

反相—高效液相色谱分析有机液肥中腐胺、亚精胺、精胺含量

何文远^{1,2}, 杨海真², 顾国维²

(1. 上海环境集团有限公司, 上海 200336;

2. 同济大学水污染控制与资源化国家重点实验室, 上海 200092)

摘要: 建立了一种高效液相色谱法分离测定 3 种生物胺 (腐胺、精胺、亚精胺) 的方法。采用 Agilent 色谱柱 C₁₈ 反相色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 粒径 5 μm), 以乙腈 - 水为流动相梯度洗脱, 丹磺酰氯作为荧光衍生试剂柱前衍生化。最佳测定条件为: 丹磺酰氯浓度为 3 mg/L, 衍生化反应温度为 60 °C, 衍生化时间为 15 min, 缓冲溶液 pH 为 9.78。并将该方法成功应用于畜禽粪便制作有机液肥过程中腐胺、精胺、亚精胺的定性、定量分析。

关键词: 高效液相色谱; 有机液肥; 生物胺

中图分类号: S145.2; S14 - 13

文献标识码: B

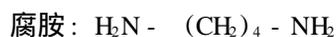
文章编号: 1673 - 6257 (2008) 03 - 0083 - 04

在治理畜禽业污染时, 往往将畜禽粪便当作废物来处理, 处理尾水达标排放, 畜禽养殖场畜禽粪便没有实现由“废”变“宝”。利用畜禽粪便制作有机液体肥料, 解决畜禽粪便污染的同时, 扭转了肥料施用化肥的主导地位, 提高了土壤的长效肥力, 有利于发展有机农业, 对于建立和恢复农业生态系统的生物多样性和良性循环, 维持农业的可持续发展有着重要意义。

腐植酸来源于动植物残体腐植化反应 (humification) 或者说来源于微生物的生物活动。腐植酸, 包含胡敏酸 (HA) 和富里酸 (FA), 富里酸也被称为黄腐酸。许多研究和综述评论文章报道了腐植酸 (包括黄腐酸 FA 和胡敏酸 HA) 对植物生长的促进作用以及对植物生理的影响^[1-4], Vaughan (1986) 利用¹⁴C 标记胡敏酸 HA 和黄腐酸 FA 验证了豌豆根组织吸收腐植酸的事实^[2]; 也有腐植酸应用于畜牧业的报道, 土耳其安卡拉大学 Seher Kucukersan 教授研究发现腐植酸有助于畜禽的生长和健康^[5], 但是其机理并不明确。Bottomley 早在 20 世纪初就发现腐植酸对植物的影响与生长激素对植物的影响类似^[6], Cacco 和 Dellagnola^[7] 等人的研究也认为腐植酸表现出的类植物激素活性, 但是, 他们认为腐植酸的活性没有植物激素活性那么强, 所以不能将腐植酸归类为植物生长激素。然而, 腐植酸是复杂的

混合物, 其表现出的生物活性是否因为腐植酸含有植物激素, 一直处于争论之中。有学者利用 GC - MS (气相色谱 - 质谱联用) 直接确定腐植酸内是否含有植物激素 (生长激素 IAA, 赤霉素, 细胞分裂素, 脱落酸), 却发现腐植酸中植物激素并不存在^[4], 因此, 腐植酸表现出的类激素活性受到质疑。C. C. Yong^[8] 发现腐植酸中存在多胺, 可能是导致腐植酸活性的原因。具有生物活性的脂肪胺 (aliphatic amines) 类化合物: 如腐胺 (putrescine)、亚精胺 (spermidine)、精胺 (permine) 会在诸如蛋白质、氨基酸等含氮有机物降解过程中产生^[9]。畜禽粪便制作有机液肥的过程就是有机物降解的过程, 畜禽粪便中含有大量含氮有机物, 这些含氮有机物降解过程可能会产生具有生物活性的多胺。本文对畜禽粪便制作有机液肥过程中生物胺进行了定性和定量分析, 有助于解释有机液肥活性的机理, 可能有机液肥表现出与腐植酸类似的活性就是因为多胺存在的缘故; 同时, 这对于有机液肥制作的质量控制和生产工艺提供了一种测定方法。

生物胺是一类具有强烈生理活性的低分子量含氮碱。它们不仅调节植物的生长、发育, 还参与植物的胁迫反应。最常见的生物胺是腐胺、亚精胺、精胺, 普遍存在于植物组织中, 对于植物生长调节具有重要作用^[10, 11]。近年来, 文献报道了许多用高效液相色谱法作为测定手段研究水果中腐胺、亚精胺、精胺^[12, 13]。腐胺、亚精胺、精胺的分子结构如下所示:



收稿日期: 2007 - 06 - 08

作者简介: 何文远 (1979 -), 男, 博士研究生在读, 研究方向为农业环境保护。

亚精胺: $\text{H}_2\text{N} - (\text{CH}_2)_4 - \text{NH} - (\text{CH}_2)_3 - \text{NH}_2$

精胺: $\text{H}_2\text{N} - (\text{CH}_2)_3 - \text{NH} - (\text{CH}_2)_4 - \text{NH} - (\text{CH}_2)_3 - \text{NH}_2$

1 材料与方

1.1 仪器与试剂

Varian 高效液相色谱仪, 包括 230 型泵系统, 荧光检测器和 Prostar 数据工作站。色谱柱 Agilent C_{18} 反相色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 粒径 5 μm)。腐胺、精胺、亚精胺、丹磺酰氯为 Sigma 产品 (ultra pure), 内标己二胺为 AR 级, 碳酸氢钠、碳酸钠 (分析纯), 所有用水均为高纯水 (18.2 M)。混标储备液的配置: 先分别配腐胺、精胺、亚精胺的 1 mg/mL 浓度的标准溶液, 再从 3 个标准溶液中各取 100 μL 于 10 mL 棕色容量瓶中定容至刻度。配置 1 $\mu\text{g/mL}$ 己二胺溶液作为内标。

1.2 色谱条件

色谱柱: Agilent C_{18} 反相色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 粒径 5 μm)。柱温: 20 $^{\circ}\text{C}$ 。流动相: 乙腈 - 水。流速: 1 mL/min。梯度洗脱程序: 20 min 内乙腈从 65% 上升到 100%, 水从 35% 降到 0%, 洗脱程序一共 25 min, 后面 5 min 100% 乙腈洗色谱柱。每次进样前 65% 乙腈洗脱 5 min 使色谱柱达到再平衡状态。进样量: 20 μL 。荧光检测器波长: $\text{Ex} = 340 \text{ nm}$, $\text{Em} = 515 \text{ nm}$ 。

1.3 衍生化

用微量移液枪先后吸取 1 mL 混标储备液 (或经过 0.45 μm 膜过滤的水样)、500 μL 己二胺 (内标)、5 mL 衍生试剂、1 mL 碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲溶液于 50 mL 塑料离心管中, 混均匀后置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中衍生 15 min。衍生后取出冷却到室温测试。

1.4 腐植酸液肥水样

液体肥料生产工艺中生物发酵 0、5、10、15、20、25、30 d 分别取液体样品, 经过 0.45 μm 膜过滤, 待测。

2 结果与分析

生物胺既没有荧光发色集团也没有紫外发色集团, 但是丹磺酰氯可以同伯胺集上的氢反应, 脱掉一分子的 HCl 生成具有荧光和紫外光的衍生物^[14]。在这一反应过程中起决定作用的条件有 4 个: 衍生剂浓度、缓冲溶液 pH 值、衍生温度和衍生时间。

2.1 衍生剂浓度

为了找到丹磺酰氯的合适浓度以使衍生化反应进行完全, 测定了当丹磺酰氯浓度从 1 ~ 8 mg/L 时对生物胺衍生效果的影响, 每组做了 3 次平行试验, 取 3 次测试平均值。图 1 表示了生物胺衍生物的生成量随衍生试剂浓度的改变而变化的情况。

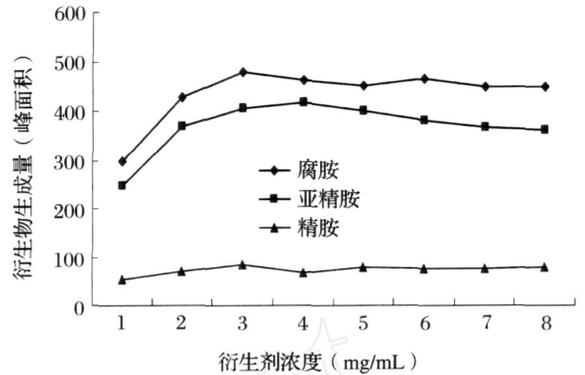


图 1 丹磺酰氯浓度对生物胺衍生物生成量的影响

从图 1 中可以看出, 丹磺酰氯浓度在 3 mg/L 时, 3 种生物胺衍生效果最好。大于 3 mg/L 时衍生物生成量趋于平衡无明显变化。为了节约试剂对于腐胺、精胺、亚精胺 3 种生物胺的测定衍生试剂丹磺酰氯浓度为在 3 mg/L 最合适。

2.2 缓冲溶液的 pH 值

生物胺和衍生剂在碱性环境下才能发生衍生化反应, 选择一个合适 pH 的缓冲溶液很重要。本研究中采用的是碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲溶液。根据试验数据可知 pH=9.78 的缓冲溶液最适合测定要求 (图 2)。

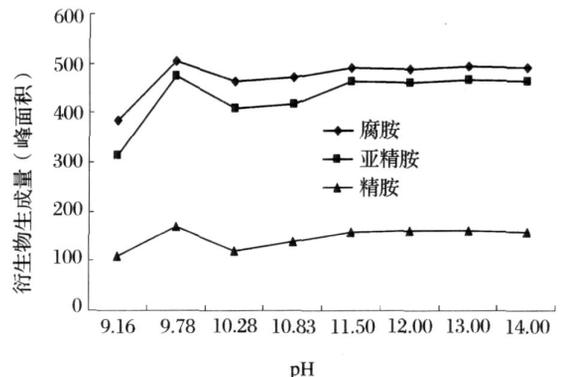


图 2 缓冲溶液 pH 值对生物胺衍生物生成量的影响

2.3 衍生温度与时间

关于生物胺衍生的衍生温度与时间问题, 以前的研究比较成熟, 笔者对前者试验过程进行了验证, 结果是 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min 比较合适, 与董伟峰

的研究结果一致^[14]。50 水浴 30 min 或者 70 水浴 10 min 测试结果差异不大。

2.4 精密度和回收率试验

取混标储备液稀释成腐胺、精胺、亚精胺各 1 μg/mL 的混合溶液, 3 mg/L 丹磺酰氯 60 水浴 15 min 衍生化, 重复测定 6 次, 记录峰面积, 计算方法的精密度, 试验结果见表 1。将 500 ng/mL 的标准品溶液 0.45 μm 膜过滤, 测定其浓度, 计算回收率, 试验结果见表 2。加样回收率试验测定结果见表 3。

表 1 3 种生物胺的精确度

	峰面积测定值	平均值	RSD(%)
腐胺	5340	5272	1.87
	5089		
	5230		
	5334		
	5298		
	5339		
亚精胺	3325	3306	0.45
	3289		
	3292		
	3313		
	3298		
	3319		
精胺	3620	3578	1.08
	3522		
	3602		
	3539		
	3599		
	3587		

表 2 3 种生物胺的回收率测定

	实际测得量(峰面积)	回收率(%)	RSD(%)
腐胺	449.60	89.92	1.16
亚精胺	434.99	87.00	2.54
精胺	441.23	88.25	2.08

表 3 3 种生物胺的加样回收率测定

	样品含量(μg/L)	加入量(μg/L)	实际测得量(μg/L)	回收率(%)	RSD(%)
腐胺	62.423	30	85.645	77.41	2.78
亚精胺	0.057	0.05	0.096	78.00	2.93
精胺	0.041	0.05	0.078	74.00	2.75

2.5 有机液肥制作工艺中生物胺的测定结果

液体肥料生产工艺中生物发酵 0、5、10、15、20、25、30 d 分别取液体样品, 经过 0.45 μm 膜过滤, 然后测试。7 个反应时刻生物胺含量见表 4。

表 4 有机液肥制作过程中生物胺含量

发酵时间(d)	腐胺(μg/L)	亚精胺(μg/L)	精胺(μg/L)
0	4.029	0.001	0.002
5	19.710	0.028	0.004
10	21.927	0.032	0.029
15	27.619	0.031	0.031
20	29.477	0.056	0.033
25	30.196	0.058	0.039
30	63.751	0.059	0.044

3 结论

本文对丹磺酰氯柱前衍生化反相高效液相色谱测定有机液肥制作过程中生物胺的方法进行了研究, 最佳测定条件为: 丹磺酰氯浓度为 3 mg/L, 衍生化反应温度为 60, 衍生化时间为 15 min, 缓冲溶液 pH 为 9.78。用本方法于液肥中腐胺、精胺、亚精胺的定性、定量分析, 回收率较高, 灵敏度高, 此方法为该类产品的质量控制在提供了快速有效的分析手段。

参考文献:

[1] Nardi, S., et al. Chemical and biochemical properties of humic substances isolated from forest soils and plant growth [J]. Soil Science Society of America Journal, 2000, 64 (2): 639 - 645.

[2] Nardi, S., et al. Physiological effects of humic substances on higher plants [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2002, 34 (11): 1527 - 1536.

[3] Chen, Y., et al. Involvement of soluble organic matter in increased plant growth in solarized soils [J]. Biology and Fertility of Soils, 2000, 32 (1): 28 - 34.

[4] Chen, Y., C. E. Clapp, H. Magen. Mechanisms of plant growth stimulation by humic substances: The role of organo-iron complexes [J]. Soil Science and Plant Nutrition, 2004, 50 (7): 1089 - 1095.

[5] Kucukersan, S., et al. The effects of humic acid on egg production and egg traits of laying hen [J]. Veterinarni Medicina, 2005, 50 (9): 406 - 410.

[6] Muscolo, A., S. Cutrupi, S. Nardi. IAA detection in humic substances [J]. Soil Biology & Biochemistry, 1998, 30 (8 - 9): 1199 - 1201.

[7] Cacco, G., G. Dellagnola. Plant - Growth Regulator Activity of Soluble Humic Complexes [J]. Canadian Journal of Soil Science, 1984, 64 (2): 225 - 228.

[8] Young, C. C., L. F. Chen. Polyamines in humic acid and their effect on radical growth of lettuce seedlings. Plant and Soil, 1997, 195 (1): 143 - 149.

[9] Lloret, S. M., C. M. Legua, P. C. Falco. Preconcentration and dansylation of aliphatic amines using C-18 solid-phase pack-

- ings - Application to the screening analysis in environmental water samples [J]. Journal of Chromatography A, 2002, 978 (1 - 2) : 59 - 69.
- [10] Valero, D., D. Martinez - Romero, M. Serrano. The role of polyamines in the improvement of the shelf life of fruit [J]. Trends in Food Science & Technology, 2002, 13 (6 - 7) : 228 - 234.
- [11] Galston, A. W., R. K. Sawhney. Polyamines in plant physiology [J]. Plant Physiol., 1990, 94 (2) : 406 - 410.
- [12] Arias, M., J. Carbonell, M. Agusti. Endogenous free polyamines and their role in fruit set of low and high parthenocarpic ability citrus cultivars [J]. Journal of Plant Physiology, 2005, 162 (8) : 845 - 853.
- [13] Nishibori, N., S. Fujihara, T. Akatuki. Amounts of polyamines in foods in Japan and intake by Japanese [J]. Food Chemistry, 2007, 100 (2) : 491 - 497.
- [14] 董伟峰, 李宪臻, 林维宣. 丹磺酰氯作为生物胺柱前衍生化试剂衍生化条件的研究 [J]. 大连轻工业学院学报, 2005, 24 (2) : 115 - 118.

Determination of the content of putrescine, spermidine and permene in liquid organic fertilizer by RP- HPLC

HE Wen - yuan^{1,2}, YANG Hai - zhen², GU Guo - wei² (1. Shanghai Environment Company Ltd., 200336; 2. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, Tongji Univ., Shanghai 200092)

Abstract: To develop a reliable method for the determination of the content of putrescine, spermidine and permene in liquid organic fertilizer by HPLC. An Agilent ODS - C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was used, sample were eluted from the column with a programmed water: acetonitrile (v/v) solvent gradient. Dansyl chloride as fluorescent derivation agent was used. The most optimal reaction conditions were determined as follows: concentration of Dansyl chloride, 3 mg/L; temperature of derivatising reaction, 60 °C; time of derivatising reaction, 15 min; and pH of buffer, 9.78. The results demonstrated that the proposed method could promise to be applicable to the qualitative determination and quantitative measurement of putrescine, spermidine and permene in liquid organic fertilizer.

Key words: RP - HPLC; liquid organic fertilizer; polyamines

[上接第 77 页]

Preliminary study on DRIS norms for banana foliar diagnosis of N, P, K, Ca, Mg and S

LI Guo - liang¹, YAO Li - xian¹, FU Chang - ying¹, TU Shi - hua² (1. Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640; 2. IPNI Office in Chengdu, Chengdu 610066)

Abstract: Regular procedures for the establishment of norms for Diagnosis and Recommendation Intergrated System (DRIS) were adopted to compare foliar nutrient contents of N, P, K, Ca, Mg and S as well as nutrients ratio or product between every two elements in high yield group with that in low yield group. P/N, N · K, N · Ca, N/Mg, N/S, P · K, P/Ca, P/Mg, P · S, Ca/K, K/Mg, K · S, Ca/Mg, Ca/S and S/Mg were screened out for the DRIS parameters, and DRIS norms for foliar nutrient diagnosis of banana were put forward.

Key words: banana; DRIS norms; diagnosis

**德国翻抛机
(有机肥生产、粪污处理)**

北京天时成方科技有限公司是德国 BACKHUS 中国总代理。德国 BACKHUS 是专业生产翻抛机的公司,该公司有着二十多年的设计及生产历史。翻抛机设备是一种将固体堆积物翻动、抛离、混合的机械,主要应用于有机肥生产、动物粪便等有机废弃物的无害化资源化处理领域。

目前中国有近 40 台设备在运行,其中一台已正常运行 15 年,世界各地有近 600 台设备在正常运行。

现诚招各省代理商,欢迎有意者来电咨询!

联系人:赵福宽 赵智勇

电话:010 - 62126600 - 206 15810055565 13810873287

网站:www.backhus.com.cn



诚招代理商