

日播种为宜，不能晚于5月30日。

参考文献

〔1〕 上海师大学系概率教研组：回归分析及其试验设计

〔2〕 北京林学院主编：数理统计

〔3〕 伏雷巴路夫：南斯拉夫，向日葵栽培讲义1979。

〔4〕 西庆奎、陈连江：谈谈黑龙江省向日葵种植合理布局，黑龙江农业科学，1982，6。

## 谷物赖氨酸含量测定法

——2·氯 3.5 二硝基吡啶法

郑云兰 赵铁男

（黑龙江省农业科学院综合化实验室）

谷物种子赖氨酸的含量是衡量其品质优劣程度的一项重要指标。种子赖氨酸含量目前国内外均以氨基酸分析仪为标准，测定仪广泛应用,但由于该分析仪价格昂贵,普及困难，因此迫切需要筛选有一个切实可行的测定方法。

赖氨酸测定方法除氨基酸分析仪法外，还有纸层析、薄层层析、离子交换层析法、微生物法，还有纸层高压电泳法、染料结合(DBL)法，2·氯 3.5 二硝基吡啶法、光谱分析法等多种。

我们于1976年开始摸索2·氯 3.5 二硝基吡啶法，1979年本法纳入全国谷物赖氨酸分析方法标准化研究协作组试验方案。几年来，对该法的回收率、显色温度和时间、标准曲线有效范围、方法的准确度、样品的脱脂和不脱脂与结果的关系，适应范围等条件，进行了大量的研究。我们对全国统供标准样品，分别以吡啶法和835型氨基酸分析仪进行测定，结果证明：该法与氨基酸分析仪测定值基本一致，具有显著的相关性 $r=0.99$ 。1983年，在全国谷类作物种子赖氨酸分析方法标准化研究协作组总结会上，对此法给予了肯定性评价。

### 试验材料

水稻品种11个（籼稻4、粳稻6、糯稻1）；小麦品种10个（冬麦3、春麦2、大麦2、小黑麦3）；玉米品种6个（奥派克玉米3、普通玉米3）；高粱品种4个；大豆品种3个。

### 试验方法

#### 一、试剂

1. 磷酸铜悬浮液

A液：称1.4克分析纯氯化铜（CuCl $\cdot$ 2H $_2$ O），用蒸馏水溶解后定容至50毫升。

B液：称取6.8克分析纯磷酸钠（Na $_2$ PO $_4$ ·12H $_2$ O），用蒸馏水溶解后定容至100毫升。

将A加入B，混合均匀后，以每分钟3000转离心15分钟，倾去上清液，沉淀物以0.05硼酸钠缓冲液冲洗再离心，这一过程重复3次。然后，将沉淀物悬浮于40毫升的硼酸钠缓冲液中。

2. 0.03M 磷酸钠缓冲液（pH=7.4）。

3. 木瓜酶A液（标准曲线用）：称取500毫克木瓜酶，以0.03M 磷酸钠溶解后定容100毫升，摇匀，过滤备用。

4. 木瓜酶B液（样品测定用）：称取400毫克木瓜酶，用0.03M 磷酸钠溶解后定容至100毫升，摇匀，过滤备用。

5. 0.05M 硼酸钠缓冲液 (pH = 9)。

6. 0.05 碳酸钠—碳酸氢钠缓冲液 (pH = 9)。

7. 显色液：称取 300 毫克 2·氯 3.5 二硝基吡啶，以甲醇溶解并定容 10 毫升备用 (用时现配)。

8. 1.2N 盐酸溶液。

9. 99.5% 甲醇。

10. 99.5% 醋酸乙酯。

11. 正己烷。

12. 盐酸单盐赖氨酸。

13. 混合氨基酸溶液：称取胱氨酸 20 毫克、甲硫氨酸 20 毫克、组氨酸 30 毫克、丙氨酸 30 毫克、异亮氨酸 30 毫克、苏氨酸 30 毫克、酪氨酸 30 毫克、甘氨酸 40 毫克、苯丙氨酸 40 毫克、缬氨酸 40 毫克、精氨酸 50 毫克、丝氨酸 50 毫克、天门冬氨酸 60 毫克、谷氨酸 300 毫克、亮氨酸 80 毫克、脯氨酸 80 毫克，将各不同量氨基酸混合，研磨均匀，然后称取 100 毫克溶解在 10 毫升碳酸盐缓冲液中。

14. 赖氨酸标准原液：2500 微克/毫升。

二、操作

1. 标准曲线绘制

A. 取赖氨酸标准原液 0、2、4、6、8、10 毫升，分别放入 6 个 10 毫升容量瓶中，以碳酸盐缓冲液定容至刻度，摇匀。即分别为每毫升含有 0、500、1000、1500、2000、2500ppm 赖氨酸系列标准液。

B. 分别取上述标准液各 1 毫升，放入 6 个 10 毫升离心管中，各加 4 毫升木瓜酶 A 液，加塞摇匀。

C. 再分别从上述 B 液的各离心管中取溶液 1 毫升，放另外 6 个 10 毫升离心管中，各加 0.5 毫升氨基酸混合液及 0.5 毫升磷酸铜悬浮液，加塞振荡 5 分钟，然后用 3000 转/分离心 10 分钟。

D. 分别取离心后 C 液，即上清液各 1 毫升，放入 10 毫升比色管中，各加 0.1 毫升 2·氯 3.5 二硝基吡啶溶液，充分振荡。室温 20℃ 下放置两小时，每 30 分钟振荡一次。

E. 向各比色管中加 5 毫升 1.2N 盐酸，充分振荡进行酸化。

F. 然后分别再向各比色管中加 5 毫升醋酸乙酯，加盖颠倒 10 次以上，进行提纯去杂。这一过程重复三次。用带有聚乙烯管的注射器去掉上层醋酸乙酯有机相 (或用分液漏斗)，最后取水相以波长 390 毫微米进行比色。此显色液浓度各为每毫升含有 0、10、20、30、40、50ppm，然后以消光值为纵座标，标准液浓度为横座标，绘制标准曲线。

2. 样品测定

(1) 称取用正己烷脱脂后的样品 0.1~0.4 克 (视赖氨酸含量而定)，放入 10 毫升离心管中，加 5 毫升木瓜酶 B 液，使样品湿润，加塞振荡 3 分钟。

(2) 放入 65℃ 保温箱中转化 1 小时，每隔 20 分钟振荡一次。然后继续于 65℃ 保温箱中转化过夜。

(3) 次日取出冷却至室温，离心。

(4) 取离心后上清液 1 毫升，放入 10 毫升离心管中，加 0.5 毫升碳酸盐缓冲液及 0.5 毫升磷酸铜悬浮液，振荡 5 分钟，离心。

(5) 取离心后上清液 1 毫升放入 10 毫升比色管中，加 0.1 毫升 2·氯 3.5 二硝基吡啶，充分振荡，室温下放置 2 小时，每 30 分钟振荡一次。

(6) 加 5 毫升 1.2N 盐酸充分振荡进行酸化，以下步骤同标准曲线，比色后从曲线上查得赖氨酸 ppm 数，减去空白，然后计算出样品中赖氨酸之含量。

赖氨酸占全籽粒%  
=
$$\frac{\text{ppm} \times 0.000001 \times 100}{0.1 \times \frac{1}{5} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{5}}$$
  
= ppm × 0.05  
ppm—曲线上查得赖氨酸微克数  
若计算赖氨酸占蛋白质百分率，将赖氨酸含量被蛋白质百分率除。

注释：  
1. 此法对缓冲液的 pH 值要求很严格，

尤其是碳酸盐缓冲液 pH 易变化, 最好一次配制足量, 但又不宜放置较长时间。

2. 样品用木瓜酶保温水解时, 要防止样品颗粒粘附管壁, 造成酶解不完全影响测定结果(木瓜酶现用现配, 过滤后呈透明液方可用)。

3. 2·氯 3·5 二硝基吡啶显色液, 一般配 10 毫升可分析 50 个样品, 一次不要配制过多, 以免造成浪费。

4. 磷酸铜悬浮液现用现配。配好后于冰

箱中保存, 最多可用一周。

### 结果讨论

#### 一、显色后稳定时间和显色温度试验

##### 1. 显色后稳定时间

我们将 L-赖氨酸单盐酸盐制成标准液, 取每毫升含 10、20、30、40、50ppm 的特测液进行显色, 显色后放置不同时间, 然后进行消光值的测定, 其结果见表 1 及图 1。

表 1 和图 1 说明, 不同浓度的标准液,

表 1 显色后稳定时间与消光值间的关系									
溶液浓度	时间		消光值						
	5 分	10 分	20 分	40 分	60 分	120 分	180 分	24 小时	
10 微克/毫升	0.081	0.087	0.092	0.092	0.092	0.092	0.092	0.092	
20 微克/毫升	0.168	0.172	0.175	0.175	0.175	0.172	0.175	0.172	
30 微克/毫升	0.226	0.226	0.230	0.230	0.232	0.232	0.230	0.230	
40 微克/毫升	0.310	0.318	0.318	0.336	0.336	0.336	0.318	0.318	
50 微克/毫升	0.398	0.408	0.408	0.410	0.419	0.410	0.408	0.408	

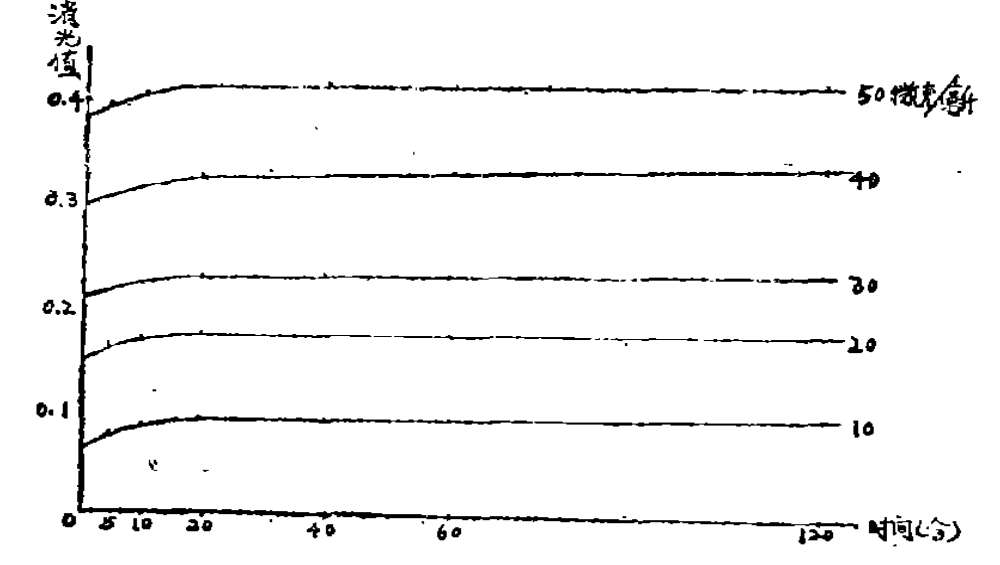


图 1 不同浓度溶液显色后放置时间与消光值的变化曲线

显色后放置不同时间测其消光值, 显色后 20 分钟即达稳定, 消光值在 24 小时内无变化。

##### 2. 显色温度

为验证该法显色时的最佳温度变化范围, 我们用标准氨基酸溶液及北玉 5 号玉米样品, 作了室温 20℃、10℃以下及保温 40℃ 30 分钟的显色对比试验见表 2。

以上试验说明, 常温 20℃下显色两小时和 40℃30 分钟显色, 赖氨酸测定结果基本一

表 2 不同显色温度对测定结果的影响

样品溶液 (微克/毫升)	测定结果		消光值		赖氨酸 %	
	温度		20℃	40℃	20℃	10℃以下
标准赖氨酸溶液 0			0.065	0.065	—	—
标准赖氨酸溶液 10			0.180	0.180	100	—
标准赖氨酸溶液 20			0.318	0.318	100	—
标准赖氨酸溶液 30			0.430	0.430	100	—
标准赖氨酸溶液 40			0.555	0.555	100	—
标准赖氨酸溶液 50			0.710	0.710	96	—
玉米北玉 5 号			0.187	0.180	0.28	0.24
玉米北玉 5 号			0.187	0.187	0.30	0.25
玉米北玉 5 号			0.187	0.187	0.30	0.25
玉米北玉 5 号			0.187	0.178	0.30	0.23
玉米北玉 5 号			0.190	0.190	0.32	0.25

致。如果进行少量样品分析也可采取保温

40℃30 分钟显色，室温低于 10℃结果偏低。四个不同含赖氨酸量的样品，5 次重复，测其消光值，结果见表 3 及图 3。

二、标准曲线有效范围试验

取显色后分别含 0、10、20、30、40、50、60ppm 的标准液，测消光值结果为：0.041、0.097、0.175、0.260、0.355、0.430、0.419，以此绘制标准曲线见图 2，看出曲线的有效范围为 10~50 微克。并取 农大 139 冬麦样品100、200、300、400 毫克，人为的制成

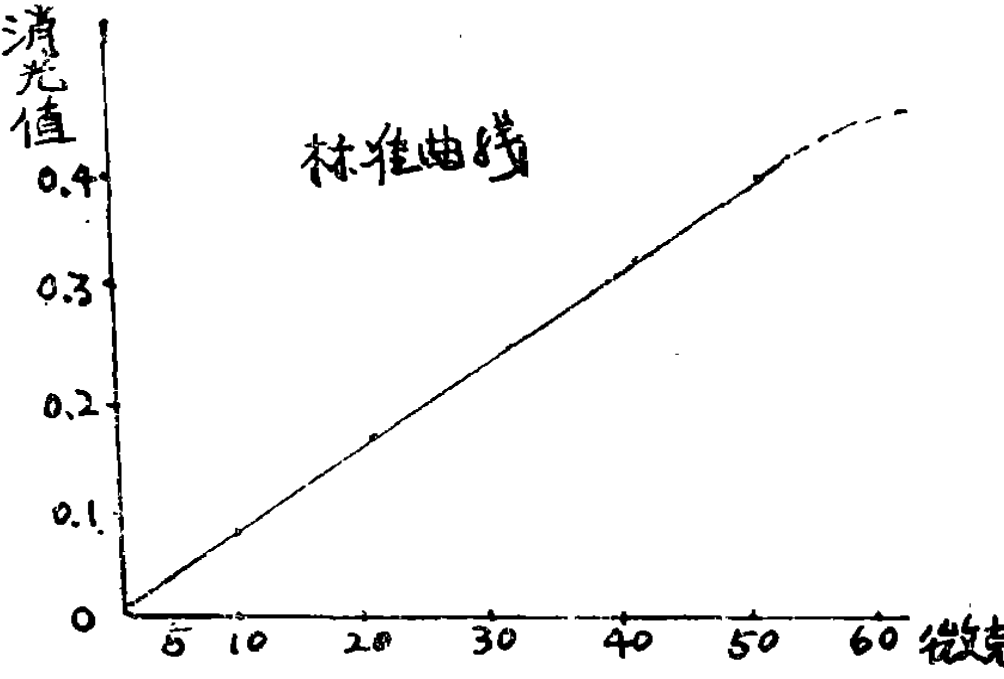


图2 赖氨酸含量与消光值间的相关性

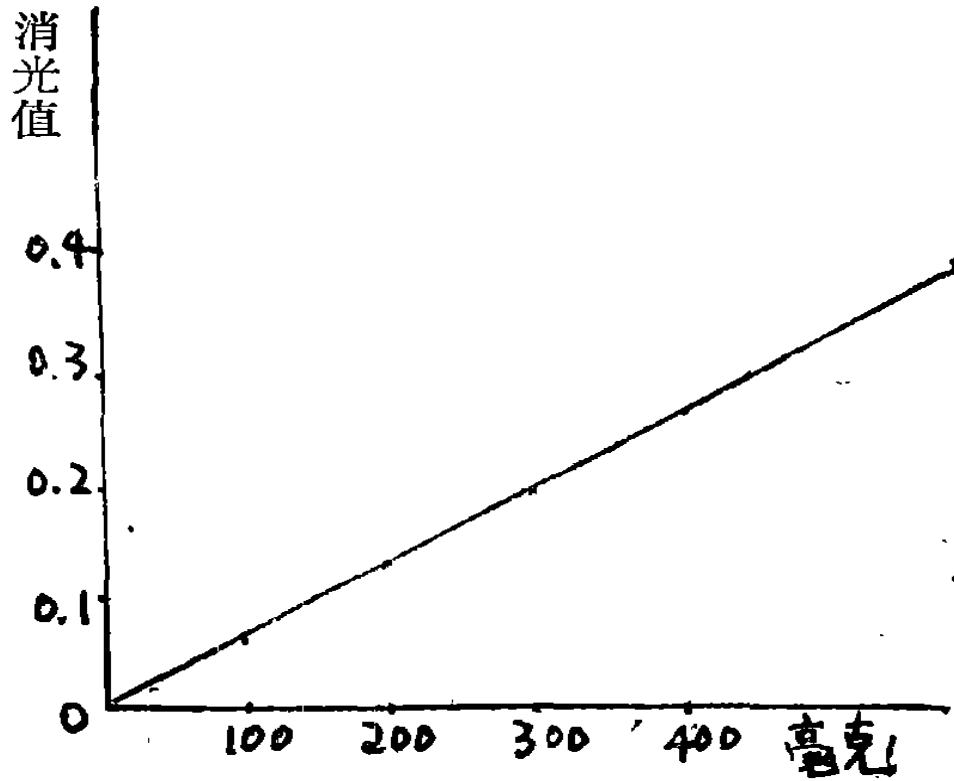


图 3 冬麦农大 139 不同称样量对吡啶法的回收量

从图 2 可以看出，在 10~50ppm 不同浓度赖氨酸标准液间与消光值形成一条良好的线性关系，即标准曲线有效范围 50ppm 以上其消光值趋于下降。而图 3、表 3 说明冬麦

表 3 冬麦农大 139 样品不同称样量对该吡啶法的准确度

处 理	含 量	吡 啶 法 测 赖 氨 酸 %					平 均	标 准 差
	重 复 次 数	1	2	3	4	5		
0.1 克样品液	5	0.39	0.38	0.39	0.37	0.38	0.38	± 0.0077
0.2 克样品液	5	0.40	0.39	0.40	0.40	0.41	0.40	± 0.0020
0.3 克样品液	5	0.39	0.40	0.39	0.39	0.39	0.39	± 0.0000
0.4 克样品液	5	0.39	0.39	0.40	0.39	0.39	0.39	± 0.0000

表 4 赖氨酸及玉米中单 2 号添加赖氨酸的回收率

赖氨酸加入量	含 量	测 得 赖 氨 酸 总 量 (微 克)					平 均	回 收 率
	重 复 次 数	1	2	3	4	5		
纯赖氨酸 20 毫克	5	19.99	19.99	20.02	19.99	20.01	20.00	100
玉米中单 2 号加赖氨酸 10 微克	5	20.80	20.80	21.05	20.80	20.70	20.83	91.90
玉米中单 2 号加赖氨酸 20 微克	5	30.30	29.50	30.00	30.00	29.20	29.74	90.50
玉米中单 2 号加赖氨酸 30 微克	5	40.00	37.00	39.80	39.60	39.00	39.48	92.80
玉米中单 2 号加赖氨酸 40 微克	5	47.40	47.80	48.00	47.40	48.80	48.04	91.00
11 = 4 $\bar{x} = 91.20$ $S_2 = 0.497$								

农大 139 从低到高的不同称样量，仍在曲线有效区间内，所测得的赖氨酸含量均一致。

三、回收率试验

分别取每毫升含20ppm 的 L-赖氨酸 单盐酸盐标准液和已知准确含赖氨酸 11.64 微克的中单 2 号玉米样品，并定量添加赖氨酸 10、20、30、40 微克，进行纯赖氨酸和样品添加量的回收率试验。四个处理，五次重复，测定结果见表 4。

由表 4 试验数据中可见，该吡啶法对标准赖氨酸回收率为 100%，对玉米中单 2 号样品添加赖氨酸回收率为 91.30%。

四、样品脱脂与不脱脂及放置时间试验

1. 样品脱脂与不脱脂对分析结果影响的试验。

我们对五种作物七个不同品种进行了不脱脂和用正己烷、乙醚两种有机溶剂脱脂后试验，测定结果见表 5。

表 5 脱脂与未脱脂对赖氨酸结果的影响

作物品种	赖氨酸%			
	吡啶法	外 理		
		未脱脂	正己烷脱脂	乙醚脱脂
硬粒中作 75 号		0.28	0.30	0.29
冬麦农大 139		0.39	0.40	0.38
O <sub>1</sub> 玉米 58~4548		0.49	0.50	0.51
普通玉米冀 17		0.35	0.37	0.37
高粱晋杂 4 号		0.22	0.23	0.23
大豆吉林八号		2.60	2.95	2.93
大豆黑农 26 号		2.52	2.98	2.95

未脱脂样品，除大豆赖氨酸测定结果偏低以外，对含油低的样品影响甚小。因此，大豆样品必需脱脂后方可测其种子中赖氨酸的含量。

2. 粉碎后样品放置不同时间分析结果的重现性试验。

从表 6 看出粉碎后谷物样品置于磨口玻璃瓶中放置两个月对分析结果无影响。

五、分析方法准确度相关性的试验

为了进一步验证该吡啶法的准确程度，

表 6 样品放置不同时间对赖氨酸含量的影响

测定时间	吡啶法	
	作物种类	赖 氨 酸%
1981 年 4 月 25 日	普通玉米冀17	0.36
1981 年 5 月 7 日		0.37
1981 年 5 月 17 日		0.37
1981 年 5 月 21 日		0.37
1981 年 6 月 14 日		0.38
1981 年 6 月 20 日		0.37
平 均 值		0.37

$\bar{x} \pm 0.0020$   $\bar{x} \pm 0.0089$

表 7 谷物种子赖氨酸标准样品分析结果比较表

样 品 名 称		赖 氨 酸 %	
		吡 啶 法	855 分析仪
粮	二白矮	0.34	0.34
	桂白二号	0.34	0.37
	珍珠矮 11 号	0.40	0.40
稻	广陆矮 4 号	0.44	0.42
	中作 14 号	0.39	0.37
	中作 75 号	0.29	0.30
梗	中丹 8 号	0.32	0.36
	7931	0.32	0.33
	7853	0.40	0.37
稻	7120	0.40	0.40
	IR837	0.40	0.38

冬	农大 139	0.39	0.38
	5036	0.51	0.50
麦	北 18	0.38	0.39
麦	中 7725	0.48	0.48
麦	中 7901	0.42	0.43
大	矮秆齐	0.54	0.55
麦	80-B23	0.54	0.55

表 7			
小 黑 麦	PH17	0.48	0.47
	OH82	0.45	0.48
	PH124	0.44	0.45

O <sub>2</sub> 玉 米	5845-48	0.50	0.50
	5813-51815	0.52	0.50
	5801-03	0.54	0.53
普 通 玉 米	中单 4 号	0.40	0.38
	冀 17	0.37	0.34
	京早 7 号	0.33	0.30

高 粱	京农 2 号	0.25	0.25
	吕农 2 号	0.25	0.25
	晋杂 4 号	0.24	0.23
粟	晋杂 5 号	0.22	0.22

大 豆	吉林三号	3.00	3.00
	吉林八号	3.10	2.95
	黑农 26 号	3.05	2.95

注：分析结果为种子中烘干样百分食量

我们用该法与日立产 835-30 型氨基酸分析仪分别对 34 个谷物样品进行测定,其结果见表 7。

表 7 可见,吡啶法与氨基酸分析仪测定结果相比较,结果基本一致。将其进行相关性测定,相关系数l为 0.99,其回 归 方 程 为  $y=0.6299+0.0001x$ 。详见图 4；

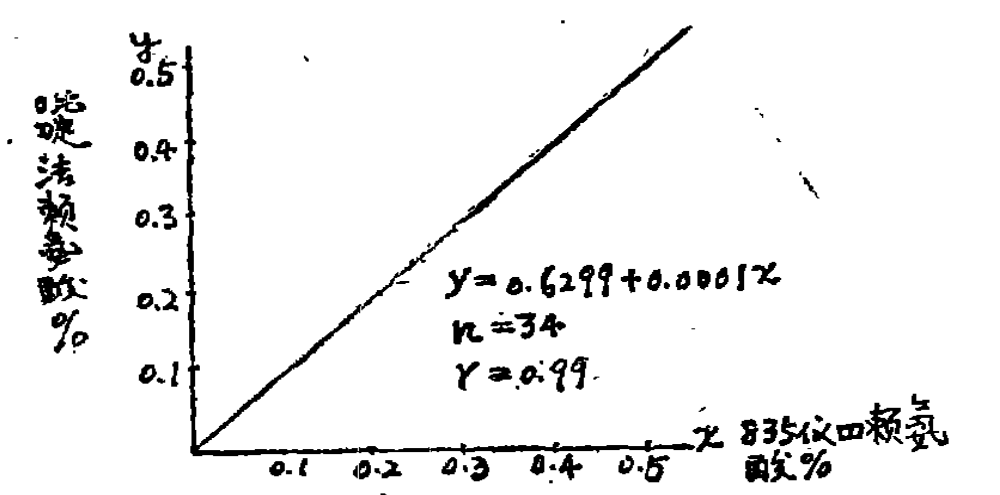


图 4 吡啶法与835仪器分析法的线性关系

#### 主要参考文献

- 〔1〕 译自苏联“Сельскохозяйственная радиохимия” 1972 年, 8 期。
- 〔2〕 《蛋白质化学研究技术》潘家秀等编著, 科学出版社 1962 年。
- 〔3〕 《国外农业科技资料》中国农林科学院, 科技情报研究所, 1974 年, 4 期。

## 三唑酮拌种防治玉米丝黑穗病应用技术※

刘绍禄 林佩力 马书君 何林 朱传德 崔万里

(黑龙江省农业科学院植保所)

黄桂潮 卢管仲

(黑龙江省农业科学院合江所)

玉米丝黑穗病是我省玉米的主要病害,发生面积广,危害严重。据 1979 年全省 21 个县(市)场 54 个点调查,平均发病率为 6.6%, 1980 年 10 个县(市) 27 个点调查,平均发病率为 7.5%, 1981 年 11 个(市)县 场 21 个点调查,平均发病率为 5.8%, 每年

损失粮食约 6~8 亿斤,是生产上急待解决的问题。

※ 参加本项试验示范的单位有:呼兰、庆安、乾利、五常、穆棱、肇东、肇州、泰来、富裕县农研所,呼兰、穆南县农技站、牡丹江、佳木斯农校、八五〇农场、八一农大等