

# 高粱、玉米籽粒蛋白质含量直接蒸馏测定法的研究

李秀香 许 超

(河南省农业科学院科学实验中心, 郑州 450002)

**摘 要** 根据每种作物籽粒蛋白质含量与酰胺含量之间存在着一定相关关系的原理, 经反复试验, 摸索出高粱和玉米籽粒蛋白质含量直接蒸馏测定法(简称 DD 法)。该法省略了凯氏法的消化过程, 把每个样品的测定时间由 2h 缩短为 4min, 测定结果的准确性、重现性与凯氏法测定结果比较无显著差异, 既节省了时间和药品, 又避免有毒气体对人体的危害, 对大批量快速筛选作物育种材料十分有利。

**关键词** 高粱 玉米 蛋白质 直接蒸馏测定法(DD 法)

作物籽粒蛋白质含量是评价作物营养价值的主要指标, 但常规的凯氏分析法测定作物籽粒蛋白质含量比较费时, 很难适应当前作物品质育种快速筛选材料的要求。用直接蒸馏快速测定法对稻麦籽粒蛋白质含量的测定在国内已有报道<sup>[1]</sup>。本文在深入研究国内外 DD 法测定作物籽粒蛋白质含量资料<sup>[1]</sup>的基础上, 把正交试验设计法应用于确定 DD 法测定的条件, 经反复试验研究, 摸索出高粱、玉米籽粒蛋白质含量直接蒸馏测定法, 适应了高粱、玉米品质育种快速筛选材料的要求。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

试材由河南省农科院高粱种质资源品质鉴定课题提供。从中选出 24 个具有高、中、低蛋白质含量(10.14%~16.64%)的品种, 从河南省农科院粮食作物研究所玉米研究室筛选 24 个玉米品种(蛋白质含量 10.90%~14.39%), 粉碎后过 60 目筛。

### 1.2 仪器和试剂

瑞典 Tecator 公司 1030 全自动定氮仪; FW90 型万能粉碎机; 40%NaOH 溶液; 1/2 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>mol/L 0.02540 溶液; 2%H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-指示剂溶液; 加速剂(CuSO<sub>4</sub>: K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>=1: 10)。

### 1.3 测定步骤

1.3.1 凯氏蛋白质含量测定法(GB2905-82) 采用 1030 自动分析系统, 称取高粱、玉米样品

各 0.1000g, 分别加入 3ml 浓  $H_2SO_4$  和 2g 加速剂, 升温至 420  $^{\circ}C$  并消煮至呈透明的蓝绿色(约需 90min), 再继续消煮 30min, 然后蒸馏, 用 2%  $H_3BO_3$ —指示剂溶液吸收逸出的  $NH_3 \uparrow$ , 馏出体积 75ml( $H_2SO_4$  回收率 95%~100%), 高粱和玉米蛋白质含量  $y_i (i=1, 2, 3, \dots, 24)$  以干基计算(表 1)

表 1 凯氏法测定高粱、玉米籽粒蛋白质含量

作物	各 样 号 蛋 白 质 含 量 $y_i (%)$																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
高粱	14.02	10.22	12.22	11.32	10.95	10.81	11.18	15.28	10.39	10.94	13.64	12.70	11.54	11.66	13.36	10.20	13.56	13.12	12.64	14.71	12.08	10.14	11.34	12.44
玉米	11.68	11.64	11.75	11.74	13.80	13.87	13.92	13.79	10.90	10.92	11.18	10.91	12.23	12.26	12.28	12.30	14.25	14.19	14.35	14.33	11.18	11.17	11.23	11.15

1.3.2 直接蒸馏快速测定法(DD)法 称取高粱和玉米样品各 2.0000g, 置 100ml 蒸馏管中, 各加蒸馏水 10ml, 再于高粱和玉米样品中分别加 35ml 和 30ml 40%  $NaOH$  溶液, 在 1030 自动定氮仪上蒸馏, 馏出体积 75ml, 用 25ml 2%  $H_3BO_3$ —指示剂溶液吸收逸出的  $NH_3 \uparrow$ , 再用 1/2  $H_2SO_4$  0.02540 mol/L 溶液滴定, 得高粱和玉米样品所消耗的滴定剂用量  $x_i$ (表 2), 每个样品测定时间约需 4min(分析前作空白值, 分析条件  $A=0.000$ ,  $B=1.000$ )。

用最小二乘法算出  $y_i (%)$  与  $x_i (ml)$  之间的回归方程式  $y=a+bx$ , 式中  $x$  为 DD 法滴定剂用量,  $y$  为 DD 法求得的蛋白质含量(表 2), 高粱和玉米的  $a$  值分别为 1.48 和 2.36,  $b$  值分别为 0.81 和 0.89<sup>[3]</sup>。

表 2 DD 法测定高粱、玉米籽粒滴定剂、蛋白质含量

作物	各 样 号 测 定 结 果																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
$x_i$ 高粱	15.52	10.83	13.31	12.81	11.73	11.57	12.01	17.08	11.04	11.72	18.75	13.90	12.47	12.61	15.08	10.82	14.92	14.41	13.82	16.37	13.13	10.74	12.22	13.58
(ml) 玉米	10.68	10.63	10.79	10.76	12.93	12.94	12.96	12.92	9.19	9.29	9.32	9.25	10.85	10.86	10.90	10.93	13.17	13.14	13.24	13.26	10.58	10.56	10.65	10.54
$y$ 高粱	14.00	10.22	12.22	11.81	10.94	10.81	11.17	15.26	10.39	10.93	16.60	12.69	11.54	11.65	13.64	10.21	13.51	13.10	12.63	14.68	12.07	10.14	11.34	12.43
(%) 玉米	11.87	11.82	11.95	11.94	13.87	13.89	13.89	13.86	10.54	10.63	10.66	10.59	12.02	12.03	12.06	12.09	14.08	14.06	14.14	14.16	11.78	11.76	11.84	11.74

以表 1  $y_i (%)$  为纵轴, 表 2  $x_i (ml)$  为横轴, 绘制直接蒸馏法滴定剂用量( $x_i$ )与凯氏法蛋白质含量( $y_i$ )的线性相关图(图 1)。

根据上述高粱、玉米回归方程式和线性相关图, 再通过直接蒸馏滴定获得高粱、玉米样品所消耗的滴定剂用量  $x$ , 即可从回归方程式的计算或从线性相关图中查到高粱、玉米样品的蛋白质含量  $y$ , 利用 1030 自动定氮仪, 可将回归方程式中的  $a$  和  $b$  直接输入自动定氮仪中的  $A$  和  $B$  通道, 样品经直接蒸馏滴定后即可自动输出蛋白质含量  $y$ 。

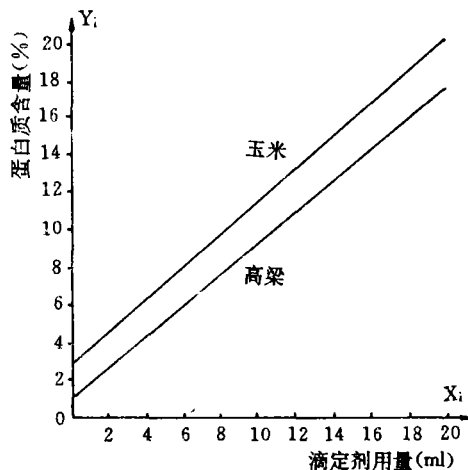


图 1 DD 法线性相关图

## 2 结果与讨论

## 2.1 测定条件研究

2.1.1 DD 法测定条件正交试验结果直观分析<sup>[5]</sup> 由称样量(A)、加碱量(B)、加水量(C)和粒度(D)等测定条件组成 4 个因素,每个因素设 4 个水平,即 A 为 0.2,0.5,1.0,2.0g;B 和 C 为 10,20,30,35ml;D 为 40,60,80,100 目。按  $L_{16}(4^4)$  正交表进行排列,组成 16 个不同的处理,每个处理重复 2 次,在自动定氮仪上直接蒸馏滴定。对各处理所消耗的滴定剂用量进行直观分析,结果列于表 3。

表 3 DD 法测定条件正交试验结果直观分析

滴定剂消耗量(ml)		称样量 A	加碱量 B	加水量 C	粒 度 D
$\bar{X}_1$	高粱	1.257	3.173	7.847	6.167
	玉米	0.956	2.545	4.934	4.114
$\bar{X}_2$	高粱	3.193	6.682	5.996	5.108
	玉米	2.261	4.027	3.964	3.434
$\bar{X}_3$	高粱	6.389	6.845	4.322	6.688
	玉米	4.460	4.910	3.418	4.392
$\bar{X}_4$	高粱	12.959	7.097	5.633	5.835
	玉米	8.369	4.564	3.731	4.106
R	高粱	11.702	3.924	3.525	1.580
	玉米	7.413	2.365	1.516	0.958

表 3  $\bar{X}$  为每个因素 4 水平的平均值,R 为每个因素 4 水平平均值中的最大值与最小值之差。从表 3 可看出两点:

第一、高粱和玉米均是  $A_R > B_R > C_R > D_R$ ,表明各因素对滴定剂的消耗量由多到少的排列顺序为称样量>加碱量>加水量>粒度。

第二、高粱和玉米称样量(A)、加水量(C)、粒度(D)等 3 个因素中  $\bar{X}$  的最大值分别为  $\bar{X}_4$ 、 $\bar{X}_1$  和  $\bar{X}_3$ ,高粱和玉米加碱量(B)因素中  $\bar{X}$  的最大值分别为  $\bar{X}_4$  和  $\bar{X}_3$ 。表明高粱、玉米称样量、加水量和粒度等因素对滴定剂的最大消耗水平分别为 2.0g、10ml 和 80 目,高粱和玉米加碱量因素对滴定剂的最大消耗水平分别为 35ml 和 30ml。

同一因素中对滴定剂的最大消耗水平与其它 3 个水平之间是否存在显著性差异,需作方差分析。结果见表 4。

2.1.2 DD 法测定条件正交试验结果方差分析<sup>[4]</sup> 从表 4 可看出,除粒度外,同一因素中对滴定剂的最大消耗水平与其它 3 个水平之间均存在着极显著的差异。由此可作出判断,高粱和玉米称样量 2.0g,加水量 10ml,高粱的加碱量 35ml 和玉米的加碱量 30ml,是 DD 法测定高粱和玉米蛋白质含量的最佳测定条件。

## 2.2 测定结果可靠性分析

2.2.1 从表 5 及图 1 可看出,直接蒸馏法滴定剂用量  $x_i$  与凯氏法蛋白质测定结果  $y_i$  之间达极显著相关。

表4 DD法测定条件正交试验结果方差分析结果

变异来源	作物	变异平方和 (SS)	自由度 (df)	方差 (S <sup>2</sup> )	F 值	F <sub>0.05</sub>	F <sub>0.01</sub>
总变异	高粱	201.23	31				
	玉米	75.40	31				
称样量间变异 A	高粱	157.89	3	52.63	134.95**	3.13	5.01
	玉米	63.18	3	21.06	191.46**	3.13	5.01
加碱量间变异 B	高粱	20.72	3	6.90	17.72**	3.13	5.01
	玉米	6.53	3	2.18	19.82**	3.13	5.01
加水量间变异 C	高粱	12.69	3	4.23	10.85**	3.13	5.01
	玉米	2.57	3	0.86	7.82**	3.13	5.01
粒度间变异 D	高粱	2.62	3	0.87	2.23	3.13	5.01
	玉米	1.00	3	0.33	3.00	3.13	5.01
机误	高粱	7.31	19	0.39			
	玉米	2.12	19	0.11			

表5 5%及1%显著水准相关系数

作物	样品数 n	自由度 n'	相关系数 r	回归方程式	5%以下显 著 r 值	1%以下显 著 r 值
高粱	24	22	0.9993**	$y=1.48+0.81x$	0.404	0.515
玉米	24	22	0.9700**	$y=2.36+0.89x$	0.404	0.515

2.2.2 对凯氏法测定蛋白质含量  $y_i$  和 DD 法测定的蛋白质含量  $y$  两组数据进行  $t$  测验结果(表6)可看出,凯氏法和 DD 法测定高粱和玉米样品蛋白质含量的值之间无显著差异。

表6 凯氏法和 DD 法蛋白质含量测定结果  $t$  测验表

作物	样品数 n	合并自由度 $n_1+n_2$	$\bar{y}_i$	$\bar{y}$	$S_{1,2}$	$S_d$	$t$	$t_{0.05}$	$t_{0.01}$
高粱	24	46	12.248	12.249	1.698	0.347	0.003	2.0008	2.6772
玉米	24	46	12.379	12.386	1.287	0.372	0.019	2.0008	2.6772

2.2.3 DD法重复测定5次的天杂-63高粱样品蛋白质含量的值为8.95%、9.00%、8.93%、8.96%和8.86%;重复测定5次的郑单8号玉米样品蛋白质含量的值为11.77%、11.73%、11.75%、11.77%和11.73%,对两组数值进行变异系数和置信限统计<sup>[2]</sup>,结果列于表7。

表7 DD法蛋白质含量测定结果变异系数和置信限

作物	n	$\bar{x}$	s	c.v %	$S\bar{x}$	$t\alpha$	$CL=\bar{x}\pm t\alpha \cdot S\bar{x}(\%)$
高粱	5	8.94	0.0532	0.595	0.02380	$t_{0.01}=4.604$ $t_{0.05}=2.776$	$8.94\pm 0.11$ $8.94\pm 0.07$
玉米	5	11.75	0.0173	0.147	0.00775	$t_{0.01}=4.604$ $t_{0.05}=2.776$	$11.75\pm 0.04$ $11.75\pm 0.02$

从表7可得出两点结论:

第一、高粱和玉米重复测定5次数值的变异系数均小于1%;

第二、无论置信度是0.95还是0.99,高粱和玉米重复测定5次的数值均落在各自的置信限之内。表明DD法测定结果重现性好,准确度高。

### 3 结论

高粱、玉米籽粒中酰胺经水解释出的铵离子所消耗的滴定剂用量与凯氏法测出的蛋白质含量之间达极显著相关;DD 法测定结果重现性好,准确度高,与凯氏法测定结果比较无显著差异,能适应大批量快速测定筛选育种材料需要。

DD 法所确定的测定条件中,称样量、加碱量和加水量等是可靠的,但是在粒度方面,可能由于所采用的 FW90 型粉碎机粉碎粒度固定在 30~100 目之间,造成粒度 40、60、80、100 目等 4 个水平在消耗滴定剂的量无显著差异,有待进一步研究。

鸣谢 本文承蒙河南省农科院徐一力、李光耀副研究员和李安智、屠礼传研究员审阅,特此致谢。

### 参 考 文 献

- 1 曾秀英,郭学兴,曹熙德等. 直接蒸馏法快速测定稻麦蛋白质含量. 作物品种资源,1990(1):25~27
- 2 中国土壤学会农业化学专业委员会编. 土壤农业化学常规分析方法. 北京:科学出版社,1983,416~419
- 3 菲诗松,丁元,周纪芎等. 回归分析及其试验设计. 上海:华东师范大学出版社,1981,2~5
- 4 范源. 农业试验统计方法. 郑州:河南科学技术出版社,1983,321~335

## Studies on Estimating Protein Contents of Sorghum and Maize Grains by Direct Distillation Method

Li Xiuxiang      Xu Chao

(Experimental Centre, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou)

**Abstract** Based on the principles of the relationship between protein and acylamino contents of different cereal grains, through repeated experiments, a direct distillation method (DD Method) is found in estimating protein contents of sorghum and maize grains. This method leaves out the digestion procedure in Kjeldahl's method, so it can cut short the testing time from 2 hours to 4 minutes for each sample. The accuracy and reappearance of DD Method has no significant difference in comparing with the result of Kjeldahl's Method. Therefore, this method can save much time and chemicals, and avoid toxic gases. It is favourable for screening large amount samples of breeding materials.

**Key words:** Sorghum; Maize; Protein; Direct distillation method (DD method)