

DOI: 10.13758/j.cnki.tr.2023.05.027

杨洋, 张心昱, 张应华, 等. 高效液相色谱分析土壤氨基糖的质量控制方法. 土壤, 2023, 55(5): 1152–1159.

高效液相色谱分析土壤氨基糖的质量控制方法^①

杨洋^{1,4}, 张心昱^{2,3*}, 张应华², 于颖超^{2,3}, 董欣妮²

(1 河北建筑工程学院市政与环境工程系, 河北张家口 075000; 2 中国科学院地理科学与资源研究所生态系统网络观测与模拟重点实验室, 北京 100101; 3 中国科学院大学资源与环境学院, 北京 100101; 4 河北省水质工程与水资源综合利用重点实验室, 河北张家口 075000)

摘要: 利用邻苯二甲醛 (OPA) 柱前在线衍生-高效液相色谱法测定了土壤中 4 种氨基糖, 即胞壁酸 (MurN)、甘露糖 (ManN)、氨基半乳糖 (GalN) 和氨基葡萄糖 (GluN) 的含量, 并从样品出峰、理论塔板数、信噪比、检出限、定量限、样品的重复性、标准样品的线性和加标回收率方面评估了检测过程中仪器和方法的灵敏度、精密度和准确度。结果表明: 检测过程中, 4 种氨基糖的出峰先后顺序为胞壁酸、甘露糖、氨基半乳糖和氨基葡萄糖; 4 种氨基糖的色谱峰峰形好, 相邻两峰的分度度 >1.5 , 相邻两峰能够完全分离; 理论塔板数 $>2\ 000$, 色谱柱的柱效高; 胞壁酸、甘露糖、氨基半乳糖和氨基葡萄糖的仪器检出限分别为 0.030、0.300、0.150 和 0.150 $\mu\text{mol/L}$, 仪器定量限分别为 0.100、1.000、0.500 和 0.500 $\mu\text{mol/L}$, 方法检出限分别为 0.010、1.500、0.100 和 0.100 $\mu\text{mol/L}$, 方法定量限分别为 0.030、5.000、0.300 和 0.300 $\mu\text{mol/L}$; 除 0~10 cm 以下土层中的甘露糖外, 其他土壤样品中氨基糖的信噪比均 >10 , 仪器和方法的灵敏度高; 氨基糖样品含量的重复性 (标准样品平行样、土壤样品平行样和土壤样品重复样的相对标准偏差均 $<5\%$) 较好, 仪器和方法的精密度高; 标准样品的线性 ($R^2>0.997\ 0$) 良好, 空白加标回收率和土壤基质加标回收率为 80%~94%, 仪器和方法的准确度较高。总之, 利用 OPA 柱前在线衍生-高效液相色谱法测定土壤氨基糖含量的分析方法操作简单、灵敏度高, 能够精确地测定土壤中的氨基糖含量。

关键词: OPA 柱前在线衍生; 微生物残体; 灵敏度; 精密性; 准确度

中图分类号: S151.9+5 **文献标志码:** A

Quality Control for Determining Amino Sugar Contents in Soil by High Performance Liquid Chromatography

YANG Yang^{1,4}, ZHANG Xinyu^{2,3*}, ZHANG Yinghua², YU Yingchao^{2,3}, DONG Xinni²

(1 Department of Municipal and Environmental Engineering, Hebei University of Architecture, Zhangjiakou, Hebei 075000, China; 2 Key Laboratory of Ecosystem Network Observation and Modeling, Institute of Geographic Sciences and Natural Resources Research, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 3 College of Resources and Environment, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 4 Hebei Key Laboratory of Water Quality Engineering and Comprehensive Utilization of Water Resources, Zhangjiakou, Hebei 075000, China)

Abstract: Four amino sugars, namely, muramic acid (MurN), mannosamine (ManN), galactosamine (GalN) and glucosamine (GluN), in soil were determined by ortho-phthalaldehyde (OPA) pre-column derivatisation-high performance liquid chromatography (HPLC). The sensitivity, precision and accuracy of the instrument and method were tested from chromatographic peaks, theoretical plates, signal-noise (S/N) ratio, limits of detection and quantification, sample content repeatability, standard linearity, and recovery. The results showed that the chromatographic peak orders of the four amino sugars were MurN, ManN, GalN and GluN. The chromatographic peak shapes were good and the resolutions of each two adjacent peaks were >1.5 , indicating that the two adjacent peaks were completely separated. Theoretical plates were $>2\ 000$, indicating high chromatographic column efficiency. The instrument detection limits of MurN, ManN, GalN and GluN were 0.030, 0.300, 0.150 and 0.150 $\mu\text{mol/L}$, the instrument quantitative limits were 0.100, 1.000, 0.500 and 0.500 $\mu\text{mol/L}$, the method detection limits were 0.010, 1.500, 0.100 and 0.100 $\mu\text{mol/L}$, and the method quantitative limits were 0.030, 5.000, 0.300 and 0.300 $\mu\text{mol/L}$, respectively.

①基金项目: 国家重点研发计划重点专项(2019YFE0126500), 中国科学院仪器设备功能开发技术创新项目(E1R10150Y)和河北省高等学校科学技术研究项目(BJK2022016)资助。

* 通讯作者(zhangxy@igsrr.ac.cn)

作者简介: 杨洋(1991—), 女, 黑龙江哈尔滨人, 博士, 研究方向为生态系统生态学。E-mail: yangyang_20220112@163.com

In addition to ManN in the soil below 10 cm, *S/N* ratios of the amino sugars amount were all >10, indicating high sensitivity of the instrument and method. The relative standard deviations of the amino sugar amount in the parallel standard samples, parallel soil samples and repeated soil samples were all <5%, indicating high precision of the instrument and method. The R^2 values of the standard curve were >0.997 0, and the recovery rates of blank and soil substrate were between 80% and 94%, indicating high accuracy of the instrument and method. In conclusion, the method for the determination of soil amino sugar content by OPA pre-column derivatisation-HPLC, which is simple in operation and high in sensitivity, could accurately determine the contents of amino sugar in soils.

Key words: OPA pre-column derivatisation; Microbial necromass; Sensitivity; Precision; Accuracy

氨基糖在土壤有机碳和有机氮含量中的占比分别为 2%~5%^[1]和 5%~12%^[2-3]。由于植物不含氨基糖,土壤动物只向土壤贡献少量的氨基糖,因此土壤中的大部分氨基糖被认为主要来自微生物^[4-5]。氨基糖作为微生物死亡残体的生物标志物被广泛测定。目前可被定量分析测定的土壤氨基糖主要有 4 种:胞壁酸 (MurN)、甘露糖 (ManN)、氨基半乳糖 (GalN) 和氨基葡萄糖 (GluN)^[6-8]。其中,胞壁酸和氨基葡萄糖是微生物细胞壁残留物,胞壁酸只存在于细菌细胞壁中,氨基葡萄糖来自于细菌和真菌细胞壁,而甘露糖和氨基半乳糖的来源尚不清楚^[6, 9-10]。氨基糖具有异源性,可作为微生物残留物标识物用于评估土壤中不同微生物死亡残体有机碳的含量。Appuhn 和 Joergensen^[5]确定了将真菌氨基葡萄糖转化为真菌残体碳的平均转化系数为 9,将细菌胞壁酸转化为细菌残体碳的平均转化系数为 45。由于土壤微生物残体碳的周转时间比微生物活体碳更长,对土壤中稳定性碳库的形成具有重要贡献^[11-12]。因此,精确地测定土壤氨基糖含量对于评估微生物对土壤有机碳的贡献具有重要意义。

国内外针对土壤氨基糖含量的分析测定方法开展了大量的研究。早期分析氨基糖的方法有电化学法^[13]、光度法^[14]和电泳法^[15]等。这些方法由于受样品杂质影响大,对复杂环境样品分析受限。目前,常用的分析方法有气相色谱法^[7]、液相色谱法^[8, 16]、红外光谱法^[17]和气质联用法^[18]。这些方法所采用的前处理方法和检测技术各不相同。气相色谱法前处理过程繁琐,且需要手动进行衍生化处理。红外光谱法虽具有结构定性方面的优势,但灵敏度较低^[9, 19]。气质联用法具有定性、可靠性和灵敏度高的特点,但是由于成本太高,因而没有被广泛应用。高效液相色谱法采用自动进样器用户模式进行邻苯二甲醛 (OPA) 在线衍生的方法,操作简单方便^[16]。Indorf 等^[8]分析了激发波长、OPA 反应时间、四氢呋喃浓度和流动相 pH 对氨基糖分离的影响,对高效液相色谱法进行

优化,使高效液相色谱法具有检出限低、灵敏度和准确度高等特点,从而使该方法得以广泛应用。

关于土壤氨基糖的分析测定多从检出限、定量限、标准曲线的线性、样品的重复性、加标回收率这几个方面考虑方法的质量控制。例如,Zhang 和 Amelung^[7]报道了气相色谱法分析氨基糖的仪器定量限、标准样品线性、样品含量的相对标准偏差和土壤基质加标回收率。Dick 等^[20]和 Zhang 等^[17]报道了红外光谱法分析氨基糖的标准样品线性。近年来,国内根据 Indorf 等^[8]的方法,建立了高效液相色谱分析土壤氨基糖的方法。一种分析方法的好坏不仅要考虑仪器的灵敏度、精密度和准确度,同时也要考虑包括前处理在内的方法的灵敏度、精密度和准确度^[21]。Indorf 等^[8]通过仪器检出限和定量限检验了高效液相色谱法分析氨基糖样品过程中仪器的灵敏度,通过标准样品线性检验了仪器的准确度,通过空白加标回收率检验了仪器和方法的准确度,但是未见包括前处理在内的整个氨基糖分析流程中仪器和方法精密度的质量控制。

本研究利用 OPA 柱前在线衍生-高效液相色谱法结合荧光检测器分析红壤剖面中具有不同氨基糖含量的土壤样品^[22],利用信噪比、检出限、定量限反映仪器和方法的灵敏度,利用标准样品平行样、土壤样品平行样和土壤样品重复样的重复性反映仪器和方法的精密密度,利用标准样品的线性和加标回收率反映仪器和方法的准确度,以为 OPA 柱前在线衍生-高相液相色谱法测定土壤氨基糖含量的质量控制提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器和色谱条件

高效液相色谱仪 (Ultimate 3000, Thermo Fisher, USA), 包括带脱气单元的低压四元梯度泵 (LPG-3400SD Pump)、自动进样器 (WPS-3000 Sampler)、柱温箱 (TCC-3000 Column Compartment)、荧光检测器 (FLD-3100 Detector) 以及变色龙色谱

数据处理系统 (Chromleon 7.1.0.898 CDS)。

4 种氨基糖的分离在十八烷基硅烷化硅胶柱 (Acclaim120 C18; 150 mm × 4.6 mm, 5 μm; Thermo Fisher Scientific, USA) 中进行。柱温箱的温度设置为 35 °C, 荧光检测器的灵敏度设为 1, 激发波长和发射波长分别设置为 330 nm 和 445 nm, 流通池温度设置

为 45 °C^[8]。

由于需要高进样精度和有效的外部针头清洗以消除残留, 因此使用专为自动柱前衍生化而设计的自动进样器。衍生过程中, 启动自动进样器的用户模式 (表 1), 自动进样器会自动加入 5 μL OPA 衍生溶液和 3 μL 氨基糖样品, 衍生化 120 s 后进样。

表 1 高效液相色谱仪测定土壤氨基糖含量自动进样器的用户自定义程序

序号	命令	参数
1	UdpDraw	Air, 1 [μL], GlobalSpeed, GlobalHeight
2	UdpDraw	ReagentAVial, 5 [μL], GlobalSpeed, GlobalHeight
3	UdpDraw	SampleVial, 3 [μL], GlobalSpeed, GlobalHeight
4	UdpDraw	Air, 8 [μL], GlobalSpeed, GlobalHeight
5	UdpMoveSyringe	Unload=8 [μL], SyringeSpeed=GlobalSpeed
6	UdpMoveSyringe	Load=8 [μL], SyringeSpeed=GlobalSpeed
7	UdpMoveSyringe	Unload=8 [μL], SyringeSpeed=GlobalSpeed
8	UdpMoveSyringe	Load=8 [μL], SyringeSpeed=GlobalSpeed
9	UdpMoveSyringe	Unload=8 [μL], SyringeSpeed=GlobalSpeed
10	UdpMoveSyringe	Load=8 [μL], SyringeSpeed=GlobalSpeed
11	UdpMoveSyringe	Unload=8 [μL], SyringeSpeed=GlobalSpeed
12	UdpMoveSyringe	Load=8 [μL], SyringeSpeed=GlobalSpeed
13	UdpMoveSyringe	Unload=8 [μL], SyringeSpeed=GlobalSpeed
14	UdpMoveSyringe	Load=8 [μL], SyringeSpeed=GlobalSpeed
15	UdpMoveSyringe	Unload=8 [μL], SyringeSpeed=GlobalSpeed
16	UdpMixWait	120 [s]
17	UdpInjectMarker	
18	UdpInjectValue	Inject
19	UdpSyringeValue	Waste
20	UdpMoveSyringeHome	GlobalSpeed
21	UdpDraw	Wash, 100 [μL], GlobalSpeed, GlobalHeight
22	UdpDispense	Drain, 100 [μL], GlobalSpeed, GlobalHeight

流动相由 A (甲醇/超纯水, 1/1, V/V) 和 B (柠檬酸缓冲溶液/甲醇/四氢呋喃, 95/2/3, V/V/V) 组成^[23]。氨基糖分离过程中流动相 A 和流动相 B 的体积比为 5/95, 流速为 1.5 mL/min, 流动相的梯度洗脱条件 (表 2) 参考 Mou 等^[23]。

表 2 流动相的梯度洗脱条件

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

1.2 试剂

供试试剂: 甲醇, 色谱纯, 购自 Fisher Scientific

公司; 硼酸、50% 的氢氧化钠、二水合柠檬酸三钠、无水乙酸钠、盐酸, 均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司; 四氢呋喃 (色谱纯)、2-巯基乙醇、邻苯二甲醛 (OPA) 和 4 种氨基糖标准样品胞壁酸、甘露糖胺盐酸盐、半乳糖胺盐酸盐和葡萄糖胺盐酸盐, 均购买自 Sigma 公司。

1.3 溶液的配制

所用溶液均采用超纯水机 (Integral 10, 默克 Milli-Q, USA) 制备的超纯水配制。将 25 g 硼酸溶解于 900 mL 超纯水中, 用 50% 的氢氧化钠将溶液 pH 调节至 11, 最后用超纯水定容至 1 L 制备 0.4 mol/L 硼酸缓冲溶液。将 2.5 mL 2-巯基乙醇加到 100 mL 硼酸缓冲溶液中混匀, 制备还原溶液。将 5 mg 邻苯二甲醛溶解于 0.4 mL 甲醇、0.4 mL 还原溶液和 8 mL 硼酸缓冲溶液中, 制备 OPA 衍生溶液。将 2.941 g 二

水合柠檬酸三钠和 0.328 1 g 无水乙酸钠溶解于 900 mL 超纯水中, 用 6 mol/L 盐酸调节 pH 至 5.3, 超纯水定容至 1 000 mL 制备柠檬酸缓冲溶液。

用十万分之一的天平分别称取 2.512 3 mg 胞壁酸和 21.563 0 mg 甘露糖胺盐酸盐、氨基半乳糖胺盐酸盐、氨基葡萄糖胺盐酸盐标准样品, 用超纯水配制成胞壁酸浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 和甘露糖、氨基半乳糖、氨基葡萄糖浓度为 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 的混合标准样品储备液。用超纯水将混合标准样品储备液逐级稀释配制成 7 个浓度序列, 其中胞壁酸的浓度为 0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{mol/L}$, 甘露糖、氨基半乳糖和氨基葡萄糖的浓度为 2、5、10、20、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.4 土壤样品采集

土壤样品采集于江西省中国科学院千烟洲亚热带森林生态系统观测研究站 (115°04' E, 26°44' N)。在马尾松 (*Pinus massoniana*) 人工林中设置一个 20 m \times 20 m 的样方, 在样方中间位置挖掘一个土壤剖面, 采集 0 ~ 10、10 ~ 20、20 ~ 40、40 ~ 80 cm 深度的土壤样品共 4 份。将新鲜土壤样品过 2 mm 筛, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 用于测定土壤氨基糖含量。

1.5 土壤样品前处理

土壤氨基糖测定的前处理方法参考 Appuhn 等^[16]。具体为: 称取 1 g 鲜土于水解管中, 加入 10 mL 6 mol/L 盐酸, 在烘箱中 105 $^{\circ}\text{C}$ 水解 6 h; 待水解液冷却至室温后, 摇匀溶液静置过夜; 取 1 mL 上清液于粗玻璃管中, 用氮吹仪 (N-Evap-112, Organomation, USA) 在氮气水浴 30 $^{\circ}\text{C}$ 吹干, 加入 1 mL 超纯水, 于氮气水浴再次吹干; 加入 2 mL 超纯水, 混匀后过 0.45 μm 滤膜, 该土壤氨基糖提取液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存待测。

1.6 氨基糖的定性方法

本研究利用含有 4 种氨基糖的混合标准样品进行定量分析。首先对胞壁酸浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 和甘露糖、氨基半乳糖、氨基葡萄糖浓度均为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的单标标准样品分别进样, 然后根据单标标准样品的保留时间确定混合标准样品以及土壤样品中胞壁酸、甘露糖、氨基半乳糖和氨基葡萄糖的出峰顺序和保留时间。

1.7 仪器和方法的灵敏度、精密度和准确度

标准样品和土壤样品出峰后, 通过理论塔板数确定色谱柱的柱效。通过相邻两峰的分度确定 4 种氨基糖色谱峰的分度情况。为了确定 4 种氨基糖的仪器检出限和定量限, 配制胞壁酸浓度为 0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 和甘露糖、氨基半乳糖、

氨基葡萄糖浓度为 0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 的混合标准样品。通过对每个浓度的标准样品连续进样 6 针, 选择浓度最低且信噪比 > 10 的标准样品 (经测试得, 浓度最低且信噪比 > 10 的胞壁酸为 0.2 $\mu\text{mol/L}$, 甘露糖为 10 $\mu\text{mol/L}$, 氨基半乳糖和氨基葡萄糖均为 5 $\mu\text{mol/L}$) 含量计算仪器检出限 (式 (1)) 和定量限 (式 (2))。通过对浓度最低且信噪比 > 10 的土壤样品 (本研究中, 信噪比 > 10 的最小浓度的胞壁酸、氨基半乳糖和氨基葡萄糖为 40 ~ 80 cm 土壤样品, 甘露糖为 0 ~ 10 cm 土壤样品) 连续进样 6 针, 利用氨基糖含量的标准差计算方法检出限 (式 (3)) 和定量限 (式 (4))。同时, 通过标准样品和土壤样品中氨基糖的信噪比, 检验仪器和方法的灵敏度^[24]。

$$\text{仪器检出限 } (\mu\text{mol/L}) = 3 \times M / \text{信噪比} \quad (1)$$

$$\text{仪器定量限 } (\mu\text{mol/L}) = 10 \times M / \text{信噪比} \quad (2)$$

$$\text{方法检出限 } (\mu\text{mol/L}) = 3 \times \text{SD} \quad (3)$$

$$\text{方法定量限 } (\mu\text{mol/L}) = 10 \times \text{SD} \quad (4)$$

式中: M 表示浓度最低且信噪比 > 10 的标准样品中氨基糖的含量; SD 表示浓度最低且信噪比 > 10 的土壤样品中氨基糖含量的标准差。

将每个土层的土壤样品分别称取 4 份, 作为土壤样品的重复样提取氨基糖, 计算土壤样品重复样中 4 种氨基糖样品含量的相对标准偏差 (式(5))。选取胞壁酸浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 和甘露糖、氨基半乳糖、氨基葡萄糖浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 的混合标准样品连续进样 6 针作为标准样品平行样, 分别从 0 ~ 10 cm 和 40 ~ 80 cm 深度样品中随机选取一个重复样, 连续进样 6 针, 分别作为高浓度和低浓度土壤样品平行样, 计算土壤样品平行样中 4 种氨基糖样品含量的相对标准偏差 (式(5))。通过标准样品平行样、土壤样品平行样和土壤样品重复样的重复性, 检验仪器和方法的精密度^[24-25]。

$$\text{相对标准偏差 } (\%) = \text{标准差} / \text{算数平均值} \times 100\% \quad (5)$$

利用胞壁酸的浓度为 0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{mol/L}$ 和甘露糖、氨基半乳糖、氨基葡萄糖的浓度为 2、5、10、20、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 的混合标准样品, 以标准样品的浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标分别绘制 4 种氨基糖的标准曲线, 每个浓度 3 个重复, 通过计算标准曲线的线性相关系数 R^2 值, 检验仪器的准确度。称取 8 份 1 g 的石英砂 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司) 代替土壤, 其中 4 份加入 0.5 mL 浓度为 15 $\mu\text{mol/L}$ 的胞壁酸和浓度为 150 $\mu\text{mol/L}$ 的甘露糖、氨基半乳糖和氨基葡

葡萄糖混合标准样品作为空白加标样品,另外 4 份不加任何试剂作为空白样品,计算氨基糖的空白加标回收率(式(6))。分别称取 8 份 1 g 的 0~10 cm 和 1 g 的 40~80 cm 土壤样品,其中 4 份加入 0.5 mL 胞壁酸浓度为 15 $\mu\text{mol/L}$ 和甘露糖、氨基半乳糖和氨基葡萄糖浓度为 150 $\mu\text{mol/L}$ 的混合标准样品作为土壤基质加标样品,另外 4 份不加任何试剂作为土壤基质空白样品,计算氨基糖的土壤基质加标回收率(式(6))。通过空白加标回收率和土壤基质加标回收率,检验包括前处理在内的整个分析流程中仪器和方法的准确度^[26]。

加标回收率 (%) = (加标样中测出的氨基糖含量 - 空白样中测出的氨基糖含量) / 加标量 \times 100% (6)

2 结果与讨论

2.1 氨基糖的定性结果

检测过程中 4 种氨基糖的出峰先后顺序为胞壁酸、甘露糖、氨基半乳糖和氨基葡萄糖,出峰保留时间分别为 8.5、10.8、17.6 和 18.9 min (图 1),这与 Indorf 等^[8]的研究中 4 种氨基糖的出峰先后顺序相同。本研

究所采用的激发波长、柱温、OPA 衍生剂的配制、衍生反应时间和流动相的 pH 以及空白加标回收率的测定均参考 Indorf 等^[8]的最优方案。为了减小缓冲盐溶液对色谱柱的伤害,延长色谱柱的寿命,本研究中减少了流动相 B 中柠檬酸缓冲液的比例,即将流动相 B 由 Indorf 等^[8]的柠檬酸缓冲液/甲醇/四氢呋喃体积比为 97.8/0.7/1.5 改为 95/2/3^[23]。4 种氨基糖完全分离所用的时间大约为 20 min,比 Indorf 等^[8]的结果延长约 1 min。4 种氨基糖的色谱峰峰形较好,胞壁酸、甘露糖、氨基半乳糖和氨基葡萄糖之间色谱峰的分度度分别为 4.91、9.54 和 1.53 (图 1),这符合国家药典委员会^[24]关于待测物质色谱峰与相邻色谱峰之间的分离度应 >1.5 的规定,表明相邻两种氨基糖的色谱峰能够完全分离。

2.2 仪器和方法的灵敏度

检测过程中,胞壁酸、甘露糖、氨基半乳糖和氨基葡萄糖的理论塔板数分别平均为 2 810、2 912、3 959 和 2 901 (表 3),表明本研究中色谱柱的柱效较高,符合国家药典委员会^[24]关于理论塔板数需

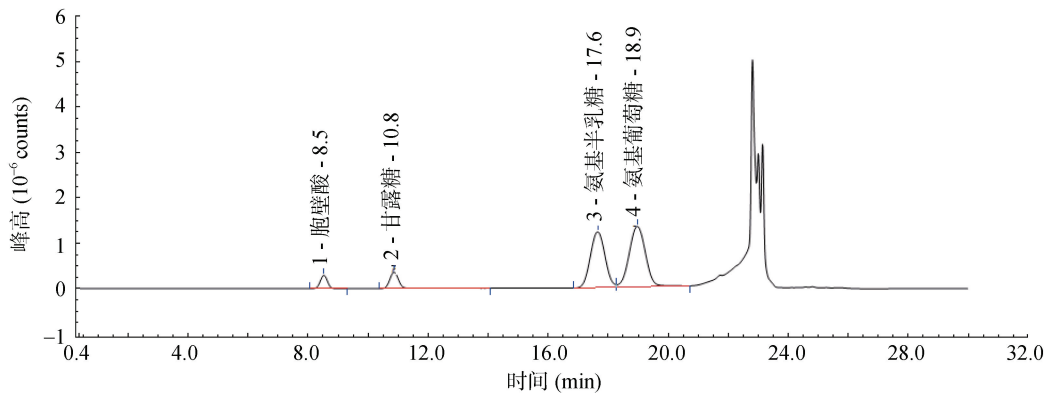


图 1 胞壁酸浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 和甘露糖、氨基半乳糖、氨基葡萄糖浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的混合标准样品出峰顺序

表 3 四种氨基糖的理论塔板数、信噪比、样品含量和重复土样的相对标准偏差 ($n=4$)

氨基糖	土样深度(cm)	理论塔板数	信噪比	样品含量($\mu\text{mol/L}$)	重复土样的相对标准偏差(%)
胞壁酸	0~10	3 431 \pm 58	37.9 \pm 1.8	1.775 \pm 0.026	1.45
	10~20	2 920 \pm 116	23.2 \pm 2.0	0.602 \pm 0.027	4.44
	20~40	2 650 \pm 73	20.7 \pm 1.4	0.352 \pm 0.013	3.65
	40~80	2 237 \pm 97	11.5 \pm 0.8	0.136 \pm 0.005	3.58
甘露糖	0~10	3 651 \pm 78	43.4 \pm 2.5	21.254 \pm 0.796	3.74
	10~20	3 101 \pm 145	4.3 \pm 0.3	4.351 \pm 0.176	4.05
	20~40	2 526 \pm 123	4.4 \pm 0.2	3.979 \pm 0.109	2.75
	40~80	2 369 \pm 150	4.2 \pm 0.3	3.912 \pm 0.145	3.69
氨基半乳糖	0~10	4 354 \pm 281	508.2 \pm 10.8	11.942 \pm 0.543	4.55
	10~20	3 873 \pm 71	16.3 \pm 0.9	3.976 \pm 0.157	3.95
	20~40	3 922 \pm 114	11.5 \pm 0.5	3.453 \pm 0.148	4.29
	40~80	3 686 \pm 283	31.1 \pm 0.8	2.476 \pm 0.121	4.87
氨基葡萄糖	0~10	3 486 \pm 85	1677.1 \pm 25.4	28.369 \pm 1.280	4.51
	10~20	2 781 \pm 124	154.7 \pm 5.5	8.036 \pm 0.226	2.81
	20~40	2 678 \pm 140	93.9 \pm 5.8	6.474 \pm 0.313	4.84
	40~80	2 658 \pm 101	34.3 \pm 1.0	3.912 \pm 0.121	3.10

>2 000 的规定。胞壁酸、甘露糖、氨基半乳糖和氨基葡萄糖的仪器检出限分别为 0.030、0.300、0.150 和 0.150 $\mu\text{mol/L}$, 仪器定量限分别为 0.100、1.000、0.500 和 0.500 $\mu\text{mol/L}$, 方法检出限分别为 0.010、1.500、0.100 和 0.100 $\mu\text{mol/L}$, 方法定量限分别为 0.030、5.000、0.300 和 0.300 $\mu\text{mol/L}$ (表 4)。本研究中, 胞壁酸、甘露糖、氨基半乳糖和氨基葡萄糖的仪器定量限分别相当于 0.02、0.18、0.09 和 0.09 $\mu\text{g/mL}$, 低于 Zhang 和 Amelung^[7]用气相色谱法测定的氨基糖胞壁酸为 10 $\mu\text{g/mL}$, 其他 3 种氨基糖为 20 $\mu\text{g/mL}$ 的仪器定量限, 也低于 Indorf 等^[8]报道的胞壁酸定量限为 0.13 $\mu\text{g/mL}$, 其他 3 种氨基糖为 0.90 $\mu\text{g/mL}$

的结果。

在所有供试土层样品中, 胞壁酸、氨基半乳糖和氨基葡萄糖 3 种氨基糖含量的信噪比均>10 (表 3), 这符合国家药典委员会^[24]和国家质量监督检验检疫总局^[25]的规定, 表明本研究中分析胞壁酸、氨基半乳糖和氨基葡萄糖时仪器和方法的灵敏度较高。对于甘露糖, 除 0~10 cm 土层深度的土壤样品外, 其他土层中甘露糖含量的信噪比均<10, 这与下层土壤中甘露糖含量较低有关, 而本研究中, 甘露糖的方法定量限为 5.000 $\mu\text{mol/mL}$ (表 4), 因此, 分析甘露糖含量低于 5.000 $\mu\text{mol/mL}$ 的土壤样品时, 需要进一步优化仪器和方法。

表 4 四种氨基糖样品的检出限、定量限、平行样的相对标准偏差以及加标回收率

氨基糖	仪器检出限 ($\mu\text{mol/L}$)	仪器定量限 ($\mu\text{mol/L}$)	方法检出限 ($\mu\text{mol/L}$)	方法定量限 ($\mu\text{mol/L}$)	标准样品平行样 的相对标准偏差(%)
胞壁酸	0.030	0.100	0.010	0.030	1.37
甘露糖	0.300	1.000	1.500	5.000	2.31
氨基半乳糖	0.150	0.500	0.100	0.300	2.46
氨基葡萄糖	0.150	0.500	0.100	0.300	2.43
氨基糖	0~10 cm 土样平行样的 相对标准偏差(%)	40~80 cm 土样平行样的 相对标准偏差(%)	空白加标 回收率 (%)	0~10 cm 土样 基质加标回收率 (%)	40~80 cm 土样 基质加标回收率 (%)
胞壁酸	0.87	2.17	90.62 \pm 1.23	86.64 \pm 4.12	81.65 \pm 1.79
甘露糖	0.50	1.77	81.47 \pm 1.00	88.15 \pm 2.86	82.94 \pm 3.46
氨基半乳糖	2.61	1.42	92.51 \pm 1.00	80.22 \pm 3.69	80.57 \pm 1.54
氨基葡萄糖	0.91	1.32	94.39 \pm 1.08	84.60 \pm 6.88	81.34 \pm 2.91

注: 标准样品平行样为胞壁酸浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 和甘露糖、氨基半乳糖、氨基葡萄糖浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 的混合标准样品; 除空白加标回收率和土壤基质加标回收率的 $n=4$ 以外, 其他数据的 $n=6$ 。

2.3 仪器和方法的精密度

本文以标准样品平行样、土壤样品平行样和土壤样品重复样的相对标准偏差反映方法的精密度^[24-25]。4 种氨基糖含量的相对标准偏差在 0.52%~4.87% (表 3 和表 4), 表明仪器和方法的精密度良好。在标准样品平行样和土壤样品平行样中 4 种氨基糖含量的相对标准偏差<3%, 虽略高于气相色谱法中标准样品平行样的相对标准偏差<2% 的结果, 但低于土壤样品平行样中样品含量的相对标准偏差 6.1%~10.9% 的结果^[7], 且符合国家质量监督检验检疫总局^[25]规定的相同条件下重复试验保留数据的相对标准偏差应 $\leq 3\%$ 的标准, 这表明仪器具有较高的精密度。而在土壤样品重复样中, 4 种氨基糖样品含量的相对标准偏差有所增加, 这受氨基糖前处理过程的影响。土壤样品重复样中样品含量的相对标准偏差<5%, 符合国家药典委员会^[24]关于重复试验数据的相对标准偏差应<5% 的规定, 表明本研究中仪器和方法的综合精

密度符合标准要求。

2.4 仪器和方法的准确度

本研究中, 胞壁酸、甘露糖、氨基半乳糖和氨基葡萄糖的标准曲线的线性相关系数 R^2 分别为 0.999 7、0.997 0、0.999 5 和 0.999 8 (图 2), 这与 Indorf 等^[8]的结果中标准曲线的线性相关系数 $r=0.998$ 的结果相当。Dick 等^[20]利用近红外光谱检测土壤总氨基糖氮含量的标准曲线 $R^2=0.90$ 。Zhang 等^[17]利用中红外光谱预测土壤中胞壁酸、氨基半乳糖和氨基葡萄糖的浓度, 以气相色谱法测量值为自变量, 中红外光谱预测值为因变量, 进行线性拟合后线性相关系数 $R^2>0.90$ 。因此, 本研究中高效液相色谱法测定土壤氨基糖的线性拟合结果良好, 能够对 0.2~20.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内的胞壁酸和 2~200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内的甘露糖、氨基半乳糖和氨基葡萄糖进行准确测定。

本研究中, 4 种氨基糖的空白样中胞壁酸、甘露

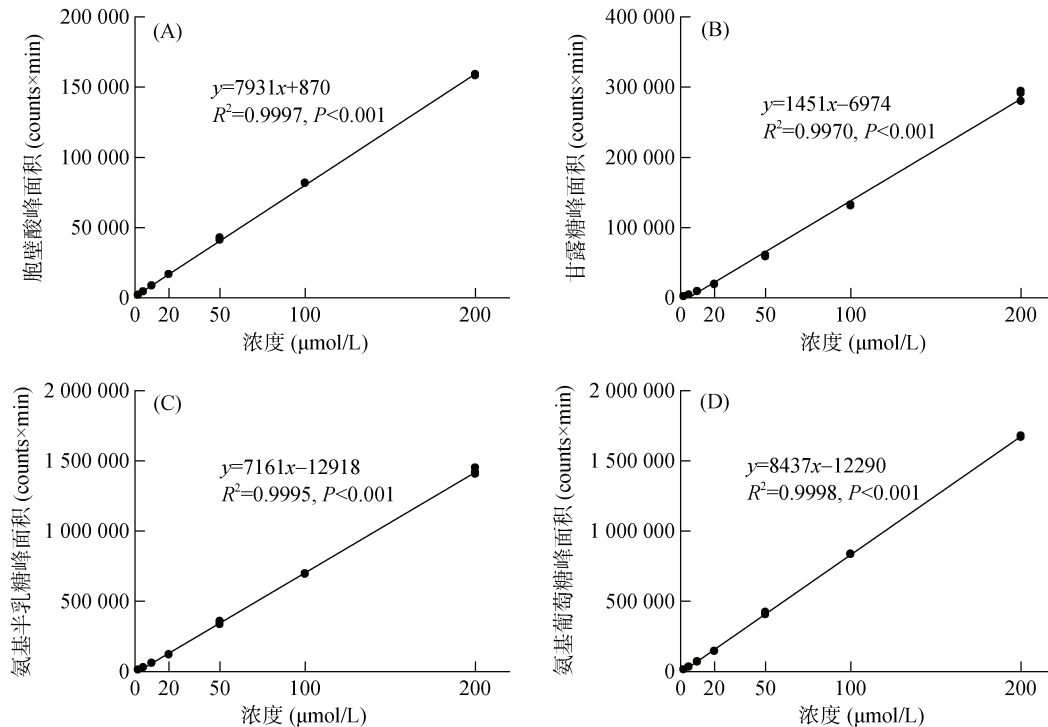


图 2 氨基糖的标准曲线

糖、氨基半乳糖和氨基葡萄糖均未检出,空白加标回收率分别为 91%、81%、93%、94%,土壤基质加标回收率在 80%~88%(表 4),这与 Zhang 和 Amelung^[7]利用气相色谱法分析氨基糖的土壤基质加标回收率为 86%~97%,以及 Indorf 等^[8]利用高效液相色谱法的分析结果中氨基糖的空白加标回收率介于 81%~115% 的结果相当,也符合中华人民共和国生态环境部^[26]关于有机物的加标回收率范围应在 70%~130% 的规定。因此,根据参考 Indorf 等^[8]的最优方案减少流动相中柠檬酸盐的比例后,本研究中分析土壤氨基糖的仪器和方法依旧具有较高的准确度。

3 结论

OPA 柱前在线衍生-高效液相色谱法检测 4 种氨基糖的出峰先后顺序为胞壁酸 (8.5 min)、甘露糖 (10.8 min)、氨基半乳糖 (17.6 min) 和氨基葡萄糖 (18.9 min),色谱峰峰形较好且分离度 >1.5 ,相邻两峰能够完全分离;理论塔板数 >2000 ,色谱柱的柱效较高;胞壁酸、甘露糖、氨基半乳糖和氨基葡萄糖的仪器检出限分别为 0.030、0.300、0.150 和 0.150 μmol/L,仪器定量限分别为 0.100、1.000、0.500 和 0.500 μmol/L,方法检出限分别为 0.010、1.500、0.100 和 0.100 μmol/L,方法定量限分别为 0.030、5.000、0.300 和 0.300 μmol/L;除 0~10 cm 深度以下土层中的甘

露糖外,其余土壤中氨基糖样品含量的信噪比均 >10 ,仪器和方法的灵敏度较高;标准样品平行样、土壤样品平行样以及土壤样品重复样中 4 种氨基糖样品含量的相对标准偏差 $<5\%$,仪器和方法都具有较高的精密密度。4 种氨基糖标准曲线的线性相关系数 $R^2>0.9970$,空白加标回收率和土壤基质加标回收率在 80%~94%,仪器和方法的准确度较高。可见,OPA 柱前在线衍生-高效液相色谱法测定土壤氨基糖含量操作简单,灵敏度、精密密度和准确度较高,是分析土壤氨基糖含量的合格方法。

致谢:感谢中国科学院千烟洲亚热带森林生态系统观测研究站对本研究野外工作的支持与帮助!

参考文献:

- [1] Joergensen R G, Meyer B. Chemical change in organic matter decomposing in and on a forest Rendzina under beech (*Fagus sylvatica* L.)[J]. Journal of Soil Science, 1990, 41(1): 17-21.
- [2] Amelung W, Zhang X, Flach K W, et al. Amino sugars in native grassland soils along a climosequence in North America[J]. Soil Science Society of America Journal, 1999, 63(1): 86-92.
- [3] He H B, Xie H T, Zhang X D. A novel GC/MS technique to assess ^{15}N and ^{13}C incorporation into soil amino sugars[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2006, 38(5): 1083-1091.

- [4] Dai X Y, Ping C L, Hines M E, et al. Amino sugars in Arctic soils[J]. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 2002, 33(5/6): 789–805.
- [5] Appuhn A, Joergensen R G. Microbial colonisation of roots as a function of plant species[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, 38(5): 1040–1051.
- [6] Amelung W, Brodowski S, Sandhage-Hofmann A, et al. Chapter 6 combining biomarker with stable isotope analyses for assessing the transformation and turnover of soil organic matter[M]//*Advances in Agronomy*. Amsterdam: Elsevier, 2008: 155–250.
- [7] Zhang X D, Amelung W. Gas chromatographic determination of muramic acid, glucosamine, mannosamine, and galactosamine in soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1996, 28(9): 1201–1206.
- [8] Indorf C, Dyckmans J, Khan K S, et al. Optimisation of amino sugar quantification by HPLC in soil and plant hydrolysates[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2011, 47(4): 387–396.
- [9] Joergensen R G. Amino sugars as specific indices for fungal and bacterial residues in soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2018, 54(5): 559–568.
- [10] Guggenberger G, Frey S D, Six J, et al. Bacterial and fungal cell-wall residues in conventional and no-tillage agroecosystems[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1999, 63(5): 1188–1198.
- [11] Glaser B, Millar N, Blum H. Sequestration and turnover of bacterial- and fungal-derived carbon in a temperate grassland soil under long-term elevated atmospheric $p\text{CO}_2$ [J]. *Global Change Biology*, 2006, 12(8): 1521–1531.
- [12] Liang C, Schimel J P, Jastrow J D. The importance of anabolism in microbial control over soil carbon storage[J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2: 17105.
- [13] Prabhu S V, Baldwin R P. Electroanalysis and detection of amino sugars, alditols, and acidic sugars at a copper-containing chemically modified electrode[J]. *Analytical Chemistry*, 1989, 61(20): 2258–2263.
- [14] Reissig J L, Storminger J L, Leloir L F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugars[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1955, 217(2): 959–966.
- [15] Suzuki S, Shimotsu N, Honda S, et al. Rapid analysis of amino sugars by microchip electrophoresis with laser-induced fluorescence detection[J]. *Electrophoresis*, 2001, 22(18): 4023–4031.
- [16] Appuhn A, Joergensen R G, Raubuch M, et al. The automated determination of glucosamine, galactosamine, muramic acid, and mannosamine in soil and root hydrolysates by HPLC[J]. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2004, 167(1): 17–21.
- [17] Zhang B, Yang X M, Drury C F, et al. A mid-infrared spectroscopy method to determine the glucosamine, galactosamine, and muramic acid concentrations in soil hydrolysates[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2013, 77(3): 842–849.
- [18] Funakoshi I, Yamashina I. Quantitative determination of partially methylated alditol acetate of amino sugar by gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Analytical Biochemistry*, 1980, 107(1): 265–270.
- [19] 魏金娥, 张洪海, 陈岩, 等. 环境样品中氨基糖分析检测方法的研究进展[J]. *地球科学进展*, 2019, 34(1): 84–92.
- [20] Dick W A, Thavamani B, Conley S, et al. Prediction of β -glucosidase and β -glucosaminidase activities, soil organic C, and amino sugar N in a diverse population of soils using near infrared reflectance spectroscopy[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 56: 99–104.
- [21] 袁国富, 张心昱, 唐新斋, 等. 陆地生态系统水环境观测质量保证与质量控制[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2012.
- [22] 于颖超, 张心昱, 戴晓琴, 等. 亚热带红壤区森林土壤剖面微生物残体碳分布及影响因素[J]. *生态学报*, 2022, 42(3): 1108–1117.
- [23] Mou Z J, Kuang L H, Yan B Y, et al. Influences of sample storage and grinding on the extraction of soil amino sugars[J]. *Soil Ecology Letters*, 2020, 2(2): 157–163.
- [24] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典-四部: 2020年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [25] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 高效液相色谱法通则: GB/T 16631—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [26] 国家环境保护总局. 土壤环境监测技术规范: HJ/T 166—2004[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.