

種子に導入された大気圧空気プラズマ起因活性種の高感度微量定量測定法の創成
**Highly Sensitive Measurement of Reactive Species Introduced into Seeds
 by Atmospheric-Pressure Air Plasma Irradiation**

奥村 賢直¹, 古閑 一憲^{1,2}, アタリ パンカジ¹, 鎌滝 晋礼¹,
 山下 尚人¹, 板垣 奈穂¹, 白谷 正治¹

Takamasa Okumura¹, Kazunori Koga^{1,2}, Pankaj Attri¹, Kunihiro Kamataki¹,
 Naoto Yamashita¹, Naho Itagaki¹, Masaharu Shiratani¹

¹九州大学, ²自然科学研究機構
¹Kyushu Univ., ²NINS

はじめに

種子へのプラズマ照射による植物の成長促進効果は大きな注目を集めている[1-5]。また、プラズマ照射の生物学的効果の解明に向けた、分子生物学的検討が開始されている[6-8]。プラズマ照射効果の機序解明には、種子に導入されたプラズマ起因粒子(活性酸素窒素種(RONS; reactive oxygen and nitrogen species)、光子、イオンなど)の定量測定が必須である。ここではプラズマ照射により種子内に生成されたRONSの測定方法の確立を目指し、液体クロマトグラフィーを用いた種子内硝酸イオンの極微量検出に成功した結果について報告する。

実験方法

実験では、スケラブル誘電体バリア放電(DBD; dielectric barrier discharge)電極を用い、24°C、55% Rhの環境下でレタス種子に空気プラズマを照射した[2-4]。電極・種子間距離は5mmとした。一度のプラズマ照射で20粒の種子を処理した。照射後、種子を粉碎し、種子1mgに対し5 μ Lの割合で超純水を加え抽出液を得た。この方法では、pH調整および脱水を必要とする従来のサンプル前処理方法と比較して簡略化している。得られたサンプルを液体クロマトグラフィートリプル四重極質量分析(LC-QqQ MS/MS, Agilent 1260 Infinity II)で評価した。

実験結果および考察

図1のMSスペクトルに示すように、プラズマ照射サンプルにのみ62m/zに明確なピークが出現している。Agilent MassHunter Workstation Data Analysis Core, ver.10による同位体分布計算結果によると99%のNO₃のmassが62m/zとなる。この結果から、62m/zのピークはNO₃であることを示す。また、1次元反応シミュレーション結果やプラズマの発光スペクトルにNOスペクトル線が観測されることから、硝酸イオン(NO₃)が気相で生成され、種子に導入されたことが考えられる。続いて、検出した分子の定量分析のため、LC-QqQ MS/MSを使用した多重反応モニタリング(MRM)分析を行った。62m/z(NO₃)から46m/z(NO₂)をMRM遷移としたプラズマ照射サンプルのMRMクロマトグラムで

は、標準のNO₃溶液と同じ4.94分の保持時間でピークが出現した。種子内のNO₃量は、0、10、30、60、および90秒の照射時間に対しそれぞれ0.08、0.29、0.73、1.69、2.78 nmol/FWmgとなり、プラズマ照射時間に伴い増加することが示された。照射0秒の結果は、他の従来の方法では検出が非常に困難な、種子中のNO₃の低濃度の測定に成功したことを示している。また、1分間のプラズマ照射により、コントロールと比較して20倍以上のNO₃-濃度が導入されることが明らかとなった。この結果は、プラズマ照射がRONSを“乾燥”種子に導入するための有効な方法であることを示している。

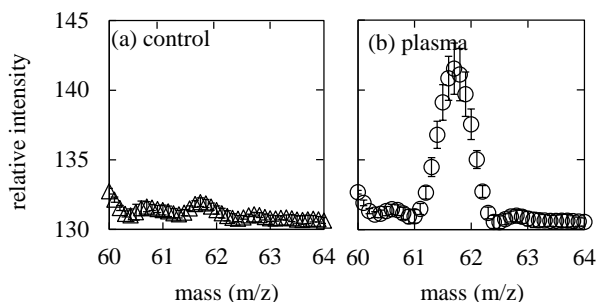


Fig. 1. MS spectrum of 60-64 m/z from 20 seeds (a) without and (b) with 5 min plasma irradiation, obtained by QMS with 3 times integration (n=5).

謝辞 本研究は JSPS KAKENHI grant numbers JP19H05462, JP19K14700, JP20H01893, JP20K14454 および Plasma Bio Consortium による支援を受けて実施された。

文献

- [1] P. Attri et al., Processes 8(8), 1002 (2020).
- [2] S. Kitazaki et al. Curr. Appl. Physics. 14 (2014).
- [3] K. Koga et al., Appl. Phys. Express. 9 (2015).
- [4] K. Kazunori et al., Jpn. J. Appl. Phys. 59 (2020).
- [5] H. Hashizume et al., Plasma Process. Polym. 18, 1, 2000181 (2021).
- [6] V. Mildaziene et al., Sci. Rep. 9 (2019).
- [7] P. Attri et al., Sci Rep 11, 2539 (2021).
- [8] C. Suriyasak et al., ACS Agricul. Sci. Technol., 1, 1, (2021).