

土壤氨基糖测定方法

(液相色谱)

一、所需材料及试剂：

- A. 水解管（四氟防爆管）
- B. 不锈钢试管架
- C. 氮吹小瓶
- D. 瓶口分液器
- E. 涡旋振荡器
- F. 针式过滤器
- G. 一次性 2 ml 灭菌注射器
- H. 1 ml、5 ml 移液枪
- I. 2 ml 液相进样小瓶

二、试剂配制

6 M HCl: 量取 496 ml 分析纯 (AR) 浓盐酸，定容至 1 L 容量瓶

流动相 A: 配制甲醇：超纯水体积为 50%：50%的甲醇溶液

流动相 B: 以 1 L 为例，称取 2.941 g 二水合柠檬酸钠和 0.3281 g 无水乙酸钠，溶解于 1 L 超纯水中，使用浓度为 6 M HCl 调节 pH 为 5.30；随后使用孔径为 0.45 μm 水系滤膜过滤柠檬酸钠溶液；过滤完成后，用量筒准确量取 950 ml 柠檬酸钠溶液于流动相 B 储液瓶中，再分别加入 20 ml 色谱柱甲醇，以及 30 ml 色谱纯四氢呋喃；混合均匀后于超声清洗机中超声脱气 5 min 备用。

流动相 C: 色谱纯甲醇

流动相 D: 超纯水

硼酸缓冲液: 称取 25.0 g 硼酸于烧杯中，加入 900 ml 超纯水溶解，使用浓度为 10 M 的 NaOH 或 50% 的 KOH 将 pH 值调节至 10.5 或 11.0，定容至 1 L，配制成浓度为 0.4 M 的硼酸缓冲液。4℃ 下可保存 1 年

还原剂: 使用 1 ml 移液枪准确移取 0.25 ml 的 2-巯基乙醇 (2-mercaptoethanol,

轻拿轻放，味道很大！）于棕色小瓶中，加入 10 ml 硼酸缓冲液，涡旋震荡均匀，避光保存（一周配一配）

衍生剂 OPA: 准确称取 5 mg (0.0050 g) 邻苯二甲醛于棕色小瓶中，依次加入 0.4 ml 甲醇、0.4 ml 还原剂，以及 8 ml 硼酸缓冲液，涡旋震荡均匀，避光保存（2-3 天一配最佳）

氨基糖标准母液: 准确称取 50 mg (0.0500 g) 的氨基葡萄糖盐酸盐、氨基半乳糖盐酸盐和甘露糖胺盐酸盐标准品，以及 5 mg (0.0050 g) 的胞壁酸盐酸盐标准品，用超纯水溶解并定容至 50 mL，配制成氨基糖葡萄糖、氨基糖半乳糖和甘露糖胺浓度为 1000 mg/L；胞壁酸浓度为 100 mg/L 的标准母液。 -18℃ 下保存

氨基糖工作曲线: 使用梯度稀释法，配制成浓度分别为 1.0/0.10、2.5/0.25、5.0/0.50、10.0/1.00、15.0/1.50、20.0/2.00、25.0/2.50 和 50.0/5.00 mg/L (ppm) 的工作曲线

三、提取步骤:

- A. 准确称取 0.5000 g（植物和海岛样品 0.1000-0.2000 g）过筛（< 2 mm）风干土壤于水解管中；
- B. 用瓶口分液器向水解管中加入 10 ml 6 M HCl，涡旋震荡均匀；
- C. 将水解管置于 105℃ 烘箱中 6 h（植物样品 3 h），结束后取出，涡旋震荡均匀，静置过夜；
- D. 水解液冷却至室温后，用移液枪吸取 0.5 ml 上清液于氮吹小瓶中，氮吹仪水浴（40 ~ 45℃）吹干；
- E. 氮吹结束后向氮吹小瓶中加入 0.5 ml 超纯水，溶解析出物，涡旋震荡均匀，继续纯氮吹干；
- F. 再次加入 2 ml 超纯水，溶解氮吹小瓶中的析出物，涡旋震荡均匀；
- G. 使用针式过滤器过滤提取液，置于 2 ml 液相进样小瓶，-18℃（4℃ 冰箱亦可）保存，待上机测定。

四、上机测定:

直接调用“氨基糖”文件夹下的测定方法

- A. 流动相: A、B、C、D 四种流动相均会用到, 其中 A、B 两种流动相用于载液分离不同的氨基糖组分, C 和 D 两种流动相用于清洗色谱柱 (建议每进样 50 个左右清洗一次色谱柱)

- B. 泵模块: 流速 1.5 ml/min

- C. 自动进样器: 进样量 10 μ l

衍生程序: 用户自定义程序

试剂 A: RE1 (RE1 位置放置的是衍生剂 OPA, 每日一换)

命令: 1) UdpDraw Air, 1 [μ l], GlobalSpeed, GlobalHeright
2) UdpDraw ReagentAVial, 5 [μ l], GlobalSpeed, GlobalHeright
3) UdpDraw RampleAVial, 3 [μ l], GlobalSpeed, GlobalHeright
4) UdpDraw Air, 8 [μ l], GlobalSpeed, GlobalHeright
5) UdpMoveSyringe Unload=8 [μ l], SyringeSpeed=GlobalSpeed
6) UdpMoveSyringe load=8 [μ l], SyringeSpeed=GlobalSpeed
7) UdpMoveSyringe Unload=8 [μ l], SyringeSpeed=GlobalSpeed
8) UdpMoveSyringe load=8 [μ l], SyringeSpeed=GlobalSpeed
9) UdpMoveSyringe Unload=8 [μ l], SyringeSpeed=GlobalSpeed
10) UdpMoveSyringe load=8 [μ l], SyringeSpeed=GlobalSpeed
11) UdpMoveSyringe Unload=8 [μ l], SyringeSpeed=GlobalSpeed
12) UdpMoveSyringe load=8 [μ l], SyringeSpeed=GlobalSpeed
13) UdpMoveSyringe Unload=8 [μ l], SyringeSpeed=GlobalSpeed
14) UdpMoveSyringe load=8 [μ l], SyringeSpeed=GlobalSpeed
15) UdpMoveSyringe Unload=8 [μ l], SyringeSpeed=GlobalSpeed
16) UdpMixWait 120 [s]
17) UdpInjectMarker
18) UdpInjectValve Inject
19) UdpSyringeValve Waste

- 20) UdpMoveSyringeHome GlobalSpeed
- 21) UdpDraw Wash, 100 [μl], GlobalSpeed,
GlobalHeight
- 22) UdpDispense Drain, 100 [μl], GlobalSpeed,
GlobalHeight

D. 柱温箱: 35°C, C18 反相柱

E. 检测器: 荧光检测器, 激发波长 330 nm, 发射波长 445 nm