



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

土壤氨基糖含量的检测方法 气相色谱法

Determination of amino sugars in soil by gas chromatography

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 次

前 言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 方法原理	1
5 试剂与材料	1
6 仪器设备	2
7 样品	3
8 试验步骤	3
9 色谱参考条件	4
10 试验数据处理	5
11 精密度	5
12 质量保证和控制	6
13 试验报告	6
参考文献	7

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利，本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由中华人民共和国农业农村部提出。

本文件由全国土壤质量标准化技术委员会（SAC/TC 404）归口。

本文件起草单位：中国科学院沈阳应用生态研究所，兰州大学，沈阳农业大学。

本文件主要起草人：张威、何红波、周锋、解宏图、鲍雪莲、袁磊、邓芳博、朱雪峰、郑甜甜、杨雅丽、梁超、张旭东、马田、安婷婷、孙良杰

土壤氨基糖含量的检测方法

气相色谱法

1 范围

本文件描述了采用气相色谱法测定土壤中氨基糖的方法。

本文件适用于土壤中氨基葡萄糖、氨基半乳糖、胞壁酸等3种氨基糖含量的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

NY/T 1121.1 土壤检测 第1部分：土壤样品的采集、处理和贮存

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

质量控制样品 (quality control samples)

日常用于评估土壤氨基糖测试过程是否正常的标准物质/标准样品。

注：土壤氨基糖含量没有标准物质，土壤氨基糖测定过程中需人为设置质量控制样品。原则上质量控制样品需均匀一致，不同批次的土壤氨基糖测定过程中均需做同一质量控制样品。

4 方法原理

土壤样品经水解，纯化和衍生后，使用含有氢火焰离子化检测器的气相色谱仪(GC-FID)进行测定，采用内标法定量。

5 试剂与材料

除非另有说明，在分析中仅使用确认为色谱纯的试剂，水为GB/T 6682规定的一级水。

5.1 盐酸溶液（ $\rho(\text{HCl})=6\text{ mol/L}$ ）：准确量取盐酸（分析纯）（市售12 mol/L）500 mL，用水稀释至1L。

5.2 盐酸溶液（ $\rho(\text{HCl})=1\text{ mol/L}$ ）：准确量取盐酸（分析纯）（市售12 mol/L）约83.3 mL，用水

稀释至 1L。

5.3 氢氧化钾溶液 (ρ (KOH)=0.4 mol/L)：准确称取氢氧化钾(分析纯) 22.4 g 于 400 mL 烧杯中，加入 200 mL 水溶解，待溶液冷却至室温后，移入 1 L 容量瓶中定容。

5.4 乙酸乙酯-正己烷混合溶剂 (1+1)：用乙酸乙酯和正己烷按 1:1 的体积比混合。

5.5 肌醇溶液 (ρ (C₆H₁₂O₆)=1.00 mg/mL)：称作内标 1，准确称取肌醇(≥99%) 50.00 mg 于 20 mL 烧杯中，加入 10 mL 水溶解，移入 50 mL 容量瓶中定容。

5.6 N-甲基氨基葡萄糖溶液 (ρ (C₇H₁₀N₂)=1.00 mg/mL)：称作内标 2，准确称取 N-甲基氨基葡萄糖(≥99%) 50.00 mg 于 20 mL 烧杯中，加入 10 mL 水溶解，移入 50 mL 容量瓶中定容。

5.7 胞壁酸溶液 (ρ (C₉H₁₇NO₇)=0.50 mg/mL)：准确称取胞壁酸(≥97%) 5.00 mg，于 10 mL 烧杯中，加入 5 mL 水溶解，移入 10 mL 容量瓶中定容。

5.8 氨基糖混合标准溶液 (ρ (C₆H₁₃NO₅)=1.00 mg/mL)：准确称取 D-(+)-氨基葡萄糖(≥99%)、D-(+)-氨基半乳糖(≥99%) 各 50.00 mg，于 20 mL 烧杯中，加入 10 mL 水溶解，移入 50 mL 容量瓶中定容，之后加 1~2 滴 6 mol/L 盐酸以防染菌。

5.9 无水甲醇。

5.10 吡啶(分析纯)。

5.11 衍生试剂：分别按 4-二甲氨基吡啶 (ρ (C₇H₁₀N₂)=40.00 mg/mL) 和盐酸羟胺 (ρ (H₃NO·HCl)=32.00 mg/mL) 的浓度配置，用吡啶:甲醇的 4:1 体积比的溶液作溶剂溶解配制。例如，欲配置 50 mL 衍生试剂：准确称取盐酸羟胺(≥99%) 1600.0 mg 和 4-二甲氨基吡啶(≥99%) 2000.0 mg 于 50 mL 试剂瓶中，加入 40 mL 的吡啶与 10 mL 的无水甲醇混合好的溶剂溶解。

5.12 二氯甲烷。

5.13 乙酸酐(分析纯)。

5.14 甲苯。

5.15 丙酮。

5.16 高纯氮气： ϕ (N) ≥99.999%。

5.17 普通氮气： ϕ (N) ≥99.9%。

5.18 水解瓶(试剂瓶，耐高温，耐酸，带聚四氟硅胶瓶垫)。

5.19 反应瓶(耐高温，带聚四氟硅胶瓶垫)。

5.20 气相色谱内衬管(规格不小于 200 μ L)。

5.21 气相色谱瓶。

6 仪器设备

6.1 气相色谱仪：配有氢火焰离子化检测器(FID)，色谱数据处理机或色谱工作站。

6.2 冷冻干燥仪：可连续工作超过 24 h。

- 6.3 烘箱：可调温。
- 6.4 水浴锅：可调温。
- 6.5 旋转蒸发仪：可调转速。
- 6.6 pH 酸度计。
- 6.7 漩涡混合器。
- 6.8 高速离心机：转速不低于 4000 r/min。
- 6.9 超声波清洗器：带有调频功能。
- 6.10 氮吹仪：模块带有加热功能。
- 6.11 分析天平：十万分之一天平，精度 0.01 mg；万分之一天平，精度 0.1 mg。
- 6.12 氢气发生器：稳定制备并输出氢气，纯度不低于 99.99%。
- 6.13 全自动空气源：稳定制备并输出空气。

7 样品

7.1 样品采集与保存

按照 NY/T 1121.1 的相关规定采集和保存土壤样品。

7.2 样品的制备

除去样品中的枝棒、叶片、石子等异物，按照 NY/T 1121.1 的要求，将采集的样品进行风干，过 60 目或 100 目筛。

8 试验步骤

8.1 水解

称取样品（7.2）（称取后样品中全氮含量约为 0.4 mg）至水解瓶（5.18）中，加入 10 mL 6 mol/L HCl（5.1），拧紧瓶盖，在 105 °C 的烘箱（6.3）中水解 8 h。

8.2 纯化

8.2.1 将水解后的样品冷却至室温后，加入 100 μL 内标 1（5.5），水解物通过定量滤纸过滤至心型瓶中，用 10 mL 水分 5 次冲洗水解瓶（5.18），滤出液用旋转蒸发仪（6.5）在 45~50 °C 真空状态下彻底干燥。

8.2.2 用 10 mL 水分 4 次溶解心型瓶中的干燥物，转入 50 mL 离心管中，在 pH 酸度计（6.6）上用 0.4 mol/L KOH 和 1 mol/L HCl（酸碱的浓度可以随着样品的特点进行适当调整）溶液调节 pH 至 6.6~6.8，沉淀物在 3000 r/min 下离心 10 min，上清液倒入心型瓶中再次在 45~50 °C 下用旋转蒸发仪（6.5）蒸发干燥或在冷冻干燥仪（6.2）上冷冻干燥 8h 以上。

8.2.3 用 6 mL 无水甲醇（5.9）分 3 次溶解心型瓶中的干燥物（利用超声波清洗器（6.9）将干燥物超

声溶解至无水甲醇中），转入 10 mL 离心管中，3000 r/min 离心 10 min，上清液转移到 5 mL 反应瓶（5.19）中，将反应瓶（5.19）在 45 °C 条件下，用氮吹仪（6.10）（普通氮气（5.17））吹扫干燥。

8.2.4 向干燥后的反应瓶（5.19）中加入 100 μL 内标 2（5.6）和 1 mL 水。

8.2.5 标准样品准备：另取 3 个反应瓶（5.19）依次加 100 μL 氨基糖混合标准液（5.8）、100 μL 胞壁酸（5.7）、100 μL 内标 1（5.5）、100 μL 内标 2（5.6）、1 mL 水。

8.2.6 将处理好的样品和标准样品（8.2.5）均用 Parafilm 封口膜覆盖反应瓶（5.19）口（瓶口用针头扎几个小孔），上下摇动反应瓶（5.19）至内壁上的干燥物全部溶解在水溶液中，将反应瓶（5.19）中的液体完全冷冻后置于冷冻干燥仪（6.2）中冷冻干燥 8h。

8.3 衍生

8.3.1 把干燥好的样品和标准样品（8.2.5）的反应瓶（5.19）从冷冻干燥仪（6.2）上取下，向各反应瓶（5.19）中加 0.3 mL 的衍生试剂（5.11），盖紧瓶盖后，用漩涡混合器（6.7）涡旋 3 s，将反应瓶（5.19）置于 75~80 °C 水浴锅（6.4）中加热 30~40 min（期间反应瓶（5.19）要涡旋摇动 3 次，每次涡旋 5 s），然后将反应瓶（5.19）冷却至室温。

8.3.2 向反应瓶（5.19）中加入 1 mL 乙酸酐（5.13），盖紧瓶盖后，涡旋 3 s，将反应瓶（5.19）置于 75~80 °C 水浴锅（6.4）中加热 60 min（期间反应瓶（5.19）要涡旋摇动 3 次，每次涡旋 5 s），然后将反应瓶（5.19）冷却至室温。

8.3.3 向反应瓶（5.19）中加入 1.5 mL 的二氯甲烷（5.12），盖紧瓶盖涡旋 10 s。

8.3.4 向反应瓶（5.19）中加入 1 mL 1 mol/L HCl（5.2），盖紧瓶盖，涡旋 30 s，静置等待液体分层，上层为无机相，下层为有机相，用带有 1 mL 移液枪头的移液枪移出分层后的上层无机相，弃去。

8.3.5 向反应瓶（5.19）中加入 1 mL 水，盖紧瓶盖，涡旋 30 s，静置等待液体分层，上层为无机相，下层为有机相，用带有 1 mL 移液枪头的移液枪移出分层后的上层无机相，弃去。用水（每次 1 mL）对有机相共进行 3 次提取，最后 1 次提取中，尽可能把水彻底地移出。

8.3.6 将反应瓶（5.19）中的剩余物（有机相）置于预先调好温度的 45 °C 氮吹仪（6.10）上，用普通氮气（5.17）吹扫干燥。用 200 μL 的乙酸乙酯-正己烷混合溶剂（5.4）（根据检测浓度的需要，可调整混合溶剂的体积）溶解反应瓶（5.19）中的干燥物，而后用 200 μL 移液枪将反应瓶（5.19）中的溶液转入带有气相色谱内衬管（5.20）的气相色谱瓶（5.21）中，等待气相色谱仪（6.1）测定。

9 色谱参考条件

推荐的气相色谱条件如下：

—色谱柱：DB-5（30 m×0.25 mm×0.25 μm），内壁涂 5%二苯基+95%二甲基聚硅氧烷；

—柱室温度（升温程序）：初始温度 120 °C，保持 1 min，以 10 °C/min 升到 250 °C 保持 2.5 min，以 20 °C/min 升到 270 °C 保持 2.5 min，以 40 °C/min 升到 300 °C 保持 1 min；

—进样口温度：250 °C；

—检测器温度：300 ℃；

—分流比：30:1；

—进样量：1 μL；

—气体流量：

1) 载气：高纯氮气（5.16），纯度不低于99.999%，载气流速0.60 mL/min；

2) 氢气发生器（6.12）：氢气纯度不低于99.99%，流量为30 mL/min；

3) 全自动空气源（6.13）：空气流量为400 mL/min；

上述气相色谱操作条件，系典型操作参数。可根据不同仪器特点，对给定的操作参数做适当调整，以期获得最佳效果。

10 试验数据处理

土壤中3种氨基糖含量采用内标法进行计算。具体计算分为两步，首先分别计算出每种氨基糖的相对校正因子（ R_f ），利用标准样品（8.2.5）计算，公式如下：

$$R_f = \frac{m_s \times A_i}{m_i \times A_s}$$

式中：

m_s ——标准样品（8.2.5）中每种氨基糖的质量，单位为微克（μg）；

A_i ——标准样品（8.2.5）中肌醇的色谱峰面积；

m_i ——标准样品（8.2.5）中肌醇的质量，单位为微克（μg）；

A_s ——标准样品（8.2.5）中每种氨基糖的色谱峰面积；

其次，计算出土壤氨基糖的含量。土壤氨基糖的含量以质量分数 ω 计，数值用毫克每千克（mg/kg）表示，按下列公式计算：

$$\omega = R_f \times \frac{A_x}{A_i} \times \frac{m_i}{m}$$

式中：

R_f ——根据标准样品（8.2.5）计算出的每种氨基糖的 R_f 值；

A_x ——土壤样品中每种氨基糖的色谱峰面积；

A_i ——土壤样品中肌醇的色谱峰面积；

m_i ——土壤样品中加入肌醇的质量，单位为微克（μg）；

m ——土壤样品称样量，单位为克（g）；

当测定结果小于10 mg/kg时，小数点后保留2位小数；当测定结果大于或等于10 mg/kg时，小数点后保留1位小数。

11 精密度

实验室内平行测定结果的相对标准偏差，氨基葡萄糖，氨基半乳糖和胞壁酸相对标准偏差均 $\leq 8\%$ 。

12 质量保证和控制

每批样品测定过程中至少做 3 个质量控制样品（3.1），不同批次质量控制样品（3.1）之间相对标准偏差应 $\leq 15\%$ 。

13 试验报告

试验报告至少应给出以下几个方面内容：

- 试验对象；
- 本文件编号；
- 结果；
- 观察到的异常现象；
- 试验日期。

参考文献

- [1] Zhang X, Amelung W, Gas chromatographic determination of muramic acid, glucosamine, mannosamine, and galactosamine in soils[J]. Soil Biology Biochemistry, 1996, 28: 1201-1206.
-