

文章编号: 0254 - 5357(2010)01 - 0009 - 05

体积排阻高效液相色谱 - 电感耦合等离子体质谱法 同时测定印度芥菜 (*Brassica Juncea*) 中镉铜锌形态

杨红霞¹, 刘 崑¹, 李 冰¹, 魏 巍², 张惠娟², 陈登云³

(1. 国家地质实验测试中心, 北京 100037; 2. 南京农业大学, 江苏 南京 230026;

3. 安捷伦科技有限公司, 北京 100022)

摘要: 建立了体积排阻高效液相色谱 - 电感耦合等离子体质谱法同时测定印度芥菜中镉、铜、锌形态分析方法。为了防止巯基化合物氧化反应的发生, 样品采取液氮保护并在 -70 °C 保存, 样品分析全流程采取氮吹防氧化措施。在镉、铜、锌胁迫下, 诱导产生植物螯合肽 (PCs)。在叶片和根部均检测到 3 种元素的 4 种形态, 植物螯合肽 (PC)₃ - Cd (Cu, Zn)、植物螯合肽 (PC)₂ - Cd (Cu, Zn)、谷胱甘肽 (GSH) - Cd (Cu, Zn)、半胱氨酸 (Cys) - Cd (Cu, Zn) 及其在植物体内的分布规律。结合植物不同部位 Cd、Cu、Zn 分布规律初步推断, Cd、Cu、Zn 在与 GSH 及 Cys 的结合上存在竞争。

关键词: 形态分析; 镉; 铜; 锌; 印度芥菜; 体积排阻高效液相色谱 - 电感耦合等离子体质谱法

中图分类号: O655.6; O657.62; O657.63; S637

文献标识码: A

Speciation Analysis of Cadmium, Copper and Zinc in Indian Mustard (*Brassica Juncea*) by Size Exclusion-High Performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry

YANG Hong-xia¹, LIU Wei¹, LI Bing¹, WEI Wei², ZHANG Hui-juan², CHEN Deng-yun³

(1. National Research Center for Geoanalysis, Beijing 100037, China; 2. Nanjing Agriculture University, Nanjing 230026, China; 3. Agilent Technologies, Beijing 100022, China)

Abstract: A method based on the coupling of size-exclusion HPLC with ICP-MS was used for speciation analysis of Cd, Cu and Zn binding non-protein thiols in extracts of Indian mustard (*Brassica Juncea*). In the presence of Cd, Cu and Zn stress, phytochelatins (PCs) were induced and metal ions in extracts were associated with the induced PCs. Four different species of (PC)₃-Cd(Cu,Zn), (PC)₂-Cd(Cu,Zn), GSH-Cd(Cu,Zn), Cys-Cd(Cu,Zn) were detected in stems and roots, and their distribution patterns within plants was studied. The results indicated that there was a competition on the combination of Cd, Cu, Zn with GSH and Cys. A non-oxidizing (nitrogen) sample preparation environment and -70 °C preservation condition were employed to avoid the oxidation of sulfhydryl groups. This research may be useful for understanding transportation of heavy metals in hyperaccumulator.

Key words: size exclusion chromatography-high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry (SEC-HPLC-ICP-MS); speciation analysis; cadmium; copper; zinc; Indian mustard (*Brassica Juncea*)

收稿日期: 2009-06-17; 修订日期: 2009-09-02

基金项目: 国家地质实验测试中心基本科研业务费项目资助(200607CSJ02); 国土资源部公益性行业科研专项资助(200911043)

作者简介: 杨红霞(1979-), 女, 助理研究员, 博士生, 主要从事元素形态分析研究。E-mail: yanghongxia@sina.com。

Cu、Zn 是生物必需的营养元素,但过量的 Cu、Zn 会对生物的生长发育造成危害。Cd 是危害性最大的重金属之一,镉污染将影响植物的生理生化活性,进而通过食物链影响人类健康^[1]。随着现代工农业生产的迅速发展,重金属复合污染问题日益严重,过去的研究大多只注重单个污染物的环境效应,对多种污染物共存于同一环境并相互作用所形成的环境污染效应重视不够。近年来,选用超累积植物修复重金属污染土壤成为植物修复的热点^[2]。超累积植物(Hyperaccumulator)是指能够超量吸收和积累重金属的植物,Brooks 等^[3]1977 年最早提出这一概念。1983 年 Chaney^[4]提出了利用超富集植物清除土壤重金属污染的思想。Baker^[5]在欧洲中西部发现了能富集 Cd 高达 2130 mg/kg 的十字花科植物天蓝褐蓝菜。Salt^[6]发现印度芥菜对镉有一定的耐受和积累能力,而且生物量较大,吸镉总量很高。这些积累植物能够耐受高浓度重金属的原因是在重金属胁迫下,植物体内生成一些特定功能的螯合体与有毒元素结合成稳定的化合物而消除这些元素的毒性作用,表现出较强的重金属抗性。这种螯合体即为植物螯合肽(Phytochelatins, PCs)。PCs 是一种富含巯基的寡肽,结构通常为(γ -Glu-Cys) $_n$ -Gly(其中 n 等于 2~11)^[7]。通常认为,PCs 对重金属解毒的机理是重金属离子进入植物体后,与细胞内的 PCs 结合形成复合物,然后转运到特定的细胞器(主要为液泡)进行区室化固定,进而防止其干扰细胞的新陈代谢^[8-9]。因此,明确植物抗重金属的生理和分子机理,从而提高植物在污染环境下的适应范围和生产能力,对于高效利用自然资源 and 进行污染环境的生物修复均具有重要意义。由于缺乏强有力的分析检测技术,植物体内重金属的迁移机制,解毒机制还没有明确结论。尤其是对 PCs 与重金属离子的结合状态,长距离运输以及解毒过程中的变化的研究还很少。

体积排阻-高效液相色谱分离(SEC-HPLC)与电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)联用技术,具有交联葡聚糖(Sephadex G50)分子筛凝胶过滤层析的根据分子量分离化合物的优点,和 ICP-MS 灵敏的多元素同时检测优点,又因为其流动相一般采用中性的 Tris-HCl/NaCl 缓冲液,与生物体本身体内条件相似,因此可以较准确反映植物螯合肽以及其他巯基化合物在生物体内与元素的结合状况^[10]。Leopold 等^[11-13]建立了 SEC-HPLC-ICP-MS 测

定金属与植物螯合肽形成的复合物,但由于柱效差,谷胱甘肽(GSH)与 PC 峰重叠。Vacchina 等^[14]用 HPLC-ICP-MS 测定植物中 Cd 的形态,同时测定 Cd、Cu、Zn 在植物中的形态,可以更清楚地了解 PCs 的形成以及在植物解毒机制中的作用。Wei 等^[15]发现了 Cd、Cu、Zn 与谷胱甘肽和半胱氨酸的结合态,未检测出 Cu、Zn 与 PCs 的结合态。

本研究建立了 SEC-HPLC-ICP-MS 同时测定印度芥菜中 Cd、Cu、Zn 形态分析的方法。在叶片和根部均检测到 3 种元素的 4 种形态,即植物螯合肽(PC) $_3$ -Cd(Cu, Zn)、植物螯合肽(PC) $_2$ -Cd(Cu, Zn)、谷胱甘肽(GSH)-Cd(Cu, Zn)及半胱氨酸(Cys)-Cd(Cu, Zn),并分析了其在植物体内的分布规律,可以为 Cu、Zn、Cd 复合污染条件下植物的抗金属性研究提供技术支持。

1 实验部分

1.1 仪器和主要试剂

7500a Agilent 电感耦合等离子体质谱仪(美国 Agilent 公司);1100 Agilent 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)。工作参数见表 1。

表 1 仪器工作条件

Table 1 Operating parameters of SEC-HPLC and ICP-MS

ICP-MS 工作条件		SEC-HPLC 工作条件	
发射功率	1360 W	色谱柱	TSK-GEL G3000 (300 mm × 7.5 mm, TOSOH, 日本)
采样深度	5.8 cm	保护柱	TSK-GEL™ PW (40 mm × 6.0 mm, TOSOH, 日本)
载气流速	1.05 L/min	流动相	10 nmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH = 7.5)
雾化器	Babington	流速	0.8 mL/min
采样模式	时间积分	进样量	100 μL(自动进样)
积分时间	1000 s		

EDTA-Cd(Cu, Zn)标准溶液:用 10 mmol/L EDTA 配制 EDTA-Cd(1.14 mg/L)、EDTA-Cu(1.26 mg/L)、EDTA-Zn(1.24 mg/L)溶液,对 Cd、Cu、Zn 未知峰进行定量,使用时按需要逐级稀释。

GSH-Cd、GSH-Cu、GSH-Zn 标准溶液:在氮气保护下配制 10 ng/L 左右的 GSH-Cd、GSH-Cu、GSH-Zn 溶液,用于确定色谱峰保留时间。

流动相:配制 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液,其中加入 0.1 mol/L NaCl 溶液和 $\varphi = 0.03\%$ (体积分,下同)的 NaN_3 ,调节 pH = 7.5, 0.45 μm 滤膜过滤,氮气鼓泡赶干净溶解氧。

分子量标准试剂:Albumin bovine(相对分子质量 67 000)、Albumin egg(相对分子质量 45 000)和 Vitamin B12(相对分子质量 1 355.4)。

水:去离子水再经 Milli-Q 装置纯化(电阻率 $>18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)。

1.2 样品处理

取一定量的鲜叶片和根系样品,在液氮中浸泡后,加 1.00 g 干净石英砂和 5.00 mL 缓冲液,将样品置于干净的玛瑙研钵中研磨至浆状。磨碎后转移至 10 mL 离心管,用 Tris-HCl 缓冲液清洗研钵,一并转移入离心管。在 4°C 离心 10 min,转速为 10 000 r/min,上层清液转移入干净离心管,置于冰箱(-70°C)保存。分析前,将样品从冰柜中取出,氮气保护下解冻, $0.2 \mu\text{m}$ 滤膜过滤后快速上机分析。

2 结果与讨论

2.1 镉铜锌元素形态分离与检测

在印度芥菜的叶片和根部均检测到 Cd、Cu、Zn 三种元素的 4 种未知峰,根据分子量标准试剂所做的分子量-保留时间公式,计算其大致分子量,再通过半胱氨酸-Cd(Cu,Zn)、谷胱甘肽-Cd(Cu,Zn)标准物质保留时间及文献[16-17]报道的分子量范围初步推断的各形态列于表 2,谱图如图 1 所示。

表 2 元素不同形态及保留时间

Table 2 Species of heavy metals with retention time

元素	标注	形态	保留时间 t_R/min
Cd	1	Cys-Cd	13.5
	2	GSH-Cd	10.2
	3	$(\text{PC})_2\text{-Cd}$	8.8
	4	$(\text{PC})_3\text{-Cd}$	7.8
Zn	1	Cys-Zn	11.4
	2	GSH-Zn	10.6
	3	$(\text{PC})_2\text{-Zn}$	9.1
	4	$(\text{PC})_3\text{-Zn}$	7.8
Cu	1	Cys-Cu	11.4
	2	GSH-Cu	10.3
	3	$(\text{PC})_2\text{-Cu}$	9.1
	4	$(\text{PC})_3\text{-Cu}$	7.8

2.2 不同元素形态在植物体内的分布规律

Cd、Cu、Zn 三种元素在同一植物不同部位的不同形态分布如图 2~图 4 所示。可以看出,Cd 在植物体内的分布规律为:根部和叶片中均能检测到 4 种形态,但叶片中 Cd 以 GSH-Cd 为主,根部以

$(\text{PC})_2\text{-Cd}$ 为主。Cu 的分布规律是:叶片中能检测到 4 种形态,以 Cys-Cu 为主,根部只检测到 $(\text{PC})_2\text{-Cu}$ 和 Cys-Cu,且叶片中 Cu 各形态浓度要远高于根部。Zn 的分布规律是叶片中能检测到 4 种形态,以 Cys-Zn 为主,根部只检测到 Cys-Zn,且叶片中 Zn 各形态浓度要远高于根部。

另外,从 3 种元素的形态分布规律看,Cd、Cu、Zn 在与 GSH 和 Cys 的结合上有竞争^[10]。Cd 会取代 GSH 上的 Cu 和 Zn,生成 GSH-Cd,进而以 GSH 为前体,合成 $(\text{PC})_2\text{-Cd}$ 、 $(\text{PC})_3\text{-Cd}$,从而使印度芥菜表现出强的耐 Cd 特性。

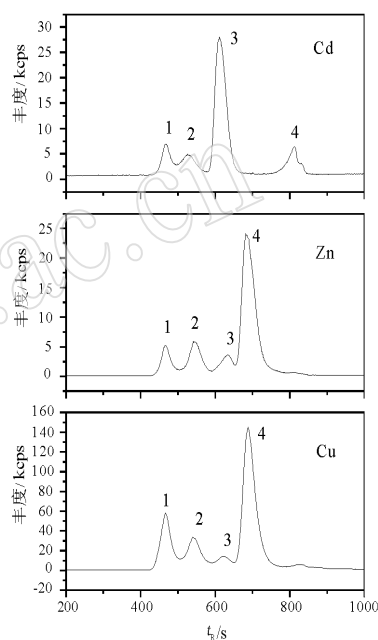


图 1 Cd、Zn、Cu 同时色谱分离谱图

Fig. 1 Chromatograms of Cd, Zn and Cu species by SEC-HPLC-ICP-MS

图 1 中 1、2、3、4 对应表 1 中各元素的形态。

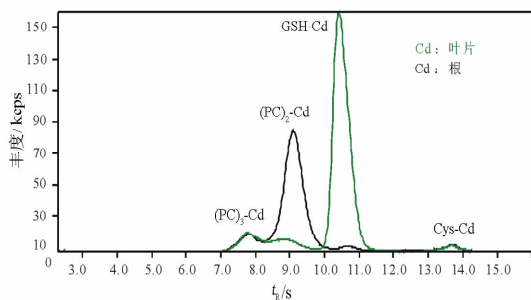


图 2 同一植物叶片和根中 Cd 形态色谱分离谱图

Fig. 2 Chromatograms of Cd species in leaf and root samples of the same plant by SEC-HPLC-ICP-MS

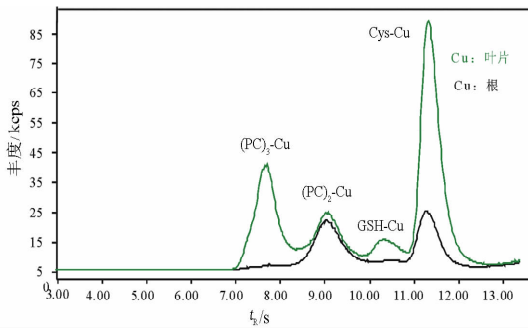


图3 同一植物叶片和根中Cu形态色谱分离谱图

Fig. 3 Chromatograms of Cu species in leaf and root samples of the same plant by SEC-HPLC-ICP-MS

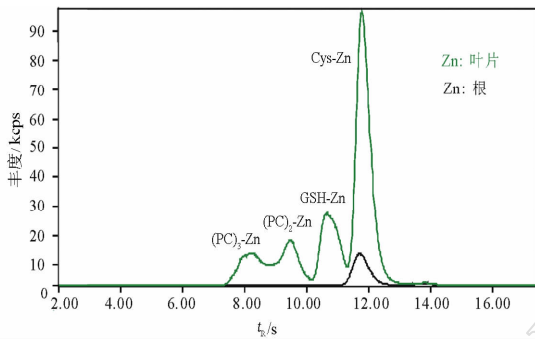


图4 同一植物叶片和根中Zn形态色谱分离谱图

Fig. 4 Chromatograms of Zn species in leaf and root samples of the same plant by SEC-HPLC-ICP-MS

3 结语

本工作建立了 SEC-HPLC-ICP-MS 同时测定印度芥菜中 Cd、Cu、Zn 形态分析的方法。为了防止巯基化合物的氧化反应发生,本工作全流程采取液氮及氮吹的抗氧化措施^[18]。在植物叶片和根部同时检测出 3 种元素的 4 种形态,即 Cys-Cd、GSH-Cd、(PC)₂-Cd、(PC)₃-Cd, Cys-Cu、GSH-Cu、(PC)₂-Cu、(PC)₃-Cu, Cys-Zn、GSH-Zn、(PC)₂-Zn、(PC)₃-Zn。在同一植物的不同部位,叶片中的形态以 GSH-Cd、Cys-Cu、Cys-Zn 为主,根部以 (PC)₂-Cd、(PC)₂-Cu、Cys-Cu 和 Cys-Zn 为主。另外,Cd、Cu、Zn 在与谷胱甘肽(GSH)和半胱氨酸(Cys)的结合上有竞争。

4 参考文献

[1] 游秀花, 聂丽华, 杨桂娣. 森林生态系统植物重金属(Cu, Zn, Cd)污染研究进展[J]. 福建林业科技, 2005, 32(3): 154-159.
[2] 骆永明. 金属污染土壤的植物修复[J]. 土壤, 1999, 31(5): 261-265.

[3] Brooks R R, Lee J, Reeves R D, Jaffre T. Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium species of indicator plants [J]. *Journal of Geochemical Exploration*, 1977, 7: 49-57.
[4] Chaney R L. Plant up take of inorganic waste constituents [M]//Land treatment of hazardous wastes. Parr J F. ed. New Jersey: Noyes Data Corporation, 1983: 50-76.
[5] Baker A J M. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements—A review of their distribution, ecology and phytochemistry [J]. *Biorecovery*, 1989, 1: 81-126.
[6] Salt D E, Prince R C, Pickering I J, Raskin I. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian Mustard [J]. *Plant Physiology*, 1995, 109: 1427-1433.
[7] Rauser W E. The role of thiols in plants under metal stress [M]// Sulphur nutrition and sulphur assimilation in higher plants. Brunold C. ed. Switzerland: Paul Haupt Bern, 2000: 169-183.
[8] Vögeli-Lange R, Wagner G J. Subcellular localisation of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves [J]. *Plant Physiology*, 1990, 92: 1086-1093.
[9] Ortiz D F, Ruscitti K F, McCue K F, Ow D W. Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270: 4721-4728.
[10] Wei Z G, Wong J W C, Zhao H Y, Zhang H J, Li H X, Hu F. Separation and determination of heavy metals associated with low molecular weight chelators in xylem saps of Indian Mustard (*Brassica juncea*) by size exclusion chromatography and atomic absorption spectrometry [J]. *Biological Trace Element Research*, 2007, 118: 146-158.
[11] Leopold I, Günther D. Investigation of the binding properties of heavy-metal-peptide complexes in plant cell cultures using HPLC-ICP-MS [J]. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 1997, 359: 367-370.
[12] Leopold I, Günther D, Neumann D. Application of high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry to the investigation of phytochelatin complexes and their role in heavy metal detoxification in plants [J]. *Analisis*, 1998, 26: 28-31.
[13] Leopold I, Günther D, Schimide J, Neuman D. Phytochelatin and heavy metal tolerance [J]. *Phytochemistry*, 1999, 50: 1323-1328.
[14] Vacchina V, Polec K, Szpunar J. Speciation of cadmium in plant tissues by size-exclusion chromatography

- with ICP-MS detection [J]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1999, 14: 1557 - 1566.
- [15] Wei Z G, Wong J W C, Chen D Y. Speciation of heavy metal binding non-protein thiols in *Agropyron elongatum* by size-exclusion HPLC-ICP-MS [J]. *Microchemical Journal*, 2003, 74: 207 - 213.
- [16] Weon Bae, Rajesh K. Properties of glutathione- and phytochelatin-capped CdS bionanocrystallites [J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 1998, 69: 33 - 43.
- [17] Polec-Pawlaka K, Ruzik R, Abranski K, Ciurzynska M, Gawronska H. Cadmium speciation in *Arabidopsis thaliana* as a strategy to study metal accumulation system in plants [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 540: 61 - 70.
- [18] Yang Hongxia, Liu Wei, Li Bing. Speciation analysis of cadmium in Indian mustard (*Brassica Juncea*) by size exclusion chromatography-high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (SEC-HPLC-ICP-MS) [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2009, 37 (10): 1511 - 1514.