

Technical Report

LCMS-IT-TOFを用いた内分泌かく乱物質スペクトルライブラリの開発

Development of spectrum library of endocrine disruptors by LCMS-IT-TOF

服部 考成¹、箕畑 俊和¹、渡邊 淳¹

Abstract:

内分泌かく乱物質は、生物のホルモン受容体と結合することによりホルモンバランスを崩させ、生体に障害や有害な影響を引き起こします。特に女性ホルモン（エストロゲン）受容体と結合する化学物質の生物への影響が懸念されており、近年、そのような化学物質を分析する必要性が高まっています。本テクニカルレポートでは、精密質量によるMSⁿ測定が可能なLCMS-IT-TOFを用いたエストロゲン活性をもつ内分泌かく乱物質のスペクトルライブラリをご紹介します。

Keywords: LCMS-IT-TOF、エストロゲン活性、環境ホルモン、スペクトルライブラリ、内分泌かく乱物質

1. はじめに

私たちは、多くの化学物質の恩恵を受けながら生活しています。しかし、環境中に存在する化学物質の中には、生物のホルモン受容体と結合することで、ホルモンバランスを乱す化学物質（内分泌かく乱物質）が存在します。内分泌かく乱物質（いわゆる環境ホルモン）とは、「環境中に存在する化学物質のうち、内分泌系に影響を及ぼすことにより、生体に障害や有害な影響を引き起こす外因性の化学物質」と定義されています。近年、内分泌かく乱物質の内、特に女性ホルモン（エストロゲン）受容体と結合する化学物質の生物への影響が懸念されており、エストロゲン活性をもつ化学物質の分析が求められています。

本テクニカルレポートでは、精密質量によるMSⁿ測定が可能なLCMS-IT-TOFを用いたエストロゲン活性をもつ内分泌かく乱物質のスペクトルライブラリをご紹介します。本スペクトルライブラリを用いることで、簡便かつ高精度でエストロゲン活性をもつ内分泌かく乱物質の同定が可能となります。また、本スペクトルライブラリには、エストロゲン活性データが登録されているため、同定された内分泌かく乱物質のエストロゲン活性データも確認できます。

2. LCMS-IT-TOF

LCMS-IT-TOF (Fig. 1) は、高速液体クロマトグラフとイオントラップ型質量分析計 (IT) および飛行時間型質量分析計 (TOF) を結合させた高速液体クロマトグラフ質量分析計です。ITによるMSⁿ能力と、TOFによる高分解能・精密質量測定的能力を兼ね備え、従来型のLC/MS/MSでは不可能であったMSⁿにおける精密質量分析が可能です。構造解析用ハイブリッド質量分析計として最高水準の高速マスマスペクトル測定性能と正負イオン高速切り替えが、1回の測定で得られる情報を大きく増やし、より信頼性の高い構造解析が可能となります。また、MSⁿの測定結果をライブラリに登録し、プリカーサ情報や精密マスマスペクトルの情報からライブラリ検索機能を使用することで、簡便かつ高精度に化学物質を同定することができます。



Fig. 1 高速液体クロマトグラフ質量分析計 LCMS-IT-TOF

3. エストロゲン活性データ

本ライブラリには、国立研究開発法人 国立環境研究所によって評価された75化合物のエストロゲン活性データ (hER α) およびそれぞれの化合物のエストロゲン活性情報をまとめた国立環境研究所のデータベースへのリンクが登録されています。エストロゲン活性試験では、酵母ツーハイブリッドシステムにより、酵母 (Y190株) にヒトエストロゲン受容体遺伝子とコアクチベーター (TIF2) の発現プラスミドおよび β -ガラクトシダーゼ発現系レポータープラスミドを組み込んだ組み換え酵母を用いて実施しました。エストロゲン活性試験などの詳細は、国立環境研究所のホームページ (<http://www.nies.go.jp/archiv-edc/estrogen/index.html>) をご参照ください。

4. 内分泌かく乱物質スペクトルライブラリ

本内分泌かく乱物質スペクトルライブラリには、75化合物、194のMSⁿスペクトルが登録されています。Table 1に、登録されている75化合物と登録MSⁿスペクトル数の一覧を示します。75化合物の内、MS²スペクトルまで登録されている化合物は31種類、MS³スペクトルまで登録されている化合物は44種類あります。Fig. 2に、Tetrachlorobisphenol AのMSⁿスペクトルを示します。MS³スペクトルにより、高精度の化合物同定が可能となります。

本スペクトルライブラリには、MSⁿスペクトル以外の情報として、Fig. 3に示すようなCAS番号、理論分子量、組成式等の情報も登録されています。また、国立環境研究所によって評価されたエストロゲン活性データおよび国立環境研究所のデータベースへのリンクも登録されています。

Table 1 ライブラリに登録されている化合物一覧

成分名	登録MS ⁿ 数
1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-propane	2
11-KetoTestosterone	3
16 α -hydroxyestrone	3
17 α -Estradiol	3
17 β -Estradiol	3
2-(1-Adamantyl)-4-methylphenol	2
2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenone	3
2,4-Dihydroxybenzophenone	3
2-Ethylhexyl p-Hydroxybenzoate	3
2-Hydroxy-9-fluorenone	2
4-(1-Adamantyl)phenol	3
4,4'-(1,3-Adamantane-diyl)diphenol	2
4,4'-Cyclohexylen bisphenol	3
4,4'-methylenebisphenol (Bisphenol F)	3
4,4'-thiodiphenol	2
4-cyclohexylphenol	2
4-cyclopentylphenol	2
4-Dodecylphenol	2
4-hydroxybenzoic Acid Isobutyl Ester	3
4-hydroxybenzoic Acid n-Amyl Ester	3
4-hydroxybenzoic Acid n-Hexyl Ester	3
4-phenylphenol	2
4-sec-Butylphenol	2
5 α -dihydrotestosterone	2
6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene	2
6-Hydroxyflavanone	3
7-Hydroxyflavanone	3
Anthrarobin	3
Apigenin	3
Benzyl 4-hydroxybenzoate	3
Benzyl n-Butyl Phthalate	3
Biochanin A	3
Bisphenol A	2
Bisphenol B	3
Bisphenol E	2
Butamifos	2
Butyl-p-hydroxybenzoate	3
Coumestrol	2

成分名	登録MS ⁿ 数
Crysin	3
Cyasterone	3
Dienestrol	3
Diethylstilbestrol(DES)	3
Equol	2
Estriol	3
Estrone	2
Ethynylestradiol	3
Fluazifop-butyl	3
Genistein	3
hexestrol	3
isopropyl 4-hydroxybenzoate	3
Kaempferol	3
Methyltrienolone	3
Mibolerone	3
Murisuterone A	3
Octafluoro-4,4'-biphenol	3
p-Benzylphenol	2
p-Hydroxybenzophenone	2
p-n-butylphenol	2
p-n-Heptylphenol	2
p-n-Hexylphenol	2
p-n-Nonylphenol	2
p-n-Octylphenol	2
p-Nonylphenol	2
p-n-Pentylphenol	2
propyl p-hydroxybenzoate	2
p-t-Octylphenol	2
p-t-Pentylphenol	2
Tebufenozide	3
Tetrachlorobisphenol A	3
TetramethylbisphenolA	3
Zearalenone	3
β -Ecdysterone	2
β -Estradiol 17-(β -D-Glucuronide)	3
β -Estradiol 3-(β -D-Glucuronide)	3
β -Estradiol 3-Sulfate	3

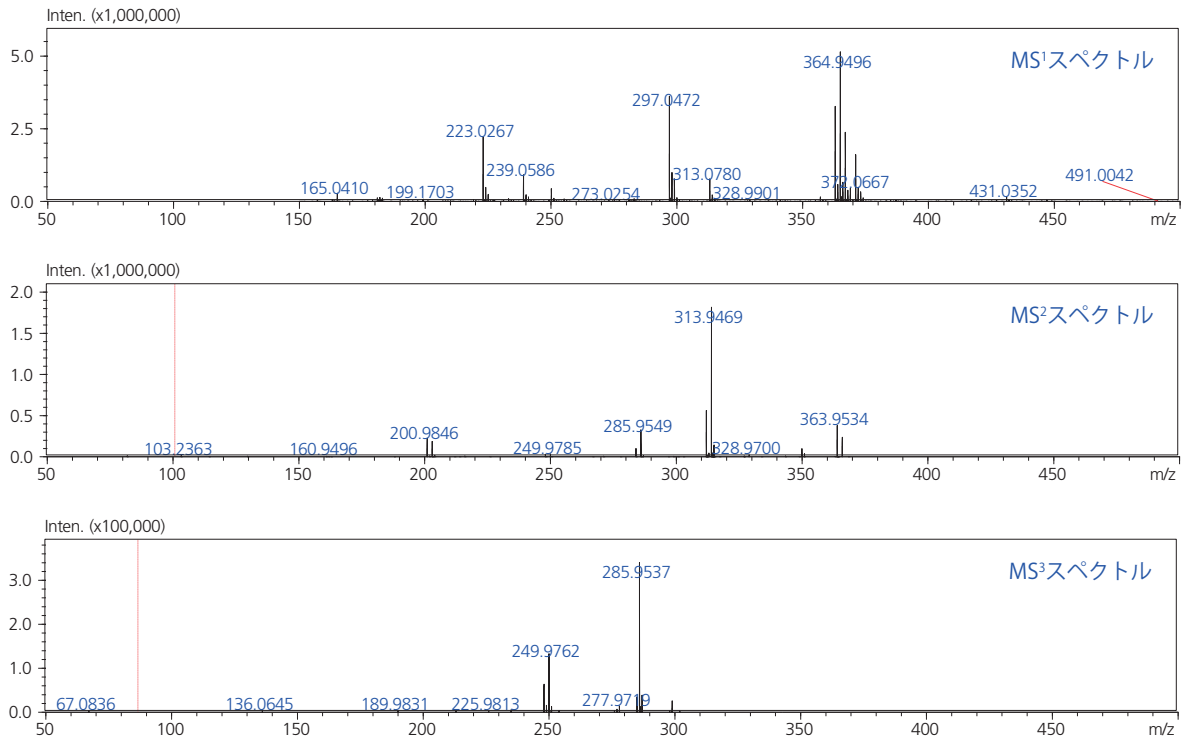


Fig. 2 Tetrachlorobisphenol AのMSⁿスペクトル

順位	インデックス	パラメータ	大文字/小文字	ヒット
1	スペクトルID	1-194		194
2	設定されていません			0
3	設定されていません			0
4	設定されていません			0
5	設定されていません			0
6	設定されていません			0
7	設定されていません			0

ヒット番号	スペクトルID	CAS番号	化合物名	類義語/示性式	理論分子量	組成式	分類	URL
21	21	1806-26-4	p-n-Octylphenol		206.1671	C14H20O		
22	22	1806-26-4	p-n-Octylphenol		206.1671	C14H20O		
23	23	104-40-5	p-n-Nonylphenol		220.1827	C15H24O		
24	24	104-40-5	p-n-Nonylphenol		220.1827	C15H24O		
25	25	80-5-7	Bisphenol A		228.1150	C15H16O2		
26	26	80-5-7	Bisphenol A		228.1150	C15H16O2		
27	27	42-52-1	Dibenzofuran		212.1452	C12H8O		

26: 228.1150: Bisphenol A

Base Peak: 212.081/10,000,000

化合物情報	スペクトルID (SP ID): 26	MS情報	イオン化法: ESI	分析情報	装置名: LCMS-IT-TOF
	CAS番号: 80-5-7		マスレンジ: 50.0000-500.0000	データファイル名: D:\Hattori\ライブラリーデータ\AI	
	化合物名: Bisphenol A		カシオンカラム: 25	分析者名: Admin	
	類義語/示性式:		カシオンカラム量: 50	分析日時: 2016/07/28 18:43:27	
	理論分子量: 228.1150		極性: 不特定	サンプル情報:	Bisphenol A
	組成式: C15H16O2				
	構造式:				
	分類:				
	URL:				
化合物情報コメント:	ReRex (ECx10/nM): 650	スペクトル情報	アライメント: -(H+) -1.00728		
	http://www.nies.go.jp/archiv-e		アライメント: 227.1086		
			アライメント: 25		
加付情報		MS段数:			
保持時間:	0.268				
加付情報コメント:					

Fig. 3 登録された内分泌かく乱物質ライブラリ

ライブラリ検索機能を使用することで、検出された化学物質のMSⁿスペクトルの情報と登録MSⁿスペクトルの情報から、化合物を同定することが可能です。Fig. 4では、検出された化学物質のMS³スペクトルからライブラリ検索機能を利用して、Tetrachlorobisphenol Aを同定した結果を示します。MS³スペクト

ルを利用することで、MS/MS分析よりも高精度な同定が可能となります。また、同定された化合物の化合物情報から、内分泌かく乱物質のエストロゲン活性データと化学物質の詳細情報を迅速に確認することも可能です。

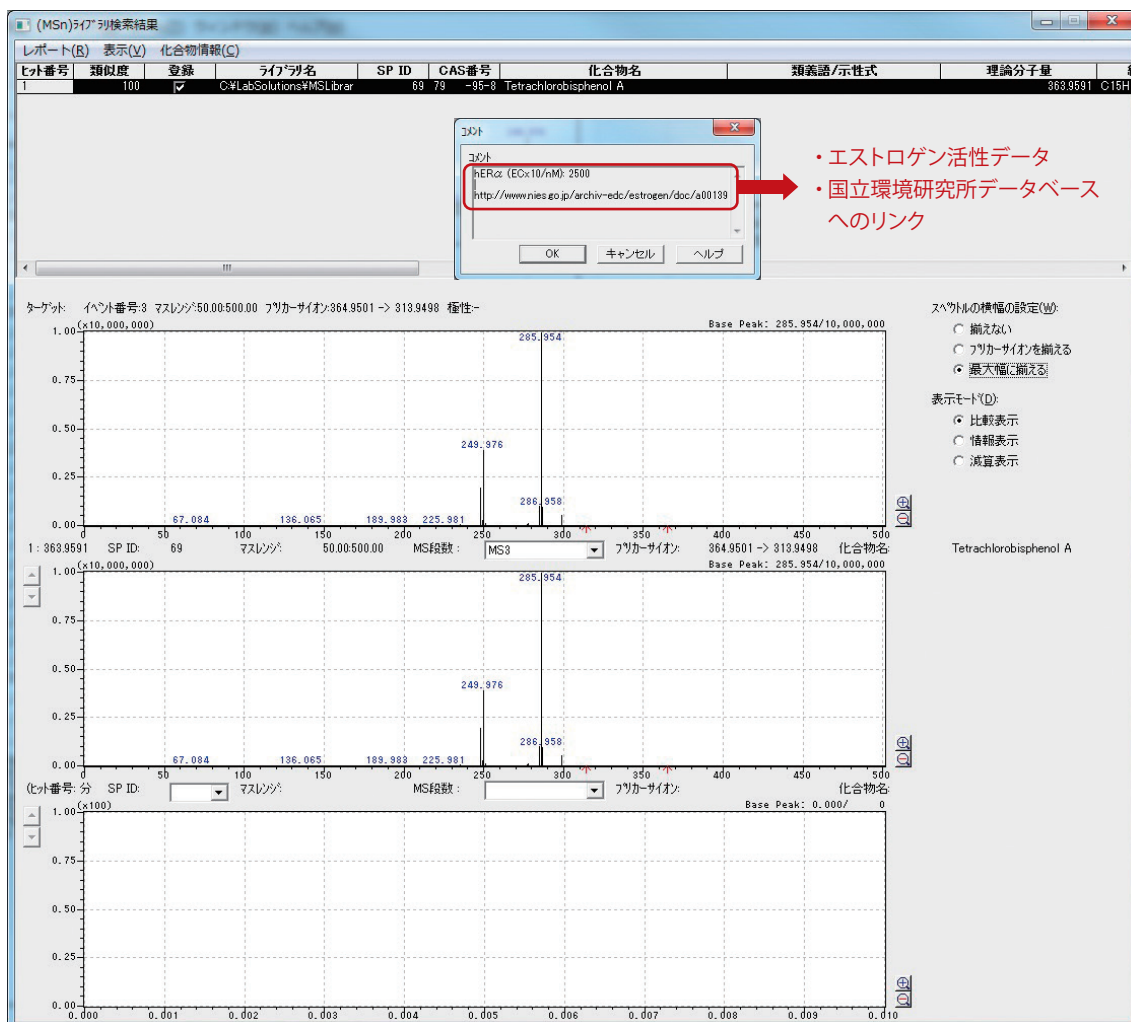


Fig. 4 ライブラリ検索結果

5. 結論

MSⁿにおける高分解能・精密質量測定が可能なLCMS-IT-TOFとエストロゲン活性をもつ内分泌かく乱物質のスペクトルライブラリを使用することで、簡便かつ高精度にエストロゲン活性をもつ内分泌かく乱物質の同定が可能となりました。また、同定された内分泌かく乱物質の化合物情報から、内分泌かく乱物質のエストロゲン活性データや化学物質の詳細情報を迅速に確認することもできます。

謝辞

本開発を行うにあたり、国立研究開発法人 国立環境研究所 中山祥嗣先生に多大なご指導、ご協力をいただきました。

この場を借りて、感謝申し上げます。

株式会社 島津製作所
分析計測事業部 <http://www.an.shimadzu.co.jp/>

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行：2018年3月
© Shimadzu Corporation, 2018