

分析应用

海洋沉积物中磷脂类化合物中脂肪酸的 GC-MS 分析

林庆梅 陈进才 李玉桂 袁东星 郑天凌 洪华生

(厦门大学环境科学研究中心, 厦门, 361005)

摘要 应用 GC-MS 技术对海洋沉积物中磷脂类化合物的脂肪酸进行了分析, 鉴定出 70 种脂肪酸, 建立了磷脂类化合物中脂肪酸的 GC-MS 测定方法。加标脂肪酸系列化合物回收率为 72.8% ~ 91.5%。探讨了用磷脂类化合物估价海洋和河口沉积物中微生物生物量的可行性。

关键词 沉积物 磷脂类化合物 脂肪酸 GC-MS

海洋沉积物中微生物生物量的准确测定面临着许多困难。沉积物中微生物种群的结构、功能和相互关系经常改变, 在现场条件下不失真地测定微生物总量非常困难^[1]。在国外, 使用磷脂类化合物中的脂肪酸组成来估价海洋和河口沉积物中微生物的群落结构, 是近几年常用的一种生化方法, 但在国内却很少有报道。磷脂类化合物只存在于所有活细胞膜中。一旦生物细胞死亡, 其中的磷脂类化合物能显示出快速转换率, 而且生物含有相对固定量的磷脂类化合物, 所以磷脂类化合物可以作为生物量的标指^[2]。磷脂类化合物的这些特性和磷脂类化合物与生物关系的密切, 决定了用磷脂作为生物标记物的可行性, 利用它可以确定生态环境中微生物的生物量分布^[3]。此外更重要的是, 从磷脂类化合物的组成成分中还可以得到微生物群落结构方面的重要信息^[4,5]。

本文以厦门近岸海域和深圳大鹏澳表层沉积物中磷脂类化合物为研究对象, 建立了磷脂类化合物中脂肪酸的毛细管柱气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 测定方法。为利用磷脂类化合物估价海洋和河口沉积物中微生物生物量的可行性, 提供了基础数据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Finnigan 4510 GC-MS-DS; 超低温冷冻干燥机; 超声波清洗器; 离心机; 恒温水浴锅; KD-浓缩器。

三氯甲烷、甲醇、丙酮、石油醚 (30 ~ 60)、正庚烷等均重蒸馏处理; 正十九烷酸, 磷酸氢二钾, 无水硫酸钠, 浓盐酸, 浓硫酸, 60HF₂₅₄ 硅胶 (色谱柱用), 以上试剂均为分析纯。

1.2 样品处理

(1) 提取 采集的沉积物样品带回实验室后, 放入冰箱 (-4) 冷冻保存。样品经冷冻干燥 96h 后, 称 20g 干

样装入 250mL 具塞三角瓶中, 加入 20mL 磷酸氢二钾-盐酸缓冲溶液 (pH7.4), 50mL 甲醇, 25mL 三氯甲烷, 超声水浴萃取 2h 后, 浸泡过夜。将浸泡过液的样品转移至离心管中离心。移出离心上清液后, 用 20mL 磷酸氢二钾-盐酸缓冲溶液, 50mL 甲醇, 25mL 三氯甲烷洗涤残渣及容器, 再次离心。两次离心液合并加入分液漏斗中。提取液加入适量甲醇和水, 使三氯甲烷: 甲醇: 水 = 1: 1: 0.9, 分相, 取三氯甲烷层, 用 KD-浓缩器浓缩至约 1mL。

(2) 过柱 称取 5.0g 60HF₂₅₄ 硅胶 (400 目活化 4h) 装入直径 0.8cm, 柱长 20cm 的玻璃柱中, 湿柱法装柱, 三氯甲烷淋洗 60HF₂₅₄ 硅胶中的杂质。将上述浓缩液用高纯氮吹干, 加入 1 mL 的三氯甲烷, 使之溶解, 并转移到 60HF₂₅₄ 硅胶中。先用 10mL 三氯甲烷淋洗, 接着用 20mL 丙酮淋洗, 再用 25mL 甲醇淋洗, 收集最后的甲醇淋洗液。

(3) 酯化 在收集的甲醇淋洗液中加入适量正十九烷酸作为内标, 并加入 2mL 甲醇-甲苯 (1: 1 V/V), 16mL 硫酸-甲醇 (1.5: 100 V/V), 在 80 水浴下回流 70min。冷却后, 加入适量的水, 用 20mL 石油醚萃取, 萃取 3 次。萃取液加入 3g 无水硫酸钠, 干燥过夜。弃无水硫酸钠, 萃取液用高纯氮吹干, 进样前加入 50μL 正庚烷溶解。

1.3 GC-MS 测定

GC 条件: 石英毛细管柱 DB-5, 30m × 0.25mm, 膜厚 0.25μm, 柱温 60, 保持 2 min, 以 20 /min 升温至 150, 再以 4 /min 升温至 290 恒温; 汽化室和传送线温度为 290; 载气氮, 柱前压 68947.6Pa, 分流 30mL/min, 吹扫 10mL/min, Grob 进样, 无分流时间 1.2min。

MS 条件: EI 电离方式, 电子能量 70eV, 发射电流 0.20mA, 倍增器电压 1200V, 电离室温度 250; 扫描范围 45 ~ 450, 每程 1.5s。

1.4 全程回收率实验

在 20g 干沉积物样品中, 加入 0.20mL 标准脂肪酸混合

溶液(正十二烷酸, 正十四烷酸, 正十六烷酸, 正十八烷酸, 正二十烷酸及正二十六烷酸的酸醋酸丁酯溶液, 总浓度为0.9170mg/mL)。提取, 过柱, 酯化及GC-MS测定方法同上。

2 结果与讨论

2.1 磷脂类化合物脂肪酸的鉴定

经GC-MS-DS测定, 共鉴定出沉积物样品中磷脂类化合物的脂肪酸70种, 碳数为C₁₁~C₃₂, 其中包括直链, 侧链, 饱和和不饱和一元酸, 羟基酸, 二元酸。鉴定结果见表1及图1。

表1 沉积物样品中磷脂类化合物的脂肪酸

化合物序号	鉴定	化合物序号	鉴定
1	n11 0	36	oHi17 0
2	5Me11 0	37	2Me18 0
3	n12 1 2	38	10Me18 0
4	n12 0	39	br19 0
5	n13 0	40	n19 1
6	OH12 0	41	D16 0
7	D10 0	42	20 5
8	oH12 0	43	oH18 0
9	i14 0	44	n20 0
10	n14 0	45	n20 0
11	D11 0	46	n21 0
12	5Me14 0	47	oH20 0
13	4Me14 0	48	n22 2
14	i15 0	49	n22 0
15	a15 0	50	n23 0
16	n15 0	51	oH22 0
17	oH14 0	52	br24 0
18	5, 9, 13triMe14 0	53	n24 0
19	i16 0	54	oH23 0
20	n16 1 9	55	D21 0
21	n16 0	56	n25 0
22	10Me16 0	57	oH24 0
23	i17 0	58	oH24 0
24	a17 0	59	n26 0
25	17 1	60	D23 0
26	n17 0	61	oH25 0
27	5, 9diMe16 0	62	n27 0
28	oH16 0	63	D24 0
29	i18 0	64	oH26 0
30	18 1	65	n28 0
31	br18 0	66	n29 0
32	18 1 9	67	D26 0
33	18 1 11	68	n30 0
34	n18 0	69	n31 0
35	br19 1	70	n32 0

注: 序号见图1谱峰号; 脂肪酸以碳数 双键数表示; 指双键位置; n, i 分别为正、反异构; 5Me 即 5-甲基; 5, 9, 13triMe 即 5, 9, 13-三甲基; br 指侧键位置未定; D 为二元酸; oH 和 oH 分别为 -羟基和 -羟基。

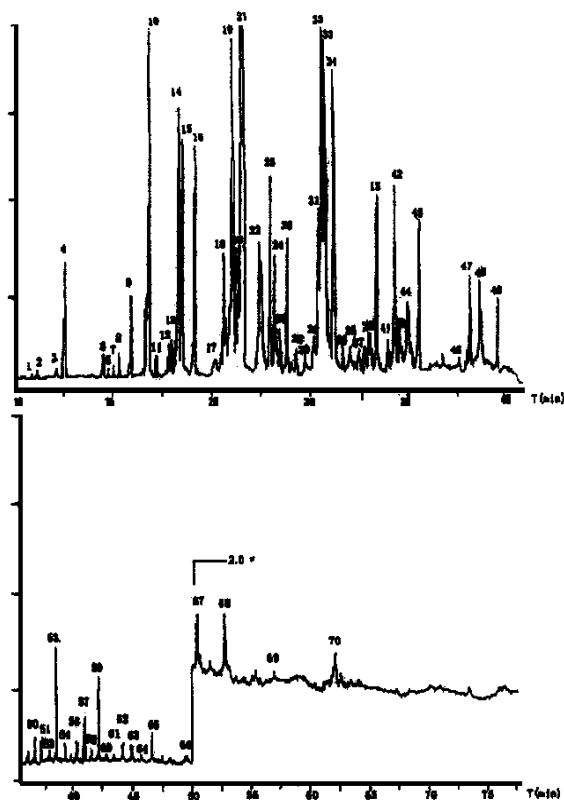


图1 磷脂类化合物脂肪酸甲酯生物的重建离子流图

2.2 全程回收率

实验结果列于表2。从表中可以看出, 加标的脂肪酸系列化合物回收率为72.8%~91.5%。在沉积物样品的化学处理过程中, 我们对提取条件进行了优化, 选用超声水浴萃取2h后浸泡过夜的提取方法, 避免了一些烦琐的操作。回收率的测定结果表明此方法可行。

表2 沉积物样品的加标回收率 (%)

样品成分	1	2	3	平均值
n12 0	69.3	89.1	81.6	80.0
n14 0	90.1	88.3	79.6	86.0
n16 0	91.3	94.8	88.5	91.5
n18 0	82.7	79.4	85.8	72.6
n20 0	88.7	79.6	74.2	80.8
n26 0	80.1	74.7	63.8	72.8

2.3 微生物生物量与正十六烷酸含量的关系

由于磷脂类化合物只存在于活细胞膜中, 沉积物中的高等植物, 浮游生物, 细菌等死生物体的磷脂无法保存, 因而所分离出的磷脂只能是细菌和微型藻活体中的磷脂。这是可以将磷脂类化合物中脂肪酸的主要成分正十六烷酸作为细菌生物量指标的依据。在本实验中, 我们对厦门近岸和深圳大鹏澳10个站位沉积物样品进行了分析。将正十六烷酸在各站位样品中的含量与这些站位沉积物中细菌生物量(采用吖啶橙荧光染色法测定)作比较, 结果见图2。

从图中可以看出,它们之间存在着较大的相关性,呈正相关关系。这说明用磷脂类化合物估价海洋和河口沉积物中微生物的生物量是可行的。

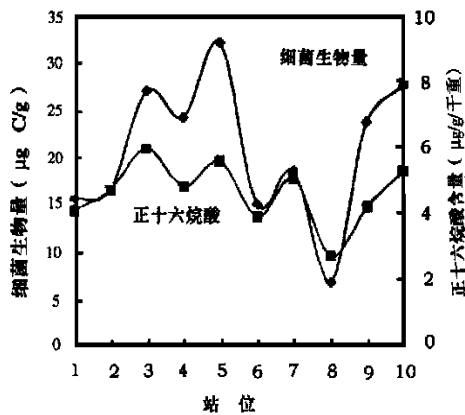


图2 细菌生物量与正十六烷酸含量的关系

2.4 讨论

本实验的有机溶剂均在玻璃容器中进行重蒸馏处理。溶剂的全程空白只有几个很小的色谱峰,且为长链脂肪烃,与脂肪酸的保留时间没有重叠,不干扰脂肪酸的分析。

参考文献

- 1 Bobbie R, White D C. Appl Environ Microbiol, 1980, 39: 1212 ~ 1222
 - 2 Perry G J, Volkman J K, Johns R B et al. Geochim Cosmochim Acta, 1979, 43: 1715 ~ 1725
 - 3 白青云. 农业环境保护, 1997, 16 (6): 252 ~ 256
 - 4 Lechevalier M P. Crit Rev Microbiol, 1978, 5: 109 ~ 210
 - 5 White D C, Davis W M, Nickels J S. Oecologia, 1979, 40: 51 ~ 62
- 收稿日期: 2000 - 11 - 01

林庆梅, 女, 工程师, 主要从事色谱质谱联用及环境监测方面的研究工作。

Analysis of fatty acids of phosphotides in marine sediment by GC-MS. Lin Qingmei, Chen Jincui, Li Yugui, Yuan Dongxing, Zheng Tianling, Hong Huasheng (Environmental Science Research Center, Xiamen University, Xiamen, 361005)

A method has been established for analyzing fatty acids of phosphotides in marine sediment by GC-MS and seventy kinds of fatty acids have been identified. The recoveries are 72.8% ~ 97.5% for series compounds of fatty acids added with standards. The feasibility of using phosphotides to evaluate the microbial biomass in marine and estuary sediments was investigated.

水泥熟料 X 射线定量物相分析方法的对比研究*

洪汉烈

赵曼曲

(武汉理工大学材料研究与测试中心, 武汉, 430070) (深圳市技术监督局质量保证中心, 深圳, 518033)*

摘要 对水泥熟料物相定量分析的常规 X 射线衍射法(外标法和重叠峰自清洗法)与 X 射线全谱拟合法的对比分析。结果表明,虽然外标法和重叠峰自清洗法对于水泥熟料的物相定量分析是可行的,但其结果的准确性往往不够理想;全谱拟合法由于最大限度地克服了常规 X 射线衍射存在的纯标样制备难,以及微吸收、择优取向、衍射峰重叠等问题,操作更为简便,分析结果具有更高的准确性。

关键词 X 射线衍射 物相定量分析 全谱拟合

1 前言

水泥熟料主要由四个物相组成,一般含有 50% ~ 75% 的 C_3S ($3CaO \cdot SiO_2$)、10% ~ 20% 的 $-C_2S$ ($-2CaO \cdot SiO_2$)、5% ~ 10% 的 C_3A ($3CaO \cdot Al_2O_3$), 以及约 10% 的 C_4AF ($4CaO \cdot Al_2O_3 \cdot Fe_2O_3$), 有时还含有少量的游离氧化钙 (CaO) 及方镁石 (MgO)。硅酸盐水泥是在水泥熟料中加入

约 5% 的石膏,经粉碎、混合后制成。因此,为了便于对水泥质量进行监控,在水泥工业中,水泥熟料物相的定量分析具有十分重要的意义。

水泥熟料物相定量分析的方法主要有 Bouge 法、显微镜统计法及 X 射线衍射法。Aldridge^[1]曾经对上述三种方法进行对比分析,指出 X 射线衍射法具有潜在优越性。然而,

*湖北省自然科学基金资助项目 (99J072)