

海水悬浮物质中脂肪酸的毛细管 气相色谱测定*

叶新荣 朱桂海

(国家海洋局第二海洋研究所, 杭州 310012)

提要 应用毛细管气相色谱和气相色谱-质谱联用技术分析长江口海水悬浮物质中饱和及不饱和脂肪酸。结果表明,该技术具有高分辨率和灵敏度,测试的精密度和准确亦较好。该法一次测定可分别得到饱和、不饱和及支链脂肪酸在海水悬浮物中的含量,适用于海洋有机生物地球化学研究。

关键词 悬浮物质 脂肪酸 气相色谱

脂肪酸作为有机地球化学生物标记物,可用于评价环境中有机物质的来源和转移过程^[1-3]。海水悬浮物质和沉积物都含有脂肪酸,其中悬浮物质中脂肪酸组分比较复杂,一般含有饱和、不饱和及支链异构体脂肪酸,碳数分布大约为 $C_{12}-C_{30}$,用填充柱气相色谱难于分离测定宽沸程的脂肪酸。Brault^[4], Saliot 等^[5,6]用气相色谱分析海水悬浮物质中的脂肪酸,并做了较多研究工作。国内这方面的研究刚起步。本文介绍了采用毛细管气相色谱法测定长江口海域悬浮物质中脂肪酸,获得较满意的结果。

一、实 验

1. 仪器与试剂

(1) 主要仪器设备 日本岛津 GC-7AG 气相色谱仪,氢火焰离子化检测器, C-R1B 色谱数据处理机。50m × 0.22mm BP₁ 键合相弹性石英毛细管气相色谱柱(SGE 公司)。索氏抽提器,旋转蒸发器 ZQF₈₁ 型(上海医械专机厂)。

(2) 试剂 色谱标准样品:肉豆蔻酸(14:0)、棕榈酸(16:0)、油酸(18:1)、花生酸(20:0)、十六碳烯-[9]-酸(16:1)、二十碳烯酸(20:1)、芥酸(22:1)、蜡酸(26:0)和峰花酸(30:0),以上为 Sigma 化学公司产;硬脂酸(18:0)、十九酸(19:0)和山萘酸(22:0)为上海试剂一厂产。所有脂肪酸标样的纯度均在 99% 以上。溶剂:二氯甲烷(分析纯)、甲醇(分析纯)、正己烷(分析纯),使用前都用全玻璃蒸馏装置重蒸。

2. 悬浮物质的收集与预处理

分析流程如图 1 所示,用水泵或 20L 玻璃瓶取长江口海水样品,用装有 1 μ m 玻璃纤维滤纸的过滤器过滤 10—50L 海水,获得的悬浮颗粒物在 -20 $^{\circ}$ C 下冷藏,经冷冻干

* 浙江大学中心实验室作了脂肪酸甲酯的气相色谱-质谱鉴定,谨志谢忱。
接受日期:1991 年 8 月 16 日。

燥,用二氯甲烷-甲醇(5:2)混合溶剂在索氏萃取器中抽提 48h,萃取物在 40℃ 水浴中用旋转蒸发器减压蒸发至近干,得到总颗粒态类脂物。在类脂物中加入已知量的内标物(十九酸),将类脂物用 2mol KOH-CH₃OH 溶液皂化 2h,用二氯甲烷-正己烷溶液萃取非皂化的烃类物质,皂化的水相用 1:1 盐酸酸化至 pH 为 2,再加入二氯甲烷萃取脂肪酸组分。将所得的脂肪酸用 14% BF₃ 甲醇溶液甲酯化,得到的总脂肪酸甲酯混合物用硅胶 G 薄层色谱分离和净化,展开剂为正己烷-乙醚-甲醇(35:5:1),一元脂肪酸甲酯斑点的 R_f 值为 0.77,刮下斑点,用二氯甲烷洗脱脂肪酸甲酯,然后将一元脂肪酸甲酯用毛细管气相色谱法分析测定。

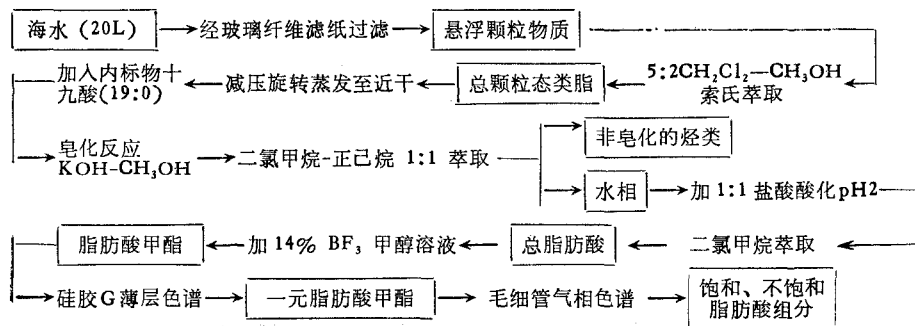


图 1 长江口水体悬浮物质中脂肪酸分析流程图

Fig. 1 Analytical flow diagram of fatty acids in suspended matter in Changjiang River Estuary sea water

3. 毛细管气相色谱分析

(1) 色谱条件 色谱柱为 BP₁ 键合相弹性石英毛细管色谱柱,长为 50m,内径为 0.22mm,柱温为 150℃ 至 295℃,以 3℃/min 的升温速率程序升温,并在 295℃ 恒温 32min。进样器温度 300℃,氢火焰离子化检测器温度 300℃,载气为高纯氮(N₂),尾吹气为 N₂,流速 50ml/min,进样量为 1μl,分流比 1:10,放大器 R₂,衰减 1/4。

(2) 定性分析 在同一色谱条件下,用已知的脂肪酸甲酯标样色谱峰的保留时间与试样脂肪酸甲酯组分色谱峰的保留时间对照进行定性。为了增加可靠性,同时用气相色谱-质谱法作鉴定。气相色谱-质谱分析采用 Finigan-Mat 公司生产的 4510 GC-MS 联用仪,Nowa-4 计算机数据系统。BP₁ 弹性石英毛细管色谱柱,载气为氦气,用电子轰击源,电离电压 70eV,图 2—5 为总离子色谱及部分脂肪酸甲酯质谱图。

(3) 定量分析 采用内标法测定海水悬浮颗粒物中饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸的含量。试样经毛细管气相色谱分离,得到各脂肪酸组分的峰和内标物的峰由 C-R1B 色谱数据处理机积分为峰面积,并进行计算,打印出每个脂肪酸组分在海水悬浮物质中的含量(μg/L)。其计算公式为:

$$X_i = \frac{m_i \cdot A_i \cdot f_{i,i}}{A_s \cdot V}$$

式中, X_i, 试样组分 i 的含量; m_i, 加入内标物的质量; A_i, 组分 i 的峰面积; A_s, 内标物质的峰面积; f_{i,i}, 组分 i 与内标物相比的校正因子; V, 水样的体积(L)。

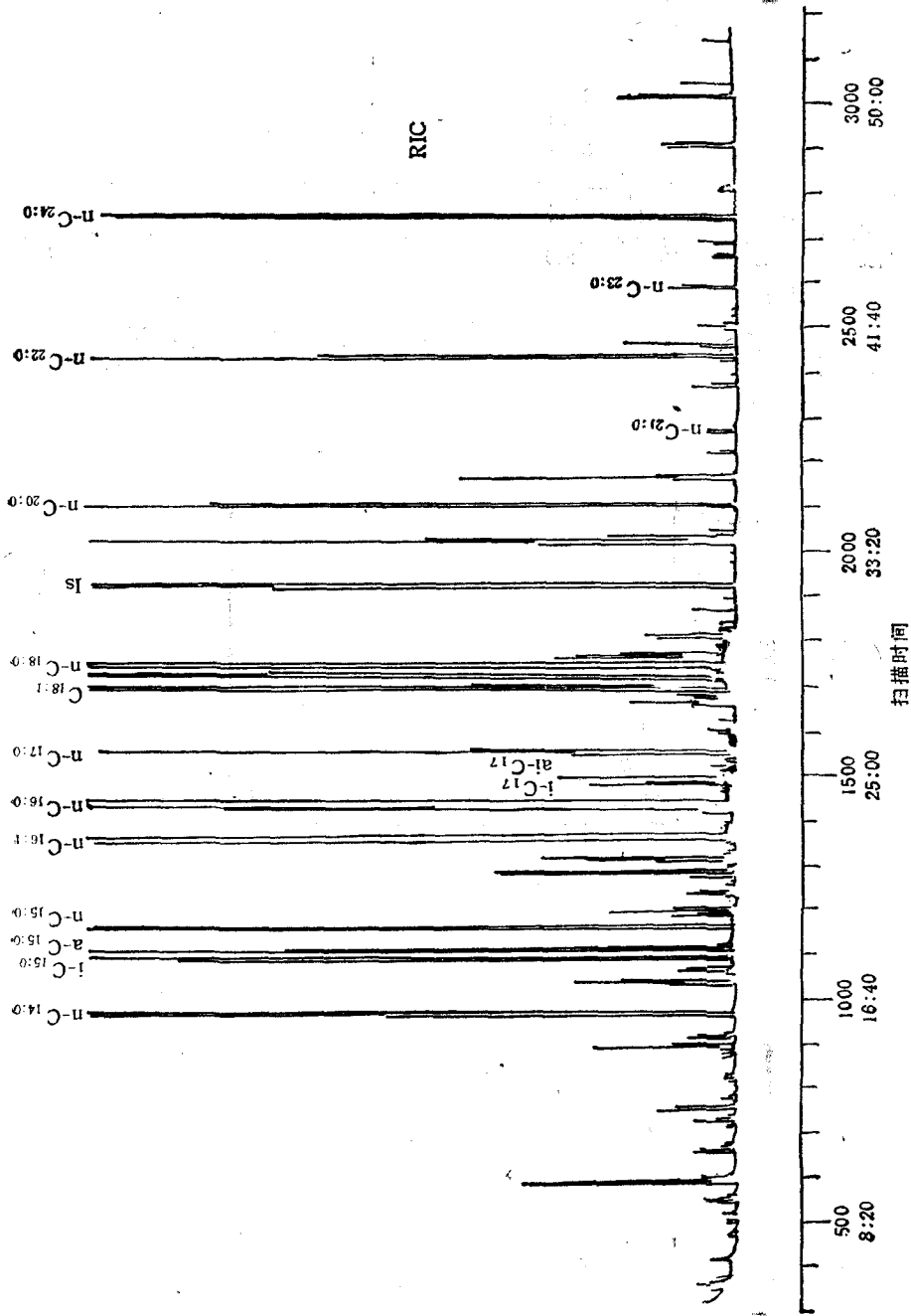


图 2 长江口海水悬浮颗粒物中脂肪酸甲酯的气相色谱-质谱的总离子色谱图
Fig. 2 GC-MS reconstructed ion chromatogram of fatty acid methyl esters in suspended matter from the Changjiang estuary

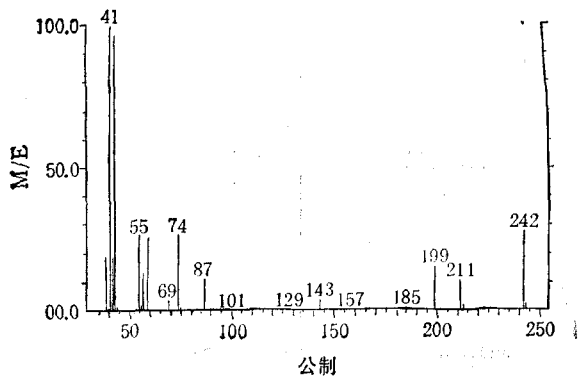


图 3 肉豆蔻酸甲酯质谱图
Fig. 3 Mass Spectrum of myristic acid methyl ester

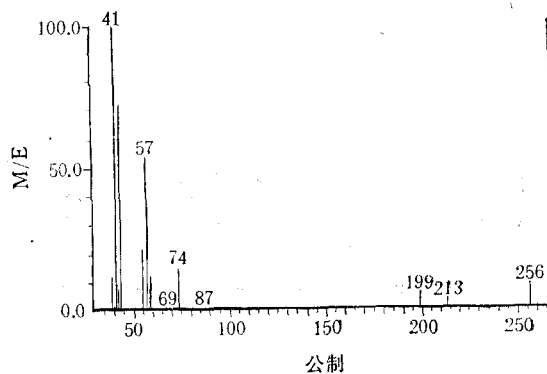


图 4 正十五酸甲酯质谱图
Fig. 4 Mass Spectrum of pentadecanoic acid methyl ester

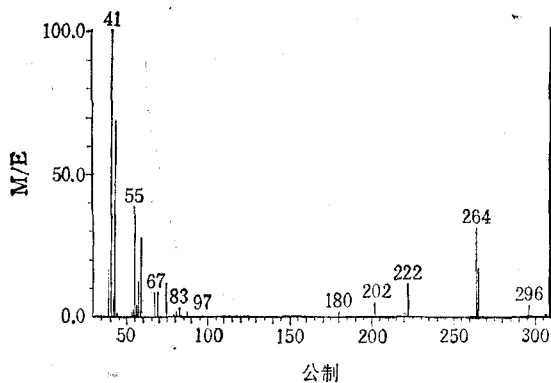


图 5 油酸甲酯质谱图
Fig. 5 Mass spectrum of oleic acid methyl ester

二、结果与讨论

1. 毛细管气相色谱柱性能

从图 6 可见, BP₁ 键合相弹性石英毛细管色谱柱具有较高的分离效能, 对饱和、不饱和、支链异构脂肪酸甲酯的峰都分离较好, 满足定性定量要求。

实验结果表明这种毛细管柱热稳定性好, 从 100—300°C 的柱温程序升温过程中不需要参比柱来补偿基线的向上飘移, 从而提高了仪器的灵敏度, 在 220°C 柱温下, 棕榈酸甲酯标样的最低检测限为 1.5×10^{-10} g/s, 为海水悬浮物质中微量脂肪的分析测定提供有利条件。

2. 方法的精密度

为了检验该方法的精密度, 用 9 种脂肪酸甲酯标样重复 8 次实验, 用峰面积归一化计算, 标准偏差列在表 1, 结果表明该方法重现性较好。

表 1 方法的精密度 ($n = 8$)Tab. 1 precision of the methods ($n = 8$)

脂肪酸	1 (%)	2 (%)	3 (%)	4 (%)	5 (%)	6 (%)	7 (%)	8 (%)	平均值	标准偏差
16:1	5.70	5.69	5.74	5.69	5.73	5.69	5.86	5.70	5.73	±0.19
16:0	11.90	11.96	11.85	11.92	11.95	11.91	11.97	11.95	11.93	±0.04
18:1	8.06	7.53	7.51	7.85	7.40	7.41	7.67	7.71	7.65	±0.22
18:0	17.40	17.43	17.54	17.46	17.30	17.49	17.77	17.44	17.52	±0.15
19:0	17.91	17.95	17.90	17.94	17.86	17.89	17.96	17.87	17.91	±0.04
20:1	7.94	7.92	8.00	8.02	7.89	7.88	7.66	7.87	7.90	±0.11
20:0	17.92	18.00	17.87	17.93	17.65	17.71	17.95	18.01	17.88	±0.13
22:1	7.67	7.85	7.86	7.68	7.96	8.00	7.50	7.70	7.78	±0.17
22:0	5.50	5.51	5.53	5.50	5.47	5.60	5.56	5.59	5.53	±0.05

3. 回收率

本方法采用内标法定量, 内标物加入到萃取物中, 以评价预处理过程中试样的回收率。内标物加入后, 如果在预处理过程中试样部分损失也不影响定量结果。从上面计算公式可知, 计算含量与进样量无关, 只与加入的内标量有关, 所以在进样前不需要定体积。表 2 为 6 个脂肪酸甲酯标样的回收率结果, 可见回收率较好。内标法可以抵消由进样量不准而产生的误差, 而且在甲酯化反应中脂肪甲酯的转化率达不到百分之百也不影响回收率, 从而提高了定量分析的准确度。内标法定量比外标法定量要优越得多。

表 2 脂肪酸的回收率试验结果

Tab. 2 Recovery of fatty acids

脂肪酸	加入量 (μg)	实测量 (μg)	回收率 (%)
14:0	9.55	9.49	99.40
16:0	9.94	9.95	100.10
18:0	10.40	10.35	99.52
18:1	10.75	10.65	99.07
20:0	10.15	10.05	99.01
22:0	10.40	10.25	98.56

4. 内标物质的选择

选择内标物质的要求是能够与试样组分峰分离开, 和试样组分性质相似, 能经历试样预处理的全过程, 试样本身不含内标物质组分或者很微量, 据报道海水悬浮物质中十九酸甚微^[1]。因此本方法选择十九酸作内标, 只要在试样中加入足够量的十九酸, 试样中所含的十九酸可忽略不计。

5. 悬浮物质脂肪酸的分析结果

图 6 为长江口海域夏季 C_1 站海水悬浮物质中脂肪酸甲酯的毛细管气相色谱图, 分析结果列在表 3。结果表明, 该悬浮物质中含有饱和脂肪酸 ($C_{14:0}$ — $C_{30:0}$)、不饱和脂肪酸 ($C_{16:1}$, $C_{18:1}$) 和支链脂肪酸 (i - $C_{15:0}$, ai - $C_{15:0}$, i - $C_{17:0}$, ai - $C_{17:0}$)。脂肪酸组分 C_{14} — C_{20} 范围内含量较高, C_{24} — C_{30} 脂肪酸含量较低, 反映了这些脂肪酸的物质来源主要是浮游生

物和藻类,并有微生物贡献的支链脂肪酸,而陆源物质相对较少。

长江口及其邻近海域脂肪酸的总浓度因站位、季节、水深和潮位不同而异,内河悬浮物质中脂肪酸的平均浓度为 $19.7\mu\text{g/L}$,长江口海域脂肪酸平均浓度为 $8.0\mu\text{g/L}$,夏季平均浓度为 $9.4\mu\text{g/L}$ (1986年),冬季平均浓度为 $6.4\mu\text{g/L}$,深层浓度为 $18.6\mu\text{g/L}$,表层浓度为 $11.2\mu\text{g/L}$,低潮位浓度为 $22.8\mu\text{g/L}$,高潮位浓度为 $6.4\mu\text{g/L}$ 。

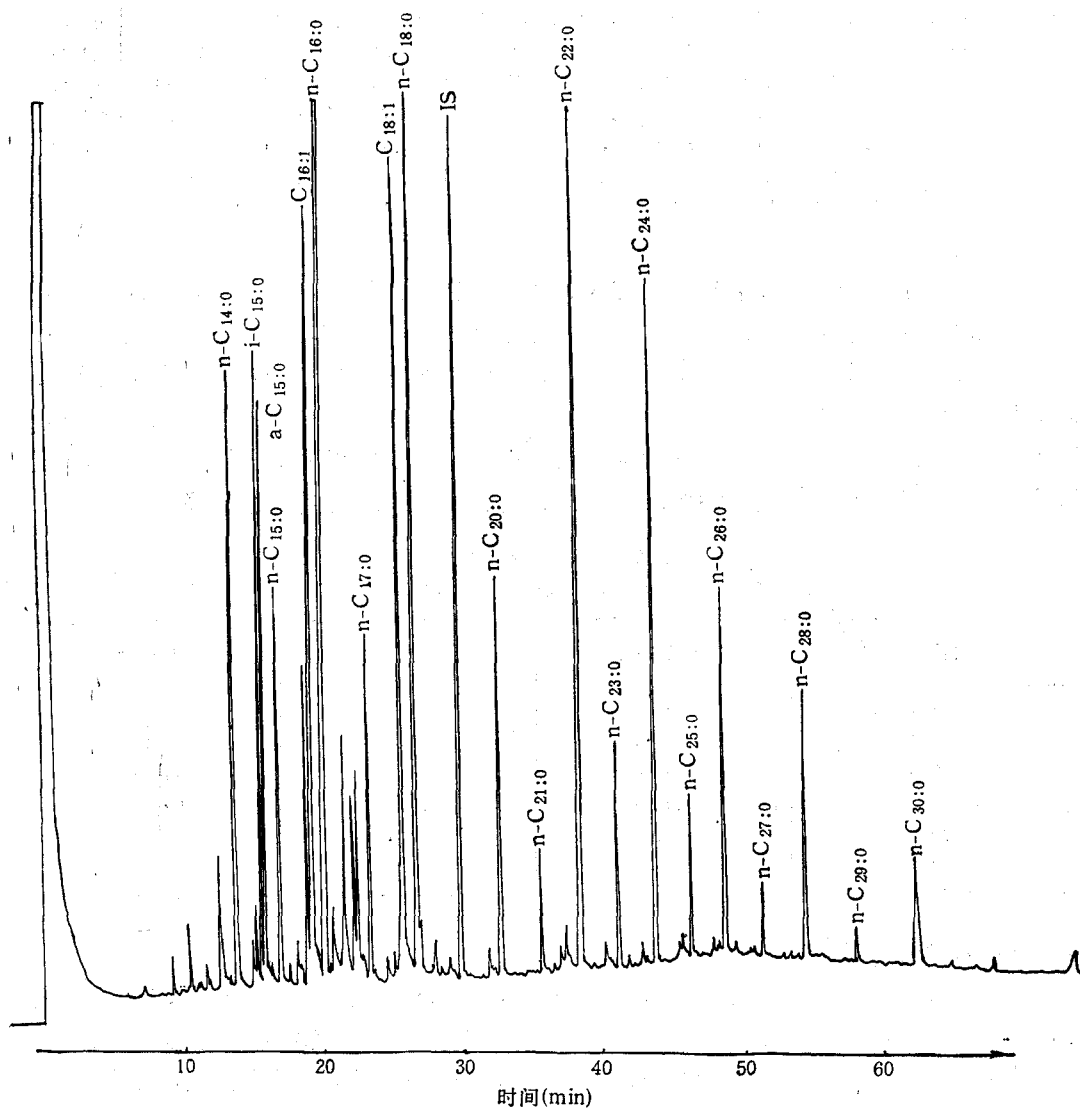


图6 长江口 C_1 站海水悬浮物质中脂肪酸甲酯的毛细管气相色谱图

Fig. 6 Capillary column gas Chromatogram of fatty acid methyl esters in suspended matter from the Chanjiang estuary Station C_1

综上所述,长江口悬浮物质中脂肪酸由浮游生物和微生物输入的脂肪酸和长江径流带入的陆源高等植物蜡的脂肪酸组成。

表 3 长江口 C₁ 站海水悬浮物质中脂肪酸甲酯的分析结果Tab. 3 Analytical results of fatty acid methyl esters in suspended matter at the Changjiang estuary station C₁

碳数	脂肪酸甲酯组分	含量 (μg/L)	碳数	脂肪酸甲酯组分	含量 (μg/L)
n-C _{14:0}	肉豆蔻酸甲酯	0.222	n-C _{20:0}	花生酸甲酯	0.185
i-C _{15:0}	异十五酸甲酯	0.187	n-C _{21:0}	正二十一酸甲酯	0.046
ai-C _{15:0}	反式异十五酸甲酯	0.202	n-C _{22:0}	山萘酸甲酯	0.384
n-C _{15:0}	正十五酸甲酯	0.152	n-C _{23:0}	正二十三酸甲酯	0.084
n-C _{16:1}	十六碳烯酸甲酯	0.378	n-C _{24:0}	正二十四酸甲酯	0.266
n-C _{16:0}	棕榈酸甲酯	1.910	n-C _{25:0}	正二十五酸甲酯	0.061
i-C _{17:0}	异十七酸甲酯	0.053	n-C _{26:0}	蜡酸甲酯	0.144
ai-C _{17:0}	反式异十七酸甲酯	0.080	n-C _{27:0}	正二十七酸甲酯	0.031
n-C _{17:0}	正十七酸甲酯	0.137	n-C _{28:0}	正二十八酸甲酯	0.158
n-C _{18:1}	油酸甲酯	0.298	n-C _{29:0}	正三十九酸甲酯	0.021
n-C _{18:0}	硬脂酸甲酯	0.732	n-C _{30:0}	峰花酸甲酯	0.102

三、结 语

应用毛细管气相色谱法测定海水悬浮颗粒物质的脂肪酸甲酯与传统的填充柱气相色谱法比较具有以下特点:

1. 分辨率高,能很好地分离 C₁₄—C₃₀ 的饱和、不饱和、支链脂肪酸甲酯,定性和定量比较准确。
2. 精密度好,内标法定量回收率高。
3. 各组分的色谱峰形尖锐、对称、提高了色谱仪的灵敏度,可检测出试样中微量组分。

参 考 文 献

- [1] Brault, M., et al., 1984, Fatty acids from particulate matter and sediment in hydrothermal environments from the east Pacific rise, near 13°N, *Org. Geochem.*, 6: 217—222.
- [2] Gillan, F. T., et al., 1981, Monounsaturated fatty acid as specific bacterial markers in marine sediments, *Advances in Organic Chemistry*, Wiley/Heyden, pp. 198—206.
- [3] Kattner, G. et al., 1983, Development of lipids during a spring plankton bloom in the northern North Sea I. particulate fatty acid, *Mar. Chem.*, 14: 149—162.
- [4] Perry, G. J., et al., 1979, Fatty acid of bacterial origin in contemporary marine sediments, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 42: 1715—1725.
- [5] Saliot, A., et al., 1981, Analysis and budget of biogeochemical markers in dissolved small and large size suspended matter in the ocean, *Advances in Organic Chemistry*, Wiley/Heyden, pp. 251—258.
- [6] Saliot, A. et al., 1982, Organic sedimentation in the water column in the Arabian Sea: relationship between the lipid composition of small and large size, surface and deep particles, *Mar. Chem.*, 11: 257—278.

DETERMINATION OF FATTY ACIDS IN SUSPENDED MATTER BY CAPILLARY GAS CHROMATOGRAPHY

Ye Xinrong and Zhu Guihai

(*Second Institute of Oceanography, SOA, Hangzhou 310012*)

ABSTRACT

Seawater samples were immediately filtered on board ship with 1 μ m glass fibres and obtained suspended matter samples from Changjiang Estuary seawater were kept frozen until analysis in laboratory. Before extraction, suspended matter were freeze-dried. Lipids were extracted in a soxhlet apparatus using 5:2 mixture of dichloromethane and methanol. Internal standard was added to each extract in order to evaluate the efficiency of the following analytical steps. The extract was saponified by 2 mol/L KOH-CH₃OH and fatty acids mixtures were extracted. Fatty acids were methylated using 14% BF₃ in methanol. Fatty acids esters mixtures were isolated with thin layer chromatography to get monofatty acids which were identified by GC-MS-DS. Determination of fatty acid methyl esters was performed by capillary gas chromatography. The method of internal standard was used in quantitative analysis. Data were corrected for losses during laboratory work-up, using recovered internal standard. Analytical results was satisfactory.

Key words Suspended matter, Fatty acids, Gas chromatography.