

# 一种利用 RT-HPLC 分析乳酸菌产生物胺的方法

孟甜 田丰伟 陈卫\* 张灏

(江南大学食品科学与技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 具有脱羧酶活性的乳酸菌可通过氨基酸的脱羧反应产生具有潜在安全风险生物胺。本文利用脱羧酶培养基初步筛查 61 株乳酸菌产生物胺情况, 再通过 RT-HPLC 法测定其在发酵液和发酵乳中的生物胺含量。用 10% 的三氯乙酸提取样品中的生物胺, 采用苯甲酰氯衍生处理后, 以甲醇/水为流动相, 进行梯度洗脱, 流速 0.8 mL/min, 紫外检测器波长为 254 nm。结果显示, 组胺和酪胺得到良好的分离, 在给定的浓度范围内呈现良好的线性关系( $R^2 > 0.995$ )。在发酵液和发酵乳中添加生物胺混合标准溶液, 平均回收率为 97.92%–101.14%, 相对偏差 RSD < 5%。结果表明, 发酵液与发酵乳中生物胺的 RT-HPLC 法, 是一种快捷、稳定、灵敏度高的检测方法, 其与脱羧酶培养基法结合可以准确地实现对乳酸菌产生物胺的评价。

**关键词:** 乳酸菌, 生物胺, 脱羧酶, RT-HPLC

## A RT-HPLC Method for the Determination of Biogenic Amine Produced by Lactic Acid Bacteria

MENG Tian TIAN Feng-Wei CHEN Wei\* ZHANG Hao

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**Abstract:** Biogenic amines are produced by some lactic acid bacteria of decarboxylase activities which are potential risk factors for lactic acid bacteria-fermented foods. In this paper, the biogenic amine-producing capacities of 61 lactic acid bacteria strains were analyzed on a decarboxylase medium. Then the methodology of RT-HPLC determination for biogenic amines in fermented broth and milk was studied. The biogenic amines in test samples were extracted by 10% trichloroacetic acid and then derived with benzoyl chloride. The HPLC analysis for the samples were conducted as the following condition: mobile phase was a gradient elution program of methanol and water, the flow rate was 0.8 mL/min. UV detector was used in the final determination on 254 nm. The results showed that biogenic amines were separated well on such condition. The method was in a linear way for the amines studied at given concentrations ( $R^2 > 0.995$ ). The average recovery ratios ranged from 97.92%–101.14% for all samples. The RSDs were less than 5%. It can be seen that the RT-HPLC method was rapid, stable, high sensitive. Combination of this HPLC method and microbial primary screening on a decarboxylase medium could evaluate the biogenic amine-producing capacity of lactic acid bacteria more accurately.

**Keywords:** Lactic acid bacteria, Biogenic amine, Decarboxylase, RT-HPLC

生物胺是由氨基酸经微生物脱羧作用产生的一类低分子碱性有机化合物,在非发酵食品中,如水果、蔬菜、肉、牛奶和鱼中其浓度很低,而发酵食品因含有氨基酸脱羧酶活性的微生物菌群可能产生大量生物胺。低剂量的生物胺对机体有着重要的生理作用,但过量摄入则有毒副作用<sup>[1]</sup>,生物胺引起的食物中毒往往与服用降血压药物、饮酒、肠胃疾病等密切相关<sup>[2]</sup>。另外,当食品中含有亚硝酸盐时,生物胺会与之结合生成致癌物亚硝胺<sup>[3]</sup>。因此,发酵食品中的生物胺也已成危害食品安全的重要问题。

生物胺种类很多,其中毒性最强的是组胺和酪胺。产生生物胺的乳酸菌主要包括:乳球菌属、乳杆菌属、肠球菌属、明串珠菌属等,其中应用于食品加工中的乳酸菌也可能产生酪胺和组胺<sup>[4]</sup>。虽然产生生物胺乳酸菌分布在各个种属,但它们并不是来自某些特定的种属,而是具有菌株特异性。不同菌株产生的生物胺的量也不尽相同,并且易受到培养条件和外界环境因素的影响<sup>[5]</sup>。

鉴于乳酸菌产生的生物胺给食品安全带来的潜在风险,为了考察本实验室保藏的具有益生作用的乳酸菌的安全性。本文以实验室保藏的包括乳杆菌属(*Lactobacillus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、片球菌属(*Pediococcus*)和双歧菌属(*Bifidobacterium*)在内的61株乳酸菌为待测菌,先使用鉴别培养基初步筛查产生物胺乳酸菌,再利用反相高效液相色谱法分析发酵液和发酵乳中产生物胺情况,为评价益生乳酸菌的安全性提供了方法和依据,确保其更安全地应用于发酵食品中。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:** 本文试验菌种包括乳杆菌属(*Lactobacillus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、片球菌属(*Pediococcus*)和双歧菌属(*Bifidobacterium*)在内的61株乳酸菌,均为本实验室保藏。

**1.1.2 试剂:** 标准品组胺、酪胺、5'-磷酸吡哆醛购自美国 sigma 化学公司。甲醇、苯甲酰氯为色谱纯、

蛋白胨、胰蛋白胨、牛肉膏、酵母膏、葡萄糖、氯化钠、乙酸钠、柠檬酸氢二铵、柠檬酸铵、 $K_2HPO_4$ 、 $MgSO_4$ 、 $MnSO_4$ 、 $FeSO_4$ 、 $CaCO_3$ 、氨基酸、溴甲酚紫、硫胺素、Tween 80、氢氧化钠、盐酸、三氯乙酸、乙醚为化学纯,均购自国药集团化学试剂有限公司。

**1.1.3 培养基:** MRS 液体培养基(%): 蛋白胨 1, 牛肉膏 1, 酵母膏 0.5, 葡萄糖 2, 乙酸钠 0.5, 柠檬酸氢二铵 0.2,  $K_2HPO_4$  0.2,  $MgSO_4$  0.02,  $MnSO_4$  0.005, Tween 80 0.1, 调 pH 值到 6.2-6.4,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。

液体脱羧酶培养基(%)<sup>[6]</sup>: 胰蛋白胨 0.5, 酵母膏 0.5, 牛肉膏 0.5, 氯化钠 0.25, 葡萄糖 0.05, Tween 80 0.1,  $MnSO_4$  0.05,  $MgSO_4$  0.02,  $FeSO_4$  0.004, 硫胺素 0.001,  $K_2HPO_4$  0.2,  $CaCO_3$  0.01, 溴甲酚紫 0.006, 5'-磷酸吡哆醛 0.005, pH 值 5.3-5.5,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。

**1.1.4 主要仪器与设备:** Waters 高效液相色谱仪, Waters 2489 紫外/可见检测器, Waters 1525 二元梯度泵, Waters RT-C18 色谱柱(5  $\mu$ m, 4.6 mm  $\times$  100 mm)。

超声波水浴(KQ-700E 型), 针筒式滤器(5 mL), 微孔滤膜(0.45  $\mu$ m, 25 mm), 数显恒温水浴锅(DK-8D 型), 分析天平(梅特勒 EL204 型)。

### 1.2 方法

**1.2.1 菌种活化:** 61 株乳酸菌 MRS 培养基活化 2 次后,在 MRS 中加入 0.1% 前体氨基酸培养基中活化 5 次。

**1.2.2 液体脱羧酶培养基检测:** 将供试菌种活化后,接种于液体脱羧酶培养基中检测,同时做 3 组平行,空白培养基对照试验。

**1.2.3 色谱条件<sup>[7]</sup>:** Waters RT-C18 色谱柱(5  $\mu$ m, 4.6 mm  $\times$  100 mm), 采用梯度洗脱, 梯度洗脱程序见表 1, 流速: 0.8 mL/min; 检测波长: 254 nm; 进样量: 20  $\mu$ L; 柱温: 35 $^{\circ}$ C。

**1.2.4 标准曲线的绘制:** 准确称取标准品酪胺组胺各 100 mg, 用 0.1 mol/L 盐酸(HCl)定容至 100 mL, 制成浓度为 1000 mg/L 混合标准储备液。量取上述标准储备液, 用 0.1 mol/L 盐酸(HCl)配制成终浓度分别为 0、50、100、150、200 和 250 mg/L 混合标准液。

表 1 HPLC 法检测生物胺的梯度洗脱程序  
Table 1 HPLC gradient elution program for biogenic amine analysis

Time (min)	A Methanol (%)	B Water (%)
0	50	50
0.5	50	50
7.0	85	15
12.0	85	15
15.0	50	50

**1.2.5 生物胺混合标准样品的衍生<sup>[7-8]</sup>:**取 2.00 mL 标样加入 1 mL 2 mol/L NaOH 调整 pH 至碱性, 加入 10  $\mu$ L 苯甲酰氯水浴 30°C 衍生处理 20 min, 而后加入 2 mL 饱和 NaCl 水浴 60°C 5 min 终止衍生化, 加 3 mL 乙醚振荡混合, 萃取完全后移取上层有机相至干净试管, 用氮气吹干后, 加 1 mL 甲醇溶解, 每个样品 5 次平行, 取 20  $\mu$ L 进样测定生物胺含量。

**1.2.6 样品溶液的制备:**发酵液样品, 经等体积 10%(M/V)三氯乙酸提取 1 h, 双层滤纸过滤, 2 mL 进行衍生处理, 衍生步骤同 1.2.5, 取 20  $\mu$ L 进样测定生物胺含量。

**1.2.7 检测限:**取不同浓度的标准液, 按照 1.2.5 的方法衍生处理, HPLC 进样分析。根据 3 倍于噪音的响应值确定检测限。

**1.2.8 回收率试验:**向发酵液样品中加入单种生物胺浓度为 50、100 和 200 mg/L 的标准品。每个添加浓度做 5 个平行, 同时做空白样品 2 份, 按照上述衍生方法和色谱条件, 进行回收试验。

**1.2.9 精密度试验:**取 3 个不同浓度 50、150、250 mg/L, 按照测定方法进行精密度试验, 5 次平行测定生物胺含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 液体脱羧酶培养基检测生物胺产生菌

61 株乳酸菌在添加 1% 的氨基酸的 MRS 培养基上活化 5 代, 接种到液体脱羧酶培养基中进行检测。由于生物胺为碱性物质, 在大量氨基酸底物存在条件下由脱羧酶作用产生物胺, 可使溴甲酚紫由黄色变为紫色。与澄清的空白培养基相比, 浑浊并呈现黄色为阴性, 浑浊并呈现红色或者紫色为阳性, 见图 1。



图 1 液体脱羧酶检测培养基检测结果  
Fig. 1 Result of liquid decarboxylase media

### 2.2 色谱条件的选择

组胺和酪胺标准品的色谱图见图 2。参照 Deng-Fwu Hwang 等的方法, 以水和甲醇为流动相, 采用梯度洗脱, 但由于与参考文献使用的色谱柱长度不同所以需重新确定保留时间, 组胺和酪胺的保留时间分别为(2.90  $\pm$  0.02) min 和(4.37  $\pm$  0.01) min。结果表明组胺和酪胺分离效果良好, 峰型对称, 没有拖尾现象, 见图 2。采用此法可以实现对组胺和酪胺的快速检测。

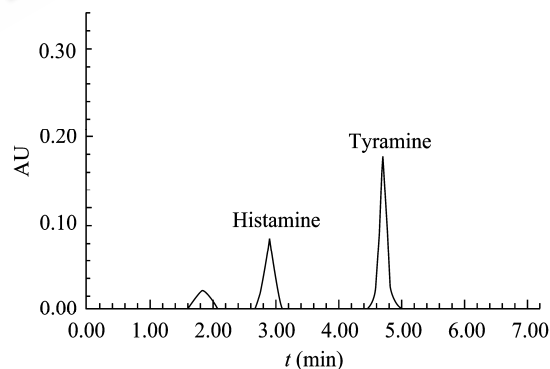


图 2 混合生物胺标样色谱图(200 mg/L)  
Fig. 2 Superposition chromatogram for standard mixture of biogenic amine (200 mg/L)

### 2.3 标准曲线的绘制和线性范围的确定

选择不同浓度的生物胺标准溶液进行检测, 确定组胺和酪胺的浓度在 0–250 mg/L 范围内是线性相关的。标准曲线见图 3, 其相关系数均大于 0.995, 说明组胺和酪胺的峰面积与相应浓度呈良好的线性关系。

### 2.4 检测限及回收率

根据信噪比(S/N)大于 3 作为判断标准, 组胺的检测限为 0.08 mg/L, 酪胺的检测限为 0.10 mg/L。

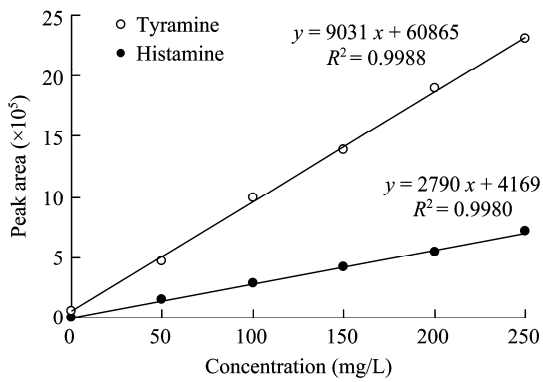


图3 生物胺含量测定标准曲线

Fig. 3 Standard curve of biogenic amines content

培养基和脱脂乳样品中分别添加生物胺浓度为50、100和200 mg/L的标准品,由表2可见,检测乳酸菌在培养基中产组胺和酪胺的回收率分别为97.92%和98.19%,在脱脂乳中组胺和酪胺的回收率分别为101.14%和98.44%,变异系数均小于5%。可见该方法回收率较高,从而说明此法是一种较为准

确检测乳酸菌在培养基和发酵乳中产组胺和酪胺的方法。

## 2.5 精密度试验

精密度试验结果见表3,可以看出酪胺和组胺在低、中、高不同浓度下精密度良好,RSD值均小于5%。苯甲酰氯衍生物较为稳定,但是为了更好地保证结果的准确性,最好是样品处理后立即上机检测。

## 2.6 发酵液和发酵乳中生物胺含量测定

对61株乳酸菌在发酵液和发酵乳中产生生物胺的量进行测定,结果见表4。结果表明61株乳酸菌中23株乳酸菌为酪胺产生菌,只有3株为组胺产生菌。由于液体脱羧酶培养基有着特殊的成分和培养条件,可以最大程度诱导乳酸菌产生生物胺,在脱羧酶培养基中乳酸菌产组胺的量为6.99–69.71 mg/L,产酪胺的量在3.98–248.08 mg/L之间,而在脱脂乳中生物胺产生量均小于30 mg/L。

表2 生物胺回收试验结果( $n=5$ )  
Table 2 Recovery tests for biogenic amines ( $n=5$ )

Biogenic amine	Sample (mg/L)	Standard sample concentration (mg/L)			RSD (%)	Average recovery (%)
		50	100	200		
Histamine <sup>(1)</sup>	69.46 ± 1.27	120.17 ± 3.76	165.53 ± 3.26	262.00 ± 2.07	3.09	97.92
Histamine <sup>(2)</sup>	9.20 ± 0.92	61.26 ± 1.03	110.69 ± 0.36	205.08 ± 4.53	1.68	101.14
Tyramine <sup>(1)</sup>	33.59 ± 1.53	83.50 ± 2.26	128.10 ± 3.37	234.05 ± 3.60	3.25	98.19
Tyramine <sup>(2)</sup>	15.16 ± 0.99	63.59 ± 0.97	117.70 ± 4.16	206.97 ± 5.63	3.64	98.44

Note: (1): Media; (2): Skim milk.

表3 生物胺精密度试验结果( $n=5$ )  
Table 3 Precision tests for biogenic amines ( $n=5$ )

Name	50 mg/L		150 mg/L		250 mg/L	
	Peak area	RSD (%)	Peak area	RSD (%)	Peak area	RSD (%)
Histamine	88.75 ± 3.09	3.48	146.72 ± 3.62	1.21	333.54 ± 12.34	3.70
Tyramine	141.20 ± 3.36	2.38	252.38 ± 8.58	2.86	422.88 ± 10.49	2.48

## 3 讨论

### 3.1 液体脱羧酶培养基检测法

微生物代谢产生生物胺是机体的应激机制,在相对低酸和营养匮乏的条件下,微生物为了维持自身生存,受胁迫机制调控而代谢产生碱性的生物胺<sup>[9]</sup>。据报道,生物胺代谢动力为细胞内外的pH梯度和电位差,贫瘠的培养条件迫使乳酸菌利用其代谢生物胺产生的能量而存活下来<sup>[10]</sup>。另外比较脱羧

酶在不同酸碱度时的X-ray构象,发现其最适pH值为酸性,而碱性和中性条件会降低其活性<sup>[11]</sup>。脱羧酶培养基正是一种营养相对贫瘠的特异性选择培养基,具有脱羧酶活性的菌株就会因受到诱导而产生生物胺,从而使加入培养基中的指示剂发生颜色变化。但由于指示剂显色范围的局限性,有些菌株产生生物胺的量较少,从而导致出现假阴性,在本文中检测到产生生物胺低于40 mg/L的乳酸菌在液体脱羧酶培养基中就出现了这种情况;而乳酸菌代谢所

表 4 乳酸菌产生物胺的检测结果比较  
Table 4 Compared test result of biogenic amines produced by lactic acid bacteria

No.	Strain	Histamine			Tyramine		
		Media	HPLC (mg/L)	Skim milk (mg/L)	Media	HPLC (mg/L)	Skim milk (mg/L)
1	<i>Lactobacillus helveticus</i> C1302	—	nd	nd	+	84.98	11.71
2	<i>Lactobacillus helveticus</i> E2402	—	nd	nd	+	224.97	10.98
3	<i>Lactobacillus helveticus</i> 6024	—	nd	nd	+	170.10	15.16
4	<i>Lactobacillus helveticus</i> D5402-1	—	nd	nd	—	3.98	0.29
5	<i>Lactobacillus helveticus</i> D1401	—	nd	nd	—	11.95	3.42
6	<i>Lactobacillus helveticus</i> C6302	—	nd	nd	+	142.81	24.10
7	<i>Lactobacillus helveticus</i> C3301	—	nd	nd	+	64.98	3.61
8	<i>Lactobacillus helveticus</i> C8402-2	—	nd	nd	—	33.59	3.19
9	<i>Lactobacillus helveticus</i> T16	+	69.46	9.20	—	15.16	2.06
10	<i>Lactobacillus plantrum</i> LP1001	—	nd	nd	+	248.08	20.86
11	<i>Lactobacillus</i> sp. CZ211-2	—	nd	nd	+	197.53	23.75
12	<i>Lactobacillus</i> sp. 5365	+	35.49	2.39	—	nd	nd
13	<i>Lactobacillus brevis</i> DJ201	—	nd	nd	+	194.63	29.17
14	<i>Lactobacillus brevis</i> LG43	—	nd	nd	+	188.11	14.04
15	<i>Lactobacillus</i> sp. DC5	—	nd	nd	+	167.97	17.18
16	<i>Lactobacillus plantrum</i> BCRC11697	—	nd	nd	+	203.40	23.61
17	<i>Lactobacillus bifidum</i> BB-20	—	nd	nd	+	179.86	26.14
18	<i>Lactobacillus bifidum</i> BB-24	—	nd	nd	+	178.48	19.05
19	<i>Lactobacillus bifidum</i> BB-39	—	nd	nd	+	153.34	13.88
20	<i>Lactobacillus brevis</i> TC17	—	nd	nd	+	229.28	27.96
21	<i>Pediococcus pentosaceus</i> 20536	—	nd	nd	+	45.40	9.05
22	<i>Bifidobacterium breve</i> BRRC14634	—	nd	nd	—	nd	nd
23	<i>Bifidobacterium bifidum</i> BCRC14615	—	6.99	nd	—	27.81	2.02
24	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> BCRC14606	—	nd	nd	—	nd	nd
25	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> S28	—	nd	nd	+	175.89	13.70

Note: +: Positive; —: Negative; nd: Not detected.

产生的一些碱类物质也会造成假阳性。所以液体脱羧酶培养基检测法作为一种简便、廉价的检测方法,只适用于对产生物胺的乳酸菌进行初步检测。

### 3.2 RT-HPLC 法检测乳酸菌产生物胺

目前, HPLC 是定量分析生物胺的主要方法, 其具有速度快、灵敏度高、分析准确等特点。生物胺在可见和紫外区域没有满意的吸收, 也没有荧光成分。故在 HPLC 检测时要进行衍生化处理, 衍生分为柱前和柱后衍生两种。常用的衍生化试剂有邻苯二甲醛(OPA)、丹磺酰氯(Dns-cL)和苯甲酰氯(B-cL), 其中苯甲酰氯具有衍生时间短、廉价、易操作和衍生物稳定等优点<sup>[12]</sup>。

在生物胺中, 组胺的毒性最大。根据试验所得结

果, 只有 3 株益生乳酸菌产生组胺, 即使它们都含有组氨酸脱羧酶基因, 但在极其适合生物胺产生的培养基中的产量最多也只有 69.71 mg/L。而酪胺是乳酸菌产生的最常见的生物胺, 其产生量在不同菌株间、不同环境下却不尽相同。本文从 61 株益生乳酸菌中检测出 23 株菌可不同程度地产生酪胺, 在脱羧酶培养基中最大产生量为 248.08 mg/L。这些益生乳酸菌包括瑞士乳杆菌、植物乳杆菌、短乳杆菌、双歧乳杆菌等。根据生物胺产生的条件: (1) 存在生成生物胺的前体氨基酸; (2) 存在含有氨基酸脱羧酶的微生物; (3) 有适宜的环境条件<sup>[1]</sup>。所以本文选择了不同的培养基质条件来比较乳酸菌产生物胺的情况。脱羧酶培养基提供了贫瘠酸性的环境, 极其适合乳酸菌产

生生物胺;而脱脂乳是一种营养丰富的基质,乳酸菌在脱脂乳的生物胺产量远低于脱羧酶培养基,均小于 30 mg/L,符合美国 FDA 规定的组胺不得超过 50 mg/L、酪胺不得超过 100 mg/L 的标准。由此证明,本实验室保藏的具有潜在益生功能的乳酸菌在生物胺产生方面是符合安全性评价标准的。

## 参 考 文 献

- [1] Silla-Santos MH. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 1996(29): 213-231.
- [2] Shalaby AR. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 1996(29): 675-690.
- [3] Scanlan RA. Formation and occurrence of nitrosamines in foods. *Cancer Research*, 1983(43): 2435-2440.
- [4] Victoria Moreno-Arribas M, Carmen Polo M. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 2003(84): 117-121.
- [5] Ten Brink BC, Daminink HM, Joosten L, et al. Occurrence and formation of biologically active amine in food. *Food Microbiol*, 1990(11): 73-84.
- [6] Sara Bover-Cid, Holzapfel WH. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 1999(53): 33-41.
- [7] Deng-Fwu Hwang, Sheng-Hsiung Chang, Chyuan-Yuan Shiu, et al. High-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in fish implicated in food poisoning. *Journal of Chromatography B*, 1997(693): 23-30.
- [8] Paleologos EK, Chytiri SD, Savvaidis IN, et al. Determination of biogenic amines as their benzoyl derivatives after cloud point extraction with micellar liquid chromatographic separation. *Journal of Chromatography A*, 2003(1010): 217-224.
- [9] González de Llano D, Cuesta P, Rodríguez. A biogenic amine production by wild *Lactococcal* and *Leuconostoc* strains. *Letters in Applied Microbiology*, 1998(26): 270-274.
- [10] Schelp E, Worley S, Monzigo AF, et al. pH-induced structural changes regulate histidine decarboxylase activity in *Lactobacillus* 30a. *Mol Biol*, 2001(306): 727-732.
- [11] Patrick M Lucas, Wout AM Wolken, Olivier Claisse, et al. Histamine-producing pathway encoded on an unstable plasmid in *Lactobacillus hilgardii* 0006. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(3): 1417-1424.
- [12] Özgül Özdestan, Ali Üren. A method for benzoyl chloride derivatization of biogenic amines for high performance liquid chromatography. *Talanta*, 2009(78): 1321-1326.

## 征订启事

### 《腐植酸》杂志 2010 年征订启事

《腐植酸》杂志于 1979 年创刊,由中国腐植酸工业协会主办,是全国唯一的腐植酸类专业科技期刊,面向国内外公开发行人。《腐植酸》杂志是《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊、《中国学术期刊(光盘版)》入编期刊、《中国核心期刊(遴选)数据库》入编期刊。本刊为国际标准大 16 开,内设 60 页,主要栏目有:“卷首语”“专题评述”“研究论文”“译文”“腐植酸质量检测”“协会(专业)标准讨论”“腐植酸文摘”“腐植酸专利简介”“腐植酸环保应用”“‘两会’动态”“信息传真”“‘乌金杯’采风”“腐植酸文献检索”等。

《腐植酸》杂志集学术性、专业性和实用性于一身,内容广泛、指导性强、信息量大,自 1979 年创刊以来,受到广大读者的关注与好评。2010 年,本刊将继续以“高扬绿色 关注民生”为指导,设置丰富的内容,为推动我国腐植酸产业的发展做好服务工作!

《腐植酸》杂志为双月刊,国际刊号:ISSN1671-9212;国内刊号:CN11-4736/TQ。每期定价 20.00 元,全年 6 期,年定价 120.00 元(含邮费)。

热诚欢迎各位新、老读者及时订阅!如需过刊,请直接与编辑部联系。

订购方式:从邮局汇款至编辑部。

地 址:北京市西城区六铺炕街 1 号 邮编:100120

收件人:《腐植酸》编辑部

电 话:010-82784950, 010-82035180

传 真:010-82784970

E-mail: chaia@126.com

网 址: www.chinaha.org