

柱前在线衍生-高效液相色谱法测定土壤中的氨基糖

朱桃玉, 金燕, 刘晓达, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司

关键词:

氨基糖; 在线衍生; 高效液相色谱法

目的

建立了高效液相色谱法-柱前在线衍生结合荧光检测器分析测定土壤中的氨基糖分析方法, 该方法稳定性好, 灵敏度高, 操作简单, 是用来分析土壤环境中氨基糖含量的理想方法。

概述

碳水化合物约占土壤有机质总量的10%~20%, 是土壤中易降解的有机成分之一。碳水化合物的含量和特性不仅影响土壤微生物活性, 而且与土壤结构形成密切相关, 因而对土壤环境质量和土壤中物质转化和循环有着重要的影响。目前, 碳水化合物的含量和特性已成为土壤有机质研究中一项重要指标和主要对象。氨基糖占到土壤有机氮5~12%。土壤中以氨基葡萄糖和胞壁酸为代表的氨基糖聚合物是土壤微生物细胞壁残留物, 是由土壤微生物合成的, 它在土壤的组成和含量具有相对的稳定性, 同时土壤氨基糖具有异源性, 其变化反映微生物对土壤有机质循环与转化的相对贡献。

国内外针对土壤环境中氨基糖的分析测定展开了大量的研究。常用的氨基糖分析方法有气相色谱法、液相色谱法和红外光谱法, 所用前处理和检测技术各异。气相色谱法前处理过程繁琐并且需要衍生化处理, 而红外光谱法虽具有结构定性方面的优势, 但灵敏度较低。本文采用反相高效液相色谱法, 利用自动进样器用户模式进行在线OPA衍生后进入荧光检测器分析测定, 能够同时检测氨基葡萄糖、氨基半乳糖、氨基甘露糖和胞壁酸, 方法稳定, 灵敏度高, 非常适合土壤环境中氨基糖的含量测定。

实验部分

仪器

Ultimate 3000液相色谱系统, 包括带脱气单元的低压四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、荧光检测器以及变色龙色谱数据处理系统。具体的仪器型号如下:

LPG-3400SD Pump

WPS-3000 Sampler

TCC-3000 Column Compartment

FLD-3100 Detector

Chromleon 7.2.9 CDS

试剂

甲醇(色谱纯, Fisher Scientific)、四氢呋喃(色谱纯, Sigma)、50%氢氧化钠(extra pure, 上海安谱)、硼酸(分析纯, 天津市大茂化学试剂厂)、柠檬酸钠(分析纯, 天津市大茂化学试剂厂)、乙酸钠(分析纯, Sigma), 水为超纯水机制备(Thermo Scientific)。

2-巯基乙醇(2-mercaptoethanol)、邻苯二甲醛(Phthalaldehyde)

,OPA) 以及标准品葡萄糖胺盐酸盐 (D-(t)-glucosamine (GlcN) hydrochloride), 半乳糖胺盐酸盐 (D-(t)-galactosamine (GalN) hydrochloride), 甘露糖胺盐酸盐 (D-(t)-mannosamine (ManN) hydrochloride), 胞壁酸 (muramic acid (MurN)) 都是来源于Sigma公司。

标准品溶液配制

分别称取GlcN、GalN、ManN标准品适量, 用水配制成浓度为1 mg/mL的储备液。MurN的储备液的浓度为0.1 mg/mL。分别移取GlcN、GalN、ManN和MurN储备液适量, 用水逐级稀释配制成浓度序列为1、2.5、5、10、15、20和25 µg/mL, 其中MurN浓度序列为0.1、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0和2.5 µg/mL用于绘制标准曲线。

衍生化试剂配制

0.4 mol/L硼酸缓冲溶液配制

称取25 g 硼酸, 加入900 mL水溶解, 然后用50%NaOH溶液调节pH到11, 最后用水稀释到1 L。该溶液4°C保存12个月。

巯基乙醇还原溶液配制

移取2.5 mL 2-巯基乙醇到100 mL硼酸缓冲溶液。该溶液4°C避光保存6个月。

OPA衍生溶液配制

称取5 mg OPA到棕色瓶中, 用400 µL甲醇溶解后, 加入400 µL巯基乙醇溶液, 最后加入8 mL硼酸缓冲溶液混匀。该溶液4°C避光保存7天。

衍生过程

- 1、启动进样器的用户模式。(InjectMode=UserProg)
- 2、定义衍生试剂OPA位置。(Reagent A Vial=RE1)
- 3、吸取1 µL气泡。(UdpDraw From=Air, Volume=1.000)
- 4、吸取5 µL OPA衍生试剂。(UdpDraw, From=ReagentAVial, Volume=5.000)
- 5、吸取3 µL样品溶液。(UdpDraw, From= SampleVial, Volume=3.000)
- 6、吸取8 µL气泡。(UdpDraw From=Air, Volume=8.000; UdpMoveSyringe Unload=8.000)
- 7、混匀, 反复五次。(UdpMoveSyringe load=8.000; UdpMoveSyringe Unload=8.000)
- 8、衍生2分钟。(UdpMixWait, Duration=120)
- 9、进样。(UdpInjectMarker, UdpInjectValve, Position=Inject)
- 10、注射器复原。(UdpSyringeValve, Position=Waste; UdpMoveSyringeHome)
- 11、清洗。(UdpDraw, From=Wash, Volume=100.000; UdpDispense To=Drain, Volume=100.000)

样品前处理

称取约0.5 g风干过筛土于水解管中, 加入10 mL 6 mol/L盐酸, 在烘箱中105°C放置6h。待水解液冷却至室温后, 摇匀溶液静置10 min。取2 mL上清液于进样小瓶中加入2 mL纯水, 用氮气吹干。再加入2 mL水涡旋后离心, 取上清液过膜后上机测试。

色谱条件

色谱柱: Hypersil Gold aQ 4.6 mm×150 mm 5.0 µm (PN: 25305-154630)

流动相A: 柠檬酸缓冲溶液/甲醇/四氢呋喃=950/20/30, 柠檬酸缓冲溶液为10 mM柠檬酸钠和4 mM乙酸钠, 用HCl调节到pH为5.3

流动相B: 甲醇/水=50/50

检测器: FLD, 灵敏度1, 激发波长330 nm, 发射波长445 nm.

柱温: 35 °C

梯度条件见表1。

表1. 梯度洗脱条件

Time(min)	A%	B%
0	95	5
19	95	5
21	20	80
24	20	80
25	95	5
30	95	5

结果与讨论

1、GlcN、GalN、ManN和MurN的标准色谱图, 四种物质的峰形较好, 分离度均大于1.5。

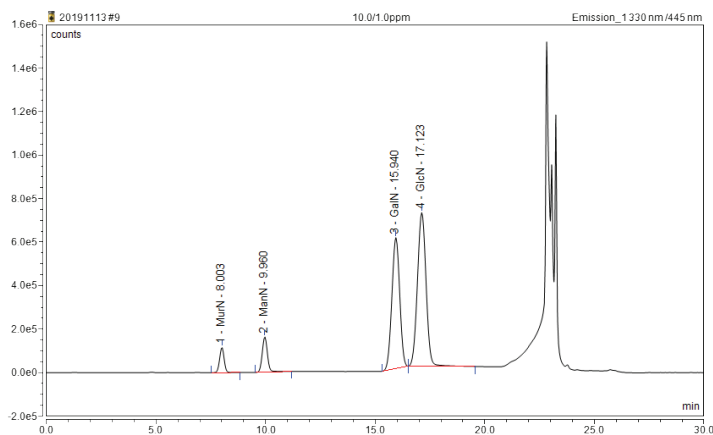


图1. 10 µg/mL GlcN, GalN, ManN和1 µg/mL MurN (出峰顺序分别为MurN, ManN, GalN, GlcN)

2、标准曲线测定结果

ManN、GalN和GlcN三种氨基糖用于绘制标准工作曲线的浓度区间为1-25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，MurN的标准曲线浓度区间为0.1-2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，每个浓度连续进两针，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标绘制标准曲线，见图2，线性数据见表1。四种物质的线性均良好， R^2 均大于0.996。

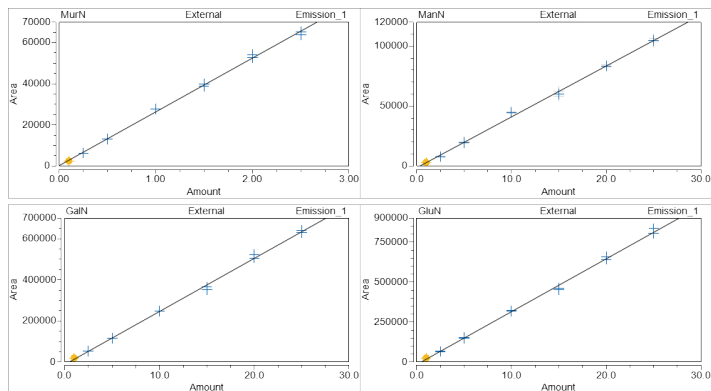


图2. MurN、ManN、GalN和GlcN的标准曲线

表2. 线性数据

Ret. Time min	Peak Name	Cal. Type	Points	Coeff. Det	C0(offset)	C1(Slope)
8.253	MurN	Lin, WithOffset, Avg	7	0.9987	255.2	26162.2
10.240	ManN	Lin, WithOffset, Avg	7	0.9979	-1388.3	4245.6
16.450	GalN	Lin, WithOffset, Avg	7	0.9987	-11820.8	25843.6
17.700	GlcN	Lin, WithOffset, Avg	7	0.9986	-14950.8	33070.1

实际样品分析

运用该方法对多批土壤样品进行前处理后上机分析测定，截取其中若干样品色谱图（图3）。从图中可以看出，样品中MurN、ManN、GalN和GlcN四种物质分离度好，且周围没有其余杂质干扰，非常适合进行定量分析。

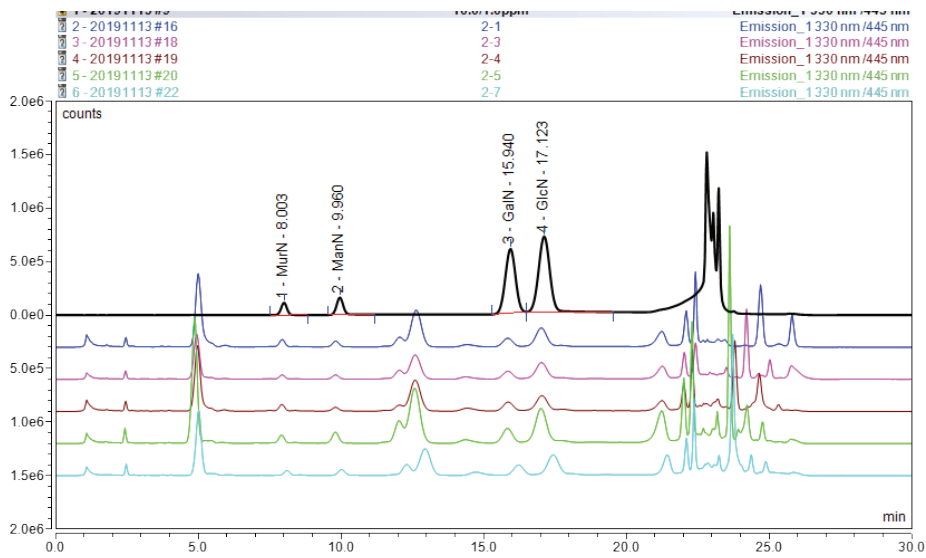


图3. 土壤样品中MurN、ManN、GalN和GlcN的分析测定

结论

本文用 OPA柱前在线衍生结合荧光检测器测定氨基葡萄糖、氨基半乳糖、氨基甘露糖和胞壁酸含量，分离效果好、灵敏度高，操作简单、方法稳定性和抗干扰能力强，非常适合土壤环境中氨基糖的分析测定。



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com