

不同提取工艺制备的海藻肥中甜菜碱含量的比较

袁蕊, 王学江, 李峰 (五洲丰农业科技有限公司, 山东烟台 264000)

摘要 [目的]测定不同提取工艺制备的海藻肥中甜菜碱含量。[方法]设计试验比较重量法和非水滴定法的准确度,并采用重量法测定了不同工艺制备的海藻肥中甜菜碱的含量。[结果]不同工艺制备的海藻肥中甜菜碱含量最高为 18.76 mg/mL,碱提取工艺制备的海藻肥中甜菜碱含量最低为 10.60 mg/mL。[结论]生物方法提取的海藻肥中甜菜碱活性成分损失少,而化学方法提取的海藻肥中甜菜碱活性成分损失大。

关键词 海藻肥;不同工艺;甜菜碱;重量法;非水滴定法
中图分类号 S142+.5 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)21-0129-02

Comparison of Betaine Content in Seaweed Fertilizers Prepared by Different Extraction Processes

YUAN Rui, WANG Xue-jiang, LI Feng (Wuzhoufeng Agricultural Science and Technology Co., Ltd., Yantai, Shandong 264000)

Abstract [Objective] The aim is to determine betaine content in seaweed fertilizers prepared by different extraction processes. [Method] The accuracy of gravimetric method and non-aqueous titration was compared by designed experiment. The content of betaine in seaweed fertilizers prepared by different process was determined by gravimetric method. [Result] The betaine content of microbiological extracting seaweed fertilizers prepared by different extraction processes was the highest, which was 18.76 mg/mL, and betaine content in the alkali extracting seaweed fertilizers was the lowest, which was 10.60 mg/mL. [Conclusion] The loss of betaine active ingredient in biological extracting seaweed fertilizers was less, while the loss of betaine active ingredient in chemical extracting seaweed fertilizers was more.

Key words Seaweed fertilizers; Different extraction processes; Betaine; Gravimetric method; Non-aqueous titration

海藻肥是以天然海藻为原料直接生产加工或配以一定数量的氮磷钾以及微量元素,经物理或生化方法精制而成的一种肥料,其在提高作物品质、增加抗性和提高产量方面的作用已被大量实践证明^[1-3],其核心物质是海藻提取物。海藻提取物中除保留了海藻中丰富的 K、Ca、Mg、Fe、Mn、Zn、I 等矿物质及维生素外,还保留了海藻中的天然活性成分,如海藻多糖、酚类多聚化合物、甘露醇、甜菜碱、植物自然生长调节物质等^[4-7]。甜菜碱是普遍存在于海洋藻类中的季胺盐物质,是海藻植物促生长剂中的类细胞激动素化合物之一。大量研究表明,甜菜碱可能参与了植物体内的各种化学物质的运输,充当大分子的组分,提高生物体细胞对于干旱、高湿、高盐和高渗环境的耐受力的作用^[8-10]。

目前测定甜菜碱含量的方法包括紫外分光光度法^[11]、凯氏定氮法^[12]、高氯酸非水滴定法^[13]、高效液相色谱法^[14]、薄层扫描法^[15]、重量法^[16]、红外光谱法^[12]等。各种方法均有其优缺点,综合考虑方法的复杂度以及对设备、操作人员的要求,重量法与高氯酸非水滴定法的测定结果较准确,操作简单、快速,便于推广。笔者对五洲丰农业科技有限公司采取碱提取、酶提取以及微生物提取方式制备的海藻肥中的甜菜碱进行测定,以期在海藻肥制定质量控制标准及其质量评价提供可靠的检验方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备 电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司),电子天平(梅特勒托利多仪器有限公司),磁力搅拌器(常州智博瑞仪器制造有限公司),250 mL 烧杯,50 mL 量筒,50 mL 容量瓶,移液枪,4 号垂熔漏斗。

1.2 试验方法

1.2.1 重量法测定甜菜碱含量。在一定的 pH(2.0 ~ 6.5)

条件下,甜菜碱与四苯硼钠定量反应生成白色沉淀,通过沉淀质量可以计算出样品中甜菜碱含量。

1.2.1.1 药品与试剂。甜菜碱标准品(北京百灵威科技有限公司,含量 98%),不同工艺提取的海藻肥,1% (W/V) 氯化铝,0.1 mol/L HCl,1% (W/V) 醋酸,2% 四苯硼钠(四苯硼钠 2 g 溶解在 100 mL 水中,加氢氧化铝 0.5 g,振摇 1 h)。

甜菜碱标准溶液:称取甜菜碱标准品配制浓度为 2 mg/mL 的溶液。

1.2.1.2 测定方法。吸取 1 mL 待测液加 0.1 mol/L HCl 2 mL,然后慢慢滴加 2% 四苯硼钠溶液 15 mL 和 1% 氯化铝溶液 2 mL,放置 5 min,用 4 号垂熔漏斗过滤。沉淀用 1% 醋酸洗 3 次,每次 3 ~ 5 mL,然后在 80 °C 干燥 3 h,称重。

按下式计算样品中甜菜碱含量:

$$\text{甜菜碱含量}(\%) = 26.8W/B \tag{1}$$

$$\text{甜菜碱含量}(\text{mg/mL}) = 268W/V^{[17-18]} \tag{2}$$

式中,W 为甜菜碱四苯硼钠沉淀的重量(g);B 为样品重量(g);26.8 = (甜菜碱的分子量 / 甜菜碱四苯硼钠沉淀的分子量) × 100;V 为吸取待测液体积(mL);268 = (甜菜碱的分子量 / 甜菜碱四苯硼钠沉淀的分子量) × 1 000。

1.2.2 非水滴定法测定甜菜碱含量。甜菜碱在水溶液中呈中性,无法在水溶液用酸碱滴定法直接测定其含量。但以冰醋酸作为溶剂,HClO₄ 为滴定剂,则能准确滴定。以结晶紫为指示剂,滴定终点时溶液由紫色变为蓝色。

1.2.2.1 药品与试剂。甜菜碱标准品(北京百灵威科技有限公司,含量 98%),不同工艺提取的海藻肥,冰乙酸,醋酸酐,结晶紫指示剂,0.1 mol/L 高氯酸标准溶液(赛默飞世尔科技有限公司)。

2% 结晶紫指示液的配制:准确称取 0.2 g 结晶紫,用冰乙酸定容至 100 mL。

1.2.2.2 测定方法。滴定:吸取 2 mL 待测液置于 250 mL 烧杯中,分别量取 50 mL 的冰醋酸和 2 mL 乙酸酐加入到烧杯

作者简介 袁蕊(1987—),女,山东烟台人,硕士,研发工程师,从事肥料开发研究。

收稿日期 2017-05-19

中,搅拌均匀。将烧杯中加入 2~3 滴 0.2% 结晶紫指示剂,用高氯酸标准液进行滴定,滴定的同时用磁力搅拌器搅拌。当溶液颜色由紫色变为蓝绿色时即为终点,记录消耗的高氯酸标准溶液的体积 V_1 (mL)。同时做空白试验,记录消耗的高氯酸溶液的体积 V_0 (mL)。

根据以下公式计算甜菜碱的含量:

甜菜碱含量(%) =
$$\frac{[c(V_1 - V_0) \times M \times 100]}{(m \times 1\,000)} \tag{3}$$

甜菜碱含量(mg/mL) =
$$[c(V_1 - V_0) \times M] / V \tag{4}$$

式中, $V_0 = 0.05$ mL; V_1 为消耗的高氯酸标准溶液的体积(mL); V 为吸取的待测液的体积(mL); c 为高氯酸标准溶液的浓度(mol/L); m 为样品的质量(g); M 为甜菜碱的摩尔质量 117.11(g/mol)。

1.3 验证及精密度试验 按上述 2 种方法,称取甜菜碱标

准品 5 份适量,做验证试验,并计算精密度。

1.4 样品测定 取不同工艺海藻肥按重量法重复测定 3 次,计算甜菜碱含量。

1.5 回收率测定 取已测含量的微生物发酵海藻肥 5 份,分别加入甜菜碱标准溶液 1、2、3、4、5 mL,按重量法测定,计算回收率。

2 结果与分析

2.1 重量法和非水滴定法测定的标准品甜菜碱含量 由表 1 可知,5 次重复测定的相对标准偏差,重量法为 0.13%,非水滴定法为 0.28%,重量法有更好的重复性。相比较而言,重量法测得的结果更接近甜菜碱含量的实际值。非水滴定法测定的甜菜碱含量比重量法测定的甜菜碱含量高,原因可能是,该方法采用结晶紫为指示剂,滴定终点的确定存在误差;甜菜碱强烈的吸湿性导致了滴定终点误差^[20]。

表 1 重量法和非水滴定法测定的标准品的含量
Table 1 The standard content determined by gravimetric method and non-aqueous titration %

方法 Method	含量 Content					平均值 Average value	RSD
	1	2	3	4	5		
重量法 Gravimetric method	98.19	97.95	98.18	97.96	98.22	98.10	0.13
非水滴定法 Non-aqueous titration	98.17	98.58	98.37	98.65	98.89	98.53	0.28

2.2 不同工艺提取的海藻肥中甜菜碱含量 不同工艺制备的海藻肥中,微生物发酵工艺制备的海藻肥中甜菜碱含量最高为 18.76 mg/mL,碱提工艺制备的海藻肥中甜菜碱含量最低为 10.60 mg/mL。碱提取、酶提取和微生物提取 RSD 分别为 0.11%、0.13%、0.14%,表明该方法重复性良好。不同提取工艺制备的海藻肥中甜菜碱含量差别显著,采用碱提法制备的海藻肥中甜菜碱含量显著低于微生物发酵、酶提取 2 种工艺制备的海藻肥中甜菜碱含量。考虑是生物方法提取的海藻肥活性成分损失少,而化学方法提取的海藻肥活性成分损失大的原因。

表 2 不同工艺提取的海藻肥中甜菜碱含量
Table 2 The content of betaine in seaweed fertilizers by different extraction processes

方法 Method	含量 Content//mg/mL				RSD %
	1	2	3	平均值 Average value	
碱提取 Alkali extracting	10.61	10.59	10.61	10.60	0.11
酶提取 Enzyme extracting	17.81	17.81	17.85	17.82	0.13
微生物提取 Microbiological extracting	18.78	18.77	18.73	18.76	0.14

2.3 回收率试验 由表 3 可以看出,5 次重复测定的平均加标回收率是 99.5%,说明重量法能准确地测定海藻肥中甜菜碱的含量。

3 讨论

甜菜碱的检测方法主要有光度法和色谱法等,光度法耗时长并且重复性差,色谱法需要昂贵的设备以及复杂的前处理。由于甜菜碱在海洋藻类中的含量很低,很多企业不具备高端的检测设备和技术,因此也很少了解和公开自己海藻液

产品中的甜菜碱含量。根据试验条件采用重量法测定海藻肥中甜菜碱含量,该方法操作快速,且试剂均为常见试剂,试验操作简便,便于推广使用,尤其适合中小型企业的产品质量分析,此方法检测海藻植物促生长剂中甜菜碱含量准确和方便,对该产业也是很好的促进。对于水溶性较好的海藻肥可直接溶于水后测定,水溶性差的则根据实际情况对样品进行处理。

表 3 回收率结果
Table 3 Results of recovery tests

编号 Serial No.	加入量 Added amount mg	测定量 Detected amount mg	回收率 Recovery %
1	2	1.984	99.2
2	4	3.950	98.9
3	6	5.988	99.8
4	8	8.008	100.1
5	10	9.950	99.5

碱提取所需反应温度高于其他 2 种工艺,反应所需 pH 9~12,反应条件较苛刻,酶提取和微生物提取所需反应温度、pH 等条件温和,其中所含生长调节物质等海藻活性成分含量均高于碱提取。五洲丰农业科技有限公司生产的海藻肥产品,所添加的海藻液均为微生物发酵或酶提取,温和的生物方法制备的海藻液富含天然植物生长调节物质,可显著提高农产品品质,促进作物生长,使农民增产增收。

参考文献

[1] 黄清梅,肖植文,管俊娇,等.海藻肥对玉米产量及农艺性状的影响[J].西南农业学报,2015,28(3):1166-1170.
[2] 姜学玲,徐维华,于忠范,等.叶面喷施美奇天然海藻肥对黄瓜的影响[J].山东蔬菜,2000(4):32-33.

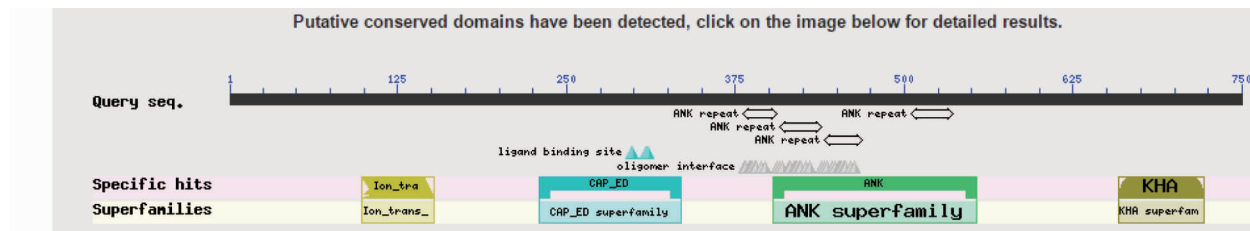


图7 RcAKT1 蛋白保守区预测

Fig.7 Prediction of RcAKT1 protein conserved domains

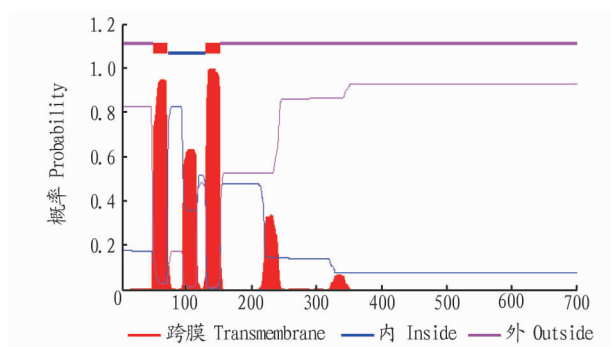


图8 跨膜结构

Fig.8 Transmembrane structure

协调作用的结果^[6],为进一步研究蓖麻的抗逆过程,首先要 在蓖麻体内克隆出所有与抗逆相关的基因,并探索出这些基因的相互作用机制,今后可以利用转基因的手段,将这些抗逆基因转入到其他抗逆性差的植物体内,有望在提高植物的

抗逆性方面取得重要突破,为农作物生产和应用做出贡献。同时,还可以采取分子生物学的一些方法研究该基因,并进一步转化到蓖麻植株内,以培育出抗逆效果更加显著的蓖麻新品种。

参考文献

- [1] 伍国强,水清照,冯瑞军. 植物 K⁺ 通道 AKT1 的研究进展[J]. 植物学报,2017,52(2): 225-234.
- [2] 胡静,胡小柯,尉秋实,等. 植物内整流 K⁺ 通道 AKT1 的研究进展[J]. 草业科学, 2017,34(4):813-822.
- [3] 杨玲玲. RACE 法克隆紫花苜蓿光敏色素 A 基因[D]. 郑州:河南农业大学,2008.
- [4] 宋笛. RACE 方法克隆云芝免疫调节蛋白基因[J]. 农业与技术,2016,36(17):21-23.
- [5] 崔素萍,刘博,黄丽丽,等. 利用 RACE 方法克隆小麦 β -1,3-葡聚糖酶基因的全长 cDNA[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2008,36(7):79-84.
- [6] 于鸿燕. 草鱼三个 PI3K/AKT 通路相关基因的克隆和表达分析[D]. 上海:上海海洋大学,2015.
- [7] 吕汰,虎东岳,汪印全. 海藻肥在蔬菜作物上的增产效果研究[J]. 甘肃农业科技,2003(10):38-40.
- [8] 保万魁,王旭,封朝晖,等. 海藻提取物在农业生产中的应用[J]. 中国土壤与肥料,2008(5):12-18.
- [9] 王强,石伟勇. 海藻肥对番茄生长的影响及其机理研究[J]. 浙江农业科学,2003(2):67-70.
- [10] 王强,石伟勇. 海藻液肥对草莓品质及贮藏的影响[J]. 土壤通报,2004,35(1):94-96.
- [11] 王云峰,石伟勇,潘超君. 海藻液体肥肥效的研究[J]. 东海海洋,2001,19(3):43-47.
- [12] 赵博生,衣艳军,刘家尧. 外源甜菜碱对干旱/盐胁迫下的小麦幼苗生长和光合功能的改善[J]. 植物学通报,2001,18(3):378-380.
- [13] 贾庚祥,朱至清,李银心. 甜菜碱与植物耐盐基因工程[J]. 植物学通报,2002,19(3):272-279.
- [14] 卢元芳. 甜菜碱处理种子对小麦和玉米幼苗抗盐性的效应[J]. 曲阜师范大学学报(自然科学版),1997,23(3):83-86.
- [15] 宋丽丽,阎振荣. 甜菜碱的制备、含量测定及其应用[J]. 河北林果研究,2002,17(4):383-388.
- [16] 胡彩虹,夏枚生,许建峰. 甜菜碱分析方法进展[J]. 中国饲料,1997(7):24-25.
- [17] 齐永秀,郝立勇,瞿宏艳,等. 非水滴定法测定盐酸甜菜碱的含量[J]. 泰山医学院学报,2002,23(4):355-356.
- [18] 杨昕,BARWELL C,刘焱文. 高效液相色谱法测定 4 种海藻中甜菜碱的含量[J]. 中国中医药信息杂志,2001,8(2):35-36.
- [19] 王隶书,吕咏,程东岩,等. 薄层扫描法测定糖蜜酒渣中甜菜碱的含量[J]. 吉林中医药,1994(6):39.
- [20] 胡彩虹,刘波静. 重量法测定甜菜碱和甜菜碱预混剂中甜菜碱含量[J]. 中国饲料,2002(4):27-28.
- [21] 李炜,张丹参. 甜菜碱的提取分离及测定方法研究进展[J]. 医学综述,2006,12(8):506-508.
- [22] 江泽荣,包文芳,范知宇,等. 甜菜碱(Betaine)的研究概况[J]. 沈阳药学院学报,1989,6(2):140.
- [23] 刘志刚,钱捷,杨明康. 甜菜碱含量测定方法研究进展[J]. 江西化工,2012(3):9-11.
- [24] 杨雪,王洪荣,邹益东,等. 甜菜碱含量的测定方法比较[J]. 饲料工业,2013,34(7):48-51.

科技论文写作规范——引言

扼要地概述研究工作的目的、范围、相关领域的前人工作和知识空白、理论基础和分析、研究设想、研究方法和实验设计、预期结果和意义等。一般文字不宜太长,不需做详尽的文献综述。在最后引出文章的目的及试验设计等。“引言”两字省略。