

一种适用于高分辨分子地层学研究的 有机质分离及定量方法

胡建芳 彭平安*

(中科院广州地球化学研究所有机地球化学国家重点实验室, 广州 510640)

摘 要 研究全球变化的手段多种多样, 高分辨分子地层学是最有力的工具之一, 进行此项研究工作要分析的样品数量大且容量小, 因此建立一种合适的有机质分离及定量方法十分重要。本文采用冷抽提的方法抽提出这类样品的有机质, 衍生化后利用 GC/MS 对化合物进行定性、定量分析。利用本方法分析的空白加标(地质体中最常见化合物)回收率结果为: 烷烃 95.8%, 脂肪酸 92.3%, 胆甾醇 99.7%, 脂肪醇 93.7%; 基质加标回收率结果为: 烷烃 94.8%, 脂肪酸 90.8%, 胆甾醇 98.8%。由此可见, 此方法可用于沉积物中常见化合物定性定量分析。

关键词 高分辨分子地层学, 小容量样品, 有机化合物

1 引 言

近年来有机地球化学已成为研究全球古气候、古环境、现代环境等变化的有力工具^[1,2]。以高分辨分子地层学重建地球各系统的演化是当前全球变化研究的一大趋势^[3], 同时也是研究污染历史、污染物自然演化的重要手段^[4,5]。高分辨分子地层学研究分析的是大批量、小容量($\leq 1\text{g}$)固体样品。传统的萃取方法——索氏抽提法具有易污染, 费时, 费溶剂, 需加温等缺点, 而冷抽提法具有溶剂用量少、不加温、不干燥样品、操作简单方便、定量准确、一次可分析多个样品的优点, 更适用于作高分辨分子地层学研究。国际上有关冷抽提方法已有报道^[6], 但真正用此方法进行有机分子的定量研究还未见报道。作者设计了一套混合旋转装置, 同时对多个(36个)小容量样品中的有机质进行冷抽提(室温), 将抽提物浓缩富集后进行衍生化, 最后进行 GC/MS 分析, 对各种有机组分: 烷烃、脂肪酸、脂肪醇类等进行定性定量。本文利用此方法分析了南海一钻孔小容量样品中的有机化合物含量, 取得了较好的效果。

2 实验部分

2.1 仪器和装置

机械旋转装置(自行设计, 3 r/min, 一次可作 36 个样), 聚四氟乙烯(FEP)密封小管(10 mL, id. 16 mm, 购于美国 Cole Parmer 公司), 色质联用仪 Finnigan GC8000-Voyager。

2.2 试剂及标准物质

甲醇、三氯甲烷均为分析纯, 经全玻系统二次蒸馏; 无水硫酸钠、氯化钾晶体, 450℃灼烧 4 h; 二次蒸馏水; 衍生化试剂: 双三甲基硅-四氟乙酰胺(BSTFA, 分析纯); 吡啶(分析纯, 干燥后使用); 标准样品: C₁₈ 脂肪酸(来源于日本, Guaranteed Reagent)、C₂₇ 胆甾醇(cholesterol, 来源于 Aldrich, 分析纯)、C₂₆ 醇(1-hexacosanol, 来源于 Fluka, 分析纯); 内标: 氘代十六酸(palmitic-d₃₁)

1999-06-09 收稿; 1999-09-10 接受。

本文系国家自然科学基金杰出青年基金资助项目(No. 49453004)。

acid, 来源于 Aldrich, 分析纯)、 C_{24} 甾代烷烃(tetracosane- d_{30} , 来源于 Aldrich, 分析纯)、 C_{27} 胆甾烷(cholestane, 来源于 Aldrich, 分析纯)。

2.3 实验流程

整个实验流程可由图 1 表示:

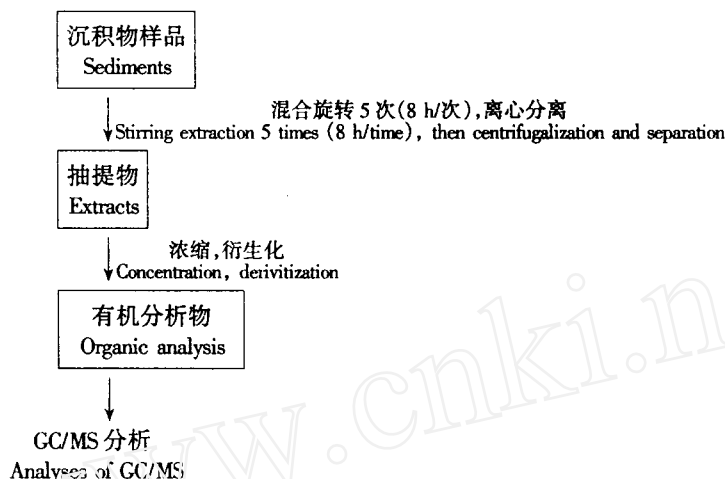


图 1 实验流程图

Fig.1 Experimental flow chart

2.3.1 样品的冷抽提 称取 1g 样品装入聚四氟乙烯密封小管, 加入 7 mL 甲醇放在混合旋转装置上旋转搅拌 8 h, 离心分离收集上清液, 重复操作两次; 向样品中加入 0.5 mL 2.5 mg/L 的 $C_{24}D_{30}$ 及 0.5 mL 5.0 mg/L 的 $C_{16}D_{31}O_2H$ 标准溶液用来作化合物的定量计算, 后加入 6 mL 甲醇/三氯甲烷(V:V 为 1:1)溶液旋转搅拌 8 h, 离心分离收集上清液; 加入 7 mL 三氯甲烷重复开始的操作两次。

2.3.2 样品的反萃取 向收集的抽提物中加入 15 mL 1 mol/L 的 KCl 水溶液, 用分液漏斗萃取分液出有机相; 向水相中加入 15 mL 三氯甲烷进行萃取, 分出有机相, 重复操作两次。

2.3.3 萃取液的干燥、浓缩 将萃取分出的有机相在旋转蒸发仪上浓缩至 20 mL 左右, 加入无水硫酸钠充分混合后静置过夜; 将上述有机相过滤除去无水硫酸钠后浓缩至 0.5 mL 左右。

2.3.4 有机相的定容、衍生化、鉴定 将浓缩液转移至有 0.5 mL 刻度的细胞瓶中, 对于质量控制及质量保证样品(空白加标、基质加标样品)还加入 0.5 mL C_{27} -胆甾烷标准溶液作校正内标, 后在高纯 N_2 流下吹至 < 0.5 mL, 加入衍生化试剂及吡啶, 最后以正己烷定容至 0.5 mL, 密封放入 -20°C 的冰箱中反应两天。实验中若有水存在, 则酸、醇的衍生化反应不彻底或不能完全进行, 这样便不能进行定量, 因而本实验要求试剂都必须严格干燥。

将上述反应后的有机分析物作 GC/MS 分析, 对化合物进行定性定量。

2.4 色谱/质谱联用仪器操作条件

色谱条件: Chrompack 硅熔毛细管色谱柱, 柱长 30 m, 内径 0.32 mm, 涂层 0.25 μm 。检测器温度为 200°C 。两段式程序升温: 初始温度为 45°C , 保持 2 min, $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 升温至 120°C , 再以 $4^\circ\text{C}/\text{min}$ 升温至 300°C , 保持 30 min, 采用冷柱头进样, 载气为氮气, 流速 1.2 mL/min。

质谱条件: 电子倍增器的电压(EMV)为 490 V, 扫描数范围 m/z 50 ~ 700, 离子源: EI 源。离子源温度 200°C , 电子能量 70 eV。接口温度 250°C 。

3 结果与讨论

3.1 校正曲线的建立

分别配置 1.25、2.5、5.0、6.25、12.5、25.0 mg/L 的 $C_{24}D_{50}$ 及 C_{27} 胆甾烷标准溶液,正己烷作溶剂;2.5、5.0、6.25、12.5、25.0、50.0 mg/L 的 C_{18} 脂肪酸、 C_{26} 醇及 $C_{16}D_{31}O_2H$ 标准溶液,1.25、2.5、5.0、6.25、12.5、25.0 mg/L 的 C_{27} 胆甾醇标准溶液,三氯甲烷作溶剂,GC/MS 法测定。以待测组分含量与相应内标物含量的比值为横坐标,以待测组分的峰面积与相应内标物的峰面积的比值为纵坐标制作标准曲线图。所得校正曲线线性方程分别为: C_{18} 脂肪酸: $Y = 0.9886X$, 相关系数为 0.999($C_{16}D_{31}O_2H$ 为内标)、 C_{27} 胆甾醇: $Y = 0.6667X$, 相关系数为 0.999($C_{24}D_{50}$ 为内标)、 C_{26} 醇: $Y = 0.3223X$, 相关系数为 0.999($C_{24}D_{50}$ 为内标)。

3.2 加标回收率试验

3.2.1 空白加标回收率试验 6 个平行空白样品都分别加入 C_{24} 甾代烷烃、 C_{18} 脂肪酸、 C_{27} 胆甾醇和 C_{26} 醇后进行整个实验流程的操作,计算各化合物的回收率(见表 1)。

表 1 空白加标样品回收率数据表

Table 1 Recoveries of standards added to the blank

化合物名称 Compounds	加入量 Added (μg)	回收量 Recovery amount (μg)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average recovery (%)	回收率的标准方差 Standard deviation of recovery (%)
$C_{24}D_{50}$	1.25 1.25 1.25	1.251 1.180 1.213	100.1 94.4 97.1	95.8	2.9
	1.25 1.25 1.25	1.182 1.137 1.220	94.6 91.0 97.6		
C_{18} 脂肪酸 Stearic acid	2.50 2.50 2.50	2.377 2.310 2.327	95.1 92.4 93.1	92.3	2.3
	2.50 2.50 2.50	2.370 2.240 2.227	94.8 89.6 89.1		
C_{27} 胆甾醇 Cholesterol	1.25 1.25 1.25	1.256 1.300 1.209	100.5 104.0 96.7	99.7	2.3
	1.25 1.25 1.25	1.247 1.220 1.251	99.8 97.6 100.1		
C_{26} 醇 1-Hexacosanol	2.50 2.50 2.50	2.280 2.327 2.380	91.2 93.1 95.2	93.7	1.6
	2.50 2.50 2.50	2.345 2.292 2.437			

3.2.2 基质加标样品回收率试验 取深海沉积物加苯/甲醇(7:3, V:V)索氏抽提 72 h 干燥后作为基质。取 5 份相等的基质分别加入 C_{24} 甾代烷烃、 C_{18} 脂肪酸、 C_{27} 胆甾醇后进行整个实验流程的操作,计算各化合物的回收率(见表 2)。同时计算检测限为:烷烃 0.2 ng/g,脂肪酸 0.5 ng/g,胆甾醇 0.2 ng/g⁽⁷⁾。

表 2 基质加标样品回收率数据表

Table 2 Recoveries of standards added to the matrix

化合物名称 Compounds	加入量 Added (μg)	回收量 Recovery amount (μg)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average recovery (%)	回收率的标准方差 Standard deviation of recovery (%)
$C_{24}D_{50}$	1.25 1.25 1.25	1.276 1.180 1.186	102.1 94.4 94.9	94.8	3.9
	1.25 1.25	1.140 1.145	91.2 91.6		
C_{18} 脂肪酸 Stearic acid	2.50 2.50 2.50	2.380 2.210 2.20	95.1 88.2 88.0	90.8	4.5
	2.50 2.50	2.490 2.220	99.5 88.9		
C_{27} 胆甾醇 Cholesterol	1.25 1.25 1.25	1.256 1.241 1.131	100.5 99.3 90.5	98.8	3.9
	1.25 1.25	1.218 1.260	97.4 100.8		

从表 1 看出空白加标样品,烷烃、脂肪酸、脂肪醇、胆甾醇的平均回收率都 > 90%, 同时回

收率的标准方差都 < 3.0%。比较表 1 和表 2 中的平均回收率数据知基质加标样品的回收率略低,但同相应的空白样品相比,其差值仅在 0.9% ~ 1.5% 之间。由表 1 和表 2 的数据知本实验整个流程的定量计算是有效的。

3.3 中试样品的分析结果

我们采用上述方法对南海一钻孔小容量样品中的有机化合物进行了定量分析,其结果见图 2。如对不同时代沉积物样品进行分析,结合样品年代学数据可绘制一系列化合物含量随年代变化的图件,为全球变化研究提供大量的有关物源、海表温度、海平面变化等的的数据。

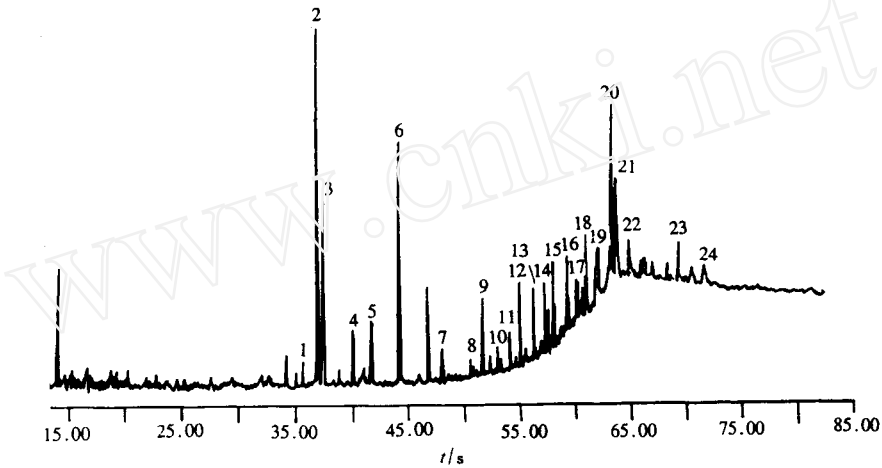


图 2 南海某样品的总离子流图

Fig. 2 Total ion current of a sample taken from a core from South China Sea

1. C_{15} 脂肪醇 (1-pentadecanol); 2. 内标 C_{16} 氘代酸 (palmatic acid- d_{31}); 3. C_{16} 脂肪酸 (hexadecanoic acid); 4. C_{17} 脂肪醇 (1-heptadecanol); 5. C_{18} 脂肪酸 (stearic acid); 6. 内标 C_{24} 氘代烷烃 (C_{24} - n -alkane- d_{50}); 7. C_{21} 脂肪醇 (1-hentriacontanol); 8. C_{27} 正构烷烃 (heptacosane); 9. C_{23} 脂肪醇 (1-tricosanol); 10. C_{24} 脂肪酸 (tetrasanoic acid); 11. C_{29} 正构烷烃 (nonacosane); 12. C_{25} 脂肪醇 (1-phentacosanol); 13. C_{26} 脂肪酸 (hexacosanoic acid); 14. C_{31} 正构烷烃 (hentriacontane); 15. C_{27} 脂肪醇 (1-heptacosanol); 16. C_{28} 脂肪酸 (octacosanoic acid); 17. C_{33} 正构烷烃 (tritriacontane); 18. C_{29} 脂肪醇 (1-nonacosanol); 19. C_{30} 脂肪酸 (melissic acid); 20. C_{31} 二醇 (C_{31} -diols); 21. C_{31} 脂肪醇 (1-hentriacontanol); 22. C_{32} 脂肪醇 (dotriacontanoic acid); 23. C_{37-2} 甲基酮 (alkadienone); 24. C_{38-2} 甲基酮 (C_{38} -alkadienone)。化合物的含量 (concentrations of compounds): 1. 0.0047; 3. 0.59; 4. 0.109; 5. 0.207; 7. 0.07; 8. 0.042; 9. 0.0148; 10. 0.112; 11. 0.121; 12. 0.181; 14. 0.14; 15. 0.026; 16. 0.425; 17. 0.103; 18. 0.284; 19. 0.135; 21. 0.288; 22. 0.156 mg/kg 干沉积物 (dry sediments)。

4 结 论

作者通过多次试验比较,建立了这种适用于高分辨分子地层学研究的有机质分离及定量方法。由表 1 看出空白加标回收率结果为:烷烃 95.8%,脂肪酸 92.3%,胆甾醇 99.7%,脂肪醇 93.7%;由表 2 知基质加标回收率结果为:烷烃 94.8%,脂肪酸 90.8%,胆甾醇 98.8%。同时从图 2 知用本方法可对小容量样品中的有机化合物进行定性定量分析。

致 谢 本文在写作的过程中得到了麦碧娴副研究员的指导和帮助,作者在此深表感谢。

References

- 1 Simoneit B R T. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **1977**, 41:463 ~ 476
- 2 Brassell S C, Breerton R G, Eglinton G, Marlowe I T, Grimalt J, Liebezeit G, Pflaumann U, Samthein M. *Org. Geochem.*, **1985**, 10:649 ~ 660
- 3 Brassell S C, Eglinton G, Marlowe I T, Pflaumann U, Samthein M. *Nature*, **1986**, 320: 129 ~ 133
- 4 Simoneit B R T, Chester R, Eglinton G. *Nature*, **1977**, 267: 682 ~ 685
- 5 Brassell S C, Eglinton G, Maxwell J R, Philp R P. In: *Aquatic Pollutants*. Eds: Hutzinger O, Van Lelyveld I H, Zoeteman B C J. **1978**: 69 ~ 86
- 6 Bligh E G, Dyer W I. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **1959**, 37: 911 ~ 917
- 7 Andrew D E, Lenore S C, Arnold E. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 19th ed., American Public Health Association, Washington, DC., **1995**: 10 ~ 11(1)

A Quantitative Method Applicable to High Resolution Molecular Stratigraphy

Fiu Jianfang, Peng Ping'an*

(State Key Laboratory of Organic Geochemistry, Guangzhou Institute of Geochemistry,
Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640)

Abstract The research of high resolution molecular stratigraphy is able to provide plenty of information about global climatic change. To do this research, we have to analyze a great number of samples in quite small amount. The present paper describes a quantitative method for this analysis. The organic lipids were extracted from the sediments by the suspension. The resulting lipids were derivatized with bis-trimethylsilyltrifluoroacetamide and subject to the analysis of GC/MS. With adding standards to the blank, the recovery of *n*-alkane, fatty acid, cholesterol and alcohol is 95.8%, 92.3%, 99.7% and 93.7% respectively. With adding standards to the mineral matrix, the recovery of *n*-alkane, fatty acid, cholesterol is 94.8%, 90.8% and 98.8% respectively. These results show this procedure is applicable to the qualitative and quantitative analysis of these compounds in the sediments.

Keywords High resolution molecular stratigraphy, small amount sample, organic compounds

(Received 9 June 1999; accepted 10 September 1999)