

地黄试管苗组织培养基中矿质元素含量测定

刘 峰, 温学森

(山东大学药学院生药学研究所, 山东 济南 250012)

摘要: 目的 建立测定地黄试管苗组织培养基中 N, P, K 元素含量的方法。方法 稀释不同倍数 MS 培养液模拟不同培养时间的地黄试管苗组织培养基, 分别用水杨酸硝化法、钼蓝法、离子选择电极法测定 N, P, K 元素的含量。结果 实验结果表明, 作者选用的测定方法简便、快速、易于操作。结果的精密度和准确度均能满足测定要求。结论 建立的方法可实际应用于地黄组织培养基中 N, P, K 元素含量的测定。

关键词: 地黄; 氮; 磷; 钾; 含量

中图分类号: O613

文献标识码: A

文章编号: 1672-979X(2007)02-0031-03

Assay method of mineral elements in tissue culture medium of test-tube plantlet of *Rehmannia glutinosa*

LIU Feng, WEN Xue-Sen

(School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract: **Objective** To establish a feasible assay methods of N, P and K element in tissue culture medium of test-tube plantlet of *Rehmannia glutinosa*. **Method** Contents of N, P and K in tissue culture medium of test-tube plantlet of *rehmannia glutinosa* were determined by the methods of salicylic acid nitrofication process, molybdenum blue method and ion selective electrode method, respectively. The culture medium had been diluted in different multiple. **Result** The methods were convenient, quick and manipulable. The accuracy and precision of the methods was suitable for the requirement of determination. **Conclusion** These methods could be used in practical production.

Key words: *Rehmannia glutinosa*; N; P; K; assay

地黄栽培历史悠久, 是大宗的常用栽培药材, 年均需求量达 1 500 万 kg, 出口量为 100 万 kg, 目前已形成了温县、武陟、孟县、博爱、沁阳等县(原怀庆辖区)为中心的黄河中下游沿岸地黄主产区^[1]。

病毒病是影响地黄栽培产量和品质的关键因素之一。20 世纪 90 年代末, 温学森等成功地实现了地黄组织培养苗脱毒, 目前已得到 85-5、金状元和北京-1 号 3 个优良品种的脱毒苗, 并成功投入生产。经过 3 年的田间实验, 证明脱毒地黄亩产可达 5 000 kg, 比带毒地黄增产 2~3 倍。但脱毒苗在大田栽培过程中, 第 1 年就有 30%~50% 再度感染病毒, 2~3 年就要更新一次种苗^[2]。因此, 如何最大可能地降低脱毒苗组织培养的成本, 成为亟待解决的关键问

题。为探讨地黄脱毒苗对培养基中各种元素的吸收规律及其对地黄生长的影响, 以进一步优化培养基组成, 降低培养成本, 我们对地黄组织培养基中 N, P, K 元素的含量测定方法进行了研究。

目前, 地黄组织培养多用 MS 培养基, 离子体系非常复杂, 而且随着试管苗的生长, 其根系可能会不断分泌有机酸、糖类、氨基酸、酚性化合物等根系分泌物进入培养基中, 加重了矿质元素含量测定的难度。到目前为止, 尚未见组织培养体系中矿质元素含量测定方法的报道。我们以稀释不同倍数的 MS 培养液模拟不同培养时间的地黄组织培养 MS 培养基, 通过实践, 建立了适合地黄试管苗组织培养体系中矿质元素含量测定的方法, 为研究地黄脱毒苗对培养基中各元素的吸收规律, 进一步优化培

收稿日期: 2006-11-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30572326, 30472189)

作者简介: 刘峰 (1976-), 女, 山东淄博人, 硕士研究生, 研究方向为中药现代化 Tel: 0531-88380620

Email: liufeng0076@163.com

培养基组成,降低培养成本奠定了基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

TU-1800型紫外-可见分光光度计(北京普析通用);AY120型电子分析天平(日本岛津);PXSJ-216型离子分析仪(上海精密科学仪器有限公司);Pk-1型钾离子选择性电极;T-818-B-6型温度传感器;JB-1A型电磁搅拌器;218双盐桥式饱和甘汞电极(外盐桥充以1 mol/L NH_4NO_3 溶液)。

1.2 试剂

(1) 硝态氮标准溶液 优级纯 KNO_3 0.721 6 g, 配置含N量分别为20, 40, 60, 80, 100, 120 mg/L的系列 NO_3^- -N标准溶液;(2) 钼酸铵溶液 钼酸铵 $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ 13 g, 酒石酸锑钾($\text{KSbC}_4\text{H}_4\text{O}_7$) 0.35 g, 分别溶解于100 mL蒸馏水中。不断搅拌下将钼酸铵溶液缓慢加入300 mL硫酸溶液(硫酸-水1:1, v/v)中,再加入酒石酸锑钾溶液,混合均匀;(3) 抗坏血酸溶液 抗坏血酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) 10 g, 纯化水溶解, 棕量瓶定容至100 mL;(4) 磷标准溶液 KH_2PO_4 0.109 7 g, 加2.5 mL硫酸溶液(浓度同上), 蒸馏水定容至500 mL, 摇匀;精密量取10 mL, 定容至100 mL, 得浓度为5 mg/L磷标准溶液;(5) 1 mol/L三乙醇胺-盐酸缓冲液(作为总离子强度缓冲溶液, TISAB), 5%水杨酸-硫酸溶液(贮于棕色瓶内, 现配现用);(6) MS培养液;(7) 无钾MS培养液。

2 方法与结果

2.1 硝态氮含量测定

目前硝态氮含量的测定多用酚二磺酸分光光度法,其前提是无水,需要事先对样品进行水浴蒸干,不适合大量样品的测定。我们采用水杨酸硝化法^[3,4]测定硝态氮含量,在浓 H_2SO_4 存在下 NO_3^- 与水杨酸反应,生成的硝基水杨酸在碱性条件下(pH>12.0) 410 nm处有最大吸收,在一定范围内与 NO_3^- 含量呈线性关系。此外, NH_4^+ , Cl^- 等离子不干扰 NO_3^- 含量的测定。

2.1.1 硝态氮标准曲线 取10 mL刻度试管7只,以0.1 mL蒸馏水作空白,6只各加入上述系列硝态氮标准液0.1 mL,然后分别加入5%水杨酸-硫酸溶液0.4 mL,混匀,室温下静置20~30 min(显色),再加入2 mol/L NaOH溶液9.5 mL,混匀,冷却至室温后,于410 nm波长下比色,记录吸光度值,绘制标准曲线,见图1。回归方程为: $A = 0.0074C + 0.0055$, $r = 0.9998$ 。

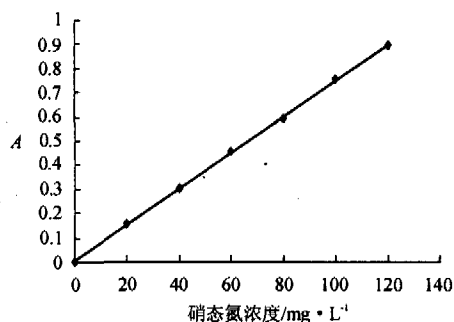


图1 硝态氮标准曲线

2.1.2 样品测定 适当稀释MS培养液,精密量取0.1 mL于10 mL刻度试管中,加入0.4 mL 5%水杨酸-硫酸溶液,混匀,室温下放置20~30 min,再加入2 mol/L NaOH溶液9.5 mL,混匀后冷却至室温,于410 nm处测定吸光度值,代入上述回归方程,即得培养液中硝态氮的浓度,结果见表1。

表1 硝态氮测定结果

样品 编号	单次测定N浓度/mg·L ⁻¹						平均N浓度/ mg·L ⁻¹	RSD/%
1	22.91	22.77	22.77	23.04	23.18	22.64	22.89	0.87
2	45.88	45.88	46.01	45.74	45.61	46.15	45.88	0.42
3	69.12	68.85	68.99	68.85	68.45	68.72	68.83	0.34
4	91.55	91.96	92.09	91.82	91.55	91.82	91.80	0.24
5	114.93	114.66	114.53	114.93	115.07	114.80	114.82	0.17

2.2 P元素含量测定

磷含量测定用钼蓝法^[5,6]。在酸性介质,还原剂存在下,正磷酸根离子与钼酸铵生成的磷钼蓝在700 nm处有较强吸收,在一定浓度范围内,与总磷含量呈线性关系。

2.2.1 磷标准曲线 精密量取磷标准溶液0, 0.5, 1, 3, 5, 7 mL于25 mL容量瓶中,加水约20 mL,加10%抗坏血酸溶液0.5 mL,摇匀,30 s后加入钼酸盐溶液1 mL,加水至25 mL,摇匀;放置反应15 min,于700 nm波长处测定吸光度,并以吸光度值为纵坐标,以标准磷浓度为横坐标,绘制标准曲线,见图2。回归方程为: $A = 0.5244C + 0.0012$, $r = 0.99999$ 。

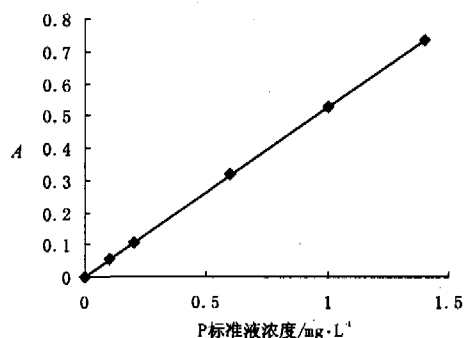


图2 磷标准曲线

2.2.2 样品测定 适当稀释MS培养液,精密量取2 mL入25 mL容量瓶中,加水至约20 mL,加入0.5 mL 10%抗坏血酸溶液混匀,30 s后加入1 mL钼酸盐溶液充分混匀,定容至25 mL。放置反应15 min,于700 nm波长处测定吸光度值,代入上述回归方程,即得培养液中磷的浓度,结果见表2。

表2 磷测定结果

样品编号	单次测定P浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$						平均P浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD/%
1	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0
2	0.62	0.62	0.62	0.62	0.62	0.62	0.62	0
3	0.93	0.93	0.93	0.93	0.93	0.93	0.93	0
4	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	0

2.3 K元素含量测定

目前,钾离子含量测定的方法很多,主要有四苯硼钠重量法、四苯硼钠比浊法、火焰光度法和离子选择电极法。四苯硼钠重量法准确但操作繁琐、费时,不适合大量样品的测定;四苯硼钠比浊法操作简单,不需特殊仪器,但准确性差,已基本淘汰;火焰光度法快速准确,但仪器设备比较昂贵。我们采用离子选择电极法^[7-9]测定钾离子含量,简便快速,样品不需特殊处理,可直接测定。

2.3.1 实验方法 采用标准加入法。准确量取经适当稀释的MS培养液25 mL于50 mL高型玻璃烧杯中,加TISAB 1.3 mL后插入钾电极和甘汞电极,电位稳定后加入浓度为100 mmol/L的KCl标准溶液0.25 mL,在电磁搅拌器上搅拌1 min,静置2 min,在离子分析仪上读取培养液浓度(以无钾MS培养液作空白校正)。

2.3.2 实验条件的选择

2.3.2.1 TISAB用量 取① 1×10^{-2} mol/L和② 4×10^{-3} mol/L KCl标准液各25 mL,分别加入不同量的TISAB,在离子分析仪上测定电位值,见表3。结果表明,TISAB用量为1.3 mL时电位值稳定。最终确定TISAB用量为1.3 mL。

表3 TISAB用量的影响

TISAB/mL	0.5	0.9	1.3	1.7	2.1	2.5	3
① E/mv	10.1	11.5	11.5	11.5	9.7	8.7	8.2
② E/mv	-10.4	-9.4	-9.4	-9.4	-9.6	-9.9	-10.7

2.3.2.2 共存离子的干扰 Rb^+ 和 Cs^+ 对 K^+ 的干扰严重,不过培养液中不含这些离子。 Na^+ 亦可干扰 K^+ 的测定,当 Na^+ 含量为 K^+ 的100倍时可直接测定 K^+ ,而培养液中 Na^+ 含量极低(10^{-3} mmol/L),因此不

会造成干扰。

2.3.2.3 电极斜率校正 采用多次添加法校正。取2种不同浓度的标准溶液A、B。A为经适当稀释后 K^+ 浓度为1 mmol/L的MS培养液,取25 mL,并加入TISAB 1.3 mL。B为浓度为100 mmol/L的KCl标准溶液。B液每次添加量为0.25 mL,共添加6次。经校正得电极斜率为42.815。

表4 钾测定结果

样品编号	单次测定 K^+ 浓度/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$						平均 K^+ 浓度/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD/%
1	1.95	1.99	2.03	1.97	1.99	2.05	2.00	1.86
2	4.87	4.92	4.89	4.90	4.87	5.08	4.92	1.62
3	7.85	8.01	7.88	8.04	7.88	7.90	7.92	0.99
4	10.92	10.85	11.06	10.93	10.78	11.11	10.94	1.14
5	14.42	14.35	13.93	13.98	14.12	14.21	14.17	1.39
6	17.46	17.03	17.35	17.22	16.99	17.23	17.21	1.05

3 讨论

本实验采用水杨酸硝化法、钼蓝法、离子选择电极法分别测定了MS培养液中硝态氮、磷、钾的含量,方法简便、快速、易操作,对样品不需预处理,适合测定大批量样品,测定结果的精密度和准确度均能满足定量要求,可实际应用于地黄组织培养基中氮、磷、钾含量的测定。

参考文献

- [1] 温学森,杨世林,魏建和.地黄栽培历史及其品种考证[J].中草药,2002,33(10):946-949.
- [2] Matsumoto M, Shoyama Y, Nishioka I, et al. Identification of viruses infected in *Rehmannia glutinosa* L var *purpurea* Makino and effect of virus infection on root yield and iridoid glycoside contents [J]. *Plant Cell Reports*, 1989, 7: 636-638.
- [3] 白岚,杜继煜.蔬菜中硝态氮含量的测定[J].农业与技术,2002,22(6):107-110.
- [4] 冯秉琦,赵军.分析水溶液中硝态氮的新方法[J].土壤农化通报,1998,13(2):54-55.
- [5] 金中华.磷钼蓝法测定地表水中总磷的探讨[J].贵州环保科技,2002,18(3):29-31.
- [6] 国家环保局水和废水监测分析方法编委会.水和废水监测分析方法[M].北京:中国环境科学出版社,1989:280-285.
- [7] 王兴恩,卢燕,丁卫,等.用离子选择电极法测定钾和钠[J].水泥工程,1996,5:30-31.
- [8] 李运涛.离子选择电极连续测定天然水中钾钠含量[J].陕西师范大学学报自然科学版,1997,25(2):115-116.
- [9] 黄德培.离子选择电极的原理及应用[M].北京:新时代出版社,1982:232-239.