

以氣流調節式 GC×GC–TOF MS / FID 檢測芳香族過敏原

Tackling the extended list of fragrance allergens by flow-modulated GC×GC–TOF MS/FID

摘要

本研究工作展現了如何透過氣流式調制裝置的 GC×GC，分析 84 個過敏原成分的標準品，進行檢測的同時一方面通過 TOF-MS 以確認定性的結果，並藉由 FID 同步完成可靠的定量計算工作。從所得結果中可看出其檢量線的線性和分析數據的重複性均相當優異，可看出氣流式調制裝置的 GC×GC 用於香料產品的品質控管上，此分析方法具有高分析通量的前途與潛力。最後以精油和香料混合物為實例，再度驗證了 GC×GC-TOF MS / FID 之分析方法，於此一應用領域的有效性與可靠度。

前言

歐盟於 2003 年所發布的指令中，規範了在香水中不得使用多種致敏化合物。該指令共標註了 26 種受管制的過敏原，並指出如果在“需沖洗”產品（例如沐浴露）中的含量若 > 100 ppm，或者在“免沖洗”產品（例如香水）中其含量達 > 10 ppm，則應於商品外標籤中明白揭露，讓消費者可清楚得知相關內容。

因此，倘若要符合該歐盟指令的要求，便必須對這些致敏性化合物進行準確的鑑定和定量，也正由於所涉及的基質相當複雜，且目標物種的濃度範圍寬泛，這對分析技術而言不啻是一個巨大的挑戰。

當前若欲涵蓋這所有的欲分析目標物種，需要使用不同的管柱固定相，方能達到足夠的層析分離度用以針對每種目標化合物進行可靠的鑑別，這是一個費力耗時且繁雜的過程。且將受指令所規範要求而必須監測的過敏原列表，其物種清單已擴展到 80 多個單獨的化合物，此分析任務將變得更加苛刻而極負難度。

為了解決此一分析難題，香料行業已經轉而引進採行全二維氣相層析（GC×GC）技術，結合飛行時間質譜儀（TOF-MS）。其無可比擬的強大分離能力可輕鬆應對最複雜的基質，而簡單，無需多餘耗材的氣流式調制裝置，更使得商業化的例行性常規分析工作更加親民耐用。

在本篇應用文獻中，評估了當欲分析這 84 種過敏原物質時，使用全二維氣相層析技術，後端搭配以 TOF-MS 以及火焰離子偵測器（FID）進行平行檢測，從而能僅由一次進樣分析的過程中，即可獲致相當完美的數據結果，可以立即的對樣品成分進行可靠

的物種鑑別與定量分析。在針對需要全面探討樣品組成的研發實驗室，也展現出此一分析平台是極佳適用的理想系統。此外，一旦方法優化和驗證步驟完成，氣流調制器的出色重複性，亦使該分析方法可以輕鬆地在多個 GC×GC-FID 系統上進行轉換，以符合各品管實驗室中的數據比對需求。

實驗部分

樣品製備：

以甲基三丁基醚 (MTBE) 為溶劑，製備 84 種過敏原物種的混合校正標準品，其濃度範圍為 3.2 ~ 400 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ，並於當中加入 1,4-二溴代苯作為內標之用。另將精油和香料混合物分別於 MTBE 中稀釋至 0.5% 和 1.5%。

GC×GC：

GC 進樣裝置為 SSL 注射埠；進樣量為 1.0 μL ；分流比 25 : 1。氣流式調制器：INSIGHT™ (SepSolve Analytical)。搭配使用分流器將樣品流析物以 1 : 4 的比例，分別導入至 TOF-MS 和 FID 檢測器。

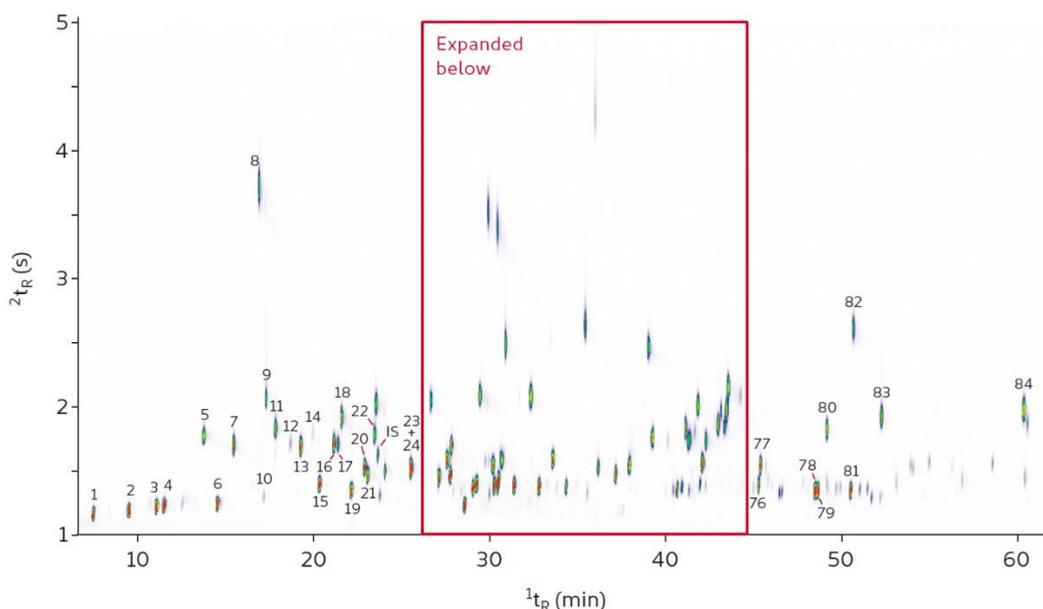
TOF-MS： BenchTOF-Select™ (Markes International)。

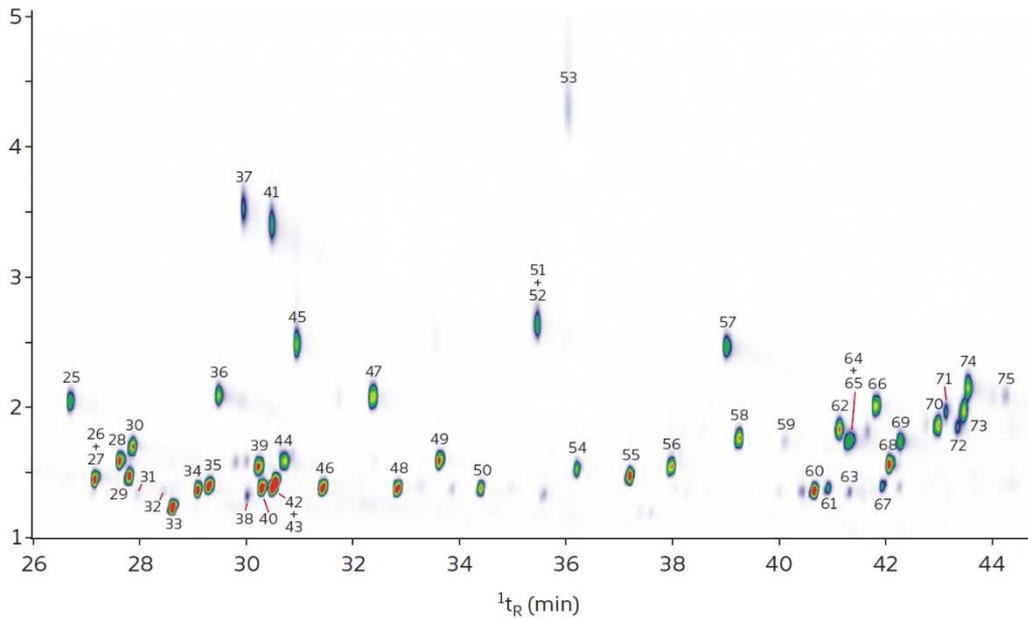
軟體： ChromSpace®GC×GC 軟體 (Markes International)。

結果與討論

1. 過敏原的分離與鑑定

由圖 1 的結果可以明顯看出，GC×GC 對香料過敏原混合物的強大分離能力，使用此一分析方法時，僅剩下少數幾對共析化合物無法有效解析開來 (其中兩對化合物乃為幾何異構物)。





圖一：GCxGC 的二維層析圖，圖中顯示了香料過敏原標準混合物的分離效果。表 1 中則列出了各波峰的定性結果。請注意從圖譜中僅看到四對共析化合物的出現。

2. 重複性

相較於加熱型的調制器系統，採用氣流型調制器之 GCxGC 除了大幅降低運行成本之外，在分析工作中另一最主要優勢便是卓越的數據重複性與結果再現性。對加熱型的調制器系統而言，層析管柱的安裝位置有任何微小的變化，都可能會對所得之圖譜結果產生重大影響，而本研究工作中所採用的，是精密加工技術所製造的微流體裝置，其設計特點尤其適合在多種儀器上安裝相同的配置，並易於用於高通量需求的大批樣品分析作業，當於多個品管實驗室間，除了執行例行性的常規檢測用途，並欲進行結果間的相互比對時，此分析系統特別適合用於此一應用目的。

表 1 中的結果，展示了以 GCxGC-FID 重複分析 10.4 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 的標準品，其分析結果的無論是在二維分析後的波峰面積，以及各分離維度上的滯留時間，均獲致十分良好的可重複性。所有的波峰面積其相對標準偏差 (RSD) 均小於 5%，而滯留時間的飄移更遠低於 1%。

No.	Compound name	¹ t _R (min)	² t _R (s)	RSD (%) (n = 5)			R ²
				Peak area	¹ t _R	² t _R	
1	α-Pinene	7.5345	1.1818	3.67	0.79	0.37	0.9956
2	β-Pinene	9.5336	1.2086	1.25	0.31	0.51	0.9981
3	α-Terpinene	11.0909	1.2286	1.26	0.27	0.22	0.9976
4	Limonene	11.5351	1.2435	0.28	0.26	0.5	0.9983
5	Benzaldehyde	13.8155	1.7851	1.62	0.26	0.24	0.9986
6	Terpinolene	14.5686	1.2484	4.18	<0.01	0.49	0.9989
7	Linalool	15.4839	1.7105	1.12	<0.01	0.38	0.9995
8	Benzyl alcohol	16.9548	3.7079	4.59	<0.01	0.28	0.999
9	Salicylaldehyde	17.3496	2.0683	1.86	<0.01	0.37	0.9985
10	cis-β-Terpineol	17.863	1.6522	4.02	<0.01	0.34	0.9992
11	Phenyl acetaldehyde	17.8827	1.8397	0.74	<0.01	0.19	0.9976
12	trans-β-Terpineol	18.7317	1.7247	1.61	<0.01	0.26	0.9985
13	Menthol	19.2944	1.7143	0.54	<0.01	0.36	0.9995
14	δ-Terpineol	19.9919	1.8075	3.02	0.15	0.5	0.9996
15	Camphor	20.3671	1.4141	0.37	0.15	0.65	0.9996
16	α-Terpineol	21.2026	1.735	0.19	0.14	0.49	0.9995
17	γ-Terpineol	21.4135	1.7247	0.98	<0.01	0.34	0.9979
18	Citronellol	21.6307	1.9317	2.56	<0.01	0.34	0.9991
19	Linalyl acetate	22.1934	1.3623	0.53	<0.01	0.63	0.9988
20	Estragole	22.9327	1.5487	1.97	<0.01	0.43	0.9987
21	Methyl oct-2-ynoate	23.1114	1.4866	1.39	0.13	0.46	0.9993
22	Methyl salicylate	23.4964	1.7868	0.79	<0.01	0.37	0.9995
15	1,4-Dibromobenzene	23.6939	1.6419	3.58	<0.01	0.46	—
23	Neral	25.5457	1.515	0.98	<0.01	0.52	0.9956
24	Carvone	25.57	1.5383				
25	Hydroxycitronellal	26.7117	2.0595	1.67	<0.01	0.45	0.9973
26	trans,cis-δ-Damascone	27.0967	1.4114	1.01	<0.01	0.53	0.9994
27	Methyl non-2-ynoate	27.1658	1.4574				
28	trans-Anethole	27.6495	1.5912	0.7	<0.01	0.5	0.9994
29	1,1-Dimethyl-2-phenethyl acetate (DMBCA)	27.8074	1.4741	0.69	0.13	0.61	0.9993
30	Safrole	27.8667	1.6957	0.59	0.13	0.34	0.9996
31	cis-Isodamascone	27.9851	1.3528	3.09	<0.01	0.7	0.9961
32	cis-α-Damascone	28.459	1.357	3.96	0.13	0.67	0.9982
33	β-Caryophyllene	28.6367	1.2441	0.27	<0.01	0.84	0.999
34	Geranyl acetate	29.0908	1.3695	0.74	<0.01	0.76	0.9991
35	trans,trans-δ-Damascone	29.308	1.4072	0.43	0.1	0.69	0.9993
36	Cinnamic aldehyde	29.4813	2.1077	1.22	<0.01	0.39	0.9996
37	Anisyl alcohol	29.9552	3.5467	4.42	0.3	0.37	0.9951
38	cis-β-Damascone	30.0341	1.3313	1.15	<0.01	0.17	0.997
39	Ebanol (isomer 1)	30.2316	1.559	0.39	<0.01	0.37	0.9995
40	trans-Isodamascone + cis,trans-δ-Damascone	30.2908	1.4038	0.63	<0.01	0.7	0.9987
41	Cinnamic alcohol	30.4685	3.4432	3.97	0.12	0.34	0.9994
42	Damascenone	30.4981	1.4245	0.63	<0.01	0.7	0.9987
43	trans-α-Damascone	30.5573	1.4348				
44	Ebanol (isomer 2)	30.7054	1.5901	0.49	0.1	0.22	0.9988
45	Eugenol	30.9522	2.5218	1.73	0.1	0.31	0.9995
46	trans-β-Damascone	31.4557	1.4038	0.92	0.09	0.65	0.9987
47	Majantol	32.3935	2.087	0.41	0.09	0.28	0.9994
48	α-Isomethylionone	32.8279	1.383	0.16	0.09	0.76	0.9994

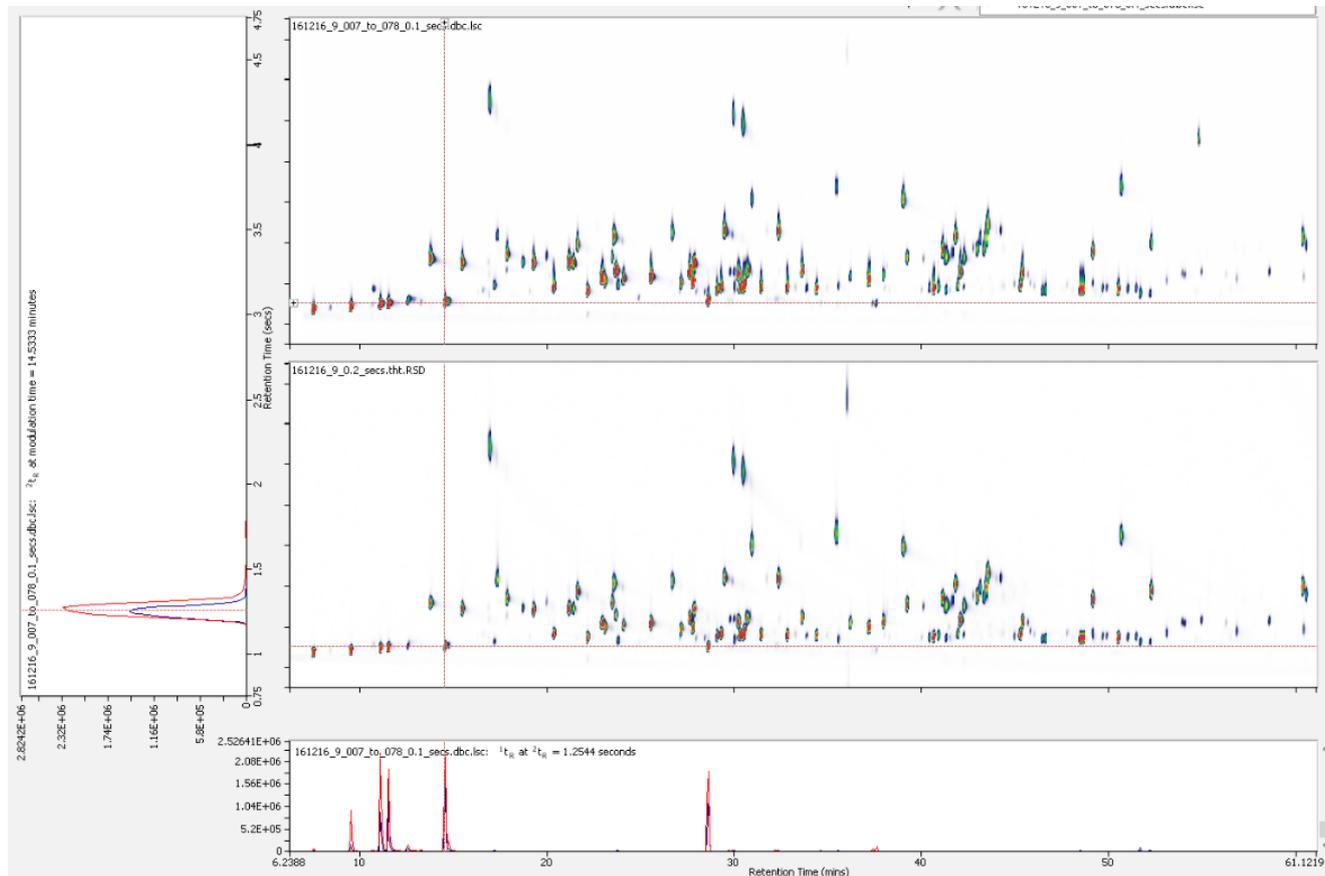
No.	Compound name	t_{R1} (min)	t_{R2} (s)	RSD (%) (n = 5)			R ²
				Peak area	t_{R1}	t_{R2}	
49	Methyl eugenol	33.6472	1.6108	0.83	0	0.62	0.9991
50	Butylated hydroxy toluene	34.4074	1.3727	0.25	0.09	0.58	0.9964
51	<i>cis</i> -Isoeugenol	35.4735	2.6668	1	0.1	0.22	0.9964
52	<i>trans</i> -Isoeugenol	35.4735	2.6668				
53	Vanillin	36.0383	4.3426	2.94	0.18	0.44	0.9969
54	Isoamyl salicylate	36.216	1.546	0.93	0.08	0.38	0.9994
55	Lilial	37.213	1.4791	0.62	0.1	0.62	0.9986
56	n-Pentyl salicylate	37.983	1.5682	0.7	0.08	0.55	0.9996
57	Coumarin	39.0295	2.493	0.72	<0.01	0.33	0.9995
58	Eugenyl acetate	39.2664	1.7799	0.62	0.08	0.45	0.9994
59	<i>cis,cis</i> -Farnesol	40.1351	1.7465	1.76	0.09	0.16	0.9953
60	Isocyclemone E (Iso super E) (isomer 1)	40.6682	1.3788	2.35	0.07	0.58	0.9996
61	Isocyclemone E (Iso super E) (isomer 2)	40.9347	1.39	0.57	0.09	0.61	0.9994
62	α -Santalol	41.412	1.8579	1.02	0.07	0.31	0.9979
63	Isocyclemone E (Iso super E) (isomer 3)	41.3395	1.3788	3.11	0.09	0.72	0.9994
64	<i>trans,cis</i> -Farnesol	41.3493	1.7799	1.5	0.07	0.29	0.9985
65	<i>cis,trans</i> -Farnesol	41.3493	1.7799				
66	3-Propylidene phthalide (minor isomer)	41.8331	2.0362	0.48	0.07	0.35	0.9996
67	Isocyclemone E (Iso super E) (isomer 4)	41.9515	1.4123	0.82	<0.01	0.7	0.9997
68	α -Amylcinnamaldehyde	42.0799	1.5905	0.45	0.07	0.42	0.9993
69	<i>trans,trans</i> -Farnesol	42.2872	1.7465	2.96	0.07	0.38	0.9952
70	Isoeugenyl acetate	42.9979	1.8914	2.08	0.08	0.27	0.9994
71	Lyril (isomer 1)	43.1559	1.9916	2.92	0.07	0.29	0.9957
72	β -Santalol	43.3533	1.8691	3.02	0.07	0.23	0.9953
73	Lyril (isomer 2)	43.4718	1.9916	2.57	0.08	0.23	0.9964
74	α -Amylcinnamyl alcohol (<i>cis/trans</i>)	43.5508	2.1811	1.19	0.07	0.21	0.9966
75	3-Propylidene phthalide (major isomer)	44.2445	2.1253	2.23	0.08	0.13	0.9981
76	Acetyl cedrene	45.2811	1.4011	0.51	<0.01	0.71	0.9997
77	Hexyl cinnamaldehyde	45.3995	1.5794	1.11	0.07	0.49	0.9992
78	Galaxolide (isomer 1)	48.5137	1.3632	2.18	0.06	0.73	0.9997
79	Galaxolide (isomer 2)	48.6632	1.3677	1.69	0.07	0.7	0.9984
80	Benzyl benzoate	49.155	1.8421	0.24	<0.01	0.41	0.9994
81	Hexadecanolide	50.5292	1.3715	0.75	0.07	0.57	0.9992
82	7-Methoxycoumarin	50.6745	2.649	0.95	0.06	0.36	0.9995
83	Benzyl salicylate	52.2737	1.9359	0.69	0.06	0.23	0.9993
84	Benzyl cinnamate	60.3649	2.0251	0.61	<0.01	0.49	0.9995

表一：使用 GC×GC-FID 分析 84 個過敏原成分之標準品，所獲得之再現性和線性等數據結果。表中將共析物質對以灰色陰影顯示，其再現性/線性數據則採將共析物加總後一併呈現之。

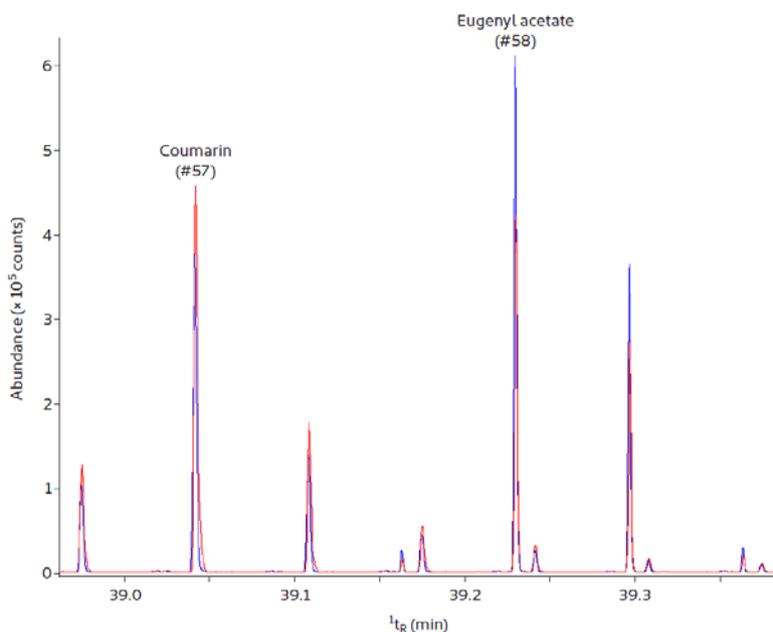
3. 波峰純度驗證

通過 TOF-MS 和 FID 進行平行檢測的好處是，TOF-MS 的數據可用於確認波峰的定性結果和波峰物質之純度。這是針對分析方法進行優化和驗證過程時的重要因素。圖 2 和圖 3 展示了 FID 和 MS 數據集之間出色的滯留時間對應性，且也助於數據處理的便利與簡化。

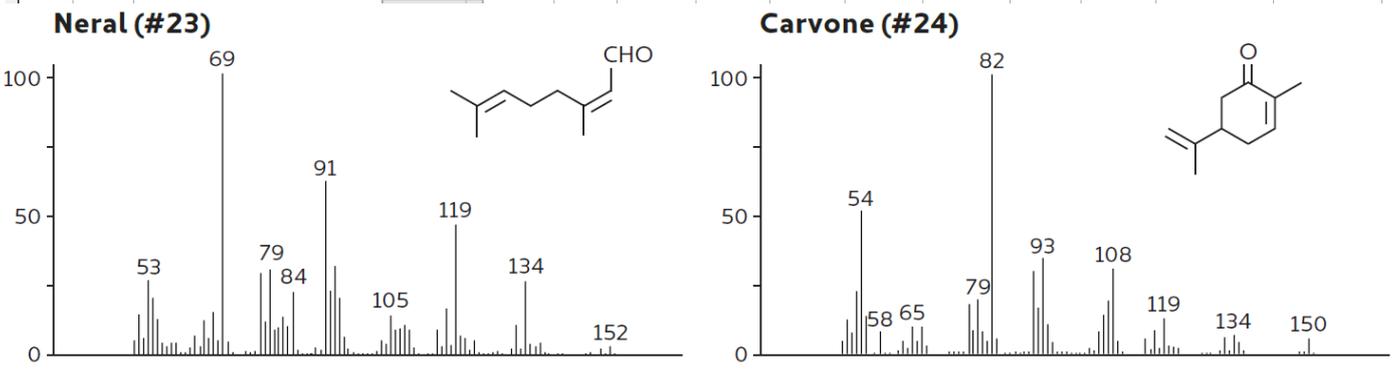
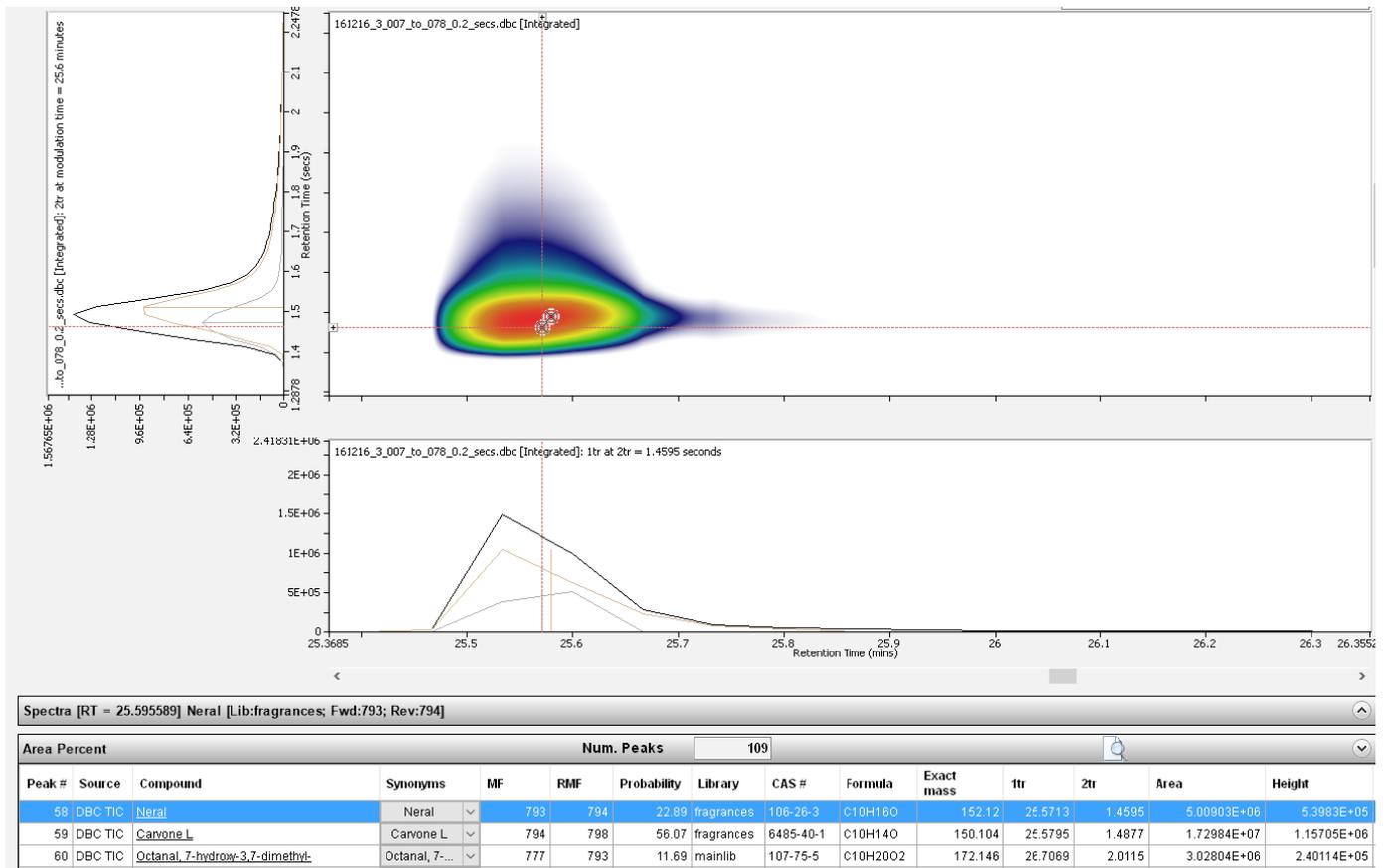
儘管 GCxGC 提供了強大的分離效果，但在本分析方法中仍檢測到許多共析物質對。儘管如此，得益於所使用之 BenchTOF 偵測器的出色圖譜品質，輔之以 ChromSpace 軟體的自動化反捲積運算法，藉由將個別波峰的質譜訊號重組後，再行與 NIST 圖庫相互比對驗證，可成功識別與解析開來這一些於層析圖上呈現共析現象的目標物種，可參見如圖 4 中所示。



圖二：由 ChromSpace 軟體所顯示之過敏原成分標準品其分析圖譜，左側與下方視窗則展示了一維與二維管柱其流析物之投影圖譜，紅線表示為 TOF 的訊號，藍線則為 FID 之訊號



圖三：將圖二中位於下方視窗的一維管柱層析圖予以放大後，可清晰看出 TOF (紅) 與 FID (藍) 兩者之波峰訊號，於滯留時間上顯示出完美的重疊性

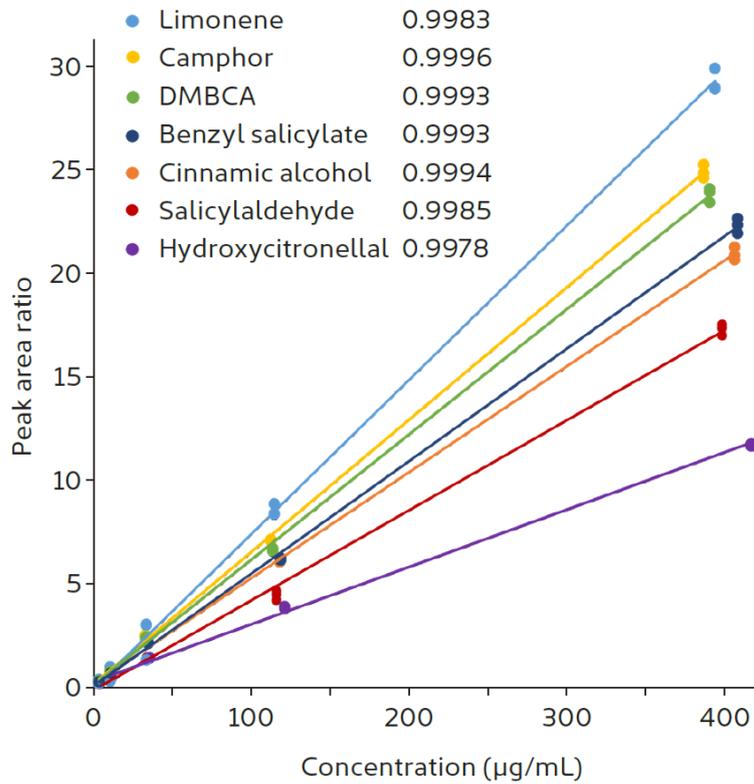


圖四：對過敏原標準品的 GCxGC-TOF MS 圖譜，透過 ChromSpace 軟體可成功對兩共析物質進行去卷積運算與質譜訊號重組

4. 線性

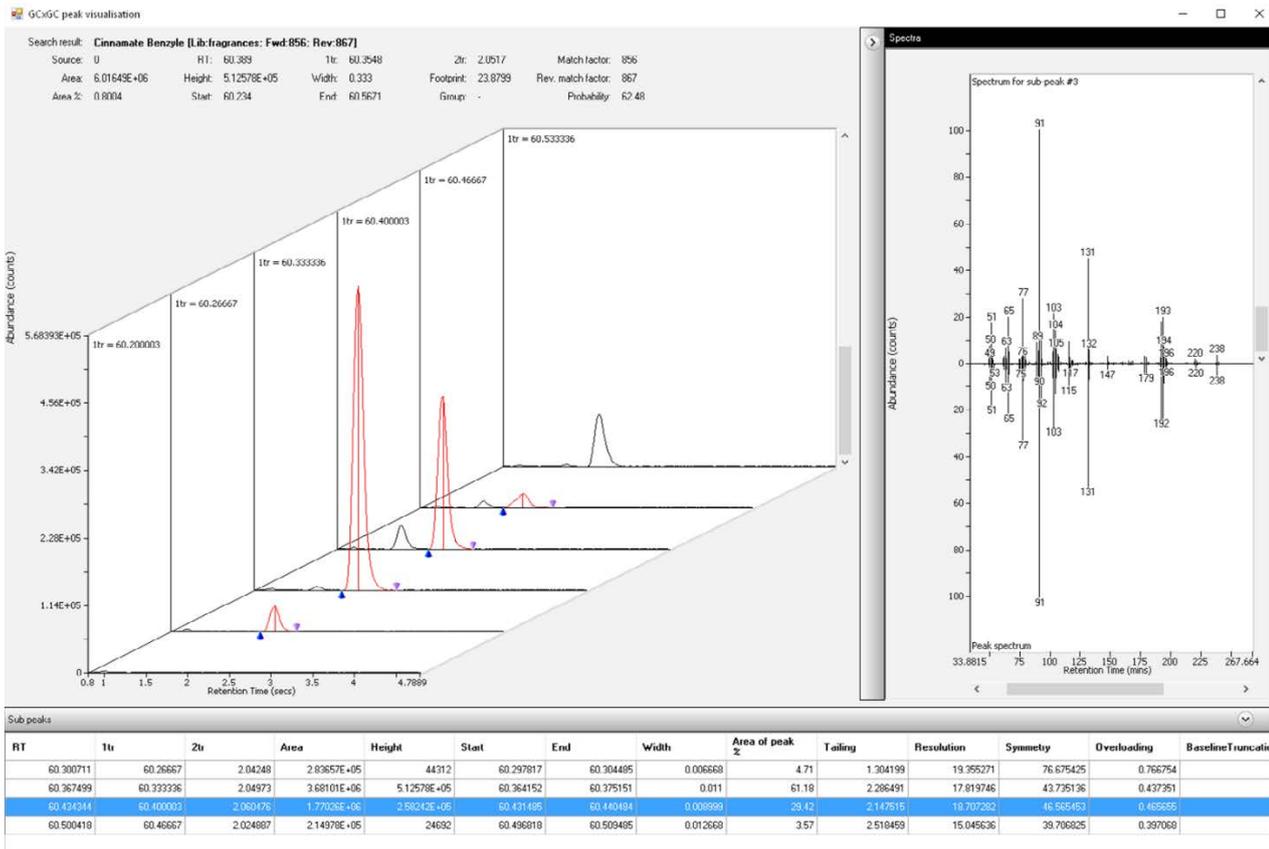
在香精香料行業中，FID 是 GCxGC 應用領域中執行定量分析工作的“黃金標準”，其原因很多，主要是因為其線性範圍寬廣，數據擷取速度快，以及具備碳質量相對應的訊號感度等等。

將五個不同濃度的校正標準品 (3.2-400 $\mu\text{g} / \text{mL}$)，進行三重複分析，表 1 總結列出其定量結果，其 R^2 值介於 0.9951 至 0.9997 之間，而平均值則為 0.9985，可看出該檢量線有優異的線性關係。圖 5 中則展示了整個分析過程中，七種過敏原的標準校正曲線。



圖五：標準品中所選定的過敏原標準品的 GC×GC-FID 校正曲線範例 (3.2–400µg/mL)

通常，過敏原的相關分析任務中，大部分時間其實是都用於數據資料處理和圖譜結果判別上面。為減輕此一工作負擔，ChromSpace 軟體中的波峰切片瀏覽功能，大幅簡化了經切片後每個子波峰的查看與檢視動作，使用戶能夠輕鬆瀏覽目標化合物的表列清單，並直觀且迅速的驗證波峰合併的結果是否正確無誤 (圖 6)。



圖六：ChromSpace 中的波峰切片瀏覽，可輕鬆回顧波峰合併的結果

5. 真實香氛樣品之分析

利用前述於 GC×GC-FID 系統上已建立完成的 84 個過敏原成分之標準品校準曲線，將五種精油和一種混合香水樣品之真實樣本進行定量分析，在表 2 中列出了這些真實樣品中所檢測到的過敏原成分及其濃度。

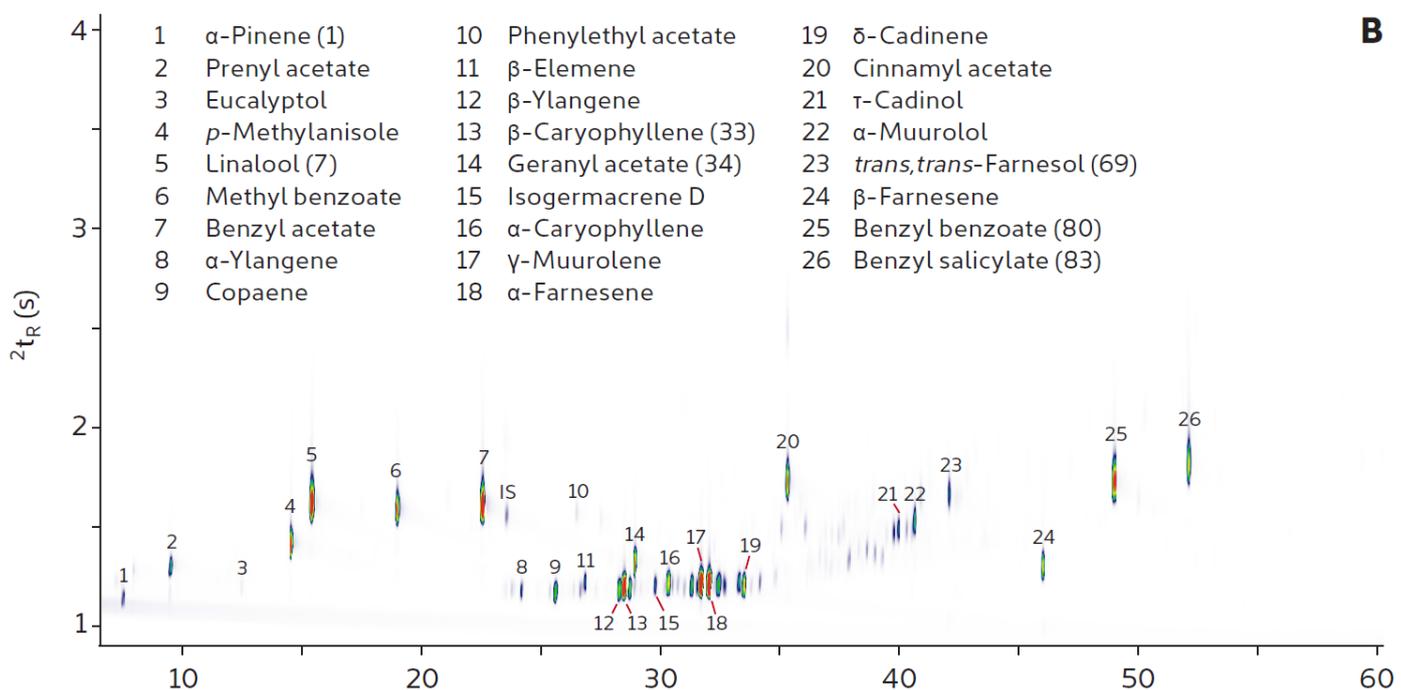
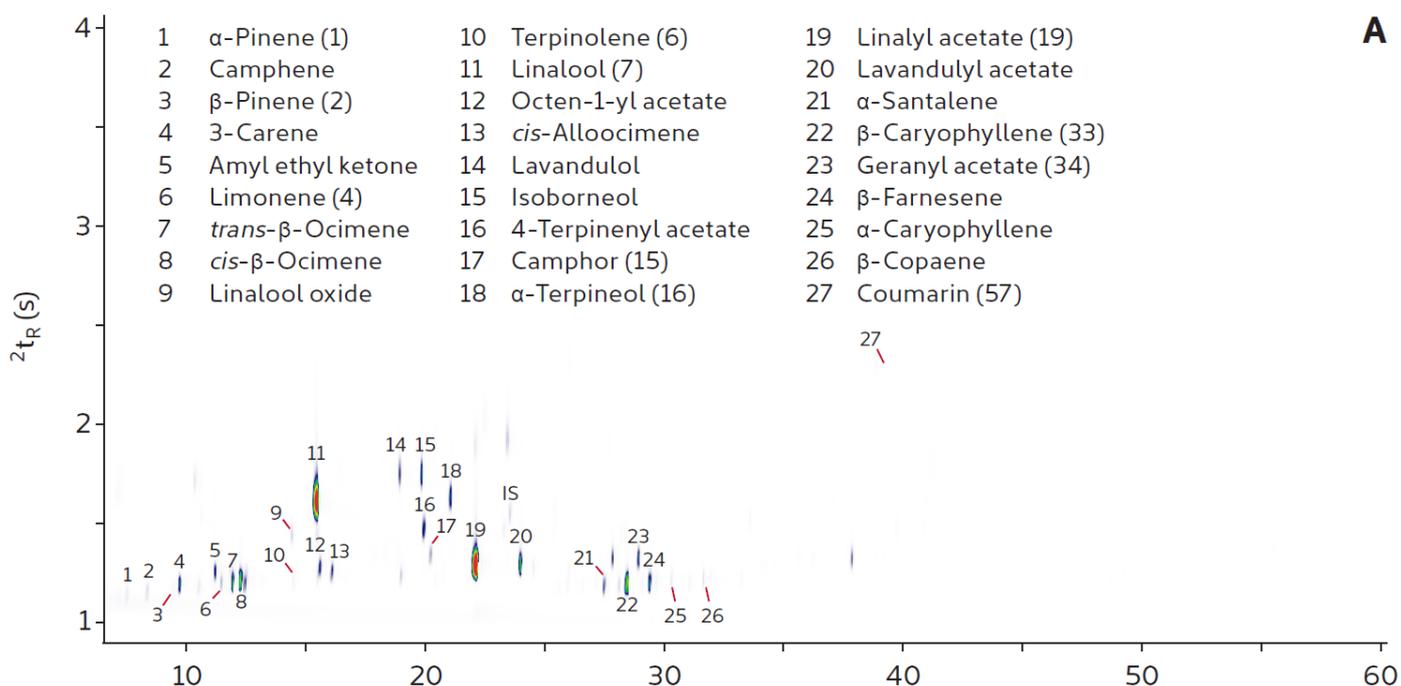
由所得到的分析結果中發現到，岩蘭草精油 (Vetiver Oil) 當中沒有檢測到任何過敏原成分，而所有其他分析樣品中均測出了眾多過敏原成分。一如預期的那樣，在檸檬精油 (lime oil) 中發現了高含量的檸檬烯；然而令人驚訝的是，廣藿香精油 (patchouli oil) 在一般的認知中通常是被認為不含過敏原的，卻也帶有少量的檸檬烯以及致敏原物質清單中的三種化合物。

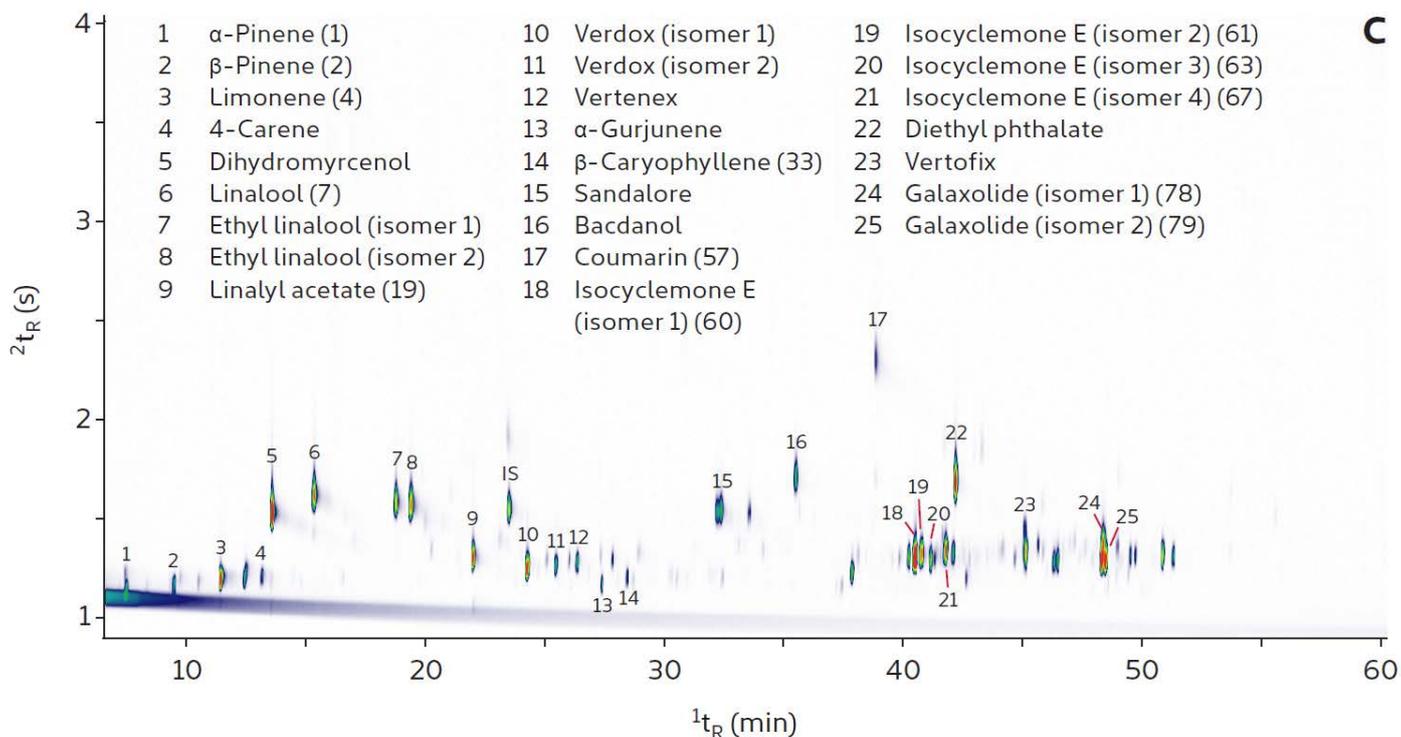
值得一提的另一點是，一直有諸多輿論聲音，呼籲應將某些受管制的過敏原完全禁用，當中便建議有涉及到三個管制物種。在本次的分析結果中，於香水混合物中便鑑定出其中之一的合成香料新鈴蘭醛 (Lyrall，即表 1 中的 71 與 73 號物質)。

No.	Compound name	Concentration (mg/mL)					
		Lime	Ylang	Patchouli	Lavender	Vetiver	Perfume mix
1	α -Pinene	64.7	5.22	6.41	4.29	—	0.98
2	β -Pinene	125.91	0.51	4.8	0.75	—	0.38
3	α -Terpinene	1.87	—	—	—	—	—
4	Limonene	545.44	—	0.64	3.81	—	1.91
6	Terpinolene	5.69	—	—	1.48	—	—
7	Linalool	1.2	112.92	—	322.06	—	1.97
15	Camphor	—	—	—	5.29	—	0.05
16	α -Terpineol	2.46	0.31	—	17.7	—	—
19	Linalyl acetate	—	—	—	528.57	—	2.3
28	<i>trans</i> -Anethole	—	0.53	—	—	—	—
33	β -Caryophyllene	4.65	66.83	46.97	34.9	—	0.13
34	Geranyl acetate	—	37.86	—	13.95	—	—
51	<i>cis</i> -Isoeugenol	—	0.08	—	—	—	—
57	Coumarin	—	—	—	1.88	—	0.64
60	Isocyclemone E (Iso super E) (isomer 1)	—	—	—	—	—	0.38
61	Isocyclemone E (Iso super E) (isomer 2)	—	—	—	—	—	6.41
63	Isocyclemone E (Iso super E) (isomer 3)	—	—	—	—	—	1.94
67	Isocyclemone E (Iso super E) (isomer 4)	—	—	—	—	—	1.14
69	<i>trans,trans</i> -Farnesol	—	7.9	—	—	—	—
71	Lyrall (isomer 1)	—	—	—	—	—	0.38
78	Galaxolide (isomer 1)	—	—	—	—	—	3.77
79	Galaxolide (isomer 2)	—	—	—	—	—	2.31
80	Benzyl benzoate	—	73.23	—	0.99	—	0.36
82	7-Methoxycoumarin	2.29	—	—	—	—	—
83	Benzyl salicylate	—	33.42	—	—	—	—

表二：擴展列表中，五種未稀釋的精油和一種香水混合物中的過敏原成分及濃度，使用 GC×GC-FID 進行定量

另外作為 FID 分析結果的輔助，TOF-MS 的數據可助於執行非目標物質的篩選之用，於圖 7 中所展示的是依蘭油，薰衣草油和混合香水三個樣品之二維圖譜。針對所有被檢出的致敏原物質成分，於薰衣草油樣品中便包含超過 1/3 的物種，其中芳樟醇 (linalool) 和乙酸芳樟酯 (linalyl acetate) 是當中最主要的波峰。而在依蘭油樣品中，除了芳樟醇之外，芳香烴類也有很明顯之訊號，包括了苯甲酸甲酯 (methyl benzoate)，乙酸苄酯 (benzyl acetate) 以及在層析後期階段才流析出來的水楊酸苄酯 (benzyl salicylate) 和苯甲酸苄酯 (benzyl benzoate)。最後毫不意外地，在混合香水樣品中測得了多種合成的致敏化合物，包括佳樂麝香 (Galaxolide)，甲基柏木酮 (Vertofix)，2-叔丁基環己基乙酸酯 (Verdox) 和新鈴蘭醛 (Lyrall)。



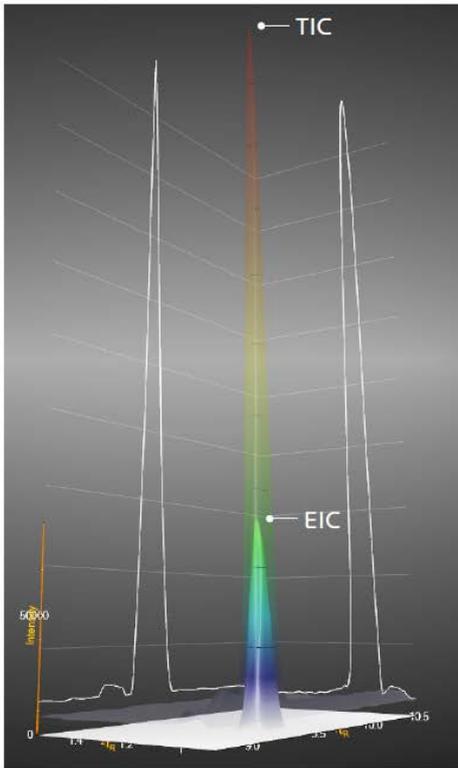


圖七：利用 GC×GC-TOF MS 在 (A) 薰衣草和 (B) 依蘭精油以及 (C) 香水混合物的非目標篩選中，鑑定出的關鍵成分。過敏原列表中存在的化合物在括號中用數字表示。

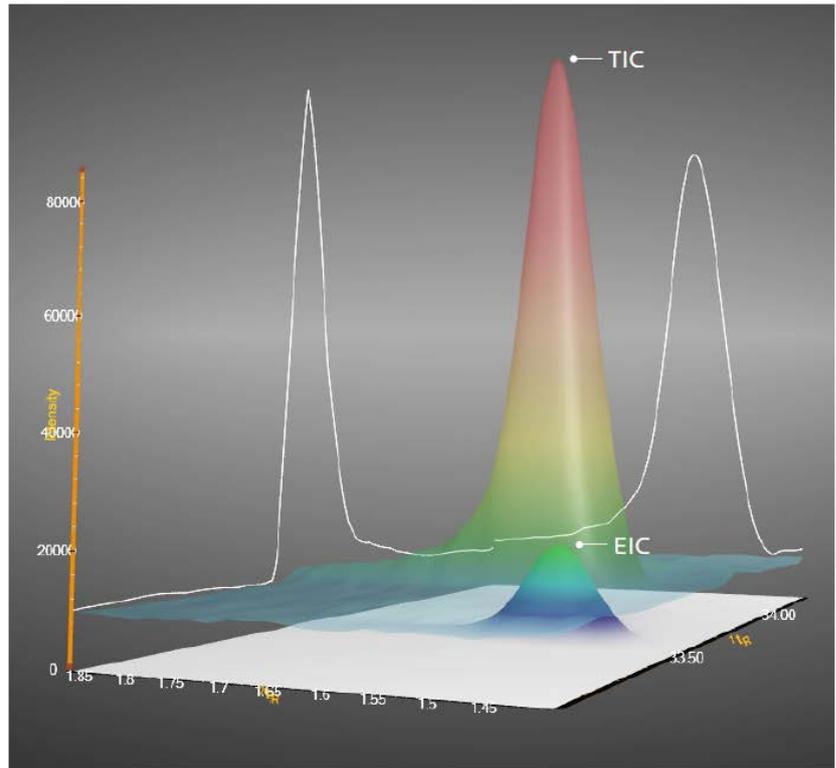
這類型的非目標物篩查對於研發和原料檢驗都極其重要，因為許多香料或精油都具有很高的市場價值，並且經常會摻假手段以佯增產量，從而獲取更大的經濟利潤。

6. 偵測極限

本研究所使用的標準品其濃度範圍為 $3.2 \sim 400 \mu\text{g} / \text{mL}$ 。但由於進樣時注射埠的分流比為 $25 : 1$ ，以及於分析管柱末端使用了並聯型的分流器，將管柱流析物同步導入 TOF-MS 及 FID 兩個偵測器內進行檢測 (TOF-MS 和 FID 的分配比例為 $1 : 4$)，因此若以最低濃度之校正標準品來換算的話，進入 TOF-MS 的每個物種成分約僅為 $20 \sim 30 \text{ pg}$ 。由圖 8 中可以明顯看出，即便進入質譜儀內的物種含量已非常微量，其訊號強度仍遠高於 BenchTOF 的檢測極限，可見該質譜儀的靈敏度相當卓越。由標準品中所含有的眾多已知物中，選定其中兩種的過敏原物種來計算其理論偵測極限，由提取離子流圖譜 (EIC) 的信噪比可清楚地看出，即便這些化合物的濃度再往下低上幾個數量級，仍能輕易地被 BenchTOF 檢測出來。

A β -Pinene

RMS S/N (EIC m/z 93) = 5200
RMS S/N (TIC) = 448

B Methyl eugenol

RMS S/N (EIC m/z 178) = 2295
RMS S/N (TIC) = 197

圖八：A： β -蒎烯 (β -Pinene · 31.3 μ g) 以及 B：甲基丁香酚 (methyl eugenol · 32.6 μ g) 其 TOF-MS 之提取離子流圖 (EIC) 跟總離子流圖 (TIC)

結論

由本研究分析結果，清楚的驗證以氣流型調制器為核心的 GC \times GC 系統，因為其強大的分離能力，僅需對樣品執行一次的分析過程，便能對樣品中各香料過敏原成分進行精準的定性與定量分析，而無需煩惱加熱型調制器所帶來的不便，也免除了其所衍生出的高昂運行成本。

本研究中，將樣品透過同步的以 FID 和 TOF-MS 進行平行檢測，針對多種欲分析的芳香性過敏原物種，可達成在一次的分析過程中，便得到了可靠的定性與定量結果，對於想要完整探討樣品中各項組分的研發實驗室，這正是最符合其所需的完美分析平台。由分析結果中各項數據資料所示，平行檢測的 FID 和 TOF-MS 訊號，在圖譜上各個波峰其滯留時間的對應關係變得十分直觀且準確，不僅使得各波峰的驗證與比對更為簡易與可信，當面對到大批量樣品的數據分析需求時，其出色的結果重複性與數據再現性，使得快速、可靠地完成資料處理與結果判讀不再遙不可及。