

## キャピラリー HPLC-ICP-MS による マイクロリットル容量の植物樹液中の 亜鉛のスペシエーション

アプリケーションノート

環境分析

### 著者

Paulina Flis, Laurent Ouerdane, Ryszard  
Lobinski

CNRS-UPPA, Laboratoire de Chimie  
Analytique Bio-inorganique et Environnement,  
UMR5254, Hélioparc, 2, Av. Angot, 64053  
Pau, France



### はじめに

多数の金属が植物の成長と発育に非常に重要な役割を果たしています。これらの金属の1つである亜鉛は、一般的に有機体中で2番目に豊富な遷移金属で、植物の生理機能においてさまざまな働きをする重要な微量栄養素です。亜鉛は、300種類を超える酵素の必須成分です。遺伝子操作および、Znフィンガー、Znクラスター、RINGフィンガードメインを含むタンパク質構造の安定化を担っています。また、光合成やCO<sub>2</sub>固定などの重要なプロセスにも関係しています。植物中の亜鉛の過不足は、植物の枯死、成長の低下、発育不全、白化、細胞死、葉の矮小化、開花の遅れを引き起こします。これらの症状のすべてが、食の安全に深刻な影響をもたらすことがあります。亜鉛の含有量と相関して作物収量が大幅に減少するためです [1 ~ 3]。



Agilent Technologies

植物の樹液に含まれる低分子量の金属含有化合物の同定から植物の生理機能をより適切に理解し、その機能を明らかにすることで、栄養作用、農業、環境の研究をさらに進展させることができます。しかし、植物サンプルなどの複雑な生物マトリックスの研究は、サンプル前処理中およびクロマトグラフィーによる分離中にさまざまな問題を引き起こすことがあります。主な問題は、極めて多様な金属錯体が低濃度で存在することと関係しています。さらに、金属錯体は不安定な場合が多く、抽出中やオフラインでの予備濃縮段階、クロマトグラフィーによる分離中にも分解することがあります。これまでのクロマトグラフィー手法の調査から、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC)、逆相 (RP) クロマトグラフィーが、分析中の金属錯体の分解を回避するのに最適な手法であることが実証されています [4]。したがって、この種のアプリケーションには、予備濃縮カラムと HILIC または RP 分離カラムで構成したクロマトグラフィーシステムが最適です。

今回の実験は、エンドウのポスト師部に存在する亜鉛種の分離用に、メタロミクス的アプローチを取り入れた ICP-MS を提案しています。胚のう液を、オンライン予備濃縮付キャピラリー HPLC-ICP-MS で分析しました。入手可能な植物樹液が少量であるため、キャピラリークロマトグラフィーの使用が不可欠でした。

## 実験

### サンプル

エンドウ (グリーンピース) の成長中のさやから取った胚のう液 (ポスト師部) を調査しました。

### サンプル前処理

さやはガラスキャピラリーで穴を開け、液状の胚乳をペリスタルティックポンプで抽出し、氷の上のエッペンドルフチューブに入れました。採取後、サンプルは直ちに液体窒素内で凍らせて、分析するまで -20 °C で保存しました。分析直前に、サンプルを解凍し、アセトニトリルで 1:2 比 (サンプル:アセトニトリル) になるように希釈した後、10000 rpm で 2 分間遠心分離しました。上澄みを採取して直ちに分析しました。

## HPLC-ICP-MS システム

Agilent 1100 LC とキャピラリーポンプとマニュアルバルブ (ループサイズ: 100 µL) を組み合わせて使用しました。30 µL の上澄みを 90 % アセトニトリルと 10 mM ギ酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.5) の 20 µL/min のイソクラティックフローを使用して SeQuant zwitterionic (ZIC-)HILIC ガードカラム (ドイツ、ダルムシュタット、Merck KGaA 社製、5 mm x 内径 1 mm、5 µm) にロードしました。サンプルを移動相で 4 分間洗浄し、SeQuant ZIC-HILIC キャピラリーカラム (ドイツ、ダルムシュタット、Merck KGaA 社製、150 mm x 内径 0.3 mm、3.5 µm) ヘバックフラッシュして化合物を分離しました。溶離液 A、10 mM ギ酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.5)、と溶離液 B、アセトニトリルを使用して、4 µL/min の流量でグラジエント溶出を実行しました。表 1 に、グラジエントプログラムを示します。

表 1. HPLC 溶出プログラム

手順	溶離液 (%B)	時間 (分)
1	90	0~5
2	90~65	5~17
3	65~52	17~47
4	52~35	47~53
5	35	53~65
6	35~90	65~70
7	90	70~75

## HPLC-ICP-MS と ESI-MS/MS

分離カラムの出口を Agilent 7700x ICP-MS (Agilent キャピラリー LC インタフェース経由、G3680A、図 1) および ESI-MS/MS に接続しました。



図 1. 小型石英スプレーチャンバと、その内部に搭載された全量を噴霧するネブライザで構成される Agilent キャピラリー LC インタフェースキット (G3680A)

ICP-MS 条件は、毎日の作業開始時に、2% 硝酸中に Y、Li、Tl、Ce をそれぞれ 20 ppb 含有するチューニング溶液を使用して、自動的に最適化しました。7700x の ORS<sup>3</sup> コリジョンリアクションセルを高エネルギーヘリウムモードで動作させて Zn 同位体で発生する多原子干渉を排除しました。<sup>64</sup>Zn および <sup>66</sup>Zn の信号は、60 ms のドウェルタイムを使用して採取しました。表 2 に、ICP-MS の使用条件を示します。

表 2. Agilent 7700x ICP-MS の使用条件

パラメータ	内容/設定値
ネブライザ/スプレーチャンバ	キャピラリー LC インタフェース G3680A
トーチ内径	1 mm
コーン	白金
RF 出力	1560 W
サンプリング深さ	7.5 mm
キャリアガス流量	0.78 L/min
オプションガス (O <sub>2</sub> ) 流量	0.04 L/min
<b>レンズ</b>	
引出し 1	2.7 V
引出し 2	-180 V
<b>セル</b>	
オクタポールバイアス	-100 V
He 流量	10 mL/min
運動エネルギー弁別	7 V

ESI LTO Orbitrap Velos 質量分析計をポジティブイオンモードで 3.0 kV で動作させました。イオン源のベーパーライザ温度は 120 °C に、キャピラリー温度は 280 °C に設定しました。フル MS モードでの分解能は 100,000 (FWHM、*m/z* 400) に設定しました。

## 結果と考察

図 2 に、グリーンピースのポスト師部サンプルにおいて <sup>64</sup>Zn で得られたクロマトグラムを示しています。キャピラリー ZIC-HILIC ICP-MS とオンライン予備濃縮とを使用することで、シャープで強いピークを得ることができ、2 つの亜鉛種を分離して検出することができました (図 2a と 2b)。両方の金属錯体は、ESI Orbitrap MS/MS で同定しました。異なる亜鉛種のリテンションタイムの測定とマスバランスの推定には ICP-MS 検出が不可欠でした。これにより、ESI-MS 質量スペクトルで亜鉛錯体を容易に検出することができました。質量スペクトルの拡大部分 (図 2d と 2e) は、2 つのイオンを亜鉛の同位体比とともに明確に示しています。これらの抽出イオンクロマトグラム (EIC) のリテンションタイムは、キャピラリー

ZIC-HILIC ICP-MS (図 2c) で観察された 2 個の亜鉛ピークと一致しています。得られたデータから、2 種類の亜鉛錯体、亜鉛-ニコチアナミン (NA) と亜鉛-(ヒスチジン)<sub>2</sub> を同定することができました (表 3)。

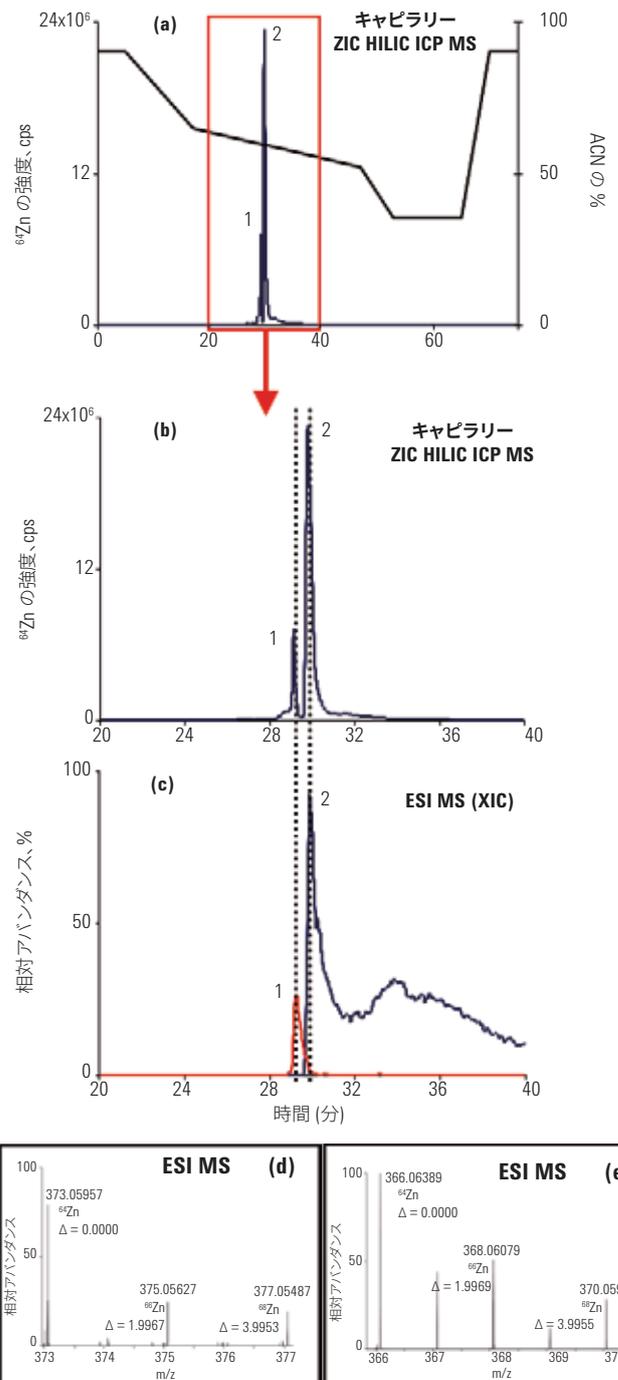


図 2. a) キャピラリー ZIC-HILIC-ICP-MS で得られたクロマトグラム  
b) キャピラリー ZIC-HILIC-ICP-MS でのクロマトグラムの一部の拡大図  
c) キャピラリー ZIC-HILIC-ESI-MS (選択したイオンのクロマトグラム) でのクロマトグラム  
d) および e) ESI-MS スペクトルの特定部分の拡大図。亜鉛の同位体比を含む

表 3. エンドウ (グリーンピース) のポスト師部中で同定された錯体を含む亜鉛のリスト

	ピーク 1	ピーク 2
リガンド	ヒスチジン	ニコチアナミン
錯体	(His) <sub>2</sub> -Zn	NA-Zn
分子式 (中性型)	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub> N <sub>6</sub> Zn	C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> O <sub>6</sub> N <sub>3</sub> Zn
理論質量	373.05973	366.06381
実験で得られた質量	373.05957	366.06389
差 ppm	-0.437	0.216

キャピラリー HPLC と ICP-MS で構成されるクロマトグラフィーシステムにより、<sup>64</sup>Zn (~ 6 fmol の Zn-NA 錯体) では 75 ng/L の検出下限を実現し、ベースラインの 20 ポイントの標準偏差の 3 倍で算出されました。この値を、70 ~ 80 % の <sup>64</sup>Zn で得られたカラム回収率に関して Zn-NA 錯体の信号と比較しました。

## 結論

今回の調査は、エンドウのポスト師部に存在する亜鉛錯体の分離と同定にメタロミクスのアプローチを取り入れた ICP-MS が効率的であることを示しています。亜鉛種は、ZIC-HILIC プレカラムを使用して予備濃縮した後、ZIC-HILIC キャピラリーカラムで分離しました。キャピラリー HPLC を ICP-MS および ESI MS/MS と連結させることによって得られたデータの組み合わせにより、さまざまな亜鉛錯体を同定することができました。入手可能な植物樹液が少量であるため、キャピラリクロマトグラフィーの使用が不可欠でした。さらに、場合によっては不安定にもなる低濃度の金属種を含む生体サンプルを分析するには、オンライン予備濃縮付クロマトグラフィーシステムが最適です。この手法により 2 種類の亜鉛種、亜鉛-ニコチアナミン (NA) および亜鉛-(ヒスチジン)<sub>2</sub> 錯体を適切に同定でき、NA とヒスチジンがグリーンピースのポスト師部で亜鉛との錯体を形成する 2 つの主要なリガンドであることが示されました。

## 参考文献

1. M.R.Broadley, P.J.White, J.P. Hammond, I. Zelko, A. Lux, *New Phytologist*, 2007, 173, 677-702
2. T.C.Fox, M.L.Guerinot, *Annu.Rev. Plant Physiol.Plant Mol.Biol.*, 1998, 49, 669-696
3. C.A.Blindauer, R. Schmid, *Metallomics*, 2010, 2, 510-529
4. L. Ouerdane, S. Mari, P. Czernic, M. Lebrun, R. Lobinski, *JAAS*, 2006, 21, 676-683



ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)

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. 2017

Printed in Japan, July 4, 2017

5991-2415JAJP



Agilent Technologies