

脉冲核磁共振仪(Pulsed NMR)对 作物种子含油量的快速测定

宋同明
(北京农业大学)

提 要

运用三种不同方法来验证脉冲NMR(Minispec PC 20)对作物种子含油量测定的准确性。样品油分的变动范围为3%至55%。三个试验中理论含油量与脉冲NMR实测含油量十分接近,相关系数都在0.997以上;对相同材料进行连续35天的7次测定,显示了仪器读数的稳定性;在取数延迟时间为3500微秒时,自然干燥、浸水8小时和在60℃烘箱中充分烤干的种子,测得的油分含量差异不显著,说明在一般情况下,种子水分含量对油分测定无明显干扰作用。

关键词 脉冲核磁共振, 含油量, 玉米种子

在油用玉米与各种油料作物的育种中,存在的一个重要问题是对含油量缺乏快速准确的分析手段。常规的化学分析法不仅费事耗时,而且对种子是破坏性的。60年代中期,连续波核磁共振仪(Wide-Line NMR)开始应用于玉米、大豆等作物单粒种子含油量的测定^[1,3,4,5,6]。由于它测定的快速性和准确性,特别是不伤害种子的生活力,因而成为油料作物育种的有力工具。在玉米中,依靠连续波NMR分析手段而进行的单粒种子表型轮回选择法比常规法选择,效率提高了1.25倍^[2]。脉冲NMR与连续波NMR相比,在理论设计上更有更多的优点。测定的速度更快,准确性更高,而且种子在磁场中的置放角度和水分含量对含油量测定的干扰更小^[7]。

本试验的目的在于探讨脉冲NMR在提高玉米和油料作物含油量育种中的应用价值。重点在验证仪器测定结果的准确性和稳定性以及种子中水分含量不同对含油量测定的干扰程度。

材 料 和 方 法

本试验所使用的脉冲NMR为联邦德国BRUKER公司生产的Minispec PC 20(20MHZ)。射频场测试管最大直径为13毫米。

首先把玉米油、芝麻油、花生油、菜籽油和向日葵油在21℃室温下分别做出标准曲线。方法是在不同的测试管中分别滴加(χ)10、20、30、40、50和100毫克的油分,这相当于重量为250毫克的玉米籽粒,含油量为4%、8%、12%、16%、20%、和40%的油分绝对量。运用制作标准曲线程序,把试管依次插入测试孔射频场,NMR测得每个样本的射频信号(Y),并自动进行直线回归($Y=b+a\chi$)分析,计算出截距值(b)和回归系数值(a)。把各个标准曲线贮存在仪器的存贮器中。未知样品测定时,只需输入样品重量,把盛样品试管插入测试

本稿于1987年3月收到,1988年12月12日终审完毕。

孔, 仪器就根据样品的射频信号和标准曲线自动计算并显示出样品含油量百分数。

为了对 NMR 测定含油量的准确性作出评价, 我们在三个不同试验中以三种方法制备一系列已知含油量的样品。第一种方法是把一定量的玉米油溶于 4 氯化碳(CCl_4), 制成含油量为 7% 至 45% 一套溶液; 第二种方法是把玉米油加入脱脂玉米粉, 制成一套已知含油量的固体样品; 第三种办法是把整粒的玉米、大豆、向日葵和花生等种子在 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 烘箱中烘干, 再用 NMR 测定它们的含油量, 之后把这些材料放入盛有乙醚的试管中浸泡 25 天, 并多次更换乙醚, 直至种子恒重为止。种子浸泡前后重量之差即为种子中油分的重量。NMR 读数的准确性可从实测数值与上述已知含油量的液体、固体与整粒种子相应数值的比较中加以判断。

通过对一组不同含油量的玉米、大豆、花生和向日葵种子 35 天之内 7 次重复测验结果的比较中来验证 NMR 读数的可靠性与稳定性。

把一组自然干燥的玉米种子先行 NMR 油分测定, 之后, 放入水中浸泡 8 小时, 种子水分含量平均提高 10.2%, 再用 NMR 测含油量, 接着把种子放入 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 烘箱, 烘烤 96 小时, 蒸发掉大部分自由水, 再测含油量。由此可以观察到种子中自由水含量的不同对 NMR 读数的影响。

结果和讨论

表 1 是溶解于 CCl_4 中玉米油的理论含油量与利用玉米、芝麻等 5 种植物油制做的标准曲线 NMR 实测结果。由于标准样品是由 CCl_4 加玉米油制备的, 从理论上讲, 以玉米油标准

表 1 溶解于 CCl_4 玉米油的实际含油量与脉冲 NMR 测定值的比较

Table 1 The comparison between calculated corn oil content soved in CCl_4 and pulsed NMR readout

样品号 Sample No.	CCl_4 重 CCl_4 weight (mg)	加入玉米 油重 Weight of added corn oil (mg)	油分含量(%) Oil content					
			计算值 Calc.	脉冲 NMR 测定值 Readout by pulsed NMR				
				玉米油* Corn oil	芝麻油* Sesame oil	葵花油* Sunflower oil	菜子油* Rape oil	花生油* Peanut oil
1	97	7.5	7.17	8.39	4.82	6.77	6.07	7.60
2	103	14	11.97	12.32	9.52	11.17	10.87	11.39
3	106	23	17.83	18.04	14.87	17.38	16.97	18.65
4	86	31	26.50	27.51	24.69	28.68	26.39	27.02
5	86	40	31.75	33.81	30.09	34.37	32.07	33.52
6	95	49	34.27	37.51	35.15	38.18	36.02	36.85
7	106	57	34.97	39.45	35.83	40.65	37.84	39.13
8	68	57	45.60	48.30	44.52	50.77	47.68	49.71
平均 mean			26.26	28.17	24.94	28.50	26.74	27.98

* 所依据的标准曲线
Based standard curve

曲线进行测试最合适。而实际上,所使用的5种标准曲线测得的结果与样品的实际含油量都不完全相符。芝麻油曲线测得结果偏低,葵花、菜子和花生油曲线测得结果不够稳定,样品含油量低时测得结果偏低或接近;样品含油量高时,测定结果都偏高。玉米油曲线测得结果普遍偏高,但测定结果和实际含油量之间存在着高度的一致性,相关系数达0.997以上(图1)。

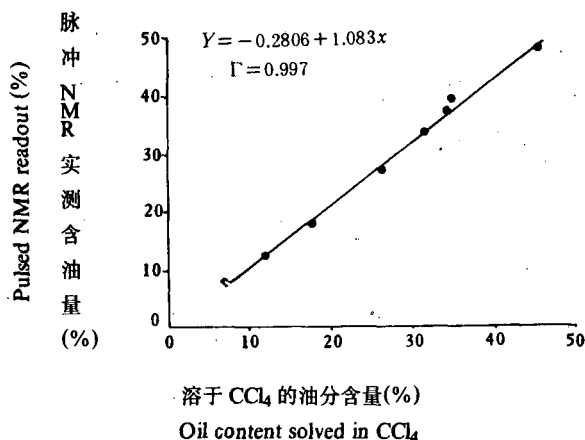


图1 溶于 CCl_4 玉米油的计算含油量与NMR实测含油量之间的关系

Fig.1 Relationship of corn oil content solved in CCl_4 and pulsed NMR readout

表2 脱脂玉米粉+玉米油的不同含油量样品与NMR测定值的比较

Table 2 The comparison between calculated corn oil content from defatted corn meal+corn oil and pulsed NMR readout

样品号 Sample No.	脱脂玉米粉重 Defatted cornmeal weight (mg)	加入玉米油重 Weight of added corn oil (mg)	油分含量(%) Oil content					
			计算值 Calc.	脉冲NMR测定值 Readout by pulsed NMR				
				玉米油* Corn oil	芝麻油* Sesame oil	葵花油* Sunflower oil	菜子油* Rape oil	花生油* Peanut oil
1	104	7	6.73	7.55	5.56	7.20	5.33	7.80
2	88	15	14.56	14.29	11.50	13.50	11.32	13.50
3	110	23	17.29	16.94	13.41	15.55	15.01	16.30
4	96	31	24.41	25.33	21.98	25.08	24.35	24.78
5	98	37	27.41	28.81	26.25	29.17	27.80	27.32
6	97	45	32.04	33.15	31.07	34.38	32.87	32.53
7	104	54	34.18	36.45	34.22	37.49	35.00	35.57
8	65	55	45.83	46.89	44.85	49.00	45.96	47.07
平均 Mean			25.31	26.15	23.60	26.42	24.71	35.61

* 解释同表1

Explanation is the same as table 1

脱脂玉米粉 + 玉米油得到各种含油量样品与使用 5 种不同油分标准曲线的 NMR 测得数据列于表 2。总趋势与表 1 相同, 芝麻油曲线所测结果偏低, 但其它曲线测验值与理论含油量更加接近。例如, 运用玉米油曲线, 在表 1 中测验值与“理论值”相差 2.01, 即 7.6%, 但在表 2, 差数只有 0.84, 即 3.3%。玉米油曲线测验值与“理论”计算值之间的相关系数达 0.999(图 2)。其余 4 条曲线测验值与计算值之间的 r 值也都在 0.994 以上。

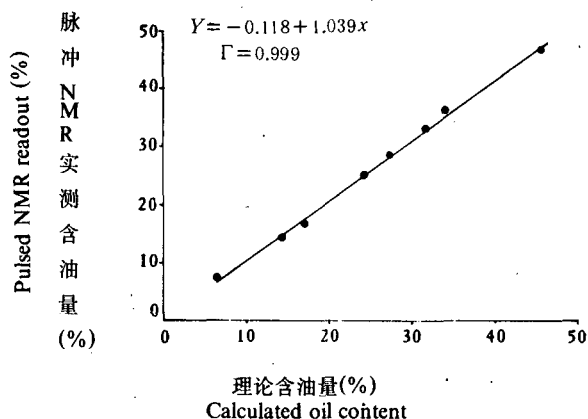


图 2 脱脂玉米粉 + 玉米油得到的理论含油量与脉冲 NMR 实测含油量之间的关系

Fig.2 Relationship of calculated corn oil content from defatted corn meal+corn oil and pulsed NMR readout

表 3 整粒玉米、大豆等作物种子运用化学法测定含油量与脉冲 NMR 测定含油量比较

Table 3 The comparison between oil content determined by chemical analysis and by pulsed NMR of whole kernel of corn, soybean etc.

测试材料 Material	样品 粒数 Sample kernel No.	样品重 Sample weight (mg)	浸出油重 Extracted oil weight (mg)	油分含量(%) Oil content						
				计算值 Calc.	脉冲 NMR 测定值 Readout by pulsed NMR					
					玉米油* Corn oil	芝麻油* Sesame oil	向日葵油* Sunflower oil	菜子油* Rape oil	花生油* Peanut oil	
玉米 corn	坚籽综合种 Rsssc	3	719	29	4.03	3.52	3.24	2.96	2.94	3.37
	辽育 5 号 Liaoyu No.5	3	998	34	3.41	3.66	3.39	3.64	3.41	3.49
	高油 1 号 High oil No.1	2	659	62	9.41	10.40	9.77	9.52	9.23	10.44
	亚里山索 Alexho	2	438	58	13.24	12.97	11.93	12.97	11.75	13.17
	伊利诺高油 IHO	2	309	53	17.15	17.30	16.33	18.06	17.66	16.72
大豆 Soybean	2	314	68	21.66	21.95	20.45	22.59	21.33	21.82	
向日葵 Sunflower	2	132	73	55.30	55.00	52.55	57.21	53.47	52.84	
平均 Mean				17.74	17.83	16.81	18.14	17.11	17.41	

* 解释同表 1

Explanation is the same as table 1

表3是用乙醚萃取法测得各作物种子整粒含油量与利用5种油分曲线实测结果的比较。不难看出,与前两个试验相比,其测定准确度是最高的。但仍以芝麻油曲线测得结果偏差较大(达5.2%),其余4条曲线测定值与油分理论含量十分接近,玉米油曲线测定值与理论值的差异只有0.5%,二者之间的相关系数为0.9996(图3)。

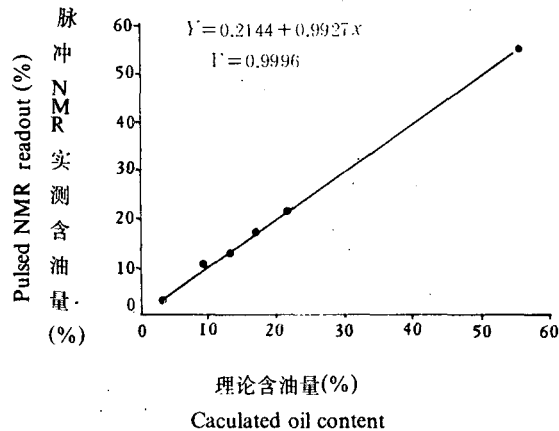


图3 化学分析法实测整粒种子含油量与脉冲NMR实测含油量之间的关系

Fig.3 Relationship of oil content in whole seeds determined by chemical analysis and pulsed NMR readout

上述3个试验点的趋势相同,以第三试验准确性最高。如果试验三代育种工作中大量进行的单粒种子油分含量的日常测定,那么脉冲NMR确能正确反映样品相对油分含量水平。

虽然以5种不同植物油分制作的标准曲线进行测定,所得结果趋势大致相同,但从表1和表2结果来看,由于所有样品都是以玉米油配制的,故都以玉米油曲线测得的结果最好。这表明,不同植物油分之间还存在着一定的结构、成分或氢质子浓度的差别。故在实际工作中,测定某一作物油分含量时,最好使用同一作物的油分曲线。

表4所列是同一批玉米、大豆、花生和向日葵样品连续35天脉冲NMR对含油量的测定结果。可以看出,不同测定时间,数据有一定程度的波动。这种波动可能是由室内温度、湿度、机器本身的状态等各种因素综合作用的结果,尤其室内温度的变化影响最大(机器的工作温度是15℃至25℃)。但也不难看出,外界环境影响的方向是一致的。要低,全部样品测定值都偏低(如11月3日结果),反之亦然(如12月9日结果)。从总体上看,测定结果的重现性是比较好的,变异系数大都在5%以内。但为了更准确地反映样品油分含量的相对水平,最好保持室内相对稳定的环境条件,或者在尽可能短的时间内完成同一批样品的测定工作。

种子水分含量对连续波NMR测定结果的干扰作用是明显的^[1]。对于脉冲NMR,取数时间为900微秒时,在60℃烘箱中烘干和在室温下干燥的向日葵、花生和油菜种子都曾得到相同的油分测定结果^[7,8],我们把取数时间延长至3500微秒,并对自然干燥、水浸泡8小时和在60℃烘箱中烘干96小时的玉米种子进行了油分测定(表5)。平均而言,与自然干燥的种子相比,水浸8小时使水分含量增加10.2%(30.9毫克),测得每粒种子油分增加1.5毫克,相对含油量降低0.5%;60℃烘干96小时的种子,水分减少4%(11.5毫克),每粒种子油分减少0.4毫克,相对含油量增加0.3%。t测验表明,三种处理之间油分含量的差异均

表4 相同样品脉冲NMR在不同时间测定结果的比较

Table 4 The comparison of pulsed NMR readout with same samples over different periods of time

测试材料 Material		测定时间 Date of determining								变异 系数
		11月27日	11月28日	11月30日	12月2日	12月4日	12月9日	12月31日	平均	
		←————— 油分 oil % —————→								
玉 米	坚秆综合种 Rsssc	2.81	2.98	3.01	3.21	3.13	3.31	3.18	3.09±.17	5.4
	辽育5号 Liaoyu No.5	3.01	3.45	3.28	3.40	3.15	3.56	3.19	3.29±.19	5.8
Corn	高油1号 High oil No.1	8.48	8.46	8.25	8.67	8.25	8.88	8.24	8.46±.24	2.9
	亚里山索 Alexho	12.45	11.56	10.74	13.45	12.33	12.46	10.96	12.00±.95	7.9
	伊利诺高油 IHO	14.08	14.46	13.66	14.37	13.72	14.59	14.09	14.14±.36	2.5
	大豆 Soybean	18.16	19.01	18.00	18.82	18.66	19.55	18.50	18.67±.52	2.8
花生 Peanut	48.86	49.29	47.98	48.59	50.78	49.16	48.63	49.04±.88	1.8	
向日葵 Sunflower	55.98	56.69	55.09	56.17	56.98	58.19	55.49	56.37±1.03	1.8	
平均 Mean	20.48	20.74	20.00	20.84	20.87	21.21	20.29	20.63±.40	1.7	

表5 脉冲NMR对不同含水状况玉米种子的测定结果

Table 5 Oil content of corn seeds in different water status determined by pulsed NMR

玉米品种 Corn varieties	处理 Treatment								
	自然干燥 Room dried			水浸8小时 8 hrs. water soaked			60℃烘干96小时 96hrs. dried in 60℃		
	种子重 Seed weight (mg)	油分 Absolute (mg)	油分 oil %	种子重 Seed weight (mg)	油分 Absolute (mg)	油分 oil %	种子重 Seed weight (mg)	油分 Absolute (mg)	油分 oil %
中单2号 Zhongdan No.2	247.0	13.2	4.8	298.4	15.3	5.3	263.8	13.8	5.2
辽育5号 Liaoyu No.5	338.8	15.1	4.5	368.5	16.0	4.4	325.8	14.5	4.5
高油1号 High oil No.1	334.0	30.8	9.2	370.2	36.9	10.0	322.8	33.1	10.3
亚里山索 Alexho syn.	283.2	43.0	15.2	315.8	41.9	13.3	271.8	41.4	15.2
Alexho IHO	295.4	33.9	11.5	320.5	31.5	9.8	278.3	31.4	11.3
平均 Mean	305.1	27.2	9.0	336.0	28.7	8.5	293.6	26.8	9.3

* 三种处理使用的种子相同

所有测验数值均为5粒种子所得资料的平均数

不显著。可见,在取数时间为3500微秒时,用自然干燥的种子,甚至不完全干燥的种子直接由脉冲NMR测油也能得到相当准确的结果,而不需要像连续波NMR那样,必须在60℃温度下烘干⁽¹⁾,从而进一步节省了时间,并简化了油分测定程序。

总之,使用脉冲NMR进行种子含油量测定,具有快速(半分钟可测一个样品)、准确、安全、卫生、不需要磨碎和烘干处理程序以及不伤害种子生活力等许多优点,是高油玉米和油料作物育种的得力工具。

参 考 文 献

- [1] Alexander, D. E., L. S. Silvela, F. I. Collins, and R. C. Rodgers, 1967, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 44, 555 — 558.
- [2] Alexander, D. E., *The Use of Wide-Line NMR in Breeding High Oil Corn*, To be published.
- [3] Collins, F. I., D. E. Alexander, R. C. Rodgers and L. S. Silvela, 1967, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 44, 708 — 710.
- [4] Conway, T. F., G. M. Moffett, and F. R. Earle, 1963, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 40, 265 — 268.
- [5] Jones, S. A. 1980, *Direct Determination of the Oil Content of Sunflower Seeds Which Contain Small Quantities of Water*. Minispec Application Note 17.
- [6] Madsen, E., 1976, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 53, 467 — 469.
- [7] Tiwari, P. N., P. N. Gambhir, and T. S. Rajan, 1974, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 51, 104 — 109.
- [8] Tiwari, P. N., 1980, *Pulsed NMR for Rapid and Nondestructive Determination of Oil in Oils Seeds*. Minispec Application Note 9.

Rapid Determination of Oil Content of Crop Seeds by Pulsed NMR

Song Tongming

(Beijing Agricultural University)

Abstract

Three experiments designed to assess the accuracy of pulsed nuclear magnetic spectroscopy (minispec PC20) have been carried out. Samples with known oil content from 3% to 55%, made by mixing corn oil with lipid-free corn meal, by mixing corn oil with carbon tetrachloride, and by gravimetric analyses were determined by pulsed NMR. High correlation between NMR readouts and calculated oil content were found ($r > 0.997$). Seven repeated determinations of the same set of samples during 35 days indicated the stability of NMR measurements. When delay time = 3500 μ seconds, the total oil content of corn seeds measured by pulsed NMR for room dried, presoaked for 8 hours, and 60℃ over dried for 96 hours was about the same, indicating that seed moisture condition had no significant interference in oil determination.

Key words Pulsed NMR, Oil content, Corn seeds