

液相色谱稳定特征峰比值鉴别模拟渤海溢油*

赵恒强^{1,2} 陈军辉^{1**} 韩彬¹ 张栋¹ 杨佰娟¹ 程红艳¹
张道来¹ 王小如^{1,3} 黎先春¹

(1 国家海洋局第一海洋研究所,海洋生态研究中心,青岛,266061; 2 中国海洋大学,化学化工学院,青岛,266100
3 厦门大学,化学化工学院化学系,厦门,361005)

摘 要 考察室外自然风化对原油液相色谱稳定特征峰分布的影响,提出基于溢油液相色谱稳定特征峰比值结合聚类分析和“*t*-检验”分析进行模拟溢油鉴别.结果表明,液相色谱稳定特征峰比值结合聚类分析可以初步推测模拟溢油样品来源,进一步采用特征峰比值和“*t*-检验”分析可以实现模拟溢油样与可疑原油样品的成功判别.

关键词 高效液相色谱,特征峰比值,聚类分析,*t*-检验,溢油鉴别.

目前,用于溢油鉴别的方法主要有气相色谱法(GC-FID)和气相色谱质谱法(GC-MS)等^[1-3].我国溢油鉴别系统规范也采用红外、荧光、GC-FID、GC-MS等方法进行溢油样品的鉴别.但是石油组成复杂,且易受风化及其他因素影响,采用单一的分析手段难以准确鉴别溢油源.因此,发展多元指纹鉴别技术^[4],进行综合分析,交叉结果得出鉴别的最终结论,对提高溢油鉴别能力和鉴别效率,保证其鉴别的准确性具有重要意义.反相高效液相色谱法(RP-HPLC)相比气相色谱法和气相色谱质谱法具有适于分离石油中极性大、沸点高的组分,受风化影响小等优点.国内外学者对高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)鉴别海面溢油做了部分研究工作. Saneer^[5]等人将双波长联用梯度洗脱法应用于溢油鉴别.许乙烈^[6]等用紫外检测器双波长双比值联用法和与荧光检测器联用等技术,实现了海面溢油鉴别.徐恒振^[7]等建立了溢油指示物(指标)HPLC-UVD相似性模式,研究结果表明,HPLC-UVD相似性模式可作为溢油指示物(指标).笔者在前期研究中建立了渤海原油的高效液相色谱特征指纹图谱,结合相似度分析可实现渤海原油样品的鉴别^[8].但是以往的研究多是采用液相色谱特征峰高比或指纹图谱相似度等进行鉴别,且未对液相指纹进行系统的风化稳定性考察,降低了鉴别结果的可靠性,对差异较小的溢油样品鉴别能力亦较差.

近年来,用于溢油鉴别的特征峰比值因具有受风化影响小,不受分析时间、分析条件变化等影响的优点,在溢油鉴别中发挥了关键作用^[9].数字化鉴别(如:主成分分析、聚类分析、*t*-分布等)因具有自动化程度高、受主观因素影响小等优点,在油指纹鉴别中得到广泛应用^[10-14].

本文在前期研究的基础上,采用液相色谱法分析测定原油样品,考察了冬季室外自然风化、夏季室外自然风化两种风化条件对模拟渤海溢油 HPLC 特征峰的影响,优选出受风化影响小的稳定特征峰,采用稳定特征峰比值结合聚类分析、“*t*-检验”分析对模拟溢油样品进行鉴别.

1 实验部分

1.1 样品采集

原油样品来自渤海采油平台、胜利油田和中东地区,不同风化时间的模拟溢油样品来自渤海采油平台,其中 W1 为冬季室外自然风化样品, W2 为夏季室外自然风化样品.具体油样来源及名称编号如表 1 所示.

2009 年 10 月 31 日收稿.

* 海洋公益性行业科研专项(200705011 200805039);国家自然科学基金(20905017);中国海监技术支撑体系项目;2008 年海洋环境保护及节能减排专项.

** 通讯联系人, Tel: 0532-88966705, E-mail: jchen@fio.org.cn

表 1 油样编号及来源

Table 1 Number and origins of oil samples

编号	油样类型	名称编号	来源
1	原油	B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, B10, B11, B12, B13, B14, B15, B16, B17, B18	渤海采油平台
2	原油	L1, L2, L3, L4, L5	胜利油田
3	原油	F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10, F11	中东油田
4	模拟溢油	W1-1(0d), W1-2(7d), W1-3(15d), W1-4(21d), W2-1(0d), W2-2(7d), W2-3(15d), W2-4(21d)	渤海采油平台

1.2 风化方法

室外自然风化(冬季、夏季)均在国家海洋局第一海洋研究所实验楼顶进行。于直径 40 cm, 高 25 cm 的玻璃缸中加入适量新鲜海水, 加入一定量原油样品, 使之形成一层厚度约为 1 mm 的油膜。风化在露天状态下进行, 雨雪天收回。分别于第 7 天、第 15 天和第 21 天取风化油样进行分析测定。

1.3 样品溶液制备方法

取 0.01 g 原油样品置于玻璃培养皿中, 加入 1 mL CHCl_3 使油样充分溶解, 加入 1 g 中性 Al_2O_3 , 混匀, 氮气吹干。将样品转入 25 mL 比色管中, 加入 10 mL 乙醇 (5% H_2O) 溶液, 于超声提取器中提取 30 min 并重复提取一次, 合并提取液, 过滤, 滤液在 50°C 条件下进行旋转蒸发浓缩至干, 加入 1.2 mL 乙腈超声溶解, 再加 0.8 mL 超纯水超声 1 min, 13000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心分离 3 min, 过 0.45 μm 微孔滤膜后作为供试品溶液。

1.4 液相色谱条件

1100 型高效液相色谱仪, 配有四元泵, DAD 检测器, 自动进样器等 (美国 Agilent 公司); Agilent ZORBAX SB C_{18} 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm , 美国 Agilent 公司) 串联 Agilent Eclipse C_{18} 色谱柱 (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm , 美国 Agilent 公司), 流动相 A 为水, 流动相 B 为乙腈, 流速为 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 20°C, 检测波长为 226 nm, 254 nm, 带宽 16 nm, 进样量为 50 μL 梯度洗脱程序为 0—25—30—55—70—95 min, B%: 65%—65%—80%—80%—100%—100%。

2 结果与讨论

2.1 油样的 HPLC 分析

在前期研究^[8]中, 建立了渤海原油样品液相色谱提取及分离测定方法。本文为适应风化油样及溢油样品量少的实际情况, 减少了原油及模拟溢油样品用量。对基质固相分散提取条件进行了重新优化, 得到了最佳优化参数, 将制备好的模拟溢油样品进样色谱测定, 模拟渤海溢油样品的液相色谱图如图 1 所示。

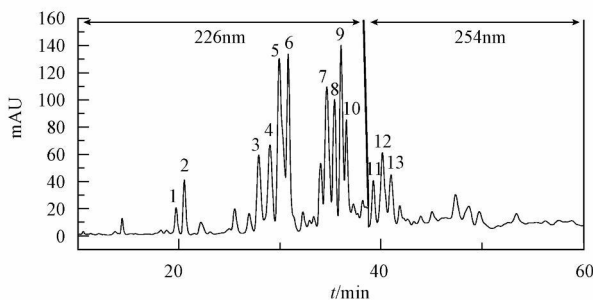


图 1 模拟渤海溢油样品 HPLC 图谱 (226, 254 nm)

Fig 1 HPLC chromatogram of simulated Bohai Sea oil spill detected at 226 and 254 nm

从图中可以看出, 前期研究中优选出的代表渤海原油油源特征的液相指纹 13 个特征峰在图中均可找到。对方法重复性和供试品溶液 48 h 稳定性进行考察, 结果显示 4 个主峰 (分别为峰 5, 6, 8, 9), 峰面

积的相对标准偏差 (RSD)值分别小于 2.90% 和 4.20%, 保留时间的 RSD 值分别小于 0.30% 和 0.28%, 说明该方法重复性良好, 供试品溶液在 48 h 内化学性质稳定.

2.2 风化对原油液相色谱特征峰分布的影响

考察两种渤海原油样品分别在冬季室外自然风化、夏季室外自然风化两种风化条件下, 在不同风化时间后, 其高效液相色谱特征峰的变化 (图 2). 从图中可以看出, 在冬季和夏季自然风化条件下, 原油液相指纹各色谱峰含量均有不同程度的变化. 根据变化规律, 总体上可以分为三类, 如图中所示, 第一类特征峰受风化影响明显, 随风化进行, 其含量明显减少 (冬季: 峰 1, 2, 3, 4, 5; 夏季: 峰 1, 2, 3, 4, 8, 10); 第二类特征峰受风化影响较第一类稍小, 随风化进行, 其含量缓慢减少或先增加后减少 (冬季: 峰 6, 7, 8, 9, 10; 夏季: 峰 5, 6, 7, 9); 第三类化合物受风化影响相对较小, 随风化进行, 其含量在 15 d 内无明显变化, 风化 21 d 后, 其含量在冬季仍变化缓慢, 在夏季明显减少 (冬季: 峰 11, 12, 13; 夏季: 峰 11, 12, 13).

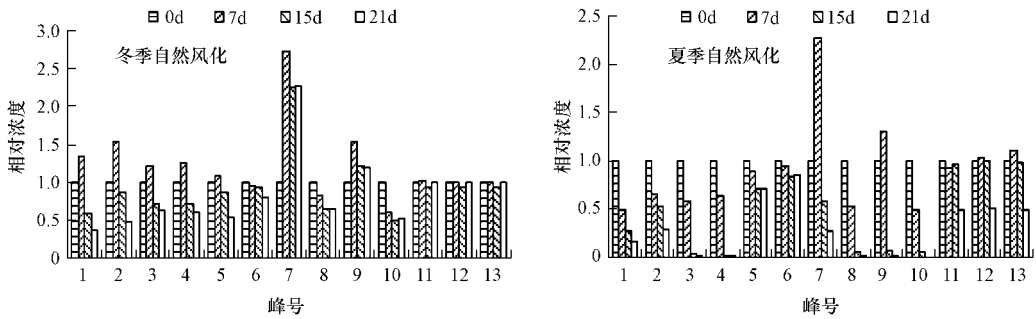


图 2 室外自然风化条件下渤海原油液相指纹变化

Fig 2 Change of HPLC fingerprint peaks of Bohai sea crude oil under the condition of weathering outdoors

通过考察风化对原油液相指纹的影响, 说明原油液相指纹各特征峰总体并不稳定. 但是, 根据风化规律可将原油液相色谱各特征峰分为几大类, 每一类中各特征峰变化规律有较好的一致性. 因此我们以变化规律相似的一组特征峰峰面积比值为考察指标, 研究风化对其稳定性的影响, 以期寻找到稳定的特征峰面积比值, 为鉴别溢油提供参考依据. 两种风化条件下, 各特征峰面积比随风化时间的变化如表 2 所示.

表 2 风化过程中稳定特征峰比值的变化

Table 2 Change of stable characteristic peak area ratios during the weathering

	冬季自然风化						夏季自然风化					
	0	7	15	21	平均值	RSD %	0	7	15	21	平均值	RSD %
A2:A1	1.59	1.80	2.40	2.04	1.96	17.87	2.19	4.19	4.14	3.87	3.59	26.41
A3:A2	2.46	1.95	2.02	3.23	2.42	24.29	2.28	0.68	0.13	0.20	0.82	121.22
A4:A3	1.29	1.32	1.28	1.28	1.29	1.56	1.17	1.06	1.01	0.85	1.02	13.12
A5:A4	1.81	1.57	2.21	1.60	1.80	16.23	1.56	5.00	2.89	1.53	2.74	59.44
A8:A6	1.00	0.86	0.71	0.81	0.84	14.32	1.04	0.82	1.16	0.44	0.86	36.73
A10:A8	1.00	0.73	0.75	0.77	0.81	15.04	0.78	0.95	0.93	0.93	0.90	9.06
A9:A7	1.82	1.03	0.98	0.95	1.19	34.96	1.96	0.79	0.24	0.18	0.79	104.09
A12:A11	2.00	1.98	1.99	1.97	1.98	0.62	2.05	2.13	2.13	2.13	2.11	1.91
A13:A11	1.32	1.30	1.30	1.31	1.31	0.86	1.31	1.35	1.33	1.29	1.32	1.82
A13:A12	0.66	0.66	0.65	0.67	0.66	0.98	0.64	0.63	0.62	0.61	0.63	2.24

从表中可以看出, 在两种风化条件下, 各特征峰面积比值随风化时间变化均有不同程度的变化. 其中特征峰面积比值 A12:A11, A13:A11, A13:A12 在冬季自然风化、夏季自然风化条件下, 在风化 21 d 后仍均表现较好的稳定性, RSD 值均小于 5%, 可以作为溢油鉴别的重要参数.

2.3 稳定特征峰比值结合聚类分析初步辨别模拟渤海溢油来源

本文采用 2.2 节优选出的稳定特征峰比值, 采用社会科学统计程序 (statistical program for social sciences, SPSS13.0) 进行聚类分析, 选用层次聚类中的 Q 型聚类, 采用类间平均连锁法进行计算小类之间的距离, 采用欧式距离平方进行聚类分析. 聚类分析结果见图 3 从图中可以看出, 18 种渤海原油样品

(B1—B18)和不同风化时间的模拟渤海溢油样品(W 1-1—W 1-4 W 2-1—W 2-4)可聚为一类; 国外原油样品可聚为两小类(F1—F11), 并且国外原油样品与渤海原油样品聚为较大一类; 胜利油田原油样品(L1—L5)可单独聚为一小类. 至此, 渤海原油样品、渤海模拟风化溢油样品、国外原油样品、国内陆地原油样品聚为一类, 即模拟溢油样品来源于渤海采油平台, 与假设一致. 由此可以看出, 基于本文选定的液相色谱稳定特征峰比值结合聚类分析, 可以将不同地区的原油及一定风化程度的模拟溢油样品按其来源进行区分, 从而初步推断出模拟溢油样品来源.

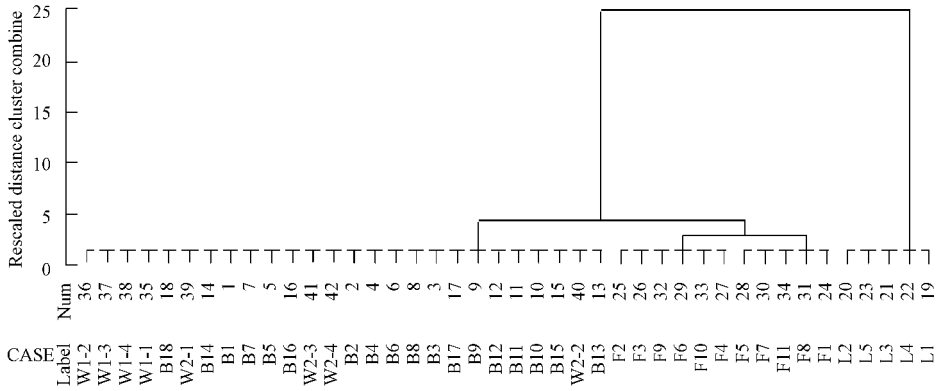


图 3 油样聚类分析图
Fig 3 Cluster analysis of the oil samples

2.4 稳定特征峰比值“t检验”分析鉴别模拟渤海溢油

采用液相色谱稳定特征峰比值结合聚类分析, 可以把差别较大的油样区分为几个大类, 初步确定模拟溢油样品来源于哪一地区, 但在性质相似的模拟溢油样品与可疑原油样品的判别上仍有一定局限性. 近年来, 国内外有较多学者^[13-14]采用生物标志物指标“t检验”用于溢油样品和可疑油样的相关分析, 取得了较好的判别结果. 首先, 需考虑每个诊断比值的误差区间, 算出诊断比值的 t 分布, 考察不同区间范围两个样品间每个诊断比值的符合情况. 诊断比值的分布情况可用下式计算得到:

$$\mu = x \pm t \cdot s \sqrt{n}$$

其中, μ 为每项诊断比值总体平均值, 也就是每项诊断比值多次平行分析结果的平均值; t 为 t 值表中在一定置信度下, 自由度为 $n - 1$ 时的值; s 为每项诊断比率多次平行分析结果的标准偏差; n 为每项诊断比值分析次数 (本实验, $n = 3$). 依据不同区间条件下, 两个油样的诊断比值和 $Y = X$ 的直线拟合的情况对其进行判别.

对需要进行 t 检验的可疑油源样品利用选定的诊断比值平均值做散点图, 采用 95% 置信度 ($t = 4.303$) 进行 t 检验分析, 所有比值误差棒均跨过直线 $Y = X$, 认为两个样品同源 (positive match); 若不满足一致条件时, 则需要再采用 98% 置信度 ($t = 6.965$) 进行 t 检验分析, 若所有比值误差棒均跨过直线 $Y = X$, 认为两个样品可能同源 (probable match); 若存在一个比值误差棒不能达到 $Y = X$ 直线上, 认为两个样品不同源 (normatch).

本文采用 2.4 中来源于渤海采油平台的冬季室外自然风化油样 W 1-2(7d) 作为模拟溢油样品 A, 随机抽取渤海原油样品 B1, B4 和渤海冬季风化油样 W 1-1(0d) 分别作为可疑溢油样品 B, C, D. 模拟溢油样品 A 与三个可疑油样 (B, C, D) 的特征峰比值统计处理数据如表 3 所示.

表 3 特征峰比值之均值、标准偏差 ($n = 3$)

Table 3 Average and standard deviation of characteristic peaks ratios for three calculations

序号	特征峰比值	X_A	S_A	X_B	S_B	X_C	S_C	X_D	S_D
1	A12:A11	1.98	0.0254	2.10	0.0315	2.10	0.0327	2.00	0.0196
2	A13:A11	1.30	0.0195	1.32	0.0208	1.16	0.0304	1.32	0.0275
3	A13:A12	0.66	0.0237	0.63	0.0341	0.55	0.0451	0.66	0.0233

采用以上判别方法,以 2.2 优选出的 3 个稳定特征峰比值作为诊断比值,对模拟溢油样品与三个可疑油样进行判别,结果如图 4 所示.从图 4 a b 中可以看出,溢油样 A 与可疑油样 B C 在 98% 置信水平时,仍有比值点 x 或 y 误差棒没有跨过直线 $y = x$,这几个点分别为特征比值 1 和特征比值 1, 2, 3 由此推断溢油样 A 与可疑油样 B C 不同源.从图 4 c 中可以看出,溢油样 A 与可疑油样 D 在 95% 置信水平时,所有比值点误差棒均跨过直线 $y = x$,由此推断溢油样 A 与可疑油样 D 同源.判别结果与预设条件相一致,说明采用液相色谱稳定特征峰比值“ t 检验”分析可以实现模拟渤海溢油样与可疑油样的正确判别.

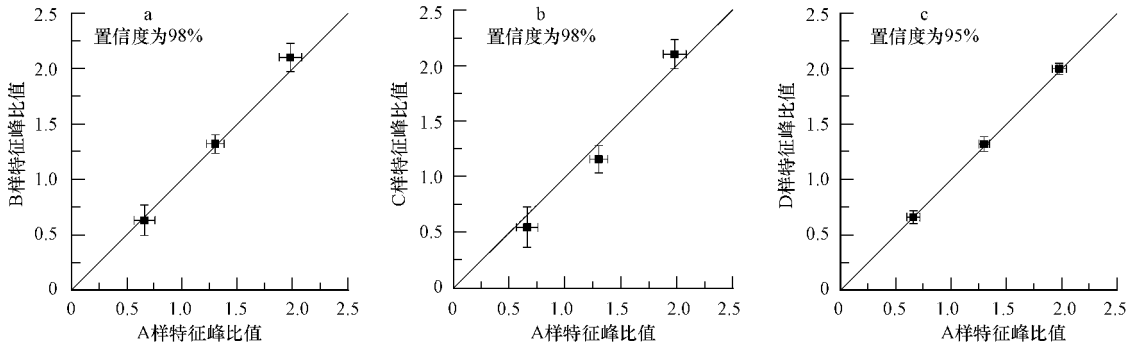


图 4 模拟溢油样品与可疑油样的液相色谱特征峰比值 t 检验结果

Fig 4 Plots for t test result between spill and a suspected source

3 结论

提出的高效液相色谱测定溢油样品的方法,能满足溢油样品量少的要求,且方法重现性高、稳定性好.通过考察风化对模拟溢油样品液相色谱特征峰稳定性的影响,优选出稳定性好的特征峰比值.采用稳定特征峰比值结合聚类分析,实现了不同来源的原油样品及部分模拟风化油样的成功聚类,初步推断出模拟溢油样品来源.采用稳定特征峰比值结合“ t 检验”分析,实现了模拟溢油样品与可疑溢油样品的成功判别.说明 HPLC 稳定特征峰比值结合多种统计学分析有望成为溢油鉴别的有力工具,可以作为 GC-MS 法的有益补充.

参 考 文 献

- [1] Wang Z D, Fingas M. Differentiation of the source of spilled oil and monitoring of the oil weathering process using gas chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 1995, 712: 321-343
- [2] Zeigler C, Nanara KM, Wang Z D, et al. Total alkylated polycyclic aromatic hydrocarbon characterization and quantitative comparison of selected ion monitoring versus full scan gas chromatography/mass spectrometry based on spectral deconvolution [J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1205: 109-116
- [3] Wang Z D, Stout SA, Fingas M. Forensic fingerprinting of biomarkers for oil spill characterization and source identification environmental forensics [J]. Environmental Forensics, 2006, 7(2): 105-146
- [4] Wang Z D, Fingas M, and Sigouin L. Using multiple criteria for fingerprinting unknown oil samples having very similar chemical composition [J]. Environmental Forensics, 2002, (3): 251-262
- [5] Saner W A, Fitzgerald G E, Welsh J P. Liquid chromatographic identification of oils by separation of the ethanol extractable fraction [J]. Analytical Chemistry, 1976, 48(12): 1747-1754
- [6] 许乙烈, 张有恩. 反相高效液相色谱鉴别海面溢油源的方法研究 [J]. 海洋环境科学, 1989, 8(4): 80-89
- [7] 徐恒振, 周传光, 尚龙生, 等. 溢油指示物(指标)HPLC-UV-D 研究 [J]. 交通环保, 1999, 20(5): 7-9
- [8] 赵恒强, 陈军辉, 张道来, 等. 基质固相分散-反相高效液相色谱特征指纹图谱鉴别渤海原油 [J]. 海洋环境科学. (已接收)
- [9] Wang Z D, Christensen JH. Environmental forensics: a contaminant specific approach [M]. New York: Elsevier, 2006: 409-464
- [10] 王丽, 何鹰, 王颜萍, 等. 近红外光谱技术结合主成分聚类分析判别海面溢油种类 [J]. 海洋环境科学, 2004, 23(2): 58-60
- [11] 庞士平, 郑晓玲, 何鹰, 等. 近红外光谱识别模拟海面溢油 [J]. 海洋科学进展, 2007, 25(1): 91-94
- [12] 包木太, 孙培艳, 崔文林, 等. 基于石油烃特征比值的多元统计方法进行原油鉴别 [J]. 分析化学, 2008, 36(4): 483-488
- [13] Wang Z D, Yang C, Fingas M, et al. Characterization, weathering and application of sesquiterpanes to source identification of spilled lighter petroleum products [J]. Environmental Science & Technology, 2005, 39: 8700-8707

- [14] 杨佰娟,徐晓琴,李庆玲,等.气相色谱质谱联用技术在海面溢油事故鉴别中的应用——案例分析[J].海洋环境科学,2008 27(6):661-670
- [15] 王传远,杜建国,贺世杰.海洋溢油的风化过程研究[J].海洋湖沼通报,2008 3:79-84
- [16] Wang Z D, Stout S A. Oil spill environmental forensics[M]. New York Elsevier 2007: 29-35

DEVELOPMENT OF A DISCRIMINATION METHOD OF BOHAI SEA SIMULATED OIL SPILLS BASED ON STABLE CHARACTERISTIC PEAK RATIO OF HPLC

ZHAO Hengqiang^{1,2} CHEN Junhui¹ HAN Bin¹ ZHANG Dong¹ YANG Baijuan¹
CHENG Hongyan¹ ZHANG Daolai¹ WANG Xiaoru^{1,3} LEE Fank Senchun¹

(1. Research Center for Marine Ecology, First Institute Oceanography of SOA, Qingdao 266061, China

2. College of Chemistry and Chemical Engineering Ocean University of China, Qingdao, 266100, China

3. Department of Chemistry of College of Chemistry and Chemical Engineering Xiamen University, Xiamen, 361005, China)

ABSTRACT

The effect of weathering outdoors on the distribution of HPLC characteristic peaks is examined, and a methodology using HPLC stable characteristic peak ratios combined with several statistical data correlation analysis methods is developed for oil differentiation, including clustering analysis and Student's *t*-test method. The origins of simulated oil spills can be speculated preliminarily through the method using HPLC stable characteristic peaks ratios combined with clustering analysis. Further, the oil spills and suspected sources can be successfully identified via using HPLC stable characteristic peaks ratios combined with Student's *t*-test method. The methodology using reverse phase HPLC stable characteristic peaks ratios combined with multi-statistical analysis is expected to be a powerful tool for the discrimination of oil spill discrimination.

Keywords HPLC, characteristic peaks ratios, cluster analysis, *t*-test, oil spill identification