

激光剥蚀-电感耦合等离子体质谱法原位分析 印度芥菜中 Cd、P、S、Cu 等 7 种元素

杨红霞* 赵令浩 高津旭 刘崑 李冰

(国家地质实验测试中心, 北京 100037)

摘 要 建立了茎中 7 种元素 Cd, P, S, K, Ca, Cu 和 Zn 的 LA-ICP-MS 原位分析及二维成像方法, 并研究了其在镉富集型印度芥菜茎中的分布特征。印度芥菜经 50 $\mu\text{mol/L}$ Cd 处理 14 d 后, 利用包埋剂包埋, 冷冻切片后, 用 Nd:YAG laser(213 nm) 器扫描, 激光剥蚀-电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS) 测定各元素强度, 同时选择¹³C 作为内标元素, 对各元素强度进行标准化处理。结果表明, 在富集型印度芥菜茎部, Cd 大量积聚于由韧皮部与木质部组成的维管组织中, 除此以外, 茎的韧皮部细胞中及表皮层也分布着大量的 Cd。7 种元素的分布相关性表明, Cd 与 Ca 具有相似的分布规律, 而 K 和 Ca, P 和 S 的分布呈显著正相关。说明重金属元素进入植株体内并被其吸收运输过程是伴随着植物对其它元素的吸收, 且具有相似的运输机制。本研究建立的元素原位分析方法证明 LA-ICP-MS 在植物样品中元素空间分布的研究方面具有很大的潜力。

关键词 激光剥蚀-电感耦合等离子体质谱法; 印度芥菜; 原位分析; 镉; 磷

1 引 言

近年来, 研究重金属在植物细胞中的微区分布渐渐成为探索植物耐性机理的热点, 基于同步辐射微区 XRF 是原位分析 Cd 的有力工具, Isaure 等^[1]利用 SRXRF 分析生长在 Cd 污染土壤的 *Arabidopsis thaliana* 叶片, 发现 Cd 主要分布在叶片的毛状体。Fukuda 等^[2]在 Cd 超积累植物 *Arabidopsis halleri* 的叶片同样发现 Cd 也分布在毛状体上, 并且 Zn 和 Mn 的分布与 Cd 相似。但 Küpper 等^[3]利用 SEM-EDX 研究却发现 Cd 主要分布在 *Arabidopsis halleri* 的叶肉细胞。近年来也有研究将 LA-ICPMS 应用于生物样品的测试的报道, 尽管具有缺乏植物激光固体标准校准物质, 而使用其它固体标样时, 可能由于基体效应而影响测试结果, 但当只需相对定量数据以便比较样品中不同元素分布情况时, 激光剥蚀-电感耦合等离子体质谱法(LA-ICP-MS) 被证明是一种有效的半定量分析方法^[4-10]。Tian 等^[11]利用 LA-ICPMS 技术结合荧光探针染色技术对超积累东南景天(HE) 叶中 Cd 等元素的分布特征进行原位分析。结果表明, Cd 在维管组织和上皮层较高, 而下表皮的分布相对较低; Zn 主要分布在上下表皮细胞中。

理想的样品无损处理技术应能利用最小的样品量对污染物暴露情况进行准确且有代表性评价^[12], 将 LA-ICPMS 应用于生物介质中微量元素分析具有很大潜力, 目前在该领域中的应用多集中于环形生长结构, 如树环^[13]、软体动物壳^[14,15]和鱼耳石^[16]。本研究采用 LA-ICPMS 建立了茎中 7 种元素 Cd, P, S, K, Ca, Cu 和 Zn 的原位微区分析及二维成像方法, 并研究了其在 Cd 富集型印度芥菜茎中的分布特征。从细胞水平上揭示超积累植物中 Cd 的转运和富集规律。

2 实验部分

2.1 仪器条件与参数

LA-ICP-MS 分析采用 Element II 高分辨率质谱(ThermoFisher 公司) 及 UP213 Nd:YAG 深紫外激光烧蚀系统(New Wave) , 采用 NIST612 进行仪器调节, 氧化物产率(²³²Th¹⁶O⁺/²³²Th⁺) 低于 0.3% , 有效降低氧化物对待测元素的干扰, 激光剥蚀采用线扫方式, 行与行的间隔为 10 μm 。具体工作参数见表 1。

2013-10-23 收稿; 2013-12-21 接受

本文系国家自然科学基金(No. 41301566), 国土资源部公益性行业科研专项(No. 200911043-26) 和中国地质大调查项目(No. 12120113015400) 资助

* E-mail: yanghongxia1@sina.com

表 1 LA-ICPMS 仪器参数

Table 1 Parameters of laser ablation (LA)-ICP-MS

LA 参数		ICP-MS 参数	
激光波长 Wavelength of Nd:YAG laser	213 nm	冷却气流速 Cool gas, Ar	16.94 L/min
束斑大小 Laser pit size	20 μm	载气流速 Carrier gas, He	0.577 L/min
脉冲频率 Pulse repetition rate	10 Hz	样品气流速 Sample gas	0.594 L/min
扫线速度 Scan speed	20 $\mu\text{m/s}$	射频功率 RF Power	1004 W
输出能量 Output energy	80%	分辨率 Resolution	300(低分辨模式)
脉冲能量 Pulse energy	0.03 mJ	元素及同位素 Isotopes	^{13}C , ^{34}S , ^{39}K , ^{44}Ca , ^{66}Zn , ^{111}Cd , ^{65}Cu , ^{31}P
能量密度 Energy density	9.55 J/cm ²		

2.2 植物培养

植物材料为富集型印度芥菜,印度芥菜种子(426308)由美国农业部种子资源库提供,种子进萌发后,播种于基质中,在基质中生长 20 d 转移到 1/4 营养液预培养 8 d,再采用全营养液培养。营养液组成为: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 2.00 mmol/L, KH_2PO_4 0.10 mmol/L, MgSO_4 0.50 mmol/L, KCl 0.10 mmol/L, K_2SO_4 0.70 mmol/L, H_3BO_3 10.00 $\mu\text{mol/L}$, MnSO_4 0.50 $\mu\text{mol/L}$, ZnSO_4 1.0 $\mu\text{mol/L}$, CuSO_4 0.20 $\mu\text{mol/L}$, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 0.01 $\mu\text{mol/L}$, Fe-EDTA 100 $\mu\text{mol/L}$ 。每天用 0.1 mol/L HCl 或者 0.1 mol/L NaOH 调营养液至 $\text{pH} \approx 5.8$,保持全天候通气,每 3 d 换一次营养液。植物在温室自然光条件下培养,日夜温度分别为 26/20 $^\circ\text{C}$,湿度为 70%/85%。在全营养液中培养 8 d 后,进行 Cd 处理,共设 2 个处理水平:①CK(完全营养液),②25 $\mu\text{mol/L}$ Cd。每个处理重复 3 次。

2.3 样品处理

取预培养 10 d 后的印度芥菜苗,添加 25 $\mu\text{mol/L}$ Cd 处理,每个处理重复 3 次。Cd 处理 14 d 后,切下植株的成熟叶片,用液氮固定,利用包埋剂包埋好后,在 -30 $^\circ\text{C}$ 的环境下利用冷冻切片机制成切片(60 μm 厚)。在 30 $^\circ\text{C}$ 条件下冷冻干燥 3 d。取出干燥后的样品,在显微镜下拍照。

2.4 数据处理

采用 Origin 8.1 软件进行数据处理及相关统计分析。

3 结果与分析

3.1 内标元素

为了补偿激光剥蚀进样量不均匀对信号强度的影响,选择 ^{13}C 作为内标元素,对各元素强度进行标准化处理。在生物基体样品中,不同组织结构 ^{13}C 含量具有一定差异,本实验对样品 ^{13}C 监测结果显示,信号波动 RSD 值仅为 4.1%,其在不同组织结构中含量基本一致,不会对结论造成影响。

3.2 镉与其它元素在茎中的分布

为获得印度芥菜茎中元素分布的二维图像,整个茎样品置于激光剥蚀样品池内,激光束扫描后,信号被输送到 ICP-MS 中检测。各元素强度经软件处理并成像。积累型印度芥菜茎中 7 种元素分布如图 1 所示,红色表示元素的含量高,而紫色则表示含量较低。

由图 1 可见,各元素在茎中有不同的分布特点。在植物茎组织切片中,几乎所有元素在维管组织及其周围细胞中分布较高,Cd 大量积聚于由韧皮部与木质部组成的维管组织中,在表皮与皮层中 Cd 浓度也较高,但在由大量薄壁细胞组成的中间薄壁组织中分布较少,其它元素则与 Cd 分布特征相似。对比其它元素,Cu 和 Zn 元素含量比 Cd 低;K 和 P 在茎内部的薄壁细胞中也有一定程度的分布,但 K 的含量要远高于其它元素,这表明 K 有很强的木质部运输和卸载的能力,与目前普遍认为的 K 是植物体移动能力很强的大量元素这一观点一致。

3.3 元素分布的相关性分析

茎中相关性结果分析表明,Cd 与 P, S, K, Ca 强度分布呈正相关($R^2 > 0.3$, 样品数 $n = 5400$, 图 2),而 K 与 Ca 呈显著正相关($r^2 = 0.75$, 样品数 $n = 5400$, 图 2c),P 和 S 呈显著正相关($R^2 = 0.5323$, 样品数 $n = 5400$, 图 3)。Cd 与 Ca 具有相似的分布规律,可能与二者离子半径相近、化学性质相似有关。而 K,

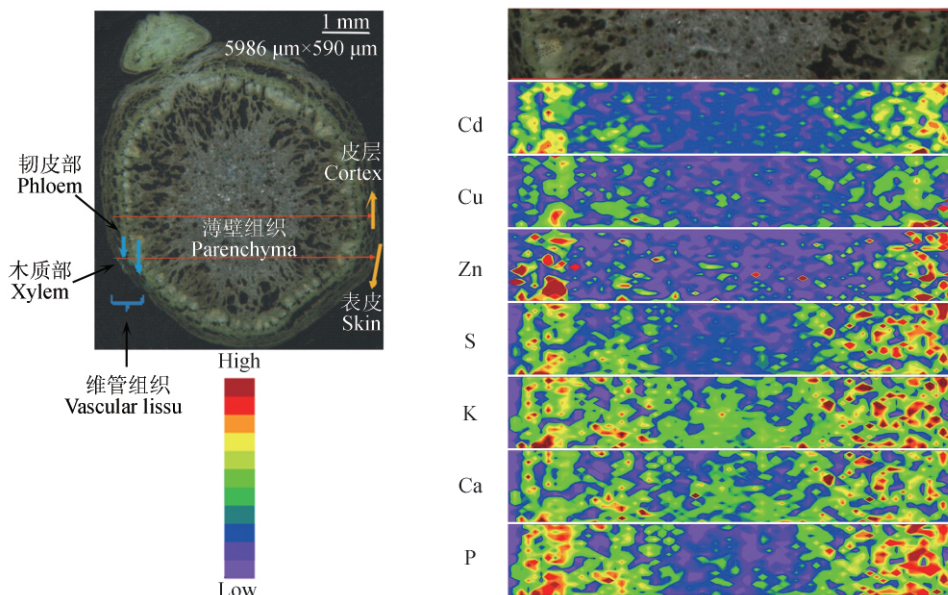


图 1 镉富集型印度芥菜茎中 Cd, Cu, Zn, S, K, Ca, P 元素的分布

Fig.1 Quantified images of different elements in stem of Indian mustard

分析区域 5986 $\mu\text{m} \times 590 \mu\text{m}$ 激光斑束 20 μm 扫描速度 20 $\mu\text{m}/\text{s}$ 扫描行距 10 μm 。

Ca, P 和 S 的分布呈显著正相关, 说明重金属元素进入植株体内并被其吸收运输过程是伴随着植物对其它元素的吸收。

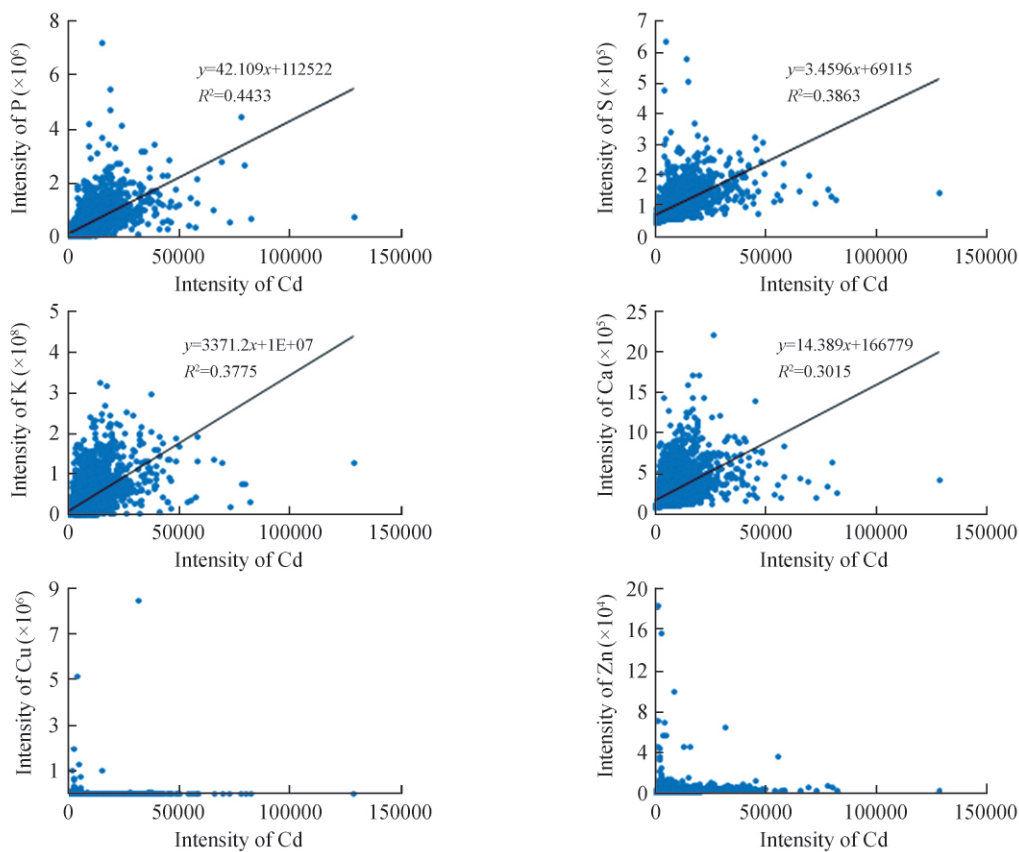


图 2 富集型印度芥菜茎中 Cd 与 P, S, K, Ca, Cu, Zn 元素的相关性分析

Fig.2 Relationships between intensity of Cd and P, S, K, Ca, Cu, Zn in the stem

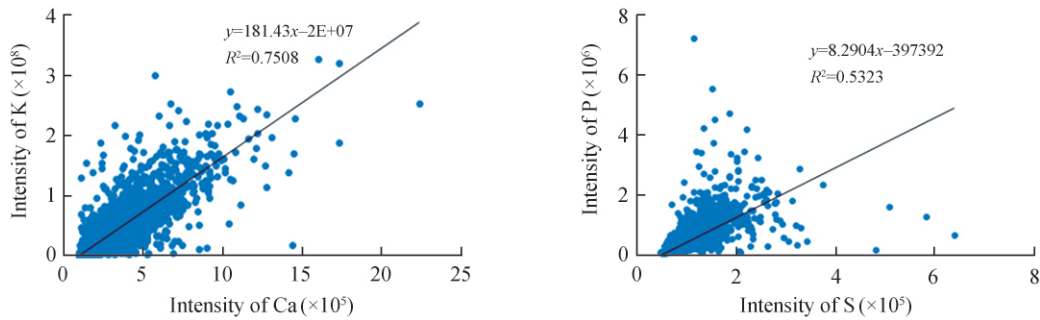


图 3 富集型印度芥菜茎中 K 和 Ca, P 和 S 元素的相关性分析

Fig. 3 Relationships between intensity of K and Ca, P and S in stem of Indian mustard

4 结 论

本实验采用 LA-ICP-MS 质谱技术原位分析了富集型印度芥菜茎中 7 种元素 Cd, P, S, K, Ca, Cu 和 Zn 的分布情况。通过定量分析软件和二维成像软件得到 Cd 等元素在细胞组织中的二维分布图像,建立了 LA-ICP-MS 定量分析植物细胞中元素分布的微区二维成像方法。双聚焦高分辨 ICP-MS 与 LA 联用技术具有分辨率高、可多元素且可选择不同同位素同时测定、可实现相对定量的优势,是研究植物组织中元素微区分布的强有力成像技术,在植物毒理学研究方面具有很大的潜力^[17]。

要解除过量重金属对植物可能的毒害,植物需要在细胞中找到一个合适的地方将其固定下来并永久储存^[18]。本研究表明, Cd 优先储存在由韧皮部与木质部组成的维管组织中,维管系统中的重金属一般被认为是与木质部运输及其向叶片中的转运有关^[19]。在富集型印度芥菜茎中 Cd 的这种分布形式表明可能有相当数量的 Cd 主要通过木质部导管运输。除此以外,茎的韧皮部细胞中还分布着大量的 Cd,表明可能有相当量的 Cd 可以通过韧皮部转运重新在植物组织中分配。另外,在茎的表皮与皮层中 Cd 浓度也较高,由此可见,叶肉细胞、茎的表皮在应对累积的重金属过程中也同样发挥着重要作用。元素分布的相关性说明重金属元素进入植株体内并被其吸收运输过程是伴随着植物对其它元素的吸收。

References

- 1 Isaure M P, Fayard B, Sarret G, Painis S, Bourguignon J. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2006, 61(12): 1242 - 1252
- 2 Fukuda N, Hokura A, Kitajima N, Terada Y, Saito H, Abe T, Nakai I. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2008, 23(8): 1068 - 1075
- 3 Küpper H, Lombi E, Zhao F J, McGrath S P. *Planta*, 2000, 212(1): 75 - 84
- 4 Perkins W T, Fuge R, Pearce N J G. *J. Anal. At. Spectrom.*, 1991, 6: 445 - 449
- 5 SUN Xiao-Hong, HU Ming-Yue, LIU Cheng-Lin, JIAO Peng-Cheng, MA Li-Chun, WANG Xin, ZHAN Xiu-Chun. *Chinese J. Anal. Chem.*, 2013, 41(2): 235 - 241
孙小虹, 胡明月, 刘成林, 焦鹏程, 马黎春, 王鑫, 詹秀春. *分析化学*, 2013, 41(2): 235 - 241
- 6 Becker J S, Matusch A, Depboylu C, Dobrowolska J, Zoriy M V. *Anal. Chem.*, 2007, 79(16): 6074 - 6080
- 7 Becker J S, Zoriy M, Matusch A, Wu B, Salber D, Palm C, Becker J S. *Mass Spectrom.*, 2010, Rev 29: 156 - 175
- 8 Pozebon D, Dressler V L, Mesko M F, Matusch A, Becker J S. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2010, 25(11): 1739 - 1744
- 9 WANG Ying, GUO Yan-Li, YUAN Hong-Lin, WEI Yong-Feng, YAN Hong-Tao, CHEN Hui-Hui. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2012, 32(1): 223 - 228
王颖, 郭艳丽, 袁洪林, 魏永锋, 闫宏涛, 陈慧慧. *光谱学与光谱分析*, 2012, 32(1): 223 - 228
- 10 Hare D, Reedy B, Grimm R, Wilkins S, Volitakis I, George J L, Cherny R A, Bush A I, Finkelstein D I, Doble P. *Metallomics*, 2009, 1(1): 53 - 58
- 11 Tian S K, Lu L L, Labavitch J, Yang X E, He Z L, Hu H, Sarangi R, Newville M, Commisso J, Brown P. *Plant Physiology*, 2011, 157: 1914 - 1925
- 12 Brian P J, Willim A H, Jennifer B. *Environ. Sci. Technol.*, 2003, 37: 2511 - 2515
- 13 Watmough S A, Hutchinson T C, Evans R. D. *Environ. Sci. Technol.* 1997, 31: 114 - 118

- 14 Price G D, Pearce N J G. *Mar. Pollut. Bull.*, 1997, 34, 1025 – 1031
- 15 Toland H, Perkins B, Pearce N, Keenan F, Leng M. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2000, 15: 1143 – 1148
- 16 Thorold S R, Shuttleworth S. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 2000, 57: 1232 – 1242
- 17 Siebold M, Leidich P, Bertini M, Deflorio G, Feldmann J, Krupp E M, Halmshlager E, Woodward S. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, 402: 3323 – 3331
- 18 Brooks R R. CAB International, New York. 1998: 55 – 94
- 19 McNear D H, Peltier E, Everhart J, Chaney R L, Sutton S, Newville M, rivers M, Sparks D L. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39(7) : 2210 – 2218

Distribution of Cd, P, S, K, Ca, Cu and Zn Elements in Indian Mustard by LA-ICP-MS

YANG Hong-Xia^{*}, ZHAO Ling-Hao, GAO Jin-Xu, LIU Wei, LI Bing
(National Research Center for Geoanalysis, Beijing 100037, China)

Abstract Imaging of trace metal distribution in the cadmium (Cd) hyperaccumulator Indian mustard by laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS) was typically performed using spatial resolutions of 25 μm . Indian Mustard was submitted to 50 mol/L Cd for 14 days exposure and analysed using Nd : YAG laser (213 nm) . Intensities of ^{13}C , ^{34}S , ^{39}K , ^{44}Ca , ^{66}Zn , ^{111}Cd , ^{65}Cu and ^{31}P were measured by ICP-MS to study elemental distribution. Preferential Cd accumulation in vascular bundles was observed in stem tissue, whereas Cd was mainly localized to the mesophyll and vascular cells. The high relationship between Ca and Cd distribution indicated that the two elements had a very similar pathway. In vivo analytical method developed in this work was useful to study spatial element distribution across stem samples and had great potential for applications in other areas of plant pathology research.

Keywords Laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry; Indian mustard; In situ analysis; Cadmium; Phosphorus

(Received 23 October 2013; accepted 21 December 2013)

《电催化》

“十二五”国家重点图书。国家科学技术学术著作出版基金资助项目。

本书由电催化基础和重要电催化过程两部分组成。内容包括从纳米结构、表面结构、电子结构出发认识电催化过程和催化剂材料的性质,到电催化剂的理论设计、理论模拟和制备;从氢、氧及有机分子电催化基础,到燃料电池、太阳能电池、生物电化学乃至工业电化学过程等电催化应用。本书在内容的选择上,既注重基础知识和研究方法的介绍,同时又紧紧围绕前沿方向。

书号: 978-7-122-17183-2 定价: 168.0 元

出版时间: 2013 年 11 月 开本: 16 化学工业出版社出版