

教育部普通高等教育“十一五”国家级规划教材
《中药栽培学》配套实验教材

中药栽培 实验技术与方法学

(药用植物栽培学实验教程)

主编 徐 良(广州中医药大学)



人民军医出版社
PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

教育部普通高等教育“十一五”国家级规划教材《中药栽培学》配套实验教材

中药栽培实验技术与方法学

ZHONGYAO ZAIPEI SHIYAN JISHU YU FANGFAXUE

(药用植物栽培学实验教程)

主 编 徐 良



人民军医出版社

PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

北 京

图书在版编目(CIP)数据

中药栽培实验技术与方法学/徐良主编. —北京:人民军医出版社, 2009. 11

药用植物栽培学实验教程

ISBN 978-7-5091-3130-5

I. 中… II. 徐… III. 药用植物—栽培—实验—高等学校—教材 IV. S567-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 186122 号

策划编辑:高玉婷 文字编辑:黎 敏 责任审读:黄栩兵

出 版 人:齐学进

出版发行:人民军医出版社

经销:新华书店

通信地址:北京市 100036 信箱 188 分箱

邮编:100036

质量反馈电话:(010)51927290;(010)51927283

邮购电话:(010)51927252

策划编辑电话:(010)51927300-8020

网址:[www. pmmp. com. cn](http://www.pmmp.com.cn)

印刷:潮河印业有限公司 装订:京兰装订有限公司

开本:787mm×1092mm 1/16

印张:14 字数:300 千字

版、印次:2009 年 11 月第 1 版第 1 次印刷

印数:0001~3000

定价:39.00 元

版权所有 侵权必究

购买本社图书,凡有缺、倒、脱页者,本社负责调换

【内容提要】

本书根据教育部全国高等教育“十一五”国家级规划教材《中药栽培学》和《药用植物栽培学》实验配套教学的需要,全面系统地总结了中药栽培实验技术与方法,反映了国内外有关栽培实验的新成就和新知识,填补了国内至今尚无国家统编中药栽培学实验教材的空白。本书科学性、先进性和实用性强,适宜全国高等医药院校、农林院校、师范院校、综合性大学及全国各高职高专等院校开设的中药学、药学、中药资源、中药栽培、药用植物栽培、中草药栽培与鉴定等相关专业作教材和教学参考书,也可作为相关研究院、所科技人员参考使用。

《中药栽培实验技术与方法学》编委会

主 编 徐 良(广州中医药大学)

副主编 王渭玲(西北农林科技大学)

岑丽华(广州中医药大学)

吴 卫(四川农业大学)

刘贤旺(江西中医学院)

巢建国(南京中医药大学)

主 审 陈士林(中国医学科学院药用植物研究所)

梁宗锁(西北农林科技大学)

编 委 (以教育部“十一五”国家级规划教材《中药栽培学》编委为序)

王 琦(吉林农业大学)

王 建(广西中医学院)

马 琳(天津中医药大学)

王渭玲(西北农林科技大学)

王惠珍(甘肃中医学院)

刘合刚(湖北中医学院)

刘贤旺(江西中医学院)

刘塔斯(湖南中医药大学)

孙志蓉(北京中医药大学)

孙海峰(黑龙江中医药大学)

朱盛山(广东药学院)

吴 卫(四川农业大学)

李先恩(中国协和医科大学)

岑丽华(广州中医药大学)

张永清(山东中医药大学)

张亚芝(长春中医药大学)

杨得坡(中山大学)

杨耀文(云南中医学院)

武孔云(贵阳中医学院)

范巧佳(四川农业大学)

青献春(山西中医学院)

俞年军(安徽中医学院)

晁 志(南方医科大学)

徐 良(广州中医药大学)

秦佳梅(南通师范学院)

高文远(天津大学)

巢建国(南京中医药大学)

黄荣韶(广西大学)

董诚明(河南中医学院)

陈新福(四川农业大学)

前 言

《中药栽培实验技术与方法学》(简称《实验教程》)是教育部“全国高等教育‘十一五’国家级规划教材”《中药栽培学》(科学出版社)和《药用植物栽培学》(中国中医药出版社)之课程教学的实验配套教材,也是我国中药栽培学领域由全国 30 多所大学联合编著的首部创新实验教材,是新世纪全国高等院校国家级规划教材《药用植物栽培学》和《中药栽培学》的重要内容和组成部分。《中药栽培实验技术与方法学》是为适应中药栽培学和药用植物栽培学课程的实践教学,以及全面培养学生严谨科学态度与增强科研生产动手能力之需而编写的一部配套教材。

2006 年,在莫斯科召开世界教育部部长会议所发表的八国集团关于教育的《莫斯科宣言》指出,“21 世纪的特征是由科技创新带来的社会、经济的迅捷变化”。我国当前推进的教学改革与素质教育都十分注重培养学生的实践和创新能力,强化学生动手能力与职业技能的培养。中药与药用植物栽培学是一门实践性与创新性很强的生物科学,研究药用植物生长发育、产量和品质形成规律及其与环境条件的相互关系,并在此基础上采取栽培技术措施以达到稳产、优质、高效的一门应用科学,其研究对象是各种中药与药用植物的群体。研究药用植物栽培,必须掌握与药用植物群体(生物学特征和生理特性)、环境(自然条件和栽培条件)及措施(调控措施和技术)3 个环节有密切关系的各种知识。我国目前正在实施中药现代化科技产业行动,全国掀起了一股种植中药材的热潮。因此,积极开展中药与药用植物的栽培实验研究,实现中药材生产的管理规范化、技术指标化、产品标准化具有重大的现实意义。开展《中药栽培实验技术与方法学》的实践与实验教学,是锻炼和培养学生中药现代化创新能力的方法措施与重要教学环节。

《实验教程》内容共分为 5 章,主要包括药用植物实验材料的准备、药用植物栽培基础实验、常用药用植物栽培的生理学测定、药用植物栽培环境及药材质量检测实验,以及中药质量控制及实验常用检测技术,累计编入本教材的中药与药用植物栽培实验总数共 42 个。在教材编写中,编者总结了国内外有关学科前沿与发展方向,反映了编者所在各院校中药栽培学的实验教学经验和科研工作积累,体现了科学性、先进性和实用性。内容上既有操作简便不需精密仪器的传统方法,也有反映现代科学的新方法与新技术,各院校可根据所处的南北地理气候特征、专业培养目标、课程教学时数、毕业论文要求和实验条件因地制宜地选择各个实验。

该书作为实验教材乃属全国首创。因教材内容设计新颖,全程均可使用多媒体,积极推进案例教学。全书强调知识融通,重视学科群建设;注重中药栽培学与中药学、农学、园艺学、基因工程等学科紧密结合,共同协调发展,集群学科,构筑专业平台,将教学与实验实践相结合,充分体现以学生为中心,教师起组织者、指导者、帮助者和促进者的作用,全面发挥学生的主动

性、积极性和创新精神,最终达到使学生更有效地消化教材的知识并有所创新。

《实验教程》主要由广州中医药大学、西北农林科技大学、四川农业大学、南京中医药大学、江西中医学院等全国 30 多所大学的专家教授参加编写与审稿,是跨学科、跨院校合作的一个典范。编写时尽可能体现栽培学实践性、应用性,突破了传统教材以理论知识为主的局限性。本书作为“十一五”国家级规划教材的配套实验教材,经广州中医药大学作为自编教材连续多年试用效果很好。其知识面广、可读性强,在全国各相关院校与专业交流使用获得普遍选用,反映良好,广受欢迎。该书非常适宜供全国高等医药院校、高等农林院校、高等师范院校、综合性大学药学院及全国各高职高专院校开设的中药学、药学、中药资源、药用植物栽培、中药栽培、中草药栽培与鉴定、药物营销(国际经济与贸易)等相关专业作教材和教学参考书;也可以作为各地相关研究院、所科技人员,企事业生产单位和各界人士参考使用,为全国广大药材种植者的经典实验技术指南。同时亦可供全国相关专业的研究生,各类高职高专等职业技术学院和普通专业院校作教材使用。

本书是在各院校的许多教师多年的实验教学经验和已编写出版的多部同类教材的基础上,通过修改、创新、充实、提高的产物。广州中医药大学徐良教授负责全书的总策划设计和主编,并根据其所主编出版的教育部“十一五”国家级规划教材《中药栽培学》和《药用植物栽培学》的教学大纲及实验教学的特色与创新要求,组织了西北农林科技大学王渭玲、广州中医药大学岑丽华、四川农业大学吴卫与陈新福、江西中医学院刘贤旺、南京中医药大学巢建国等专家会同已出版的“十一五”国家级规划教材《药用植物栽培学》和《中药栽培学》的 40 多位编委,分别对各章节进行了科学性、可行性的论证及分工编写(按照“十一五”国家级规划教材编审委员会的计划决定,凡是参与本《中药栽培学》和《药用植物栽培学》教材编写的全体作者均成为该配套实验教材的编委);教程的第 1 章、第 3 章由王渭玲、岑丽华等老师主持编写,第 2 章、第 4 章由徐良、王渭玲等老师主持编写,第 5 章、附录由岑丽华、徐良等老师主持编写;吴卫、陈新福老师编写第 2 章实验七和第 2 章实验八,陈新福、吴卫老师编写第 4 章实验五、第 4 章实验六,巢建国老师编写第 2 章实验十六、第 2 章实验十七,刘贤旺老师编写第 1 章实验四,第 1 章实验五。全书初稿完成后,经徐良、陈士林、梁宗锁、王渭玲等多位专家仔细审阅,最后由徐良教授根据教学大纲、人才培养目标及教材出版部门的相关规则,再次进行修改和定稿。在此,我们对所有参与本教材编写和审阅的同志一并表示感谢。

由于理论和实践范围的局限性,不足之处,欢迎各院校和广大读者在使用过程中提出宝贵意见,以便再版时进一步修订提高。

全国高等院校《中药栽培实验技术与方法学》编委会

2009 年 7 月

目 录

第 1 章 实验药用植物材料的准备	(1)
第 2 章 药用植物栽培基础实验	(8)
实验一 栽培药用植物种类和药用植物园	(8)
实验二 药用植物栽培设施种类的识别	(9)
实验三 药用植物种质鉴定及种子发芽试验	(10)
实验四 药用植物浸种催芽技术及相关测定	(11)
实验五 药用植物栽培的播种育苗	(15)
实验六 药用植物的扦插与嫁接繁殖	(16)
实验七 药用植物种苗快速繁殖(组培快繁)	(18)
实验八 药用植物种子种苗质量检测	(23)
实验九 栽培药用植物的生长分析	(31)
实验十 薏苡成熟期产量测定和其他性状调查	(34)
实验十一 薏苡不同群体结构、产量性状的调查分析	(36)
实验十二 栽培丹参植物学形态特征及其主要类型的识别	(37)
实验十三 决明栽培测产及主要经济性状的考察	(38)
实验十四 药用植物栽培田间试验设计	(40)
实验十五 药用植物生产过程的观察记录及档案管理	(47)
实验十六 农药波尔多液的配制	(52)
实验十七 农药石硫合剂的配制	(53)
第 3 章 常用药用植物栽培的生理学测定	(56)
实验一 药用植物根系活力的测定	(56)
实验二 栽培药用植物体内硝酸还原酶活性的测定	(59)
实验三 植物体内硝态氮含量的测定	(62)
实验四 药用植物组织水势的测定	(63)
实验五 逆境对栽培植物细胞膜的伤害	(64)
实验六 植物体内游离脯氨酸含量的测定	(66)
实验七 药用植物苯丙氨酸解氨酶活性测定	(68)
实验八 药用植物叶面积的测定	(69)
实验九 药用植物叶绿素含量的测定	(74)
实验十 药用植物光合速率的测定	(76)
第 4 章 药用植物栽培环境及药材质量检测实验	(84)
实验一 药用植物栽培土壤中汞的测定	(84)

实验二	药用植物栽培土壤中铅和镉的测定	(87)
实验三	药用植物栽培土壤中铬的测定	(89)
实验四	药用植物栽培土壤中砷的测定	(90)
实验五	药用植物种植地土壤肥力的测定	(92)
实验六	药用植物栽培灌溉水化学需氧量(COD _{Cr})的测定	(96)
实验七	药用植物栽培灌溉水溶解氧(DO)的测定	(98)
实验八	药用植物栽培灌溉水中生化需氧量的测定	(100)
实验九	药用植物栽培灌溉水中氨氮的测定	(102)
实验十	药用植物栽培灌溉水中硝酸盐氮的测定	(103)
实验十一	药用植物栽培灌溉水中挥发酚类的测定	(105)
实验十二	中药材重金属含量检测	(107)
实验十三	中药材农药残留含量检测	(114)
实验十四	栽培中药材有效成分总黄酮含量检测	(118)
实验十五	中药材含水量检测	(119)
第5章	中药质量控制及实验常用检测技术	(120)
第一节	药材检定通则	(120)
第二节	药材及成方制剂显微鉴别法	(121)
第三节	分光光度法	(123)
第四节	色谱法	(128)
第五节	毛细管电泳法	(137)
第六节	杂质检查法	(139)
第七节	铅、镉、砷、汞、铜测定法	(140)
第八节	氯化物检查法	(143)
第九节	铁盐检查法	(143)
第十节	重金属检查法	(144)
第十一节	砷盐检查法	(145)
第十二节	水分测定法	(147)
第十三节	灰分测定法	(149)
第十四节	乙醇量测定法	(149)
第十五节	脂肪与脂肪油检验法	(151)
第十六节	酸败度检查法	(153)
第十七节	农药残留量测定法	(154)
第十八节	甲醇量检查法	(156)
第十九节	浸出物测定法	(157)
第二十节	鞣质含量测定法	(157)
第二十一节	挥发油测定法	(158)
第二十二节	无菌检查法	(159)
第二十三节	微生物限度检查法	(164)
附录 A	中华人民共和国环境空气质量标准 GB 3095-1996	(179)

附录 B 中华人民共和国农田灌溉水质标准(GB5084-92)	(183)
附录 C 中华人民共和国土壤环境质量标准(GB 15618-1995)	(188)
附录 D 中药材规范化生产允许和禁止使用的农药种类及使用原则	(191)
附录 E 中华人民共和国农业部公告(第 199 号)	(194)
附录 F 药用植物及制剂进出口绿色行业标准	(195)
附录 G 中药材生产质量管理规范(试行)	(198)
附录 H 中药材生产质量管理规范认证管理办法(试行)	(203)
附录 I 中药材 GAP 认证检查评定标准(试行)	(206)
参考文献	(211)

第 1 章

实验药用植物材料的准备

一、实验植物材料的种类

作为药用植物栽培学实验的植物材料非常丰富,按其来源可分为天然植物材料和人工培养的植物材料两大类。天然植物材料包括植物幼苗、根、茎、叶、花、果实、种子等各种植物组织或器官;人工培养的植物材料包括通过溶液培养、基质培养及植物组织培养形成的植物幼苗、突变性细胞、原生质体、愈伤组织以及人工选育的品种、杂交种、突变体等植物材料。按其存活状态和生理状态又可分为新鲜植物材料和干材料两类。不同种类的植物材料可根据实验的目的和条件不同而加以选择。

二、药用植物材料的培养

在进行药用植物生长及生理规律研究时,除采用一部分天然植物材料外,经常需要进行植物的人工培养,培养的种类很多,常用的有土培、水培和砂培等,在研究特殊问题时,也有采用隔离培养、流动培养及灭菌培养等方法。以下介绍常用植物材料的培养方法。

(一)溶液培养(或砂基培养)

溶液培养也称为水培法,是以水溶液作为植物的生长环境,是将植物生长发育所需要的矿质元素用适当的无机盐配制成营养液来培养植物,并使其正常生长的一种培养方法。用溶液培养植物材料,可以避免土壤中复杂因素的影响,并能方便地观察植物对矿质元素的吸收和运输。在科学研究和生产实践中,溶液培养已成为一种重要的栽培方法。但在溶液培养过程中,经常会出现根系缺氧、溶液 pH 和渗透势发生改变等因素引起的死苗现象。有时就需采用砂基培养,砂基培养是在洗净的石英砂或玻璃球等材料中加入营养液来培养植物的方法。

1. 营养液的配制 合适的营养液对于水培植物的生长十分重要,由于植物对各种离子的配比、渗透压和 pH 的要求各不相同,因此迄今还没有适合于所有植物生长的万能营养液。目前常用的有适宜于中生植物生长的有 Hoagland 营养液和 W. Knop 营养液,适宜于水稻生长的木村营养液和 Espino 营养液等。一般植物都可选用某种营养液作为基本溶液,再根据不同植物的特点进行适当调整。如薹苳生长过程中对硅有特殊要求,培养液中添加硅可使植株生长健壮,而且培养液中的营养元素浓度要求比一般作物低,pH 也有所不同。但是,无论选择哪种营养液,都需要注意各种元素之间的配比,它们必须是一种平衡溶液。

2. 培养缸的选择 培养缸可选用玻璃、金属、陶瓷、塑料或水泥等材质制成的盆钵。盆钵容积因植物种类和栽培时间长短而有不同,一般在 1~2L 为宜。随着植株长大,可以更换 2L 以上或更大的培养缸。做缺素实验时,最好选用聚乙烯塑料培养缸,以免缸体释放的元素干扰

实验。做分根培养时,可在缸的底部中线焊上隔板,将缸体平均分成两个部分。培养缸选好后,还要配上合适的盖子,常用厚布或硬纸板在加热的石蜡中浸透,晾凉后打上大小合适的孔,也可用泡沫塑料板打上大小合适的孔,供栽培幼苗。如果是玻璃或透明的塑料培养缸,需要将缸体涂黑或用黑纸包裹,外边再包上一层白纸,避免根系见光,同时可抑制藻类的生长。

3. 幼苗的培育和定植

(1)育苗:以黄芪为例。①取籽粒饱满、无病虫的黄芪种子若干,用自来水洗净并去掉多余水分后,用 0.1 % HgCl_2 溶液消毒 10 min,取出后先用自来水反复冲洗,再用蒸馏水洗 2~3 次,并在蒸馏水中吸胀 4~6h(吸胀时间长短因不同种子而异),将其平铺在垫有 2 层吸水滤纸的培养皿上,在 25℃ 恒温培养箱中催芽。待胚根长出 0.5 cm 左右时,即可进行溶液培养。②取 1~1.5 cm 厚的塑料泡沫板,切割成与培养盆(缸)口形状相同且略大一些的块,再用打孔器在上面均匀的打成直径 1 cm 左右的孔,一面装上塑料纱网待用。③在准备好的培养缸中装入 1/4 浓度的完全培养液至 3/4 高度。将塑料泡沫板盖好后(有塑料纱网的一面朝下),选取生长一致的萌发黄芪播种在小孔中,每孔 2~3 粒(并留 1 个小孔插入通气管),盖上 1 层湿纱布,按随机排列法整齐的摆放在温室中的灯光下培养。注意每天打开气泵 2 次,每次通气不少于 30 min。如果培养时间超过 1 周时,还需要更换培养液。④培养结束后,按实验要求取一定部位的材料进行各项测定,并倒去培养液,洗净培养盆。

(2)幼苗移栽:以黄芪为例①如果需要较长时间培养幼苗,可以不在塑料泡沫板下装塑料纱网,使根系通过小孔直接伸到培养液中。②首先将待移栽幼苗的根系先用自来水洗净,再用蒸馏水洗 2~3 遍,放在吸水纸上吸去表面多余水分,用海绵条轻轻裹住幼苗基部,并插入泡沫板的小孔中。每个小孔可插 3~4 株 2 叶龄的黄芪幼苗。待全部插完(留 1 孔通气)后,小心地将根系放入培养液中盖好,一般培养幼苗的营养液应稀释到原浓度的 1/4~1/2 为宜。其余各步操作与种子育苗相同。

(3)大田栽培苗或土壤盆栽苗的溶液培养:从大田或培养盆中挖出的苗首先需要用自来水清洗根系(注意尽量不使根系受损伤),然后在自来水中培养 2~3d,待发出新根后再进行溶液培养。其余步骤与(2)相同。

4. 培养期间的管理

(1)通气:进行大量溶液培养时,可以采用自动的通气装置,实验室的小规模实验通常使用小型的鱼缸加氧泵或手工定时打气的办法解决根系的通气问题。

(2)调节溶液 pH 和渗透势:在培养溶液里,随着作物的生长和根系的代谢作用,使溶液 pH 发生改变,需经常更换溶液或采用含有缓冲能力的混合营养液来维持溶液 pH,一般 pH 为 5.5~6.5。另外还必须使营养液维持一定的渗透势,以保持生理平衡。通常适宜于作物生长的渗透势在 -0.1~-0.3 MPa。

(3)营养液的更换:植物生长过程中不断消耗培养钵中水分和养分,必须经常浇水保持原有的液面。在植物生长期间,营养液要经常更换,以保持一定的营养水平。一般夏季 1 周更换 1~2 次,冬季 1~2 周更换 1 次。

(二)土壤培养

土壤培养是以土壤作为植物的培养介质,通常将土壤装入盆钵中,又称为盆栽培养。

1. 土壤的准备 在装盆时,所用土壤需通过机械混合、风干过筛后搅拌均匀,保存在较大的容器中备用。然后再根据不同的实验目的对土壤进行拌肥、加水等处理。同时留样进行土

壤含水量、pH、N、P、K 和有机质等各种营养元素的含量以及土壤农化性质的测定。

2. 盆钵的准备 用于土培试验的盆钵有很多种,包括玻璃盆、搪瓷铁盆、陶瓷盆和塑料盆等。盆钵的大小应当根据药用植物种类和实验任务来确定。一般禾谷类和豆科植物,可以用 $20\text{cm} \times 20\text{cm}$ 或 $15\text{cm} \times 30\text{cm}$; 高大一点的植物则需用 $30\text{cm} \times 30\text{cm}$ 或更大一点的盆钵。在装盆之前,一定要先把实验用的盆钵洗干净。浇水用的管子、排水用的小石砾石及尼龙纱等都要事先准备好。

3. 播种和管理 用于盆栽的种子要进行仔细选择,播种量应多于计划留苗数;播种密度应根据实验要求和植株的大小决定。播种时要将已经称过重量的盆土留一部分出来作为盖土用,一般植物盖土厚度为 $2 \sim 3\text{cm}$,小粒种子和难出土的双子叶植物盖土深度应在 2cm 以下。播前将盆土压平、灌水,当水分渗入土壤后,将种子按适当的距离均匀排列好,再将盖土均匀覆盖在种子上并轻轻压平,上面最好再盖上一层干净的石英砂,防止浇水时形成板结。幼苗出土前,可用纸或其他材料覆盖盆面,以减少土壤水分蒸发。在幼苗即将出土时,可将纸全部取下,并补撒一些石英砂,厚度一般以 $0.5 \sim 1\text{cm}$ 为宜。

三、实验材料的取样技术

实验结果的准确性在很大程度上决定于取样方法的科学性和样品的代表性。从大田或培养材料中抽取的作为实验的样品(药材)称为分析样品,分析样品的获得需要经过下列步骤:

采取原始样品 → 分选平均样品 → 获得分析样品。

(一)原始样品的采样方法

1. 采样方式

(1)随机取样:在实验区或大田中选择有代表性的样点,其数目多少视田块的大小而定,一般为 $3 \sim 5$ 个。样点选好后可随机采取一定数量的样株,也可在每一个样点中按规定的面积采取样株。一般每个样点取 $10 \sim 20$ 株或取 1m^2 面积内的全部植株作为样株。

(2)对角线取样:在实验区或大田可按对角线选定 5 个取样点,然后在每个取样点上随机取一定的样株,或在每个样点上按规定面积采取样株。薏苡等禾本科类药材或作物一般每点取 50cm 双行或 1m^2 ,也可每点取 $10 \sim 20$ 株。

2. 平均样品的采取法

(1)混合取样法:一般颗粒状(如种子等)或粉末状(如面粉等)的样品可采取混合取样法进行取样。其具体操作方法是:将原始样品平铺在木板或玻璃板上,均匀地摊成一层,按照对角线划成 4 等份。取对角线的 2 份为进一步取样的材料,而将其余的 2 份淘汰。再将留下的 2 份充分混合后用同样的方法重复上述的操作,每次淘汰 50% ,直到所取的样品达到要求数量为止,这种取样方法也称为四分法。液态样品如植物汁液、伤流液或饮料等在取样时,应将多个重复样品混合后量取一定的体积作为平均样品。

(2)按比例取样法:有些水果、蔬菜、薯类作物等植物材料生长往往不均衡,在这种情况下,应将原始样品按不同类型的比例选取平均样品,例如天门冬、麦冬、桔楼等瓜类药材在选取平均样品时,应按大、中、小不同类型样品的比例取样,然后在将每一个样品纵切剖开后各切取相同的比例,混合在一起组成平均样品。采取果品药材的平均样品时,如核桃、杏仁、木瓜、佛手等果实,应考虑果枝在树冠上的分布方位、成熟度及果实体积大小的差异等因素,然后按各相关的比例取样混合成平均样品。

(3)按生长期取样法:在植物生理学研究中,常常需要观察、分析某种植物材料或某种因素的处理在不同生长期的动态变化,因此需要按生长期取样。在幼苗期取样,因植株较小,采取的株数就比较多;随着植株逐渐长大,每次采取的株数也相应减少。尽管各种作物有所不同,但总的原则是所取样品的干重应当大于分析用量的2倍以上,而且决不能采单株作为样品。在各个生长期取样时,都应事先调查植株的生长状况,并将样本区分为若干类型,计算各种类型植株所占的比例,再依此采取相应的样株作为平均样品。

3. 注意事项

(1)取样时应避开地头、边行、粪堆、水沟或缺苗断垄等没有代表性的地方。

(2)取样后按分析的目的分成各个部分,如根、茎、叶、穗等,然后捆好附上标签,分别装入样品袋。

(3)对于水分较多、容易霉烂变质的果蔬样品,经分选得到平均样品后可在冰箱中冷藏,或用干燥灭菌处理或烘干后供分析之用。

(二)药材取样法

药材取样法是指选取供检定用药材样品的方法。取样的代表性直接影响到检定结果的正确性。因此,必须重视取样的各个环节。

1. 取样前,应注意品名、产地、规格等级及包件式样是否一致,检查包装的完整性、清洁程度以及有无水迹、霉变或其他物质污染等情况,详细记录。凡有异常情况的包件,应单独检验。

2. 从同批药材包件中抽取检定用样品,原则如下:

药材总包件数在100件以下的,取样5件;100~1000件,按5%取样;超过1000件的,超过部分按1%取样;不足5件的,逐件取样;贵重药材,不论包件多少均逐件取样。

3. 对破碎的、粉末状的或大小在1cm以下的药材,可用采样器(探子)抽取样品,每包件至少在不同部位抽取2~3份样品,包件少的抽取总量应不少于实验用量的3倍;包件多的,每包件的取样量一般按下列规定:

一般药材100~500g;粉末状药材25g;贵重药材5~10g;个体大的药材,根据实际情况抽取代表性的样品。

如药材的个体较大时,可在包件不同部位(包件大的应从10cm以下的深处)分别抽取。

4. 将所取样品混合拌匀,即为总样品。对个体较小的药材,应摊成正方形,依对角线划“×”字,使分为4等份,取用对角2份;再如上操作,反复数次至最后剩余的量足够完成所有必要的试验以及留样数为止,此为平均样品。个体大的药材,可用其他适当方法取平均样品。平均样品的量一般不得少于实验所需用的3倍数,即1/3供实验室分析用,另1/3供复核用,其余1/3则为留样保存,保存期至少1年。

四、分析样品的处理与保存

采回的新鲜样品常混有泥土等杂质,不可用水冲洗,应用柔软的湿布擦净,然后置于空气流通处风干或烘干。烘干样品时,可先把植株放入105℃烘箱中杀青15~20 min,及时终止酶活性,再转入70~80℃,一直维持到样品烘干至恒重为止。一般烘干样品所需时间约为1天左右。为了避免糖、蛋白质、维生素等成分的损失,可采用真空干燥或冷冻真空干燥法。根据样品的不同特点,烘干后还要分别进行如下处理。

(一)种子样品

一般淀粉性种子的平均样品最好用电动样品粉碎机粉碎。粉碎前应将机内清扫干净,最初粉碎出来的少量样品应弃去不用,然后正式进行粉碎,使全部样品通过80~100目的筛子,混合均匀后,按四分法取出一定量的样品作为分析样品贮藏于干燥的磨口式广口瓶中,贴上标签,注明样品的名称、编号、采取地点、处理、日期和采样人姓名等。长期保存时,还需要在标签上涂蜡并在样品中放入少量樟脑等防腐剂。蓖麻、芝麻、亚麻、花生等油料种子不要用粉碎机粉碎,可取少量样品在研钵中研碎,以免脂类损失。

(二)茎秆样品

干燥后的茎秆样品也要粉碎,所使用的粉碎机与粉碎种子的电动磨粉机不同,实验室常用的小样品量植物样品粉碎机即可用于茎秆样品的粉碎,该机的切割部分由几副排列相反的刀片组成。粉碎后的样品按上法保存。

(三)新鲜植物和多汁样品

用于测定酶活性或某些成分(如维生素C、DNA、RNA等)的含量时,需要使用新鲜样品。因此,样品的保鲜非常重要。取样后应立即进行待测组分的提取;也可在液氮中冷冻保存,或用冰冻真空干燥法获得干燥样品后,在0~4℃冰箱中保存。一般多汁样品,如瓜、果或富含浆汁的茎叶类中草药等,在保存过程中容易发生变化,取回样品后,应立即取出平均样品,再用锋利的不锈钢刀切成小块,在电动捣碎机中打成匀浆,如果样品含水量较少,可按样品重量加入适量的水或提取介质,然后捣碎。样品量少时,可在研钵中研磨,必要时可加少量石英砂。如果所测物质不稳定(如某些维生素和酶等),则上述操作均应在低温下进行。样品匀浆若来不及测定,可暂存冰箱内,但时间不宜过长(一般不应超过1~2h)。

五、实验结果和数据的记录、处理与分析

实验不仅要认真操作,如实记录实验数据,还须对实验数据进行科学、合理的处理与分析,这是科学研究中的一个重要环节。它可以帮助我们分析结果的正确性,检查产生误差的原因,提高分析测定的可靠程度,指导分析工作中的实验设计和质量控制。

(一)有效数字及其运算

有效数字是指分析测定中实际能测量到的数据。记录数据和计算结果,都应以测定方法和所用仪器准确程度来决定。所保留的有效数字中,只有最后一位是可疑数字或不定数字。例如在千分之一分析天平上称得某药品0.320g,就不能记为0.32g或0.3200g,而只能记为0.320g。0.3200g药品需要在万分之一分析天平称取,而0.32g药品只需要在百分之一天平称取就可以。10ml移液管可读数到小数第二位,如5.20ml,0.1ml移液管可读数到小数第四位,如0.0500ml。

实验数据记录及运算的一般规则是:

1. 记录实验数据时,只应保留一位不定数字。
2. 在运算中去掉多余尾数后进位或弃取,以“四舍五入”或“四舍六入五留双”为原则。
3. 运算中表示倍数或分数关系的自然数不含不定数,看作无限有效。pH、lgk等对数值,其有效数字的位数仅取决于小数部分的位数。
4. 几个数相加减或相乘除时,应取有效数字的位数按绝对误差最大,即小数点后位数最少的一个数据决定。例如: $0.340(\pm 0.001) + 9.25(\pm 0.01) - 1.2365(\pm 0.0001)$ 三个数据中

9.25 的绝对误差最大,是 0.01,故应为: $0.34 + 9.25 - 1.24 = 8.35$ 。

(二)误差和实验结果的可靠性

误差就是测得值与真实值之间的差值,包括偶然误差和系统误差,偶然误差是由偶然因素引起的,它的产生是偶然的,不能预知的,也是不可避免的,只能减小,不能消除。系统误差是由于某个因素引起的误差,如仪器不良或个人的习惯与偏向等,这种误差可以根据其发生的原因加以校正,是可以消除的。在分析测定过程中,误差是绝对存在的,尤其是生物试验,受环境影响更大,造成误差的因素更多。实验中必须以误差理论做指导,以达到降低实验误差、提高实验精确度的目的,并为实验结果的统计分析打下基础。应用统计学的方法分析实验结果的正确性,并判断其可靠程度。实验中,每种处理至少要设 3 次重复,否则无法进行统计检测。

系统误差影响分析结果的准确度,偶然误差影响分析结果的精密性。准确度和精密性共同影响分析结果的可靠性。

所谓准确度是指测得值与真实值符合的程度,它用误差来表示。误差分为绝对误差和相对误差。所谓精密性是指测定结果的再现性,即几次重复测定彼此间符合的程度,它用偏差来表示。偏差也分为绝对偏差和相对偏差。

(三)误差分析

平均值是应用最广泛的一种能说明总体特征的数值。在同一样品所得到的多个实验数据,最简单的办法是计算其算术平均值($\bar{X}$),它是观察值总和除以观察个数的商。但这还不能很好反映测定结果的可靠性,还需要计算出偏差或相对偏差。在分析中,当数据不多时,用算术平均偏差或相对平均偏差表示精密性较简便;而当数据较多或分散程度较大时,用标准偏差即均方差 S 或相对标准偏差即变异系数 $C.V$ 表示精密性则更可靠。

为了检测某一样品所属总体平均数和某指定的同类样品总体平均数之间,或两种处理取样所属的总体平均数之间有无显著差异时,在总体方差未知,又是小样本情况下,可以用 t 测验,再根据设定显著水平和自由度大小,从 t 值表中查得概率值(P),即可推断不同样品或同一样品的不同处理之间是否具有显著差异性及其差异水平。

t 值实质上是差数的 5% 和 1% 置信区间;它只适用于检测两个相互独立的样品平均数。要明确多个平均数之间的差异显著性,还必须对各平均数进行多重比较。在进行多重比较时,多采用最小显著极差法(简称 LSR 法),这一方法的特点是不同平均数之间的比较采用不同的显著差数标准,可用于平均数间所有相互比较,其常用方法有新复极差测验和 q 测验两种。各平均数经多重比较后,常采用标记字母法表示,在平均数之间,凡有一个相同标记字母的即为差异不显著,凡具有不同字母标记的即为差异显著。并用小写字母(a、b、c 等)表示 $\alpha=0.05$ 显著水平,大写字母表示 $\alpha=0.01$ 显著水平。差异显著性也可用标号的方法表示,凡达到 $\alpha=0.05$ 水平(差异显著)的数据,在其右上角标一个“*”号,凡达到 $\alpha=0.01$ 水平(差异极显著)的数据,在其右上角标两个“*”号,凡未达到 $\alpha=0.05$ 水平的数据,则不予标记。

(四)方差分析的基本步骤

1. 将资料总变异的自由度和平方和分解为各变异因素的自由度和平方和,进而算出均方差。
2. 计算均方比,作出 F 测验,以明了各变异因素的重要程度。
3. 对各平均数进行多重比较。具体方法可参考有关专业书籍。

(五)相关与回归分析

在仪器分析中,常常需要把待测物质的标准含量对测得的物理量绘制成标准曲线,然后再根据标准曲线去查出待测样品的含量。这种方法比较繁琐,而且查出的数值也不够精确。用一元线性回归法计算则显得更为方便、省时。这样不仅能用相关系数的大小表示线性关系的程度,而且能连续运算出最终结果。

在进行一元线性回归法计算时,一般用 x 表示待测的物质质量, y 表示测得的物理量,一元线性回归方程为: $y = a + bx$ 式中 a 称为回归截距, b 称为回归系数。

$$b = \frac{\sum (X_i - \bar{X})(y_i - \bar{y})}{\sum (X_i - \bar{X})^2} \quad (\text{式 1-1})$$

$$y = \bar{y} - b \bar{X} \quad (\text{式 1-2})$$

式中 y_i 是制作标准曲线的各标准溶液测得的物理量, $\bar{y}$ 是这几个物理量的算术平均值; X_i 是 y_i 相对应的物质质量, $\bar{X}$ 是这几个物质质量的算术平均值。用 r 代表相关系数,表示为:

$$r = \frac{\sum (X_i - \bar{X})(y_i - \bar{y})}{\sum (X_i - \bar{X})^2 \cdot \sum (y_i - \bar{y})^2} \quad (\text{式 1-3})$$

这样,根据样品测得的物理量 y ,便可以从回归方程计算出它的物质质量 X 。

$$X = \frac{y - a}{b} \quad (\text{式 1-4})$$

相关系数(r)是表示两个变量(X, Y)之间线性关系密切程度的指标,其值在 -1 至 $+1$ 间。如两者呈正相关, r 呈正值, $r=1$ 时为完全正相关;如两者呈负相关则 r 呈负值,而 $r=-1$ 时为完全负相关。完全正相关或负相关时,所有图点都在直线回归线上;点的分布在直线回归线上下越离散, r 的绝对值越小。当例数相等时,相关系数的绝对值越接近 1, 相关越密切;越接近于 0, 相关越不密切。当 $r=0$ 时,说明 X 和 Y 两个变量之间无直线关系。