

技术与方法 Techniques and Methods

改良NH₄F掩蔽法在测定植物组织二价铁含量中的应用倪琳琳¹, 侯焯琪¹, 封士达¹, 吴晨阳³, 陆小龙², 韦军^{1,*}扬州大学¹园艺与植物保护学院, ²测试中心, 江苏扬州225009; ³宿迁学院, 江苏宿迁223800

摘要: 针对NH₄F掩蔽法测定二价铁含量中存在的问题, 将此测定方法改良为: 对提取液不用浓硫酸或盐酸调节pH, 直接先加入0.15% 邻菲罗啉溶液2 mL, 再加入3 mol·L⁻¹ NH₄F溶液2 mL, 决定系数和变异系数分别为0.9998和10.23%, 回归率达到了100.82%, 适合植物组织中二价铁含量的精确测定。

关键词: 植物组织; Fe²⁺; NH₄F掩蔽法

Application of Improved NH₄F Masking Method in Determination of Ferrous Iron in Plant TissuesNI Lin-Lin¹, HOU Zhao-Qi¹, FENG Shi-Da¹, WU Chen-Yang³, LU Xiao-Long², WEI Jun^{1,*}¹College of Horticulture and Plant Protection, ²Testing Center, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China; ³Suqian College, Suqian, Jiangsu 223800, China

Abstract: In order to solve the problems of ferrous iron contents in plant tissues, NH₄F masking method were improved in this paper. The results showed that the determination coefficient and coefficient of variation were 0.9998 and 10.23% respectively and the recovery was up to 100.82%, when 0.15% phenanthroline 2 mL and 3 mol·L⁻¹ NH₄F 2 mL were added in turn without sulfuric acid or hydrochloric acid to adjust pH.

Key words: plant tissue; ferrous iron; NH₄F masking method

铁是植物必需的微量元素, 参与植物体内的叶绿素合成、氧化还原反应和电子传递等(申红芸等2011), 在植物的生理代谢过程中起着重要作用。植物缺铁黄化已成为世界性营养失调问题, 解决缺铁问题对农业甚至人类健康都有十分重要的意义(金亚波等2007)。我国长江中下游地区的梨园普遍存在缺铁黄化问题, 因此准确评价梨树铁营养状况尤为重要, 叶片全铁含量变化常用来作为植物铁营养状况诊断的生理指标, 但近年来研究发现, 全铁含量并不能准确反映植物体内的铁营养状况(Terry 1980)。80年代中期, 提出用植物组织在低浓度HCl浸提液中的铁含量评价植物铁营养状况, 称其为活性铁指标(Pierson和Clark 1984), 这一概念在此后的诊断工作中得到较多的应用。上述两种诊断指标的共同之处是全铁和活性铁的离子形态均由Fe²⁺和Fe³⁺组成, 区别仅是活性铁是一种以Fe²⁺为主, 混杂有部分Fe³⁺的铁含量(Pierson和Clark 1984)。近年来的研究表明, 在植物正常铁代谢过程需要的铁离子形态主要是

Fe²⁺ (Clarkson和Hanson 1980), 显然, 在植物生产上直接采用Fe²⁺含量变化作为诊断指标可能对评价植物的铁营养状况更具有应用价值, 但多年来, 国内外对Fe²⁺含量变化与铁营养状况的关系研究未见报道, 主要原因之一是针对植物组织中Fe²⁺含量变化的可靠测定方法尚未成熟。

目前, 测定植物组织中Fe²⁺和Fe³⁺含量变化的方法主要为双波长分光光度法和掩蔽法(高勇等2013)。双波长分光光度法选择510和390.5 nm两种波长, 以邻菲罗啉为显色剂, 同时测定Fe²⁺和Fe³⁺的含量(曲东和王保莉1991)。由于Fe³⁺和邻菲罗啉的反应常呈非线性, 难以准确测定三价铁的含量变化, 也影响到植物组织中二价铁含量变化的准确测定(Patel等2001)。常用的掩蔽法有EDTA掩蔽法和NH₄F掩蔽法, EDTA掩蔽法是利用

收稿 2015-04-30 修定 2015-07-14

资助 江苏省高校专业学位研究生科研实践计划项目(SJLX_0614)。

* 通讯作者(E-mail: weijun@yzu.edu.cn; Tel: 13004326981)。

EDTA与 Fe^{3+} 形成稳定的络合物EDTA- Fe^{3+} ,从而掩蔽 Fe^{3+} 对 Fe^{2+} 测定的干扰,但是研究表明,EDTA还能与 Fe^{2+} 形成较稳定的络合物EDTA- Fe^{2+} ,也掩蔽了部分 Fe^{2+} (高勇等2013),因此,EDTA掩蔽法测定植物组织中的二价铁含量变化的准确性值得商榷(姚群峰等2000)。 NH_4F 掩蔽法是首先将测定液的pH值调节至 ≤ 3 ,然后依次加入 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NH}_4\text{F}$ 2 mL和0.15%邻菲罗啉2 mL,在波长510 nm处进行比色测定(姚群峰等2000),原理是利用 NH_4F 中氟离子(F^-)与 Fe^{3+} 形成稳定的络合物,从而掩蔽 Fe^{3+} ,使邻菲罗啉只与 Fe^{2+} 发生显色反应,但该方法目前主要应用于水中二价铁含量的测定,尚未用于植物组织中二价铁的测定(姚群峰等2000)。此外,显色剂邻菲罗啉和掩蔽剂 NH_4F 的加入顺序也对可能对测定结果的准确性产生影响,从理论上分析,先加入邻菲罗啉显色,再加入 NH_4F 掩蔽,则邻菲罗啉先与 Fe^{2+} 反应,生成的 Fe^{2+} -phen复合物比较稳定,可以减小 Fe^{2+} 的氧化;而先加入 NH_4F 掩蔽,再加入邻菲罗啉显色,则 F^- 与 Fe^{3+} 反应生成稳定的络合物,减少 Fe^{3+} -phen复合物的生成,避免其发生光化学还原反应(高勇等2013);如果同时加入邻菲罗啉和 NH_4F , F^- 不可避免会影响 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 对邻菲罗啉的竞争。

因此,本文基于原有的 NH_4F 掩蔽法进行改良,不对植物样品提取液进行pH调节,设置不同 NH_4F 溶液浓度和不同的显色剂邻菲罗啉和掩蔽剂 NH_4F 的加入顺序,探索适合对植物组织中二价铁含量变化进行准确测定的方法。

材料与方法

1 材料

供试材料为扬州大学教学果园的砂梨品种‘新高’(*Pyrus pyrifolia* Nakai cv. ‘Niiitaka’),砧木豆梨(*Pyrus calleryana* Decne),株行距4 m \times 5 m,十年生,砂壤土。

1.1 样品采集与处理

按照河北省标准(DB13/T 1401-2011)梨叶片营养诊断技术规程,新梢长至10 cm后采集‘新高’树冠外围发育枝梢中段的健康叶。

取1 g鲜样用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸按1:50的比例浸提(静置24 h),过滤后取1 mL浸提液利用紫外可见分光光度计测定浸提液中 Fe^{2+} 的含量,重复3次(邹春琴等1998)。

1.2 试验仪器

紫外可见分光光度计(UV745N,上海精密科学仪器)。

2 方法

2.1 最适测定方法筛选

准确加入不同浓度梯度(1、2、3、4和5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 标准溶液5 mL至样品提取液。 NH_4F 溶液和邻菲罗啉溶液的加入顺序设置3个处理,分别为 A_1 (混合后同时加入)、 A_2 (先加入 NH_4F 溶液后加入邻菲罗啉溶液)和 A_3 (先加入邻菲罗啉溶液后加入 NH_4F 溶液)。 NH_4F 溶液浓度设置4个处理,分别为 B_1 ($0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、 B_2 ($1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、 B_3 ($2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、 B_4 ($3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和 B_5 ($5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。 NH_4F 溶液和邻菲罗啉溶液用量均为2 mL,共15个处理,每个处理均作标准曲线,对照为原 NH_4F 掩蔽法。

数据分析采用DPS数据处理系统的LSD法(莫惠栋1991)。回收率(%)=(加标样品测定平均值-未加标样品测定平均值)/加标量 $\times 100$ (杨剑虹等2008)。

2.2 遮光处理对测定结果的影响

鉴于实验显色过程中可能发生的光化学还原反应对测定结果的影响,对本实验筛选出的最适测定方法进行遮光对比实验。方法是测定前对测定器皿表面用锡箔纸包裹严密,其它操作与对照相同,即准确加入不同浓度梯度(1~5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 标准溶液5 mL至样品提取液。

结果与讨论

1 不同 NH_4F 溶液浓度和加入顺序的筛选

从表1可以看出,处理 A_2B_5 的决定系数明显偏低,可先排除。对照回收率远大于105%,也不符合要求。回收率接近95%~105%(杨剑虹等2008)的处理有 A_1B_4 、 A_1B_5 、 A_3B_4 和 A_3B_5 四种,其中变异系数最小的是处理 A_3B_4 。后续实验统一采用 A_3B_4 处理。

表1表明,B处理中, B_1 、 B_2 和 B_3 处理的回收率都远远高于105%,导致测定结果被过分夸大(杨剑虹等2008),原因可能是 NH_4F 溶液浓度过低(0.1 、 1 和 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), Fe^{3+} 没有被完全掩蔽,残留的 Fe^{3+} 与邻菲罗啉反应,生成 Fe^{3+} -phen复合物,该复合物发生光化学还原反应,生成 Fe^{2+} -phen,导致结果偏大,回收率过高,因此可行的处理是 B_4 和 B_5 。A处理中, A_2 处理的回收率也都远远高于105%,原因可能是同时加入邻菲罗啉和 NH_4F 后, F^- 的掩蔽效果受到影响,

表1 不同NH₄F溶液浓度和加入顺序对决定系数、变异系数和回收率的影响Table 1 Effects of different NH₄F solutions and adding orders on determination coefficient, coefficient of variation and recovery

编号	NH ₄ F浓度/ mol·L ⁻¹	处理A ₁ (同时加入NH ₄ F和邻菲罗啉)			处理A ₂ (先加NH ₄ F后加邻菲罗啉)			处理A ₃ (先加邻菲罗啉后加NH ₄ F)		
		决定系数(R ²)	变异系数/%	回收率/%	决定系数(R ²)	变异系数/%	回收率/%	决定系数(R ²)	变异系数/%	回收率/%
B ₁	0.1	0.9996	40.91 ^d	142.97	0.9996	70.61 ^c	169.04	1.0000	37.64 ^e	142.22
B ₂	1.0	0.9995	26.03 ^g	116.51	0.9856	30.03 ^f	164.87	0.9997	37.84 ^e	136.64
B ₃	2.0	0.9999	16.93 ^j	111.13	0.9677	24.36 ^b	171.52	0.9991	29.40 ^f	108.20
B ₄	3.0	0.9997	17.29 ^j	103.14	0.9032	114.29 ^b	144.42	0.9998	10.23 ^m	100.82
B ₅	5.0	0.9997	14.58 ^k	106.15	0.5389	1 099.59 ^a	113.31	0.9996	12.73 ^l	100.58
对照	2.0				0.9161	19.37 ⁱ	215.40			

不同小写字母表示5%水平的显著差异。对照为原NH₄F掩蔽法。

原本应与F⁻络合的Fe³⁺不和F⁻结合,反而与邻菲罗啉反应生成Fe³⁺-phen复合物,Fe³⁺-phen发生光化学还原反应生成Fe²⁺-phen,导致回收率偏高。

本实验虽未对提取液进行调节pH处理,但仍得到满意的决定系数、变异系数和回收率,说明不调节pH也能准确测定植物组织中的二价铁含量。原因可能是原NH₄F掩蔽法要求在加入掩蔽剂NH₄F之前必须需将pH调节至3以下,因为F⁻的存在会有利于Fe²⁺的氧化,而pH≤3时会使先加入的F⁻以HF的形式存在,等加入显色剂和缓冲溶液之后,F⁻再离解与Fe³⁺络合,同时邻菲罗啉与Fe²⁺发生显色反应(姚群峰等2000)。但是有研究表明,即使将溶液pH调节至2.5以下,也不能避免残留的F⁻加速Fe²⁺的氧化(高勇等2013),且表1原NH₄F掩蔽法的结果也证明了这点。由于植物组织提取液对酸碱度具有一定缓冲效能,在加入掩蔽剂之前加酸调节pH并不能完全解决Fe²⁺氧化的问题,虽然该方法用于水中铁的价态分析时结果较好,但对植物组织提取液仅用酸调节其pH并不能达到理想的分析结果。因此,作者认为测定植物组织中的二价铁可以不加酸调节pH。

2 遮光对测定效果的评价

从表2可以看出,遮光对Fe²⁺含量测定结果的决定系数、变异系数和回收率均不存在显著性影响。改良NH₄F掩蔽法不需要在遮光条件下进行显色反应。

因此从决定系数、变异系数和回收率三个方面综合考虑,适合用于测定植物组织中二价铁的方法是处理A₃B₄。具体方法为:(1)称取1 g叶片鲜样,加入1 mol·L⁻¹盐酸50 mL浸提,静置24 h后过滤备用;(2)取1 mL浸提液,先加入2 mL邻菲罗啉

表2 遮光对Fe²⁺含量测定效果的评价

Table 2 Evaluation of effect of shading on ferrous iron content

处理	决定系数(R ²)	变异系数/%	回收率/%
对照	0.9998 ^a	10.23 ^a	100.82 ^a
遮光处理	0.9997 ^a	10.83 ^a	101.33 ^a

不同小写字母表示在5%水平的显著差异。

(0.15%)溶液,然后加入2 mL NH₄F (3 mol·L⁻¹)溶液,再加入5 mL NaAc (1 mol·L⁻¹)缓冲溶液,定容至25 mL,显色30 min;(3)利用紫外可见分光光度计于510 nm波长处测定其吸光度。

参考文献

- 高勇,贺一凡,梁建芬,黄振武(2013).基于邻二氮菲的铁价态分析方法的比较.食品科技,38(5):285-289
- 金亚波,韦建玉,王军(2007).植物铁营养研究进展I:生理生化.安徽农业科学,35(32):10215-10219
- 莫惠栋(1991).农业试验统计.江苏扬州:扬州大学,202
- 曲东,王保莉(1991).邻二氮菲分光光度法同时测定水稻土中Fe(II)和Fe(III).西北农业大学学报,19(1):85-88
- 申红芸,熊宏春,郭笑彤,左元梅(2011).植物吸收和转运铁分子生理机制研究进展.植物营养与肥料学报,17(6):1522-1530
- 杨剑虹,王成林,代亨林(2008).土壤农化分析与环境监测.北京:中国大地出版社,9
- 姚群峰,徐顺清,周宜开,董春洲(2000).邻菲罗啉分光光度法测定铁的价态.中国卫生检验杂志,10(1):3-5
- 邹春琴,陈新平,张福锁,毛达如(1998).活性铁作为植物铁营养状况诊断指标的相关研究.植物营养与肥料学报,4(4):399-406
- Clarkson DT, Hanson JB (1980). The mineral nutrition of higher plant. Ann Rev Plant Physiol, 31: 239-298
- Patel KS, Shukla A, Goswami A, Chandavanshi SK, Hoffmann P (2001). A new spectrophotometric method for the determination of total and ferric iron in rain water at the ppb level. J Anal Chem, 369(6):530-534
- Pierson EE, Clark RB (1984). Ferrous iron determination in plant tissue. J Plant Nutr, 7(1-5):107-116
- Terry N (1980). Limiting factors in photosynthesis I. Use of iron stress to control photochemical capacity *in vivo*. Plant Physiol, 65: 114-120