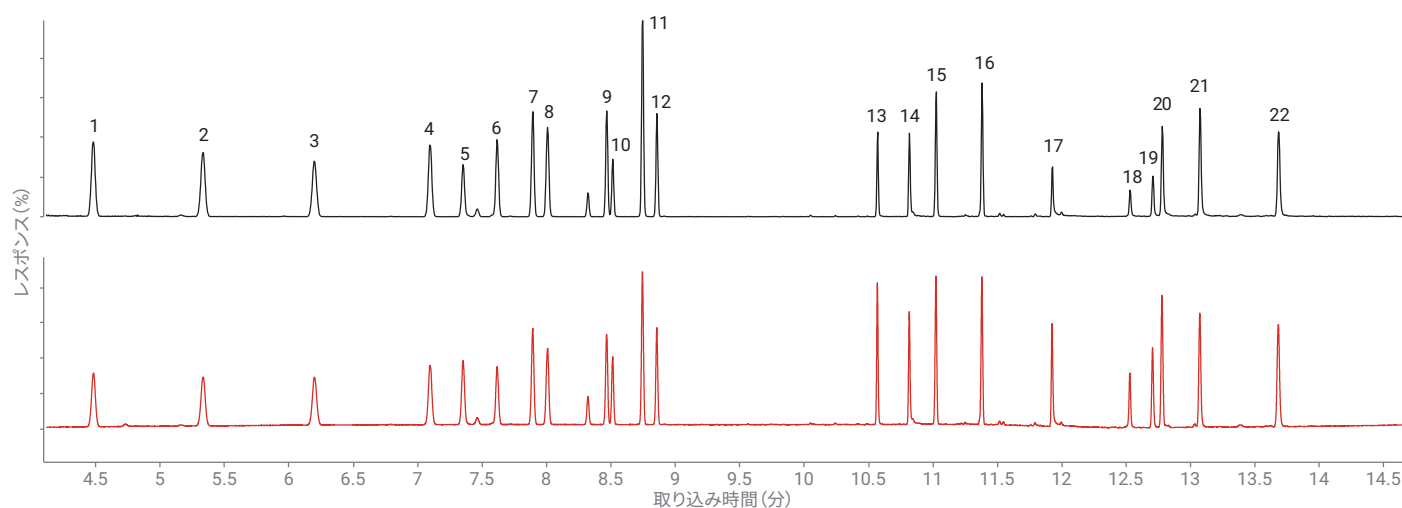


図 2. 標準溶液のトータルイオンクロマトグラム（黒色）と FID クロマトグラム（赤色）

表 6. 化合物リスト、リテンションタイム、MSD および FID 信号のキャリブレーション情報

ピークイン デックス	化合物名	リテンションタイム (分)	MSD 最小 キャリブレーション ポイント (ng)	MSD 最大 キャリブレーション ポイント (ng)	MSD 相関係数 (R ²)	MSD QC 精度 (750 ng)	FID 最小 キャリブレーション ポイント (ng)	FID 最大 キャリブレーション ポイント (ng)	FID 相関係数 (R ²)	FID QC 精度 (750 ng)
1	α-ピネン	4.484	5	2,500	0.998	96.5 %	5	2,500	0.999	98.9 %
2	カンフェン	5.330	5	2,500	0.997	97.9 %	25	2,500	0.999	96.8 %
3	β-ピネン	6.201	5	2,500	0.998	97.8 %	25	2,500	0.995	98.3 %
4	3-カレン	7.095	5	2,500	0.998	97.4 %	25	2,500	0.999	97.3 %
5	β-ミルセン	7.352	5	2,500	0.998	93.6 %	50	2,500	0.998	95.7 %
6	α-テルピネン	7.615	10	2,500	0.998	95.5 %	25	2,500	0.997	97.7 %
7	D-リモネン	7.895	5	2,500	0.999	93.8 %	25	2,500	0.998	97.2 %
8	ユーカリプトル	8.008	10	2,500	0.999	96.3 %	10	2,500	1.000	99.5 %
9	Γ-テルピネン	8.467	5	2,500	0.999	97.3 %	10	2,500	0.999	96.6 %
10	β-オシメン	8.513	10	2,500	0.998	97.2 %	10	2,500	0.998	96.7 %
11	P-シメン	8.747	5	2,500	0.998	96.5 %	5	2,500	0.998	96.9 %
12	テルピノレン	8.855	10	2,500	0.999	97.1 %	10	2,500	0.998	98.2 %
13	リナロール	10.571	5	2,500	0.999	100.9 %	5	2,500	0.998	97.8 %
14	イソプレゴール	10.818	50	2,500	1.000	95.2 %	25	2,500	0.997	98.4 %
15	カリオフィレン	11.022	5	2,500	0.997	95.9 %	5	2,500	0.997	99.4 %
16	フムレン	11.381	5	2,500	0.997	94.9 %	10	2,500	0.997	99.6 %
17	ゲラニオール	11.924	5	2,500	0.996	100.4 %	10	2,500	0.999	104.3 %
18	ネロリドール 1	12.5347	10	2,500	0.996	94.0 %	25	2,500	0.997	100.0 %
19	ネロリドール 2	12.705	10	1,000	0.995	97.6 %	25	2,500	0.997	99.1 %
20	カリオフィレンオキシド	12.784	25	2,500	0.999	91.2 %	5	2,500	1.000	102.0 %
21	グアイオール	13.072	5	2,500	0.999	93.2 %	10	2,500	0.997	100.2 %
22	α-ビスパロール	13.682	5	2,500	0.996	93.3 %	5	2,500	0.996	103.5 %

MSD のキャリブレーション制限値は、選択した定量メソッドにより影響を受けます。これらのデータは、定量イオンにより定量し、定性イオンにより確認をしました。追加の定量メソッドの例として、トータルイオンクロマトグラムの積分、定量および定性イオンのピーク面積の合計算出、トータルイオンクロマトグラムレスポンスの使用があります。

FID のキャリブレーション範囲は、ピークの S/N 比が 3:1 になるようにして決定しました。システムのガスと消耗品に汚れないとすると、報告された FID 値は予想した FID 性能に対して妥当な値です。

一部の化合物に対してさらに低いレベルの検出が必要な場合は、システムの構成を変更せずに注入口スプリット比を減少できます。これで改善されない場合は、別の検出器スプリットを算出するか、または検出器スプリットを完全に取り除いてカラムを直接 1 つの検出器に接続することにより、MS/FID スプリットを変更できます。

適切なキャリブレーション範囲を決定してから、大麻サンプルを処理しました。テルペンプロファイルの信頼性を向上させるために、サンプルを収穫してから分析するまで温度制御する必要があります。理想的には、乾燥させた花の材料を氷点下で保管します。評価したサンプルでは品種情報が得られなかったため、参照は使用できません。

一部の大麻品種には 100 を超える化合物が含まれていると予想されるため、サンプルを適切に特性解析するには追加の標準が必要です。同定用のより多くの参照を構築するためのメソッドに対する分析に使用できる標準はいくつかあります。比較のために、33-化合物 Supelco テルペン標準混合セット (p/n CRM40755(A) および CRM40937(B)) を購入して分析しました。図 3 では、Restek 標準、Supelco 標準、2 つの大麻サンプルのトータルイオンクロマトグラムを重ね表示しています。これら 2 つのサンプルでは、10 ~ 12 分の範囲に Restek 標準には存在していない多数のピークが存在しているため、2 番目の標準の追加情報を得ることが有用になる場合があります。図 4 と 5 では、4 ~ 8 分および 10 ~ 13 分の拡大図を重ね表示しています。図 4 は、予想された初期に溶出するモノテルペンが両方の品種に存在しているが、量は異なることを示しています。これらの拡大重ね表示には、D-リモネンの主成分付近 (7.8 分) に情報を示すピークも存在しています。これは、DB-HeavyWAX カラムによって分離が改善された例です。小さいピークを適切に分離することにより、サンプルをより詳細に特性解析できるようになります。図 5 で拡大されている部分は、いずれの標準にも存在しないピークを含む、クロマトグラムの別の領域を示しています。各サンプルの未知のピークは、NIST 17 ライブラリスペクトルと MassHunter Qualitative Analysis を用いて同定しましたが、多数のピークの大部分はマッチファクターが 90 を超えていました。

自動化デコンボリューションを用いたより包括的な特性解析を実施するために、MassHunter Unknowns Analysis を用いて大麻サンプル A を処理しました。図 6 に、Unknowns Analysis の画面を示します。このツールを用いることにより、ピークの同定とデコンボリューション用のフィルタがメソッドに組み込まれ、サンプルに関する自動検索プログラムが実行されます。使用した 2 つの標準には合計で 37 の化合物が含まれており、これは高アバンドンスの一般的なテルペンを網羅しています。しかし、MassHunter Unknowns Analysis を用いた場合、大麻サンプル A と B に関して 41 および 78 の化合物が簡単に同定できました。Unknowns Analysis は、MSD が収集したスキャンデータに対応しています。

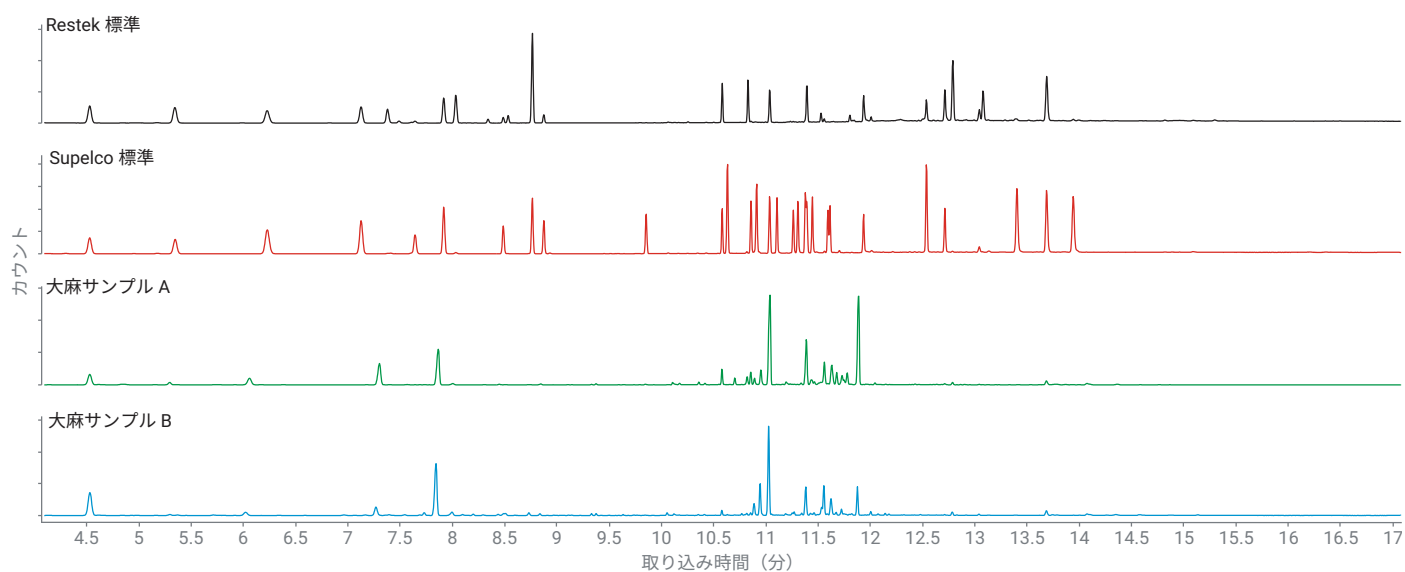


図 3. 2 つの異なる大麻と Restek および Supelco 標準のトータルイオンクロマトグラム

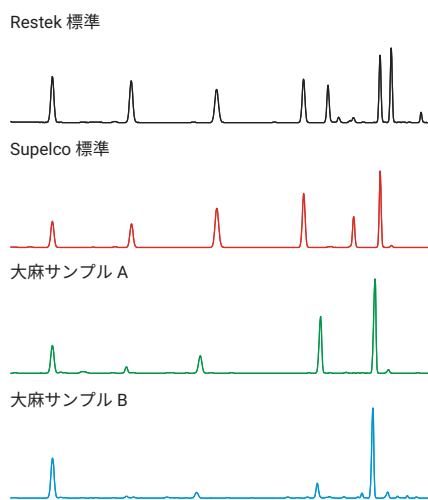


図 4. 4 ～ 8 分の時間範囲の拡大図。α-ピネン、β-ピネン、3-カレン、β-ミルセン、および D-リモネンは両方の大麻サンプルに存在しています。

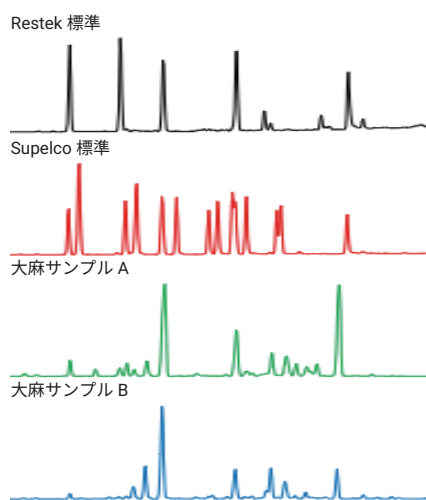


図 5. 10 ～ 13 分の時間範囲の拡大図。この領域では、Agilent DB-HeavyWAX による分離が優れていました。いずれの標準とも一致しない複数の化合物が、1 つのサンプルまたはもう 1 つのサンプルに存在しています。

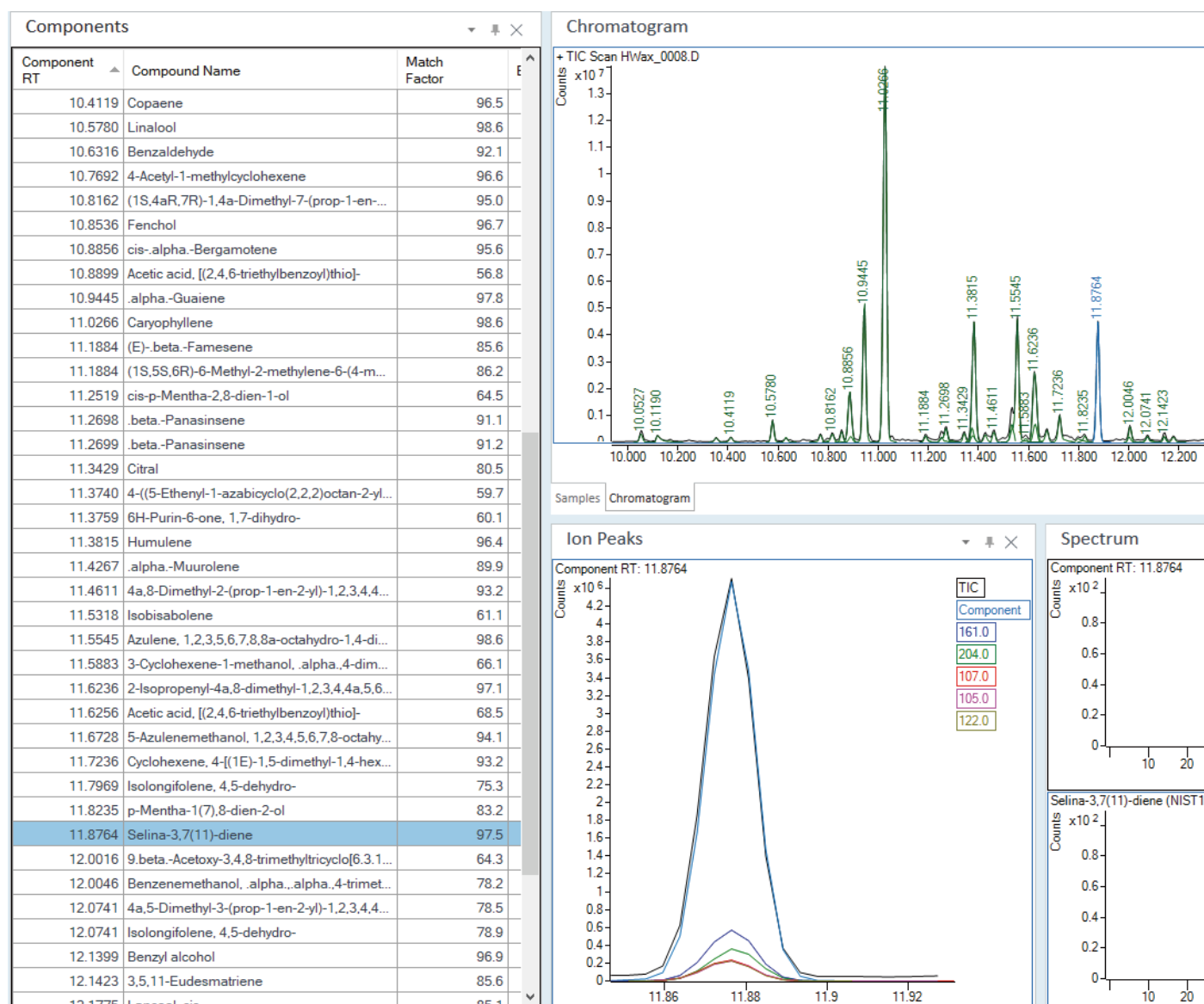


図 6. サンプル A を Unknowns Analysis で処理した際の画面

結論

2つの異なる大麻サンプルのテルペンプロファイルを、Agilent 8890 GC と 7697A ヘッドスペースオートサンプリング導入、パージ済み CFT スプリッタと PSD、および FID/MSD を組み合わせた信号収集を用いて分析しました。Agilent MassHunter バージョン 10 では、Unknowns Analysis を用いたスクリーニングワークフローに有用な新しいプラットフォームが導入されています。Agilent DB-HeavyWAX カラムは今回の結果を得るための重要な要素であり、17 分未満でサンプルを効率的に分離しています。

サンプルの特性解析はワークフローにとって重要であり、質量分析では、ライブラリ照合やデコンボリューションなどのツールを組み込むことにより一歩進んだ環境が実現します。ワークフローの目標は既知の化合物を定量することですが、FID により低コストで分析を実施し、リテンションタイムの二次参照としてリテンションインデックス照合のようなツールを使用できます。選択した検出器に関係なく、最適な分離を実行することにより、生成したデータの信頼性が向上します。2つの手法を1つのメソッドに組み合わせることにより、単一システム上で FID と MSD の両方の強みが活かされます。

8890A GC では、使いやすいメンテナンスカウンタ、豊富なトラブルシューティングツール、およびリモートアクセスが可能な内蔵ブラウザインタフェースを組み込むことにより、アジレントの従来の堅牢なサンプル分析機能を拡張しています。革新的な DB-HeavyWAX カラムにより、従来の WAX ケミストリよりも高温が実現できるため、テルペンの分離が改善されています。テルペンをプロファイリングする際に重要な考慮事項は、分離を最適化すること、サンプル温度を保持すること、複数の参照標準を使用することです。大麻ベースの製品の研究と商品化が進む中で、アジレントはテルペン分析用の包括的かつ堅牢なシステムを提供していきます。

参考文献

1. Singh, B.; Sharma, R. A. Plant Terpenes: Defense Responses, Phylogenetic Analysis, Regulation and Clinical Applications. 3 Biotech **2015**, 5(2), 129–151. doi:10.1007/s13205-014-0220-2
2. Lockwood, G.B. Techniques for Gas Chromatography of Volatile Terpenoids from a Range of Matrices. Journal of Chromatography A. November **2001**, 936(1-2), 23–31.
3. Hilliard, C.; Rigdon, A. et al. A Fast, Simple FET Headspace GC-FID Technique for Determining Residual Solvents in Cannabis Concentrates. <https://www.restekgmbh.de/aktuelles/fast-simple-fet-headspace-gc-fid-technique-determining-residual-solvents-cannabis>
4. Zou, Y. Agilent J&W DB-WAX ウルトライナートキャピラリー GC カラムによるラベンダーオイルの分析 (Lavender Oil Analysis Using Agilent J&W DB-WAX Ultra Inert Capillary GC Columns) . Agilent Technologies, publication number 5991-6635JAJ, **2016**
5. Abercrombie, V.; Provoost, L. Agilent J&W DB-HeavyWAX カラムの熱安定性および最高温度の向上 (Increased Thermal Stability and Maximum Temperature of the Agilent J&W DB-HeavyWax column) . Agilent Technologies, publication number 5991-9035JAJ, **2018**
6. The Kováts Retention Index System. Analytical Chemistry, **1964**, 36 (8), 31A-41A DOI: 10.1021/ac60214a727

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

アジレントの製品および溶液は、大麻の品質管理および安全性試験の目的のために、州/国の法律で許可されているラボでの使用を想定しています。

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. 2020
Printed in Japan, May 26, 2020
5994-1497JAJ
DE.519444444