

## 解决方案 | 液相色谱法测定水溶肥料中游离氨基酸含量

氨基酸水溶肥料，从字面上来看，就是含有氨基酸分子的一类肥料。它是农业生产中常用的一种多功能、环保型肥料。它将农作物生长过程中的各种营养元素合理的络合在一起，使用后能提高作物叶绿素含量，增强作物光合作用，能补充多种营养元素，满足整个作物生长过程中的养分需要。使作物健壮旺盛、根系发达、叶面浓绿肥厚、坐果率高、果实膨大快、果实丰满、品质好、产量高。并增强作物抗旱、抗寒、抗病、抗重茬的能力。肥料所含有的有机质、高活性有益菌群，可以有效抑制土壤中有菌和病虫害的产生，能活化土壤，增加土壤的透气性，显著降低生理病害和土壤病害的发生，减少农药使用量，使农产品品质及产量提高。

氨基酸的含量在氨基酸水溶肥料中尤为重要。农业标准 NY 1429-2010 中规定了氨基酸有机肥（液体）的含量不低于 100g/L，农业标准《水溶肥料游离氨基酸含量的测定》NY/T 1975-2010 中对氨基酸的检测方法做了推荐，分别是氨基酸自动分析仪法和柱前衍生-液相色谱仪法。本文参考 NY/T1975-2010，建立了柱前衍生-液相色谱法测定水溶肥料中游离氨基酸含量的方法，供相关人员参考。

### 测试原理

试样用磺基水杨酸沉淀蛋白质后，用 EDTA 络合金属元素释放氨基酸，氨基酸经化学衍生后由液相色谱仪分离并测定天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、胱氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸和精氨酸共 17 种氨基酸的含量，这些氨基酸含量综合，几位肥料中游离氨基酸的含量。

## 仪器和试剂

LC-5510 液相色谱仪（配 UV 检测器）

实验室常用分析设备；

氨基酸分析方法包；

磺基水杨酸溶液。

## 实验条件

色谱柱：Amino Acid, 5  $\mu$ m, (4.6 $\times$ 250mm)；

流动相：

流动相 A：0.1mol/L 醋酸钠溶液（pH6.5）：乙腈=93:7

流动相 B：水：乙腈=20:80

流速：1.0 ml/min；

柱温：40 $^{\circ}$ C；

波长：254nm；

进样量：20  $\mu$ L。

梯度程序：

时间 (min)	A%	B%
0	100	0
11	93	7
13.9	88	12
14	85	15
29	66	34
32	30	70
35	0	100
42	0	100

45	100	0
60	100	0

### 样品前处理

#### 标准品衍生

分别精称标准品溶液 160  $\mu\text{L}$ ，置于试管中，加入稀释后的 A 溶液 100  $\mu\text{L}$  和稀释后的 B 溶液 100  $\mu\text{L}$ ，摇匀，室温反应 60min；然后加入正己烷溶液 400  $\mu\text{L}$ ，旋紧盖子后振摇 10s，室温下静置分层，去下层 200  $\mu\text{L}$  溶液，加入 800  $\mu\text{L}$  水混合均匀，再取 200  $\mu\text{L}$  加入 800  $\mu\text{L}$  水混合均匀，用孔径为 0.22  $\mu\text{m}$  的有机滤膜过滤，待分析；

#### 样品前处理

称取适量试样，置于 250mL 容量瓶中，充分溶解后，加水至刻度，混匀。放置过夜后过滤，取 2mL 于 10mL 试管中，加入 2mL 磺基水杨酸溶液，混匀，放置 1h。然后准确加入 1mLEDTA-Na 溶液，混匀，用 0.45 $\mu\text{m}$  滤膜过滤。将滤液按照标准样衍生化方法进行衍生，待用。

### 实验结果

按照下表表格配置氨基酸标准溶液，然后进样衍生，按照实验条件调整仪器待稳定后，将衍生后的标准溶液上机。以吸光度为纵坐标，浓度为横坐标，绘制标准曲线。

表 1 标准溶液浓度

名称	浓度 (mmol/L)				
门冬氨酸	0.1	0.2	0.5	1	2.5
谷氨酸	0.1	0.2	0.5	1	2.5

丝氨酸	0.1	0.2	0.5	1	2.5
甘氨酸	0.1	0.2	0.5	1	2.5
组氨酸	0.1	0.2	0.5	1	2.5
精氨酸	0.1	0.2	0.5	1	2.5
苏氨酸	0.1	0.2	0.5	1	2.5
丙氨酸	0.1	0.2	0.5	1	2.5
脯氨酸	0.1	0.2	0.5	1	2.5
酪氨酸	0.1	0.2	0.5	1	2.5
缬氨酸	0.1	0.2	0.5	1	2.5
蛋氨酸	0.1	0.2	0.5	1	2.5
胱氨酸	0.05	0.1	0.25	0.5	1.25
异亮氨酸	0.1	0.2	0.5	1	2.5
亮氨酸	0.1	0.2	0.5	1	2.5
苯丙氨酸	0.1	0.2	0.5	1	2.5
赖氨酸	0.1	0.2	0.5	1	2.5

### 样品检测

将处理后的样品，按照实验条件进行检测，外标法测定游离氨基酸的含量。

名称	摩尔质量 (g/mol)	原样稀释倍数	检测含量 (mM/L)	原样含量 (mM/L)	含量 (g/L)
门冬氨酸	133.1	312.5 倍 (取 0.8mL 定容至 100mL, 取 2mL 加前处 理试剂 3mL)	0.34	106.25	14.14
谷氨酸	147.13		0.44	137.5	20.23
丝氨酸	105.09		0.56	175	18.39
甘氨酸	75.067		0.39	121.87	9.15
组氨酸	155.15		ND	ND	ND
精氨酸	174.2		ND	ND	ND

苏氨酸	119.12		0.21	65.63	7.82
丙氨酸	89.093		0.22	68.75	6.13
脯氨酸	115.13		0.31	96.875	11.15
酪氨酸	181.19		ND	ND	ND
缬氨酸	117.15		0.19	59.375	6.96
蛋氨酸	149.21		ND	ND	ND
胱氨酸	240.3		ND	ND	ND
异亮氨酸	131.17		0.09	28.125	3.69
亮氨酸	131.17		0.01	3.125	0.41
苯丙氨酸	165.19		0.02	6.25	1.03
赖氨酸	146.19		0.08	25	3.65
游离氨基酸 总含量 (g/L)	102.75				

### 实验总结

本文参考 NY/T1975-2010，建立了柱前衍生-液相色谱法测定水溶肥料中游离氨基酸含量的方法。实验表明，该方法样品分离度好，重复性良好，而且结果准确，可满足标准的需求，供相关人员参考。

