

ガスクロマトグラフ飛行時間質量分析計を用いた アルコール分析の測定条件最適化に関する検討

○中野真紘^{A)}、小川直也^{A)}、沢田義治^{A)}、尾山公一^{B)}

^{A)} 分析・物質技術支援室 組成分析・構造解析技術グループ

^{B)} 分析・物質技術支援室

概要

生命農学研究科の質量分析室に設置されている日本電子(株)社製の高性能ガスクロマトグラフ飛行時間質量分析計(JEOL, JMS-T2000GC AccuTOF™ GC-Alpha)を用いて、1 級から 3 級までのブタノールを用いた単一成分の分析およびヘッドスペース(HS : Head Space)法による市販のレモングラスティー飲料の香気の多成分分析を行った。ブタノールの分析では、構造異性体の違いによるガスクロマトグラフ(GC)の保持時間の違いやフラグメンテーションの差異に着目して解析を行った。レモングラスティーの香気成分の分析では、統合解析および AI 構造解析を用いて含有成分の構造推定を行った。

1 はじめに

質量分析では、測定化合物の分子量や分子構造によって適切なイオン化方法を選ぶ必要があり、測定化合物に応じたイオン化方法の選択は極めて重要である。また、試料の分離と導入方法も重要なファクターになるが、これらを選択する際にも分子量や分子構造の情報が重要になる。本報告では、EI (Electron Ionization : 電子イオン化)法および FI (Field Ionization : 電界イオン化)法を用いて低分子有機化合物をターゲットにした質量分析を行った。試料の分離には、ガスクロマトグラフ(GC)を使用し、測定試料には、ブタノールと市販のレモングラスティー飲料を用いた。1 級から 3 級までのブタノールを用いた単一成分の分析では、液体注入法により試料を導入し、GC の保持時間の違いやフラグメンテーションの差異に着目して解析を行った。市販のレモングラスティー飲料の香気の多成分分析では、HS 法により試料を導入し、統合解析および AI 構造解析を利用して含有成分の構造推定を行った。統合解析において特定できなかったアルコールについては、AI 構造解析および標準試料を用いた実際の測定を行うことで化合物の特定が可能になった例を報告する。

まず、質量分析の概要について説明する。質量分析とは、物質を構成する分子(または原子)の質量を計測する手法である。具体的には、無機または有機化合物をイオン化し、 m/z で分離して各々の m/z のイオン量を測定することで、定性および定量分析を行う。得られるマススペクトルからは分子構造に関する情報を得ることができるため、測定試料の分子構造を推定することができる。

次に、本報告で使用した装置であるガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)の概要を説明する。GC-MS は、ガスクロマトグラフ(GC)と質量分析計(MS)を連結させた複合分析装置である。GC で固体もしくは液体の混合物中の揮発性成分を分離した後、MS でイオン化ならび m/z に応じて分離し、検出させることにより得られるマススペクトルから分子構造を推定する。GC-MS は、有機化合物の合成確認、大気環境測定、食

品中の香気成分および微量農薬の確認などの幅広い分野で使用されている。

本報告で使用した装置の外観および仕様をそれぞれ図 1 および表 1 に示す。また、GC に付属するオートサンプラー2850T (HTA S.R.L (BS, Italy))を使用すると、液体注入法に加えて、HS 法および自動固相マイクロ抽出(SPME : Solid Phase Micro Extraction^[1])法による試料導入が可能である。HS 法および SPME 法は、固体もしくは液体の測定試料を入れ密封したバイアル瓶をオートサンプラー付属のオープンで加熱することにより、測定試料から揮発性成分を抽出させ、それらを注入する方法である。HS 法では、試料をバイアル瓶に入れ密封した際の上部の空間(HS : Head Space)に移動した分析種を GC に導入する。一方、SPME 法では、ファイバーにコーティングされた固定相に HS 部にある分析種を吸着・分配させる方法であり、濃縮効果がある。



図 1. 分析装置の外観

表 1. 質量分析計の仕様

イオン化法	EI / FI / FD
質量範囲	m/z 4 - 6,000
最高分解能	30,000
質量精度	1 ppm (内部標準)
試料導入	GC / 直接導入 (DEP / DIP / FD)

2 構造異性体を持つアルコール類の分析

2.1 測定試料

ブタノール(butanol : $C_4H_{10}O$)は、無色透明の液体で複数の構造異性体を持つアルコールである。本検討では、1 級から 3 級までの 3 種類のブタノールの構造異性体(*n*-butanol , 2-butanol , *tert*-butanol)を測定試料とした。測定試料は、溶媒である THF(tetrahydrofuran)中に体積比 1 %となるように溶解し、測定に供した。

2.2 測定条件

GC および MS の測定条件を以下に記載する。

GC : 8890 GC (Agilent Technologies)、カラム : DB-WAX UI (30 m × 0.25 mm , 0.25um , Agilent Technologies)、オープン : 40 °C (5 min) - 20 °C / min - 140 °C - 50 °C / min - 240 °C (5 min)、キャリアガス : He (1.0 mL / min)、注入口温度 : 230 °C、注入方式 : Split (100 : 1)

MS : JMS-T2000GCAccuTOF™ GC-Alpha(JEOL)、イオン化温度 : 230 °C、イオン化モード : EI (70 eV)、mass range : m/z 25 – 300

2.3 測定結果

TICC および各時間におけるマススペクトルを図 2 に示す。TICC では、GC の昇温に伴い、沸点の低い順に、*tert*-butanol (RT = 3.02 min, bp. 82 °C)、2-butanol (RT = 5.63 min, bp. 100 °C)、*n*-butanol (RT = 7.70 min, bp. 118 °C)の検出を確認した。分子の表面積が小さいほどクロマトグラフィーとの相互作用が小さくなり、保持時間が短くなると考えられ、これは 1 級から 3 級の順に保持時間が短くなっていることと一致する。また、RT = 12.5 では、溶媒の THF に安定化剤として添加されている BHT(di-*tert*-butyl-4-methylphenol)のピークを

確認した。RT = 5.63 min の 2-butanol のピークに肩ができてテーリングしているのは、保持時間の遅い *n*-butanol との相互作用の影響であると推測している。マススペクトルでは、各化合物において異なるフラグメンテーションを示した。2-butanol および *n*-butanol では、親イオンの検出が確認できたが、*tert*-butanol では親イオンの検出は確認できなかった。これは、多置換のアルコールほどヒドロキシ基が脱離した後に生成するカチオンが安定であることに起因するためと考えられる。それぞれのブタノールのスペクトルの最も強度の大きいフラグメントイオンピークは、*tert*-butanol が $m/z = 59.04902$ 、2-butanol が $m/z = 45.03334$ 、*n*-butanol が $m/z = 56.06178$ であった。また、各スペクトルでは、共通のフラグメントピークがある一方、フラグメントピークパターンおよびピーク強度は異なることが確認できた。これは、構造異性体であってもフラグメントピークパターンとピーク強度は化合物の分子構造に強く依存しているためであると考えられる。

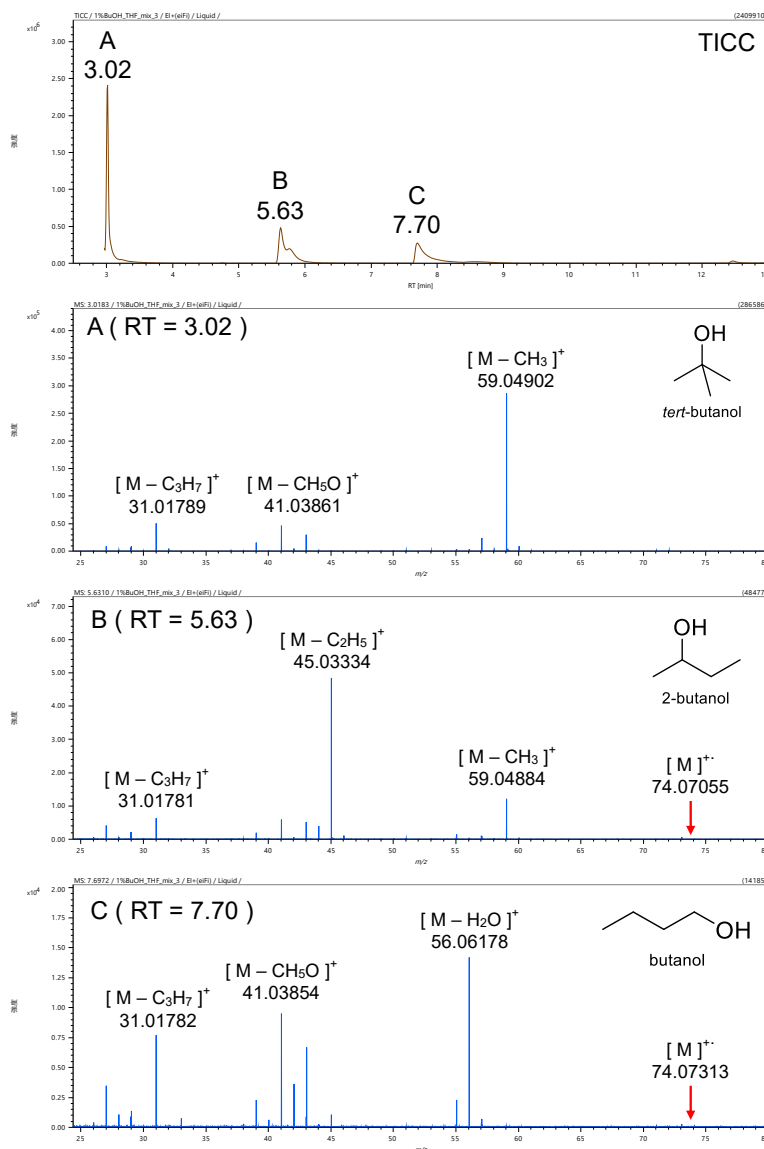


図 2. 3 種類のブタノールの測定結果

3 HS 法による香気成分の分析および測定結果の解析

3.1 測定試料

市販のレモンガラスティー飲料のうち 5 mL を 20 mL のバイアル瓶に入れ、アルミ製のキャップで密封した。これをオートサンプラー付属のオープンを用いて 60 °C で 5 分間加熱し、HS 部の 1 mL を測定に供した。

3.2 測定条件

GC および MS の測定条件を以下に記載する。

GC : 8890 GC (Agilent Technologies)、カラム : DB-WAX UI (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm, Agilent Technologies)、オープン : 40 °C (1 min) - 20 °C / min - 100 °C - 10 °C / min - 180 °C - 20 °C / min - 240 °C (5 min)、キャリアガス : He (1.0 mL / min)、注入口温度 : 230 °C、注入方式 : Split (100 : 1)

MS : JMS-T2000GCAccuTOF™ GC-Alpha (JEOL)、イオン化温度 : 250 °C、イオン化モード : EI (70 eV), FI, mass range : m/z 25 – 500

3.3 データ解析

日本電子(株)が提供している JMS-T2000GC 専用の未知物質構造解析ソフト(msFineAnalysis AI^[2] Ver.2)を用いて測定結果の解析を行った。EI 法では、マススペクトル上にフラグメントイオンピークが多く検出され、このスペクトルパターンが化合物の構造を反映している。これらスペクトルパターンとデータベースに登録されているスペクトル情報を照合することにより、類似性の高い化合物がリストアップされ、未知試料の分子構造を推定することができる。この方法をライブラリーサーチという。一方、FI 法は、EI 法と比較してフラグメントイオンが生成しにくく、分子イオンピークが検出されやすい。このため、EI 法のみでは判定できない成分の分子量と分子式の推定を行うことができる。EI 法によるライブラリーサーチと FI 法による分子イオンピークの確認を組み合わせることにより、未知物質の分子式を推定する統合解析を用いて、測定試料に含まれる化合物の推定を行った。

統合解析では、ライブラリーサーチで使用するデータベースに登録されている化合物のみの検索となり、データベースに未登録の化合物に対するアプローチや、未知物質の構造推定については解析者による経験と膨大な時間を要することが課題とされてきた。そこで、開発された AI 構造解析では、深層学習を用いて既知化合物の実測 EI マススペクトルと構造式を学習させ、構造式からマススペクトルを予測するモデルを構築したメイン AI と、実測マススペクトルを解析し、部分構造の有無を予測するサポート AI の2つの AI を用いて未知物質の構造式を予測することが可能である。本検討では、統合解析および AI 構造解析を用いて測定試料に含まれる化合物の推定を行った。

3.4 測定および解析結果

EI および FI による TICC ならびに各時間におけるマススペクトルを図3に示す。また、統合解析結果を表2に示す。FI の TICC における※のピークは、ドリフト補正で使用したシロキサンのピークである。

レモングラスティーに含まれるレモングラスはイネ科の植物であり、香気成分の主成分はレモンの香味成分であるシトラールとされている。シトラールには、*cis* 体のネラールと *trans* 体のゲラニアルがあり、これらの混合物がレモングラスの香気の主成分とされている。図3および表2に示すように、RT = 9.76 min および RT = 10.28 にネラールおよびゲラニアルのピークを確認した。シトラール以外には、酢酸ゲラニルやリナロール、ミルセンといったモノテルペン、レモングラスの精油に含まれるとされるメチルヘプテノン(スルカトン)、多くの精油に含まれるカリオフィレンのピークを確認した。

表2に示す統合解析結果において、2番目にピーク面積が大きいピークの推定構造は、cyclohexanol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-であり、メントール(menthol : C₁₀H₂₀O)のヒドロキシ基の位置異性体であった。レモングラスティーを飲用した際の清涼感から、メントールがライブラリーサーチの上位に検出されると予想していたが、統合解析結果ではメントールは上位に検出されなかった。これを疑問に思い、AI 構造解析を行った結果、メントールが候補として提示された。この結果をさらに確認するために、実際に標準試料のメントールを測定して測定結果と比較することにした。メントールの結晶 30 mg をメタノール 1 mL に溶解し、3.2節と同様の条件で測定を行った。図4にレモングラスティーの香気成分の RT = 9.29 min における EI および FI のマススペクトルを、図5にメントールの RT = 9.30 min における EI および FI のマススペクトルを示す。両サンプルとも保持時間は良い一致を示した。また、レモングラスティーの香気成分におけるフラグメントパターンとメントールのフラグメントパターンも非常に良い一致を示した。これらのことから、統合解析結果で2番目にピーク面積が大きかった化合物のピークはメントールである可能性が非常に高いと考えられる。

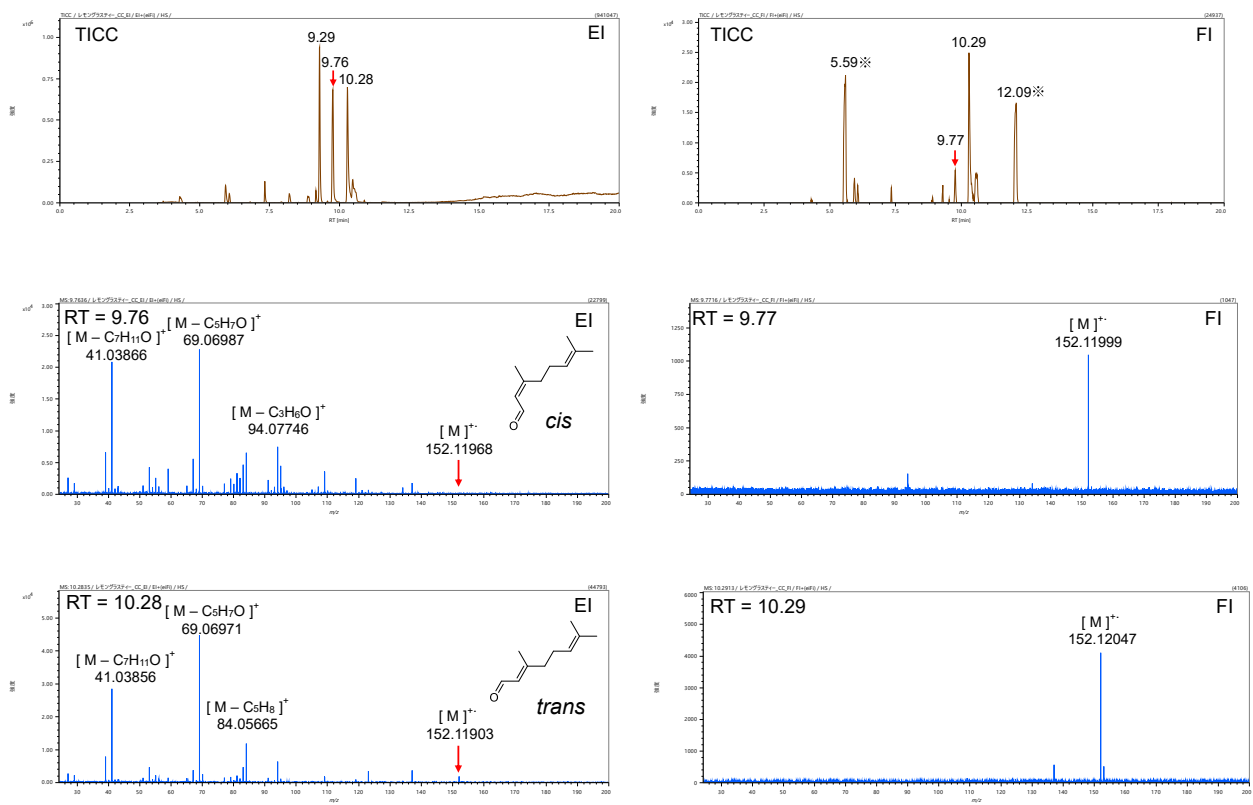
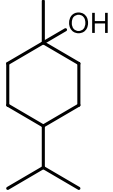


図 3. レモングラスティーの香気成分の測定結果

表 2. 統合解析結果

	RT [min]	面積	m/z (obs.)	m/z (calc.)	化合物名	組成式	備考
1	9.76	2453126	152.12059	152.11957	Neral	$C_{10}H_{16}O$	ネラル
2	9.29	2311943	156.15185	156.15087	Cyclohexanol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-	$C_{10}H_{20}O$	
3	10.28	2268019	152.12043	152.11957	2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl-, (E)-	$C_{10}H_{16}O$	ゲラニアル
4	10.47	519570	-	-	Geranyl acetate	$C_{12}H_{20}O_2$	酢酸ゲラニル
5	5.92	354388	142.13617	142.13522	4-Nonanone	$C_9H_{18}O$	4-ノナノン
6	8.87	217404	-	-	Caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	カリオフィレン
7	8.20	208572	-	-	Linalool	$C_{10}H_{18}O$	リナロール
8	4.28	192781	-	-	β -Myrcene	$C_{10}H_{16}$	ミルセン
9	6.06	170555	126.10421	126.10392	5-Hepten-2-one,6-methyl-	$C_8H_{14}O$	メチルヘプテノン (スルカトン)

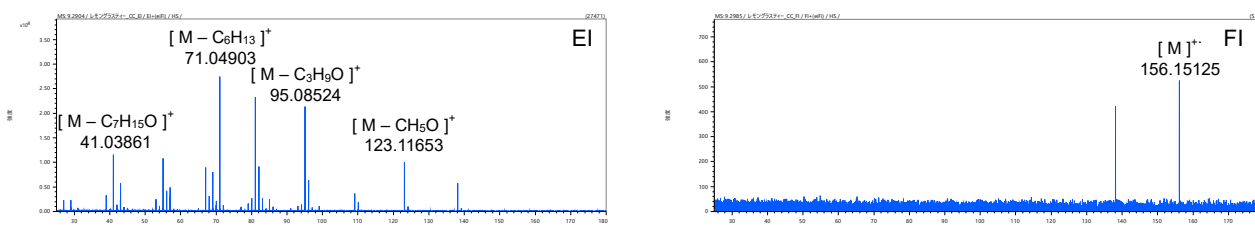


図 4. レモングラスティーの香気成分の RT = 9.29 におけるマススペクトル

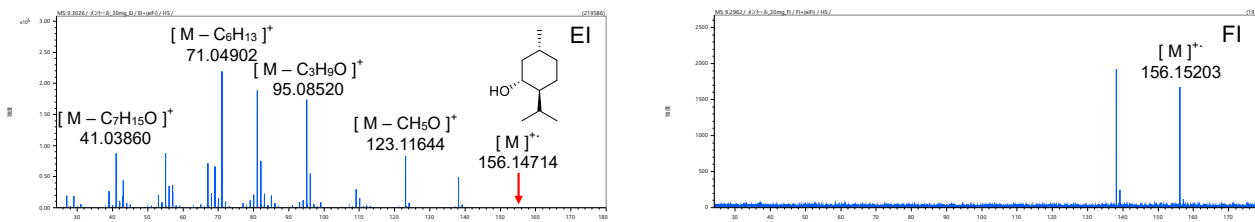


図 5. メントールの RT = 9.30 におけるマススペクトル

4 まとめ

高性能ガスクロマトグラフ飛行時間質量分析計を用いて、ブタノールの構造異性体の分析および市販のレモングラスティー飲料の香気成分の多成分分析を行った。ブタノールの構造異性体の分析では、同じ分子式であっても骨格が異なれば、化合物毎に異なるフラグメントパターンを示すことが確認できた。また、HS 法による市販のレモングラスティー飲料の香気成分の分析では、統合解析および AI 構造解析を組み合わせた構造解析を行うことで、より信頼性の高い解析が可能となることを確認することができた。

今後は、未知物質および様々な特徴を持つ化合物の測定に対応できるよう、さらなる分析技術および解析能力の向上に努めていきたい。

参考文献

- [1] Arthur, C.L., et al, “Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers”, *Analytical Chemistry*, 1990, 62(19), pp. 2145–2148
- [2] 生方正章, “GC-TOFMS 及び機械学習を用いた構造解析手法—未知物質解析ソフトウェア msFineAnalysis AI の紹介—”, *ぶんせき*, 2023, 5, pp.198-204

謝辞

本報告は、令和 6 年度名古屋大学全学技術センター自発的技術研鑽助成プログラム(採択番号 2024-03 番)の支援を受けています。ここに深く感謝の意を表します。