

测定植物体内氯离子含量的滴定法和分光光度法比较

周强, 李萍, 曹金花, 於丙军*

南京农业大学生命科学学院, 南京 210095

Comparison on Titration and Spectrophotometric Methods for Determination of Chloride Content in Plants

ZHOU Qiang, LI Ping, CAO Jin-Hua, YU Bing-Jun*

College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

摘要: 以耐盐性较强的大麦(*Triticum aestivum*)品种‘鉴4’幼苗为材料, 比较硝酸银滴定法与分光光度法(分别以明胶-乙醇水溶液和丙酮作为胶体保护剂)测定植物体内氯离子含量的结果表明, 无论是实验数据的准确性和重现性, 还是实验操作的简便性, 分光光度法(特别是以明胶-乙醇水溶液作为胶体保护剂)都优于滴定法。

关键词: 氯离子; 滴定法; 分光光度法

氯是植物第16个必需营养元素(Broyer等1954)。作为微量营养元素, 其在植物体内主要以离子形态(Cl^-)参与光合作用、抑制植物病害、调节气孔开闭、维护细胞渗透压和保持体内电荷平衡等生理活动(罗庆云等2003)。它的过量与不足均会导致植物生长不良(何念祖和孟赐福1987)。植物对 Cl^- 的需要量较低, 土壤中的 Cl^- 量一般都大大超过植物生长的需求量, 因此, 相对于 Cl^- 亏缺而言, 土壤中 Cl^- 的过量而造成的 Cl^- 毒害是植物(尤其是在盐胁迫下)遭受逆境胁迫中常见的问题(於丙军和刘友良2004)。

测定植物体内氯含量, 是评估植物氯营养状况的最直接而有效的办法。而氯含量测定的准确与否关键在于植物体内氯的提取和测定方法的选择。植物体内氯的提取一直沿用高温干灰化法, 此法须对植物样品进行前处理, 但耗能大, 成本高, 精密度低, 可靠性差。近年来有人提出用热水浸提法取代干灰化法(计小江等1997)。测定氯的方法一般有: 硝酸银(AgNO_3)滴定法(又称莫尔法)、分光光度法、比浊法、原子吸收法、离子选择电极法和离子色谱法等(李永生和郭慧2007), 这些方法各有特点。本文采用仪器设备要求简单, 操作快捷的 AgNO_3 滴定法和分光光度法(分别以明胶-乙醇水溶液和丙酮作为胶体保护剂), 以大麦幼苗为材料, 分别从实验结果的准确性、重现性以及实验操作简便程度等方面进行比较, 以便建立一种更快速、更准确的植物体内

氯含量的测定方法。

材料与方法

1 材料的培养和处理

用大麦(*Triticum aestivum* L.)品种‘鉴4’为材料, 材料培养参照刘俊等(2005)文中的方法。幼苗长至一叶一心时, 用含0(对照)、100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl的1/2 Hoagland营养液作根际处理, 7 d后取全株, 材料处理和氯离子提取参照於丙军等(2001)文中的方法。

2 测定氯离子的方法

2.1 硝酸银滴定法 参照龚明等(1990)文中的方法。其中的 K_2CrO_4 指示剂由原来的5% K_2CrO_4 改为含4.2% (W/V) K_2CrO_4 和0.7% (W/V) $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 的中性指示剂。滴定标准 Cl^- 溶液时, 分别在锥形瓶中加入10 mL浓度梯度的标准 Cl^- 溶液和100 μL 中性指示剂, 以8 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 AgNO_3 溶液进行滴定; 滴定植物样品 Cl^- 提取液时, 分别在锥形瓶中加入适量提取液, 以去离子水稀释至10 mL, 文中其余测定步骤不变。

2.2 以丙酮为胶体保护剂的分光光度法 参照雷启福等(2004)文中的方法。取1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准 Cl^-

收稿 2007-09-03 修定 2007-09-29

资助 江苏省自然科学基金青年科技创新人才(学术带头人)项目(BK2007525)和国家自然科学基金(30400280)。

* 通讯作者(E-mail: bjyu@njau.edu.cn; Tel: 025-84399012)。

溶液 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 和 3.5 mL, 置于 25 mL 容量瓶中, 加入 2 mL HNO₃ 溶液[由浓 HNO₃ 和去离子水按 1:1 (V/V) 配制]、2 mL 丙酮、1 mL 5 g·L⁻¹ AgNO₃ 溶液, 用去离子水定容后摇匀, 此时, Cl⁻ 溶液浓度分别是 0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12 和 0.14 mmol·L⁻¹。暗处静置 10 min。用 1 cm 石英比色皿, 以试剂空白作参比, 然后用分光光度计(型号 UV-9100)测定波长 335 nm 处吸光度值。向容量瓶内加入适量的植物样品 Cl⁻ 提取液, 其余测定步骤不变。

2.3 以明胶-乙醇水溶液为胶体保护剂的分光光度法 参照申海燕(2003)和关瑞等(1999)文中的方法。取 9 个 50 mL 的容量瓶, 依次编号, 分别加入 1 mmol·L⁻¹ 的标准 Cl⁻ 溶液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0 mL, 先加入 25 mL 去离子水, 后加入 1.0 mL 明胶-乙醇水溶液和 0.5 mL 硝酸溶液[由浓 HNO₃ 和去离子水按 1:2 (V/V) 配制], 混匀后, 再加入 0.5 mL 20 g·L⁻¹ AgNO₃ 溶液。定容、混匀, 此时, Cl⁻ 溶液浓度分别是 0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12、0.14 和 0.16 mmol·L⁻¹。放置于暗处 10 min。然后用分光光度计(型号 UV-9100)测定波长 300 nm 处吸光度值, 以试剂空白作参比, 得到标准曲线。向容量瓶内加入适量的植物样品 Cl⁻ 提取液, 其余测定步骤不变。

以上各试验均重复 3 次以上。试验数据用统计分析软件(SPSS 13.0)进行均值、标准差和差异显著性分析。

实验结果

1 标准曲线

1.1 硝酸银滴定法 以 17 个不同浓度(0~0.50 mmol·L⁻¹)的标准 Cl⁻ 溶液滴定得到的 AgNO₃ 溶液消耗体积和 Cl⁻ 浓度关系的数据, 经线性回归处理, 得到标准曲线的回归方程为: $y=1.3462x+0.3107$, 相关系数 $r=0.9986$ [x 表示 Cl⁻ 浓度(mmol·L⁻¹); y 表示滴定体积(mL)], 以 0~0.5 mmol·L⁻¹ Cl⁻ 范围内的线性关系较好, 但标准曲线未通过坐标原点(图 1)。

1.2 以丙酮为胶体保护剂的分光光度法 以 8 个不同浓度标准 Cl⁻ 溶液测得的吸光度值绘制标准曲

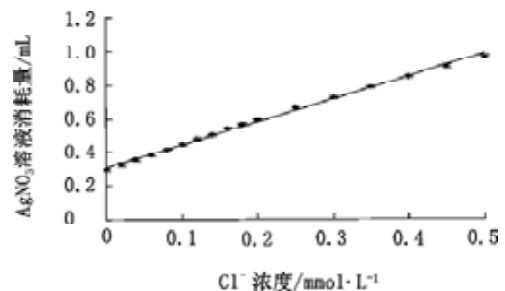


图1 用硝酸银滴定法测定 Cl⁻ 含量的标准曲线

线, 曲线的回归方程为: $y=2.3665x+0.0021$, 相关系数 $r=0.9993$ [x 表示 Cl⁻ 浓度 (mmol·L⁻¹); y 表示吸光度], 在 0~0.14 mmol·L⁻¹ Cl⁻ 范围内的线性关系良好, 标准曲线基本上通过坐标原点(图 2)。

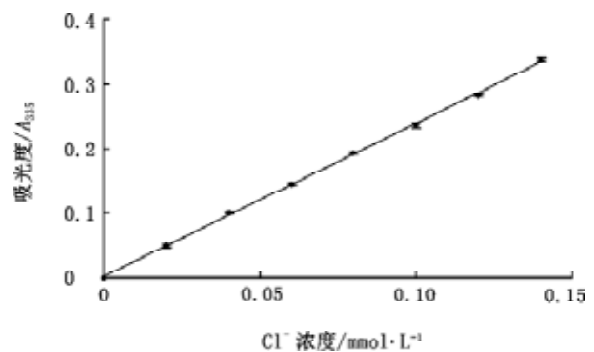


图2 用分光光度计法(丙酮)测定 Cl⁻ 含量的标准曲线

1.3 以明胶-乙醇水溶液为胶体保护剂的分光光度法 以 9 个不同浓度标准 Cl⁻ 溶液测定的吸光度值绘制标准曲线, 曲线的回归方程为: $y=2.9206x+0.0022$, 相关系数 $r=0.9992$ [x 表示 Cl⁻ 浓度 (mmol·L⁻¹); y 表示吸光度]; 在 0~0.16 mmol·L⁻¹ Cl⁻ 范围内的线性关系良好, 标准曲线基本上也是通过坐标原点(图 3)。

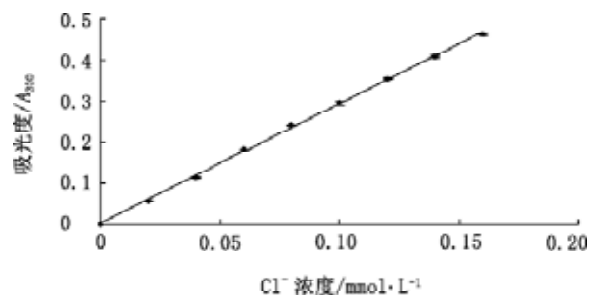


图3 用分光光度法(明胶-乙醇水溶液)测定 Cl⁻ 含量的标准曲线

2 加标回收试验

取3份0.5 g NaCl (准确到0.0001 g), 用3种方法测定(样品3次平行测定), 并计算回收率的结果表明, 硝酸银滴定法的回收率为87.73%~117.78% (平均为106.89%), 相对标准差(RSD)为10.80%; 以丙酮为胶体保护剂的分光光度法的回收率为98.60%~103.23% (平均为100.94%), RSD为1.80%; 以明胶-乙醇水溶液为胶体保护剂的分光光度法的回收率为98.48%~104.33% (平均为101.21%), RSD为1.66% (表1)。

3 植物样品中Cl⁻含量的测定

大麦幼苗按实验方法处理后, 获得Cl⁻提取液, 分别用3种方法进行测量, 同一样品作3次平行测定的结果显示, 同一组样品的3种测量方法结果基本上一致, 差异不显著, 而以100 mmol·L⁻¹ NaCl处理7 d后的大麦幼苗体内的Cl⁻含

量极显著高于未作NaCl处理的(表2)。

讨 论

从加标回收试验的结果可知, 硝酸银滴定法的准确度为88.43%, 极显著低于分别以丙酮、明胶-乙醇水溶液为胶体保护剂的分光光度法的准确度(分别为98.32%和98.44%); 硝酸银滴定法的变异系数为10.33%, 极显著高于以丙酮、明胶-乙醇水溶液为胶体保护剂的分光光度法的变异系数(分别为1.86%和1.78%), 而以丙酮为胶体保护剂的分光光度法和以明胶-乙醇水溶液为胶体保护剂的分光光度法在准确度和变异系数上均无显著差异(表3)。此外, 硝酸银滴定法的标准曲线明显未通过坐标原点(图1), 而2种分光光度法的标准曲线均基本上通过坐标原点(图2、3)。所以, 从测量结果的准确度和重现性来看, 2种分光光度

表1 加标回收试验结果

| 测定方法 | NaCl 含量 /g | Cl ⁻ 含量 /mmol | 测定回收值 /mmol | 平均回收率 /% | RSD/% |
|-----------------|------------|--------------------------|---------------|----------|-------|
| 硝酸银滴定法 | 0.5012 | 8.5763 | 9.0280±1.0712 | 106.89 | 10.80 |
| | 0.5018 | 8.5866 | 9.6557±0.6396 | | |
| | 0.5005 | 8.5643 | 8.7643±1.0957 | | |
| 分光光度法(丙酮) | 0.5012 | 8.5763 | 8.7580±0.1645 | 100.94 | 1.80 |
| | 0.5018 | 8.5866 | 8.6247±0.1192 | | |
| | 0.5005 | 8.5643 | 8.5483±0.1980 | | |
| 分光光度法(明胶-乙醇水溶液) | 0.5012 | 8.5763 | 8.7530±0.1008 | 101.21 | 1.66 |
| | 0.5018 | 8.5866 | 8.7410±0.1499 | | |
| | 0.5005 | 8.5643 | 8.5990±0.2122 | | |

表2 对照和100 mmol·L⁻¹ NaCl处理7 d的大麦幼苗植株体内的Cl⁻含量

| 测定方法 | 重复 | Cl ⁻ 含量 /mmol·g ⁻¹ (DW) | | | |
|---------------------|----|---|---------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| | | 对照 | | 100 mmol·L ⁻¹ NaCl | |
| | | 平行测定的平均值 | 总平均值 | 平行测定的平均值 | 总平均值 |
| 硝酸银滴定法 | 1 | 0.668±0.069 | 0.704±0.106 ^{Bb} | 1.648±0.093 | 1.465±0.195 ^{Aa} |
| | 2 | 0.610±0.052 | | 1.495±0.144 | |
| | 3 | 0.834±0.047 | | 1.253±0.056 | |
| 分光光度法(丙酮) | 1 | 0.661±0.020 | 0.653±0.041 ^{Bb} | 1.651±0.023 | 1.560±0.075 ^{Aa} |
| | 2 | 0.608±0.023 | | 1.485±0.030 | |
| | 3 | 0.688±0.030 | | 1.544±0.012 | |
| 分光光度法 (明胶-乙醇水溶液) | 1 | 0.667±0.022 | 0.664±0.045 ^{Bb} | 1.568±0.034 | 1.515±0.052 ^{Aa} |
| | 2 | 0.632±0.020 | | 1.465±0.034 | |
| | 3 | 0.695±0.015 | | 1.511±0.020 | |

数字间大写字母不同表示差异极显著($P < 0.01$); 小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。下表同此。

表3 测量方法的准确度和重现性

| 测定方法 | 准确度 /% | 变异系数 /% |
|---------------------|--------------------------|--------------------------|
| 硝酸银滴定法 | 88.43±4.40 ^{Bb} | 10.33±3.23 ^{Aa} |
| 分光光度法(丙酮) | 98.32±1.09 ^{Aa} | 1.86±0.66 ^{Bb} |
| 分光光度法 (明胶-乙醇水溶液) | 98.44±1.21 ^{Aa} | 1.78±0.47 ^{Bb} |

法相当, 均明显高于硝酸银滴定法(表3)。

硝酸银滴定法要求的仪器和试剂简单, 操作简便, 主要难点在于滴定终点的判断。因为当溶液滴定到终点, 即由乳白色转变到砖红色时, 氯化银(AgCl)白色沉淀先生成, 白色沉淀出现以后就掩盖了指示剂 K_2CrO_4 和 $K_2Cr_2O_7$ 的黄色以及 Ag_2CrO_4 的砖红色, 判断滴定终点时容易产生误差(贾霞莉 1998), 因此, 硝酸银滴定法的操作要求较高, 而分光光度法的实验操作则较为简单快捷, 也不存在此种问题。

就本文中用不同方法测定植物样品 Cl^- 含量的结果而言, 硝酸银滴定法与分光光度法测得的结果平均值之间差异不显著(表2), 这可能是植物样品和实验重复之间的差异性掩盖了实验方法产生的差异之故, 但前者的标准差明显较大, 重复性较差, 因此实验结果的准确性就很难保证。一般只有在严格和正确操作的前提下, 通过增大实验的重复数, 才能获得较为可靠的结果。本文中 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 处理 7 d 的大麦幼苗体内的 Cl^- 含量极显著高于未作 NaCl 处理的(表2)。根据黄建国和袁玲(1989)报道, 当大麦植株在外界 Cl^- 浓度小于 $0.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时体内即开始积累 Cl^- 。王宝山(1991)的实验也表明, $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 处理 3 d 的大麦叶中 Cl^- 含量为 $1.1\text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW) 左右, 未作 NaCl 处理的叶中 Cl^- 含量约为 $0.4\text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW), 本文结果与这些结果相似。由于本文中使用的 1/2 Hoagland 营养液中本身含有微量的 Cl^- (约 $9.15\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 大麦植株在外界 Cl^- 浓度较低时, 可能已富积了适量的 Cl^- , 所以导致未作 NaCl 处理的大麦植株也含有一定浓度的 Cl^- 。

综上所述, 本文中硝酸银滴定法测量结果的准确度基本可以达到实验的要求, 所以认为传统的滴定法仍具有一定的应用价值。就分光光度法

而言, 用丙酮和明胶-乙醇水溶液均在一定程度上增加 AgCl 胶体溶液的稳定性(戚文彬和刘丹萍 1989), 其标准曲线基本上通过坐标原点, 回归方程的 r 值可以达到 0.999 以上, 可用于定量分析。不论是标准品还是植物样品, 2 种分光光度法的测量精度均比硝酸银滴定法高, 准确度和重现性也都很好, 操作简便快捷。就丙酮和明胶-乙醇水溶液 2 种胶体保护剂而言, 这 2 种分光光度法的测量精度、重现性、准确度和操作简便性均无显著差异, 但丙酮对人体和环境有一定的负面影响, 所以认为, 以明胶-乙醇水溶液为胶体保护剂的分光光度法更适用于氯离子含量的测定。

参考文献

- 龚明, 赵方杰, 吴颂如, 汪良驹, 刘友亮(1990). NaCl 胁迫对大麦硝酸盐吸收和有关的酶活的影响. 植物生理学通讯, (2): 13~16
- 关瑞, 李昌, 宋维(1999). 分光光度法测定微量氯离子的研究与应用. 化学工程师, (6): 43~45
- 何念祖, 孟赐福(1987). 植物营养原理. 上海: 上海科学技术出版社, 252~254
- 黄建国, 袁玲(1989). 大麦和小麦吸收 Cl^- 、 $H_2PO_4^-$ 、 K^+ 的动力学研究. 土壤通报, (1): 37~44
- 计小江, 李超英, 毛美飞(1997). 植物内氯测定中前处理方法探讨. 浙江农业科学, (2): 89~91
- 贾霞莉(1998). 硝酸银滴定水中氯离子. 中国井矿盐, (5): 43
- 雷启福, 周春山, 高艺, 蒋新宇, 吴名剑(2004). AgCl 溶胶比浊法测定烟草中的微量氯. 光谱实验室, 21 (5): 931~935
- 李永生, 郭慧(2007). 工业水中氯离子测定方法的进展. 工业水处理, 27 (4): 1~5
- 刘俊, 张艳艳, 章文华, 刘友良(2005). 大麦根中多胺含量和转化与耐盐性的关系. 南京农业大学学报, 28 (2): 7~11
- 罗庆云, 於丙军, 刘友良(2003). NaCl 胁迫下 Cl^- 和 Na^+ 对大豆幼苗胁迫作用的比较. 中国农业科学, 36 (11): 1390~1394
- 戚文彬, 刘丹萍(1989). 丙酮对 Ga-ECR-CPB 体系的增敏效应及其应用. 岩矿测试, 8 (2): 91~95
- 申海燕(2003). 水中微量氯离子的微型测定. 长沙铁道学院学报, 21 (4): 87~88
- 王宝山(1991). 盐胁迫对大麦根和叶生长及其 Na^+ 、 Cl^- 和 K^+ 含量的影响. 山东师范大学学报(自然科学版), 6 (4): 88~91
- 於丙军, 刘友良(2004). 植物中的氯、氯通道和耐盐性. 植物学通报, 21 (4): 402~410
- 於丙军, 罗庆云, 曹爱忠, 刘友良(2001). 栽培大豆和野生大豆耐盐性及离子效应的比较. 植物资源与环境学报, 10 (1): 25~29
- Broyer TC, Carlton AB, Johnson CM, Stout PR (1954). Chlorine — a micronutrient element for higher plants. Plant Physiol, 29: 526~532