

水稻籽实中 Pb 的分布及其结合形态

杨居荣, 何孟常, 查 燕, 刘 虹

(北京师范大学环境科学研究所, 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100875)

摘 要: 采用组织化学及生物化学分析方法, 研究了重金属污染区水稻籽实中 Pb 的分布及其结合形态。结果表明, Pb 在籽实各形态结构中的浓度分布不均匀, 胚和种皮中的浓度显著高于胚乳和颖壳。就 Pb 总量而言, 胚乳中的比例最高; Pb 在籽实的主要营养成分中, 以蛋白质中的分布比例最高, 可达 83%, 脂肪中甚微; 在 4 种主要类型蛋白质中, 以谷蛋白和球蛋白中的比例较高。凝胶层析的结果表明, 蛋白质 – Pb 结合体的表观分子量为 54. 5KD, 蒸煮及体外消化酶的处理下, 前者易分解, 出现分子量较小的结合物。

关键词: 水稻籽实; 铅; 结合形态; 稳定性

中图分类号: X132 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000 – 0267(2001)03 – 129 – 04

The Distribution and Binding Forms of Lead in Rice Seed

YANG Ju -rong, HE Meng -chang, ZHA Yan, LIU Hong

(State Key Joint Laboratory of Environmental Simulation and Pollution Control, Institute of Environmental Science, Beijing Normal University, Beijing 100875 China)

Abstract: The distribution and binding forms of Pb in polluted rice seeds were studied using both methods of histochemistry and biochemistry. The results indicated that the distribution of Pb in rice grains was very uneven. The concentrations of Pb in either embryo or seed capsule was higher than that in endosperm and chaff, respectively. However, the accumulated contents of lead was chiefly in the endosperm. The percentage of protein – binding forms in total contents of rice grains for Pb was the highest and reached to 83%, while the percentage of fat – binding forms for Pb was lower. In terms of fractionation of albumin, globulin, prolamin and glutelin, it was shown that Pb was mainly bound with glutelin and globulin. Separation of proteins by Sephadex chromatography and subsequent analysis by atomic absorption spectroscopy revealed that apparent molecular weights of protein – bound Pb were 54. 5KD and 5. 50 KD, respectively. After treatment of cooking and enzyme digestion, high molecular weight protein – binding Pb was broken down into low molecular weight complex (5. 50KD).

Keywords: rice seed; lead; protein – bound forms; stability

Pb 是污染环境的重要污染物, 在金属矿区受采矿、冶炼、污水灌溉等人为活动的影响, Pb 进入环境的数量逐年增多。Pb 对人体的危害, 除通过大气经呼吸道进入的途径外, 还可通过食物链传递摄入人体。Pb 对人体健康的影响, 除与其摄入总量有关外, 受存在形态的影响, 毒性也有较大差异, 如有机 Pb 与无机 Pb 相比, 动物和人体的中毒症状和毒性程度有很大不同^[1]。但迄今为止, 有关粮食及食品中 Pb 的形态及其与毒性关系的报道所见甚少^[2]。本文以污染稻谷为材料, 分析了 Pb 在其中的分布及存在形态, 为进一步评价其对人体的毒性提供科学依据。

收稿日期: 2000 – 07 – 11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (49771069)

作者简介: 杨居荣 (1939—), 女, 北京师范大学环境科学研究所教授, 主要研究方向为环境生态学。

1 材料及方法

1. 1 样品来源

污染稻谷取自云南兰坪县铅锌矿区周围农田收集的样品。

1. 2 籽实形态结构区分

取水稻籽实, 先剥离颖壳, 将颖果置于少量去离子水中, 使其充分吸胀, 在解剖镜下剥离区分出皮层、胚和胚乳, 风干后备用。

1. 3 籽实中脂肪的提取

按国家标准方法 (GB2906 – 82)^[3] 提取籽实中粗脂肪。

1. 4 籽实中主要蛋白质的提取

采用连续提取法^[4] 区分清蛋白、球蛋白、醇溶谷

蛋白和谷蛋白。提取顺序为:去离子水、5% NaCl、70% 乙醇、0.2% NaOH,提取液与样品的比例为 10:1。其步骤是:将提取液加于样品中,搅拌 1 h,置冰箱(4℃)内 10 h 后,离心 30 min ($9\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$),取上清液,沉淀部分按同样方法进行下一提取剂的提取。

1.5 蛋白质 - Pb 结合体的凝胶层析

称取适量去种皮、脱脂样品,用 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris - HCl (pH 7.5) 提取,样品与提取液的比例为 1:10。充分搅拌后置于冰箱内(4℃)10 h,在高速冰冻离心机中离心($20\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$)1 h,取上清液于冰冻干燥箱内浓缩 5 倍。取浓缩样品 1 mL,用 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris - HCl 溶解,经 Sephadex G75 柱($2.0\times100\text{ cm}$)以 $0.02\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris - HCl 缓冲液(pH7.5)进行洗脱。用自动部分收集器(BS2-100)以 $4\text{ mL}\cdot(20\text{ min})^{-1}$ 流速,每管 4 mL 收集洗脱液。紫外分光光度计(BECKMAN UV-8B)测定洗脱液的紫外吸收峰(225 nm 处),同步测定洗脱液中 Pb 的浓度。

采用标准蛋白质曲线法测定洗脱液样品的分子量。标准蛋白质为:牛血清蛋白质(分子量 66 000)、鸡卵清蛋白(分子量 45 000)、胰蛋白酶(分子量 24 000)、细胞色素 C(分子量 12 400)、胰岛素(分子量 5 734),均为分析纯。标准蛋白质混合液按样品相同的方法经 Sephadex G75 柱层析,绘制蛋白质标准曲线。

1.6 Pb 的测定

待测样品经硝酸、高氯酸消化后,用原子吸收分光光度计(固定 180-80)测定其含量。

2 结果与分析

2.1 Pb 在籽实结构中的分布

从表 1 结果看出,Pb 在籽实中的浓度分布是不均匀的,其中胚中浓度最高,种皮次之,胚乳和颖壳中浓度较低。但从 Pb 的总量分布看,由于各结构组分占籽实重量的比例不同,胚乳是组成籽实最重要的部分,通常可占籽实重量的 70%—80%,故就 Pb 的总量而言,以胚乳中 Pb 占绝对优势,约 73% 的 Pb 分布

表 1 Pb 在水稻籽实各形态结构中的浓度及比例

Table 1 Concentrations and proportions of Pb in different forms of rice seed

形态结构	lg 籽实中各形态 结构组分的重量/g	Pb 浓度 /mg · kg ⁻¹	占 Pb 总量 的比例/%
颖壳	0.182 9	0.110	10.19
种皮	0.029 4	0.646	9.57
胚	0.018 8	0.707	6.70
胚乳	0.769 0	0.189	73.54

在胚乳中。

籽实中各形态结构的化学组成有很大差别。颖壳的主要成分是粗纤维;种皮俗称米糠层,以矿物质含量较高,还有粗纤维、维生素、脂肪等成分;胚中则含有多量的蛋白质,还有少量脂肪和可溶性碳水化合物;胚乳则以淀粉为主,70% 的淀粉分布在胚乳中,还含有少量蛋白质和脂肪。表 1 胚中浓度显著高于胚乳的结果,说明 Pb 易于与蛋白质相结合。种皮中浓度也较高的事实说明,Pb 在粗纤维中的结合量也较高。

2.2 Pb 在籽实主要营养成分中的分布

从表 2 结果看出,以蛋白质中 Pb 的浓度最高,残渣(主要是淀粉,少量纤维素和矿物质)次之,脂肪中浓度很低。从 Pb 的总量分布看,以蛋白质中占据绝对优势,可达 83% 以上,其次是残渣部分。该结果进一步表明 Pb 主要与蛋白质相结合,此外,还可与纤维素

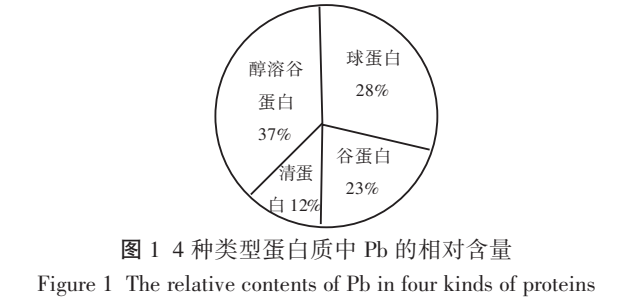
表 2 Pb 在籽实主要营养成分中的分布

Table 2 The distribution of Pb in extracts of fat and protein of rice seed

形态结构	lg 籽实中各形态 结构组分的重量/g	Pb 浓度 /mg · kg ⁻¹	占 Pb 总量 的比例/%
颖壳	0.182 9	0.110	10.19
种皮	0.029 4	0.646	9.57
胚	0.018 8	0.707	6.70
胚乳	0.769 0	0.189	73.54

等生物成分相结合,而与脂肪的结合甚微。

根据种子储藏蛋白质在各种溶剂中溶解度的不同可以分为清蛋白、醇溶谷蛋白、球蛋白和谷蛋白。其中清蛋白溶于水主要是酶蛋白,在水稻种子蛋白中占 5%;球蛋白不溶于水,但溶于盐类溶液,约占种子蛋白的 10%;醇溶谷蛋白不溶于水和盐类溶液,但溶于 7% 酒精溶液,约占水稻种子蛋白质的 5%,谷蛋白不溶于水、盐类和乙醇溶液,但溶于稀碱或稀醇溶液,在水稻种子蛋白中所占比例最高,可达 80%。对 4 种类型蛋白质中 Pb 相对含量的测定结果见图 1。可以看出,以球蛋白和谷蛋白中 Pb 的分布比例最高,特别是仅占种子蛋白总量约 10% 的球蛋白中,Pb 的相对含量可达 42% 以上。



2.3 蛋白质 - Pb 结合体的稳定性

2.3.1 蛋白质 - Pb 结合体的层析分离

将脱脂籽实 Tris - HCl 可溶性组分的凝胶层析结果示于图 2。由图 2 看出,脱脂籽实 Tris - HCl 可溶性组分经 Sephadex G 75 柱分离得到 3 个明显的紫外吸收峰,分别出现在第 15 管(1 峰)、31 管(2 峰)、和 44 管(3 峰)处,经与相同条件下的蛋白质曲线相对照,这 3 个峰的表现分子量分别为 54.5 KD、16.04 KD 和 5.5 KD。

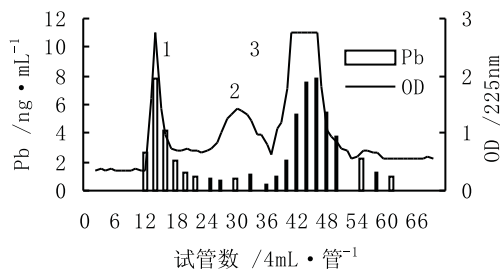


图 2 水稻籽实 Tris - HCl 提取液的凝胶层析结果
Figure 2 Sephadex G - 75 column chromatography of rice extracts with Tris - HCl method

2.3.2 蛋白质 - Pb 结合体的稳定性

(1) 煮沸处理对蛋白质 - Pb 结合体的影响

将脱脂籽实煮沸后,用 Tris - HCl 提取并经 Sephadex G75 柱层析,其结果示图 3。与图 2 未经煮沸处理的层析结果相比较看出,煮沸后洗脱液中有的 3 个蛋白质紫外吸收峰的 OD 值均明显变小,尤以第 1 峰下降明显,在第 3 峰后原无明显紫外吸收的部分出现了区分不够清晰的紫外吸收“平台”。洗脱液中 Pb 浓度峰也发生了相应变化,原有的 1、2 浓度峰在煮沸后变得不明显,在 1 到 3 峰之间的洗脱液中 Pb 的浓度均低,而在第 3 峰之后新出现紫外吸收部分的洗脱液中检测到较高浓度的 Pb。该结果表明,煮沸加热影响使水稻蛋白质变性,可能是热变性引起蛋白质凝

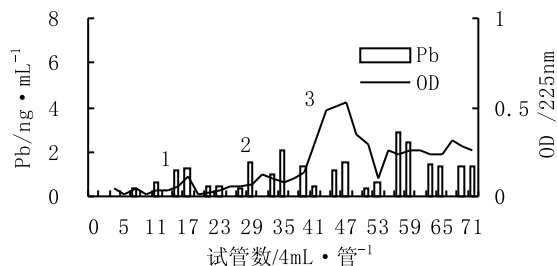


图 3 煮沸对水稻籽实中蛋白质 - Pb 结合体的影响
Figure 3 Effects of cooking on protein - binding Pb in rice seed

结,变成不可溶,因此不能透过凝胶柱,使 1、2 峰几乎消失;也有可能是大分子蛋白质 - Pb 结合体分解成小分子或多肽物质,与此同时,Pb 也被释放出来,成为小分子结合物。

(2) 消化酶处理对蛋白质 - Pb 结合体的影响

为模拟人体内蛋白质 - Pb 结合体的变化,采用体外消化酶(胃蛋白酶、胰蛋白酶)处理后进行凝胶层析的方法,分析蛋白质 - Pb 结合体的变化(图 4、图 5)。从图 4 可见,在胃蛋白酶的作用下,洗脱液的蛋白质紫外吸收峰发生了改变,第 1 紫外吸收峰的 OD 值明显低于未加酶处理的对照组,第 2 峰比对照组略低,而第 3 峰的 OD 值变化不明显。洗脱液中 Pb 的浓度明显降低,第 3 峰处 Pb 的浓度也略有降低。在第 3 峰后无紫外吸收的洗脱液中可见到较高浓度 Pb 的分布。该结果表明,在胃蛋白酶的作用下,大分子蛋白质 - Pb 结合体分解,Pb 的结合形式也随之改变。

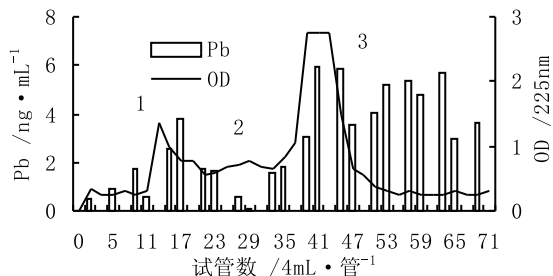


图 4 胃蛋白酶消化对水稻籽实中蛋白质 - Pb 结合体的影响
Figure 4 Effect of pepsin digestion on protein - binding Pb in rice seed

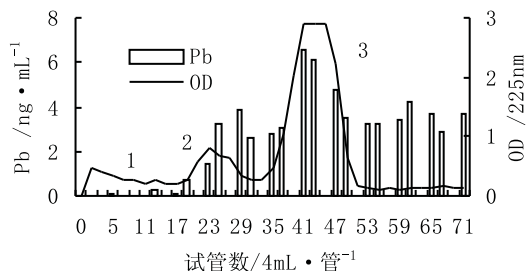


图 5 胰蛋白酶消化对水稻籽实中蛋白质 - Pb 结合体的影响
Figure 5 Effect of trypsin digestion on protein - binding Pb in rice seed

从图 5 看出,在胰蛋白酶作用下,洗脱液的第 1 紫外吸收峰消失,第 2 峰变化不明显,第 3 峰的形状与对照组相比较基本一致。可见胰蛋白酶能够彻底分解第 1 峰(54.4KD)处的蛋白质分子。从 Pb 的浓度分布看,也发生相应改变,第 1 峰处已无 Pb 的分布,第 2 峰处 Pb 浓度与对照相差不大,第 3 峰后的洗脱液中含有较高浓度的 Pb。

3 结论

- 3.1 Pb 在水稻籽实中的浓度分布是不均匀的, 胚和种皮中的浓度显著高于胚乳和颖壳。由于胚乳是组成籽实最重要的部分, 可占籽实总重量的 80%, 故从 Pb 的总量分布看, 以胚乳中的分布比例最大, 可达 73%。
- 3.2 在水稻籽实的主要营养成分中, Pb 在蛋白质中的分布比例最高, 可达 83%, 脂肪中很少。在 4 种类型蛋白质中, 以谷蛋白和球蛋白的分布比例较高。
- 3.3 凝胶层析结果表明, 蛋白质 - Pb 结合体的表观分子量为 54.5KD; 在蒸煮及消化酶的处理下, 大分子蛋白质 - Pb 结合体可 (54.4KD) 被分解, 出现了分子量较小的结合物。

4 讨论

如前所述 Pb 在水稻籽实各部位的分布不均匀, 颖壳和种子中的 Pb 占据相当比例, 因此, 随着稻谷加工成糙米、精米, 一部分 Pb 将随之被去除。据笔者对不同加工深度的试验结果^[5], 经粗加工成糙米时, Pb 的去除率即可达到 51%, 当经细加工成精米后, Pb 的去除率可高达 50%, 这在很大程度上减轻了 Pb 对人体的危害。然而, 颖壳和稻谷麸通常作为饲料, 其对牲畜的影响应该考虑, 特别是在重金属污染区尤应注意。此外, 近年来人们注意到膳食纤维在防治多种疾病及人体保健中具有重要作用, 积极开展了膳食纤维

的开发利用研究。此时应注意膳食纤维的内源性 Pb 污染, 应在原料的选择或相应的脱除工艺上予以注意。

当前, 在研究包括 Pb 在内的重金属生物或人体毒性时, 往往采用投加金属无机化合物的形式进行毒性试验。从本文可知, Pb 在谷物中并非以简单的无机化合物或离子态存在, 经摄食进入生物或人体后, 其在体内的吸收、代谢与无机形式会有较大区别, 它们在体内各器官的蓄积及随粪、尿的排泄机制及其与毒性关系需进一步研究。从本文模拟消化酶的试验可知, 大分子蛋白质 - Pb 结合体在消化酶的作用下可分解为小分子结合体, 其结合形态以及其中有无游离态 Pb 尚需进一步研究, 它们在人体各器官内的蓄积及吸收、排泄情况对毒性影响较大, 应作进一步研究。

参考文献:

[1] 王连生. 环境中有机金属化合物[M]. 南京: 南京大学出版社, 1989. 152 - 164.

[2] Bray J T. Multielement analysis of metal - binding proteins in cytosol fractions[J]. *The Science of the Total Environment*, 1983, 28: 367 - 374.

[3] GB2906 - 82, 谷物、油料作物种子脂肪测定方法[S]. 北京: 技术出版社, 1983.

[4] 皆川兴荣. カドミウム污染米中の重金属の化学形态[J]. 日本公卫志, 1978, 25(2): 97 - 102.

[5] 查燕, 杨居荣, 刘虹, 何孟常. 谷物中重金属的分布及加工过程的影响[J]. 环境科学, 2000, 12(3): 52 - 55.

中国农业生态环境保护协会召开第五次代表大会暨生态农业产业化经验交流会

中国农业生态环境保护协会第五次代表大会暨生态农业产业化经验交流会于 2001 年 5 月 15 日至 17 日在西安召开。协会会长代表、农业部相关司局领导及新闻单位的代表等共 116 人出席了会议。

会议开幕式由协会第四届副理事长张文庆主持。农业部副部长张宝文应邀出席会议并作了题为《发扬成绩, 开拓创新, 推进农业生态环境建设和保护再上新台阶》的讲话。陕西省农业厅副厅长王锋到会致了贺词。中国农学会向大会发来了贺信, 热烈祝贺本次大会的召开。协会第四届理事长相重扬受第四届理事会的委托, 向大会作了题为《抓住机遇, 开拓进取, 为推进我国农业生态环境保护事业的发展而奋斗》的工作报告。

大会选举了第五届理事会理事, 讨论并通过了《中国农业生态环境保护协会章程》, 新一届理事会选举王锡吾等 41 人为常务理事, 并一致推选王锡吾同志为理事长, 郭士勤、闵耀良、李文华、江树人、骆世明、李玉浸、王树清为副理事长, 郭志凯为秘书长。根据形势发展的需要, 第五届理事会对协会专业委员会进行了调整, 确定设立 6 个专业委员会和一个分会。在闭幕式上, 五届理事会理事长王锡吾作了总结发言, 并根据我国农业生态环保工作现状、发展规划及协会实际情况, 提出了五届理事会的工作思路、目标和近期工作重点。

大会开展了以“生态农业产业化”为主题的经验交流。河北省农业厅副厅长李大北等 8 位代表作了大会发言。“生态农业产业化”的实质内容是无公害农产品的生产, 代表们介绍了无公害农产品生产的典型经验, 就目前全国无公害农产品的发展提出建设性的意见和策略。

这次大会是在全党、全国人民满怀信心跨入 21 世纪, “十五”计划已开始全面实施, 我国国民经济又取得飞跃发展的大好形势下召开的, 与会代表表示要继续发扬勇于拼搏, 和团结协作精神, 继往开来, 开拓进取, 真抓实干, 为开创农业生态环境建设和保护的新局面, 贡献自己的力量。