

# pH 对 SPE-HPLC-ESI-Q-TOF-MS 检测海水 中小分子活性物质的影响研究\*

张倩<sup>1, 2, 3, 4</sup> 宋金明<sup>1, 2, 3, 4</sup> 李学刚<sup>1, 2, 3, 4</sup> 彭全材<sup>1, 2, 3, 4</sup>  
袁华茂<sup>1, 2, 3, 4</sup> 李宁<sup>1, 2, 3, 4</sup> 段丽琴<sup>1, 2, 3, 4</sup>

(1. 中国科学院海洋生态与环境科学重点实验室 中国科学院海洋研究所 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋生态与环境科学功能实验室 青岛 266237; 3. 中国科学院大学 北京 100049; 4. 中国科学院海洋大科学研究中心 青岛 266071)

**摘要** 海水溶解有机物(dissolved organic matter, DOM)中含有的生物活性物质在海洋生态系统中作用巨大,但因缺乏适合的分离提取方法而严重阻碍了对其不同组分在生态系统中作用的探索。固相萃取法对富集提取海水 DOM 十分有效,在用其提取海水 DOM 时,海水 pH 对活性物质提取效果的影响很大,但目前针对海水的这种影响尚存在很大争议。本文以天然近海海水作为基质,探究不同 pH 条件下用亲水-疏水平衡(hydrophilic-lipophilic balanced, HLB)固相萃取小柱萃取海水中活性分子的提取效率,并使用高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(HPLC-Q-TOF-MS)在负离子(ESI-)模式下检测解析提取物的组成。研究结果表明,当海水样品 pH 为中性和强酸性时都能获得较好的提取效率,随着 pH 的降低,提取物质谱的整体响应值降低,但可识别的谱峰数目增加,提取出有机物的分子量和性质差异都更广泛。分析提取物分子在范克雷维伦(van Krevelen)图和质荷比-氢碳比( $m/z$ -H/C)图上的分布发现,中性条件适合提取饱和度较高的小分子化合物,而具有生物活性的带有不饱和基团的化合物及蛋白质、糖类等生物大分子在强酸性提取条件时提取效果和分辨率更好。综合提取效率、有效峰数目和分子组成特征考虑,用 HLB 固相萃取小柱提取近海海水中的小分子活性物质时,将海水样品 pH 调节为 2 较为适宜。

**关键词** 有机小分子活性物质; 固相萃取分离; 海水 pH 影响; HPLC-ESI-Q-TOF-MS  
**中图分类号** P714.4 **doi:** 10.11693/hyh20180300056

海洋中溶解有机物(dissolved organic matter, DOM)是地球上最大且最具异质性的活性碳库,其浓度、组成和循环在过去 20 多年中吸引了众多学者的关注与研究(宋金明等, 2008, 2018; Kujawinski *et al.*, 2009)。海洋 DOM 大部分由难以被生物利用的腐殖质等物质组成,但其中也有大量具有生物活性的分子,其独特的生物或生理作用不仅为人类研发新药物或材料提供启示,而且在生态系统中也发挥着重要作用

用,特别是其中的化感物质可以显著促进或抑制浮游植物的生长(宋金明等, 2018)。然而,由于这些活性物质来源多种多样,化学组成十分复杂,包括氨基酸、糖类、脂肪酸、酚、萜、大环内酯、环聚醚、嘌呤碱等(Kujawinski *et al.*, 2009; 彭全材等, 2014; Assunção *et al.*, 2017),在海水中单组份有机物的浓度极低(通常小于 1mmol/L),而海水又是一种含有大量无机盐的复杂基质(Dittmar *et al.*, 2008; Koprivnjak *et al.*

\*青岛海洋国家实验室鳌山科技创新计划项目, 2016ASKJ14 号; 国家自然科学基金项目, 41376092 号; 中国科学院仪器设备功能开发技术创新项目, HYQY-GNKF2016-1-2 号; 国家自然科学基金委-山东省联合资助项目, U1606404 号。张倩, 博士研究生, E-mail: zhangqian314@mails.ucas.ac.cn

通讯作者: 宋金明, 博士生导师, 研究员, E-mail: jmsong@qdio.ac.cn

收稿日期: 2018-03-19, 收修改稿日期: 2018-07-10

al, 2009), 沉积物的再悬浮与颗粒物的形成与分解有严重干扰有机组分的检测(宋金明等, 2018), 使得检测这些活性物质在海洋环境中的存在形态和含量变得极其困难, 探究它们在生态系统中发挥何种作用只能依靠实验室模拟培养和野外观测现象来猜测(Song *et al.*, 2018)。这些物质中仅有少量组分可以确定为已知物质, 其余绝大部分只能划分到大类, 缺乏分子层面的描述(张倩等, 2017)。

如何提取海水中的有机活性物质是探知其组成和含量的关键一环。为进行更精确的分子鉴定, 从理论上来说所得提取物应脱去大体积的海水、完全脱盐, 保留下足量、有组分代表性的 DOM, 且处理步骤不能引入污染(Dittmar *et al.*, 2008; Koprivnjak *et al.*, 2009; 孙玲玲等, 2018)。经过几十年的努力, 基于固相萃取小柱的 DOM 提取方法已经建立并且广泛应用于各种环境样品, 与 XAD 树脂或超滤法相比, 使用固相萃取小柱富集提取海水中的有机活性物质不需要冗长的前处理过程, 提取效率高, 操作流程简单方便, 极大地降低了人工操作对提取效率的影响程度, 使结果更具可重复性(Dittmar *et al.*, 2008)。不同固相萃取填料分离得到的提取物组成有所差异, PPL 填料倾向于保留高比例的含氮化合物, C18 填料对于高饱和度的分子更具亲和力, 亲水-疏水平衡(Hydrophilic-Lipophilic Balanced, HLB)填料对极性和非极性分子都有较好的提取效果, 并且对于酸碱和干燥等不利条件有很好的耐受性, 尤其适用于野外采样的现场处理, 已被广泛应用于从海水中检测各类有机物(韩典峰等, 2016)。

使用固相萃取法提取海水 DOM 时, 通常需要对水样进行预处理, 但不同文献报道的预处理方法及原因各不相同。采用常规固相萃取法提取海水 DOM 时, 通常需要加酸酸化以防止金属离子络合和提高提取效率(Cawley *et al.*, 2016)。Cawley 等(2016)鉴定南极盐湖间隙水中的溶解有机物时将水样酸化至 2。在用 HLB 小柱提取自然水体中的药物、抗生素(张金等, 2015)、雌激素(廖涛等, 2013)和酰胺类除草剂(吴春英等, 2016)时, 通常将水样 pH 调节为 3 以获得最大提取效率。顾佳萍(2011)研究软骨藻酸的提取条件时也发现, 采用较大量(500mL)海水时 pH 为 3 能收获最大提取效率。袁圣柳等(2013)用 HLB 小柱提取生活污水中的抗精神病药物时将水样 pH 调节至 7。陈猛等(2009)探究水样 pH 对于 HLB 小柱提取自然水体中农药残留的影响时发现, 水样 pH 在 6—8.5 的变化对

于提取效率没有影响。采用 HLB 小柱提取海水中的除草剂(韩典峰等, 2016)、兽药(洪家俊等, 2013)、农药(孙静等, 2015)和有机磷酸酯(陈玫宏等, 2017)时, 也不需调节水样 pH 就可获得理想的回收率。但 Dittmar 等(2008)用盐酸将海水 pH 酸化至 2, 并未酸化和加 NaOH 调节 pH 至 12 的水样作为对照, 发现其对有机酸和酚类的提取效率仅为酸化水样的三分之一。这些成果充分说明在前处理环节选择合适的样品 pH 对取得理想的提取和检测结果至关重要。但到目前为止, 用固相萃取法提取海水 DOM 的最适 pH 仍存在争议。虽然一些研究在定性分析海水中的天然溶解有机物时将海水 pH 酸化至 2(Cawley *et al.*, 2016; Hertkorn *et al.*, 2016; LaRowe *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017), 但这些报道均基于受人类活动影响很小、溶解有机物来源相对简单的大洋或极地水体, 而近海海水中的溶解有机物种类更加多样, 组成成分与大洋溶解有机物有较大差异, 其中来源于人类活动的活性有机物分子占很大比例。针对近海海水特殊的有机物组成情况(梁宪萌等, 2016), 应选用何种 pH 条件对其中的活性分子萃取效果最好? 不同样品 pH 对表征其分子组成又有什么影响? 这些问题尚未见具体分析。基于样品 pH 对 HLB 固相萃取小柱的重要影响, 本文重点研究了不同 pH 条件下用 HLB 固相萃取小柱提取近海水中的活性物质(分子)的提取效率, 并使用高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(HPLC-Q-TOF-MS)仪器在负离子(ESI-)模式下定性分析检测解析提取物的具体分子组成。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

电喷雾四极杆飞行时间质谱(ESI-Q-TOF MS)(德国 Bruker 公司); 1260 Infinity 液相色谱系统(美国 Agilent 公司); 固相萃取装置(美国 Agilent 公司); 氮吹仪; GM-0.33A 型隔膜真空泵(天津津腾实验设备有限公司); Seven Excellence 多参数 pH 计(美国梅特勒-托利多集团); VarioTOC 总有机碳分析仪(德国 Elementar 公司); 连续流动分析仪(德国 QuAatro 公司)。

InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱(美国 Agilent 公司); Supel-Select HLB 小柱(美国 Sigma-Aldrich 公司); GF/F 滤膜(英国 Whatman 公司); 甲醇和乙腈(HPLC 级, 德国 Merck 公司), NaCl(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。超纯水系统(18 MΩ cm)

由本实验室 Milli-Q 超纯水系统(美国 Milli-pore 公司)制备。

所有玻璃器皿及滤膜均经过马弗炉高温灼烧(560°C, 6h), 并用超纯水洗净烘干。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 海水样品采集** 实验用海水采集自南黄海海滨青岛汇泉湾, 采水使用的玻璃广口瓶事先经过 560°C 灼烧 5h, 用超纯水冲洗干净并烘干, 采水前用样品海水润洗, 采得样品立即运回实验室进行下一步处理。

**1.2.2 海水样品前处理** 海水样品采集后立即使用干净的玻璃滤器通过 Whatman GF/F 玻璃纤维膜(预先 450°C 灼烧 5h 并用样品海水浸洗)过滤, 用 pH 计测定海水 pH 和盐度, 留出部分样品储存于配有聚四氟乙烯垫片和旋口瓶盖的玻璃瓶中, -20°C 保存以备溶解有机碳(dissolved organic carbon, DOC)和溶解有机氮(dissolved organic nitrogen, DON)测定。剩余样品分为 7 组, 分别用盐酸酸化至 pH 为 2、3、4、5、6、7 和不酸化。

本文选择以亲水改性苯乙烯聚合物为填料的 HLB 固相萃取小柱进行实验, 使用步骤依据厂家提供的推荐方案, 过柱流程均通过固相萃取装置实现。正式进样前依次用 6mL 甲醇和 6mL 酸化至与样品相同 pH 的超纯水活化 HLB 小柱。保持柱床湿润, 以不超过 10mL/min 的流速将 500mL 样品通过小柱。随后用至少 15mL 酸化至样品 pH 的超纯水淋洗填料, 以保证完全除盐。继续减压抽干 5min 使填料干燥, 将小柱连接至配有聚四氟乙烯垫片及旋口瓶盖的玻璃样品瓶, 用 6mL 甲醇: 乙腈(50 : 50 v/v)以不超过 2mL/min 的流速洗脱, 洗脱液储存于-20°C 以备进一步检测。空白组分别用超纯水和人工海水(35g NaCl/L)经过相同步骤获得。

**1.2.3 总 DOC 及 DON 测定** 为比较 HLB 固相萃取小柱的提取效率, 分别对过滤后的海水样品及其 HLB 提取物进行 DOC 定量。样品用浓硫酸酸化至 pH 值为 2, 使用总有机碳分析仪以高温催化氧化-非色散红外吸收法测定 DOC 含量, 同时以邻苯二甲酸氢钾标准溶液校准, 测量精度为 1%, 检测限为 0.06mg/L。用连续流动分析仪测定样品中  $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$  和  $\text{NO}_2\text{-N}$  的浓度, 三者之和即为溶解无机氮(DIN)含量(即样品中的本底氮含量), 同时利用微波协助-过硫酸钾氧化法消解样品中其他形式的 N, 将其转化为  $\text{NO}_3\text{-N}$ , 再用连续流动分析仪测定消解后

样品中三种形态的氮含量, 得到溶解态总氮含量(DTN), DON 含量为 DTN 与 DIN 含量的差值。提取物 DOC 和 DON 按如下方法测定: 取一定量的 HLB 洗脱液, 氮吹至干燥, 用超纯水重新溶解, 洗脱液的测定结果根据固相萃取的浓缩系数进行相应换算, 再与海水样品 DOC 和 DON 相除以计算提取效率。

**1.2.4 HPLC-ESI-Q-TOF-MS 条件** 色谱条件: Infinity Lab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱(3.0×50mm, 2.7 $\mu\text{m}$ ), 柱温 20°C; 进样量 20 $\mu\text{L}$ ; 流动相由水(A)和乙腈(B)组成, 流速为 0.2mL/L, 梯度洗脱程序: 0—1min, 10% B; 1—2min, 10%—35% B; 2—12.5min, 35%—75% B; 12.5—22min, 90% B; 22—25min, 10% B。质谱条件: 样品以 120 $\mu\text{L}/\text{h}$  的速度通过 ESI 离子化进样, 质谱用 ESI(-)模式运行, 毛细管电压为 3500V, 进样口电压为 20V, 载气流速 4L/min, 温度为 200°C。采用全扫描模式, 质谱扫描范围 50—1800m/z。二级质谱碰撞能分别为 5、10、20 和 40V。每日进样前以小分子混合校正液校正仪器, 质量准确度小于 0.1ppm。液相进样的同时加入甲酸钠内标作为校正。

**1.2.5 数据处理及统计学分析** ESI-Q-TOF-MS 产生的原始数据采用 DataAnalysis 软件进行质谱峰识别和分子式计算, 得到包含质荷比、响应值、信噪比和计算分子式的数据表, 然后用 Excel 软件进行数据处理。主成分分析(PCA)由 Past 软件进行, 由于样品中各质谱峰的响应值高低差距非常大, 故将响应值取对数作为矩阵分析, 并用 1 替换原本为 0 的响应值( $\log 1=0$ )。用 DataAnalysis 软件进行质谱峰自动识别和匹配, 匹配分子式为  $\text{C}_{0-3}\text{H}_{0-3}\text{O}_{0-3}\text{N}_{0-10}\text{P}_{0-3}\text{S}_{0-3}\text{Cl}_{0-3}$ , 考虑[M-H]和[M+Cl]加合模式, 质量误差小于 5ppm, 匹配评分大于 70。当匹配结果不唯一时, 选用匹配评分最高的分子式。

HPLC-ESI-Q-TOF-MS 数据通过云端代谢组学数据处理平台 XCMS Online (<https://xcmsonline.scripps.edu>)进行特征检测和保留时间校正、归类, 得到一系列以 m/z、保留时间和响应强度表示的特征离子(Tautenhahn *et al*, 2012; Gowda *et al*, 2014; Benton *et al*, 2015)。仅选用保留时间大于 0.3min、峰高相差 4 倍以上且具有对应的加合离子或同位素离子的特征离子作为有效特征离子。通过二级质谱推算这些差异特征离子的结构式, 通过 Chemspider 数据库检索, 选择质量误差小于 0.05ppm 的结果, 结合文献报道确认相应的物质。

## 2 结果与讨论

### 2.1 海水不同 pH 条件下的提取效率

用 HLB 小柱对不同 pH 的海水样品进行提取, DOM 提取效率为 7.9%—42.3%(表 1)。天然海水 DOM 组成成分复杂, 不同组分分子间的分子量和极性均有很大差异, 很难用单一填料获得很高的提取效率, 同类方法对海洋 DOM 的提取效率通常在 10%—50% 之间(Li *et al.*, 2017), 因此除 pH 为 5 和 6 的样品外, 其余 pH 条件下的提取效率均在正常范围内。总体来说人工海水样品的 DOM 提取效率高于天然海水, 可能是因为人工海水中的 DOM 含量组成成分较为简单, 相对容易提取。天然海水与人工海水 DOM 提取效率

的差异表明盐度不是影响 HLB 小柱提取效率的最主要因素, DOM 本身的组成成分和具体结构特性作用更加突出。有趣的是, DOM 提取效率与海水 pH 值之间并不是单调递增或递减的关系, 而是在 pH 介于 5—6 之间出现最低值, 对此可能的解释是 pH 对于 DOM 提取效率的影响不仅仅是通常认为的防止金属离子络合和共沉淀, 而且在不同的 pH 环境下有机分子本身的解离状态也会发生变化, 从而影响其在固相萃取填料吸附位点上的吸附状态, 造成提取效率变化。HLB 小柱对 pH 调节为 7 的海水样品 DOM 提取效率最高, pH 为 2 的次之, 但是具体哪一种 pH 条件对于海水中小分子活性物质的提取效率最高, 还需结合提取物的具体分子组成来分析。

表 1 空白组和海水样品的 pH、DOC(溶解有机碳)、DON(溶解有机氮)含量、C/N(碳氮比)及提取效率  
Tab.1 Blank and sample pH, DOC, DON, C/N and extraction efficiency

样品名称	pH	盐度	DOC (mg/L)	提取物 DOC (mg/L)	DON ( $\mu\text{g/L}$ )	提取物 DON ( $\mu\text{g/L}$ )	C/N	提取物 C/N	提取效率
超纯水空白	7.05	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	—	—	—
	2.00	2.13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	—	—	—
人工海水空白	6.02	35.64	1.05	0.24	64.82	16.57	18.9	16.9	23.2%
	2.00	37.47	1.05	0.41	64.82	13.32	18.9	35.9	39.3%
	8.08	30.65	1.05	0.34	64.82	12.18	18.9	32.6	12.7%
	7.00	30.65	1.05	1.14	64.82	10.91	18.9	21.9	42.3%
	6.00	30.73	1.05	0.24	64.82	9.46	18.9	29.6	9.0%
海水样品	5.00	30.75	2.70	0.21	101.49	10.85	31.0	22.6	7.9%
	4.00	30.30	2.70	0.49	101.49	26.32	31.0	21.7	18.3%
	3.00	30.59	2.70	0.45	101.49	11.44	31.0	45.9	16.8%
	2.00	32.38	2.70	0.55	101.49	14.44	31.0	44.4	20.3%

### 2.2 海水 pH 对 ESI-Q-TOF-MS 检测结果的影响

按照 1.2.4 节建立的 ESI-Q-TOF-MS 质谱条件直接进样分析海水样品及空白对照, 图 1 为空白溶剂、高纯水空白、人工海水空白和海水的质谱总离子流图。从图中可以看出, 超纯水空白在质谱上的响应强度最高, 人工海水次之, 其响应强度与溶剂空白类似, 天然海水的响应强度最低, 这说明天然海水有严重的基质效应, 会干扰质谱分析的准确性, 使其具体 DOM 组分难以分辨。观察不同 pH 的同种样品质谱响应强度, 发现 pH 越小, 响应强度越低。这说明调节样品 pH 加入的酸增大了样品的离子强度, 使样品基质效应对分析的干扰更大, 可能对某些低含量物质的定量检测造成不利影响。

选取相对强度大于 0.1%、信噪比大于 20 且不出现在仪器空白中的  $m/z$  谱峰视为有效峰。结合质谱图(图 2)和有效峰数目(表 2)发现, 随着样品 pH 的降低, 谱峰数目随之增加, 而总质谱响应值降低, 造成目标谱

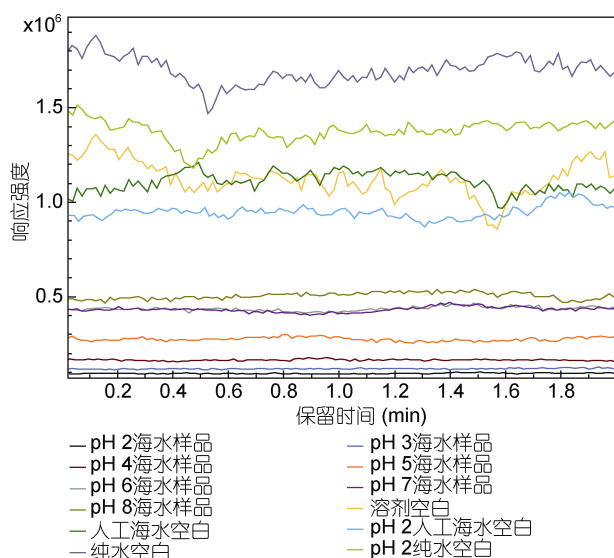


图 1 空白溶剂、超纯水空白、人工海水空白和海水提取物的质谱总离子流图

Fig.1 Total ion chromatograms of solvent, ultrapure water, artificial seawater, and natural seawater extracts

峰与背景噪音之间的差别减小,有效峰数目不是随样品 pH 降低而单调递增的,但总体看来还是 pH 为 2 时有效峰数目最多,表示将水样 pH 调节至 2 有利于检出更多种有机分子,对定性分析海水溶解有机物的分子组成最为有利。除了与 pH 的正相关关系外,质谱响应值与样品盐度也表现出了明显的关联性,人工海水空白响应值明显低于纯水空白,说明样品

间响应值的降低与样品离子强度差异带来的基质效应有关。随着加酸酸化,样品的离子强度增加,酸化到 pH 为 2 时盐度比原水样增加了两个单位左右(表 1),随之而来的基质效应会对检测响应值较低的物质造成不利影响,这表示在对特定有机物进行定量检测时,还需结合具体物质的提取效率选择合适的 pH 条件。

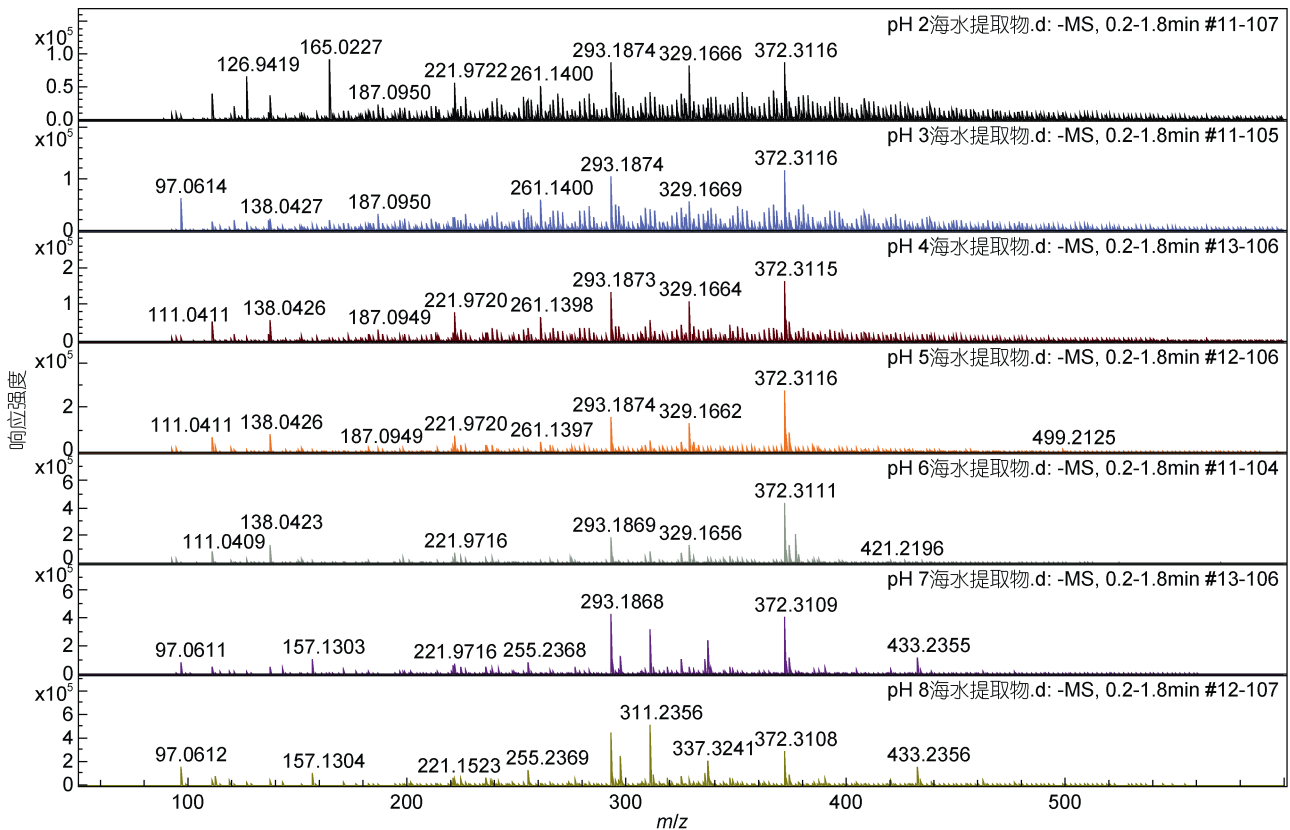


图 2 不同 pH 海水样品提取物的质谱图

Fig.2 Mass spectrum of seawater extracts at different pH values

限于 Q-TOF 质谱的分辨率,为保证计算出分子式的准确度,在对质谱峰进行分子式指认时只选取相对响应值大于 1% 的有效峰用 DataAnalysis 软件进行质谱峰的自动识别和分子式指认,采用考虑 C、H、O、N、S、P 和 Cl 元素下匹配度最高的分子式,各样品能被指认为特定分子式的谱峰统计情况如下表(表 2)。实际海水样品中能被指认为特定分子式的谱峰个数仅占总有效峰数目的 20%—30%,总体来说随着海水 pH 的降低,指认出的分子式种类增加,当海水 pH 为 2 时指认出的分子式种类最多。

海水中天然有机物的元素组成通常以 C、H 和 O 为主,仅含有这三种元素的有机物占检出总有机物的 39%—62% (张耀玲, 2013; LaRowe *et al*, 2017), 但

本文采集的海水样品中仅由 C、H、O 三种元素组成的化合物不足全部检出种类的 10%, 绝大部分鉴别出的分子式带有杂原子, C、H、O、N 四种元素组成的分子占总分子式的 24.9%—35.0%, 含 S 原子的分子接近总分子种类的一半, 含 P 原子的分子约占 24%, 含 Cl 原子的分子在空白组中几乎不存在, 而在天然海水中占 7.5%—20.4%。提取物的具体分子组成与提取方法有关, 用 XAD 树脂提取水体 DOM 倾向于保留元素组成较为简单的物质, 提取物中由 C、H、O 三种元素组成的物质可达 50% 以上(Cawley *et al*, 2016; Derrien *et al*, 2017), 电渗析(Koprivnjak *et al*, 2009; 张耀玲, 2013)和常用的几种 SPE 小柱(包括 C18、PPL 和本实验采用的 HLB 填料)(Li *et al*, 2017)

对含杂原子分子的保留度较高,因此提取物中仅由 C、H、O 三种元素组成的化合物占总检出种类的比例较少。鉴于空白组测定结果中含有大量含 N 化合物,有理由猜测在萃取过程中,是否存在部分用于填料亲水改性的含氮基团(通常是 N-乙烯基吡咯烷酮结构)脱落,与样品 DOM 一起被洗脱,对检测结果造成干扰。但空白组提取物中 DOC 和 DON 含量不高(表 1),尤其是纯水空白提取物中 DOC 和 DON 均低于检测限,且样品与提取物的总 C/N 比均大于 20,说明填料渗漏出的 N 不足以对检测结果造成这样大的干扰。本文海水样品分子组成与文献报道差异较大的原因还有可能是新鲜的近海海水与大洋深层海水 DOM 分子组成本身具有很大差异。目前对海水 DOM 具体分子组成的研究集中于贫营养的大洋(LaRowe *et al*, 2017)、南极盐湖(Cawley *et al*, 2016)或某些具有特殊生态系统的近岸海区,如红树林河口区(张耀玲, 2013)等,像本文采用的这种同时受到人为因素和自然因

素影响的海水其 DOM 分子组成如何尚缺乏足够的数据参考。但近海海水中的有机物来源更加复杂,影响因素多种多样,与大洋海水相比有机氮磷的种类更为丰富(宋金明, 2004)。人类日常生活及工业生产过程会向环境中释放大量有机磷类杀虫剂、多氯联苯、卤代烃、亚硝胺、含硫农药及药物等有机污染物(汪珊等, 2005; 彭全材等, 2014; 刘清泉等, 2016),这些带有杂原子的化合物在近海水体中经历复杂的生物、化学过程后形成多种多样的加合或降解产物,因此,相较于大洋海水,近海海水中含有 N、P、S、Cl 等杂原子的分子种类繁多,占总 DOM 分子种类的比例也更高,造成了本文中这种宏观 C/N 比较高但微观 C/N 比很低、含有杂原子的分子占总分子式种类的比例很高的现象。

对空白样品和不同 pH 的样品质谱峰及其响应强度进行主成分分析(图 3),发现选择不同 pH 条件进行萃取时,解析出的有机分子组成特征存在差异,横

表 2 不同 pH 下提取物的有效峰数目、平均响应值及分子组成统计

Tab.2 The peak number, average intensity, and molecular composition of blank and seawater extracts in different pH values

样品名称	纯水空白		人工海水空白				海水样品				
	pH										
pH	7.05	2.00	6.02	2.00	8.08	7.00	6.00	5.00	4.00	3.00	2.00
#有效峰	628	599	730	832	1042	1065	1335	1532	1420	1355	1570
#总分子式	45	37	52	56	214	235	257	401	413	400	494
平均响应值	103210	86634	60691	46552	14202	12834	12548	9005	10139	11275	9633
平均 $m/z$	293.26	292.55	280.01	274.21	344.04	333.07	332.48	343.37	311.76	290.65	324.90
%CHO	15.6	10.8	15.4	10.5	6.5	6.4	5.8	8.2	8.2	6.2	5.7
%CHON	66.7	64.9	51.9	55.4	35.0	32.3	25.7	24.9	28.6	25.2	24.9
%N	78.3	81.6	67.9	73.2	73.8	74.9	68.5	68.1	72.4	71.5	69.4
%S	13.3	13.5	23.1	23.2	40.6	43.8	55.2	50.6	49.2	51.5	54.4
%P	17.8	16.2	13.5	7.1	21.0	21.7	28.0	27.4	21.1	23.5	24.5
%Cl	0	0	0	7.1	16.4	20.4	12.4	15.7	14.0	7.5	15.2
#C <sub>a</sub>	15.5	15.3	14.1	13.6	16.3	14.8	16.2	16.4	14.4	14.0	15.1
#Cl <sub>a</sub>	0.0	0.0	0.0	0.1	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2
#H <sub>a</sub>	28.0	27.7	26.8	25.1	26.1	24.5	21.9	20.7	18.4	18.2	17.7
#N <sub>a</sub>	2.6	2.7	2.5	2.9	3.1	3.3	2.7	2.8	3.0	2.8	2.8
#O <sub>a</sub>	1.8	1.7	1.7	1.4	2.2	2.2	1.8	2.1	2.1	1.5	2.2
#P <sub>a</sub>	0.2	0.2	0.2	0.1	0.3	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3	0.3
#S <sub>a</sub>	0.2	0.1	0.3	0.3	0.5	0.6	0.7	0.7	0.6	0.6	0.7
H/C	1.8	1.8	1.9	1.8	1.6	1.7	1.3	1.3	1.3	1.3	1.2
O/C	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
C/N	6.1	5.7	5.6	4.7	5.2	4.5	6.0	5.8	4.8	4.9	5.4
RDB	4.2	4.2	3.3	3.8	5.9	5.2	7.9	8.7	7.8	7.7	9.0

注: #有效峰: 有效峰数目; #总分子式: 解析出的总分子式数目; %CHO: 由 C、H、O 三种原子组成的分子占总分子式种类的比例; %CHON: 由 C、H、O、N 四种原子组成的分子占总分子式种类的比例; %N、%S、%P、%Cl: 含有 N、S、P、Cl 原子的分子占总分子式种类的比例; #C<sub>a</sub>、#Cl<sub>a</sub>、#H<sub>a</sub>、#N<sub>a</sub>、#O<sub>a</sub>、#P<sub>a</sub>、#S<sub>a</sub>: 平均 C、Cl、H、N、O、P、S 原子数; RDB: 环双键当量

坐标代表的主成分 1 解释了 34.2% 的差异, 纵坐标代表的主成分 2 解释了 19.5% 的差异。代表不同样品的点分别落在 4 个象限内, 据此将它们分成空白、中性、弱酸性和强酸性 4 组, 同组样品间分子组成特征相近, 不同组别的分子组成特征差异较大。虽然强酸性组的质谱峰分布更加分散, 但由于总有效峰数目的增加, 平均  $m/z$  值反而比中性组低。由 C、H、O 这 3 种原子组成的分子所占比例在 4 个组别中仅有微弱差异, 中性组由 C、H、O、N 这 4 种原子组成的分子所占比例略高, 含 Cl 原子的分子占比也比酸性条件下的提取物高, 在强酸组中检出含 S 分子的几率更高, 弱酸组对含 P 分子的选择性略高于强酸组。随着海水 pH 的降低, 提取物分子组分的平均 RDB 值更高, 即含有环和双键等不饱和基团或碳链结构的分子更多。许多常见的生物活性分子含有 N、S、P 等杂原子(如氨基、亚氨基、巯基、磷酸基等)或含有不饱和基团(如羰基、酯、酐、酰胺等), 因此弱酸性组和强酸性组比中性组检出生物活性分子的几率更高。但由于弱酸性组的提取效率太低, 综合考虑还是强酸性组对生物活性分子的提取效果更好, 其中尤以海水 pH 调节为 2 效果最好。

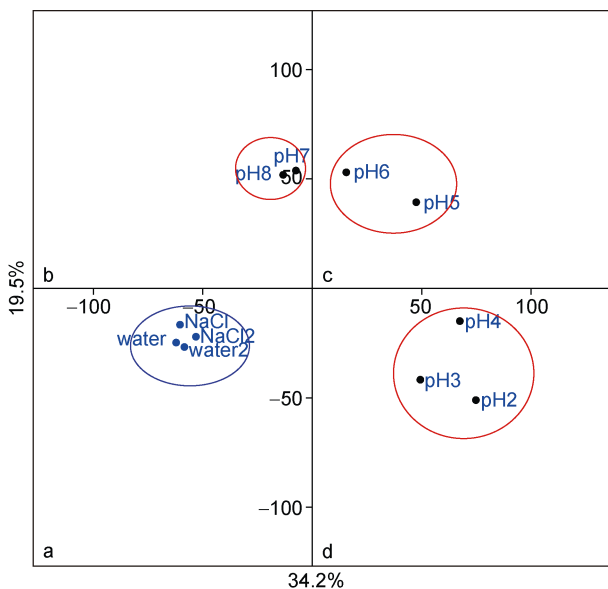


图 3 空白组及海水不同 pH 条件下提取物组成的主成分分析图

Fig.3 PCA of extracts of blanks and seawater in different pH values

注: a: 空白组; b: 中性组; d: 弱酸性组; d: 强酸性组

当以  $m/z$  作为横坐标时, 从图 4 中可以直观地看出组分分子的质量分布情况。HLB 固相萃取法提取到的海水 DOM 以小分子为主, 主体质量落在

100—600 $m/z$  之间。中性环境下提取得到的物质分子量集中在 200—500 $m/z$  间, 随着样品 pH 的降低, 提取物的分子量分布范围更加广泛。本文中的 HLB 提取物主要由小分子高饱和度的脂或烃和一系列分子量稍高的不饱和化合物组成, 分子量较高的化合物倾向于有更低的 H/C 比值。

许多生物相关的分子都有特定的 H/C 比和 O/C 比, 因此它们在 van Krevelen 图中有特定且唯一的表示区域(Derrien *et al*, 2017), 如: 脂类( $1.5 \leq H/C \leq 2.0$ ,  $0 \leq O/C \leq 0.3$ )、蛋白质( $1.5 \leq H/C \leq 2.2$ ,  $0.3 \leq O/C \leq 0.67$ )、糖类( $1.5 \leq H/C \leq 2.4$ ,  $0.67 \leq O/C \leq 1.2$ )缩合的芳环结构( $0.2 \leq H/C \leq 0.7$ ,  $0 \leq O/C \leq 0.67$ )、木质素( $0.7 \leq H/C \leq 1.5$ ,  $0.1 \leq O/C \leq 0.67$ )、不饱和碳氢化合物( $0.7 \leq H/C \leq 1.5$ ,  $0 \leq O/C \leq 0.1$ )和单宁( $0.5 \leq H/C \leq 1.5$ ,  $0.65 \leq O/C \leq 1$ )。对这 4 组样品分别做 van Krevelen 图(图 4)可以看出, 中性组的组分分子在 van Krevelen 坐标中的分布最为集中, 主要是脂质和不饱和烃, 在图的右下方几乎没有组分分子点存在。随着海水 pH 的降低, 组分分子在 van Krevelen 坐标中的分布更加分散, 表示提取出的物质种类更多, 分子异质性高。在中性组中几乎没有出现的木质素、蛋白质和糖类在酸性条件下能被提取出来, 含有高不饱和结构的芳香族、烯类和脂环类物质种类也在酸性条件下增加, 这说明前处理时样品 pH 的减小更有利于检测含有高不饱和基团的生物组分分子。强酸性组提取出的 DOM 在 van Krevelen 坐标中的分布情况更接近于文献中报道的典型天然水体 DOM 的分子组成(张耀玲, 2013; LaRowe *et al*, 2017; Rathgeb *et al*, 2017)。目前已有报道的生物活性分子虽然性质各异, 结构多样, 但大部分是带有这样高不饱和基团的多肽、多糖、酮、酯、有机酸等物质(Song, 2010; 吴梧桐等, 2000; 张倩等, 2017), 表明强酸性的样品前处理条件更适合用以提取海水中的小分子活性物质。

由于弱酸性组的提取效率太低, 不利于从复杂的海水基质中提取低含量的活性分子, 因此下文的讨论中均排除弱酸性组, 仅比较中性组和强酸性组的组成差异。

为了更直观地比较中性组和强酸性组中检出分子的差异, 图 5 将两组检出的分子峰响应强度比值(单组峰强度/两组峰强度之和)同时置于 van Krevelen 坐标中, 观察不同区域的分子丰度差异。所有分子点都分布在 van Krevelen 坐标的左上部分, 显然, 强酸性组更易检出的分子更多, 分布范围也更广泛, 在 H/C

比为 1、O/C 比小于 0.2 的区域最为集中, 说明更易在较低 pH 条件下检出的分子的种类相对丰富, 以不

饱和或带有芳环结构的碳氢化合物为主。中性 pH 条件下检出的分子点则主要分布于 H/C 大于 1.5、O/C

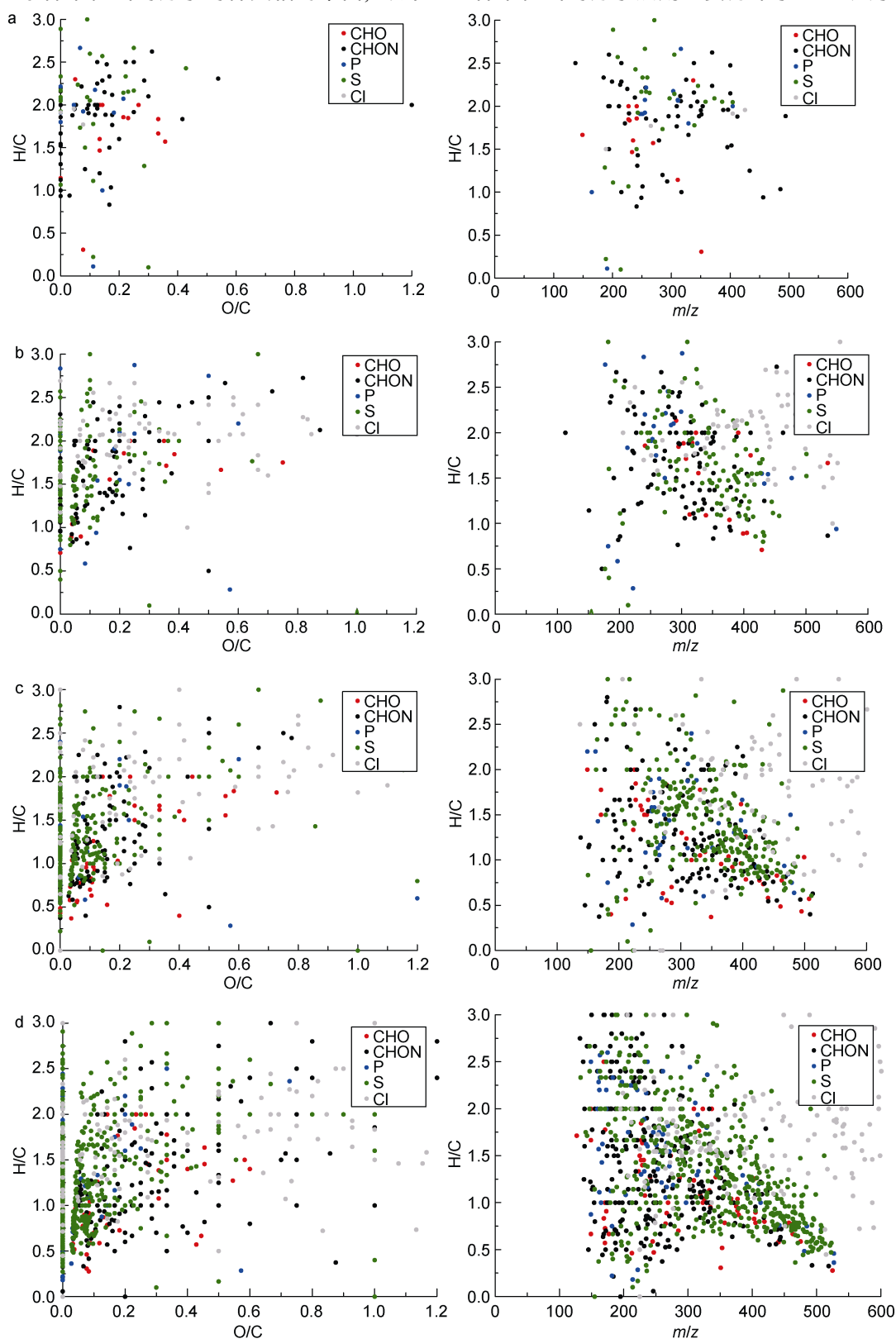


图 4 空白组(a)、中性组(b)、弱酸组(c)和强酸组(d)的 van Krevelen 图及  $m/z$ -H/C 图

Fig.4 The van Krevelen and  $m/z$ -H/C diagrams of blanks (a), seawater in neutral (b), weak acidic pH (c), and strong acidic groups (d)



小于 0.3 的区域, 说明中性 pH 条件对脂类的选择性更高。与生物相关的脂类大部分作为储能物质(如脂肪)和结构分子(如磷脂), 仅有固醇具有生物活性, 而固醇属于类异戊二烯类物质, 通常以环戊烷多氢菲为基本结构并且带有羟基, 具有较高的不饱和度和含氧量, 这些物质在较低 pH 条件下也能获得不错的提取效果, 说明强酸性 pH 条件对活性分子的检测解析效果更好。

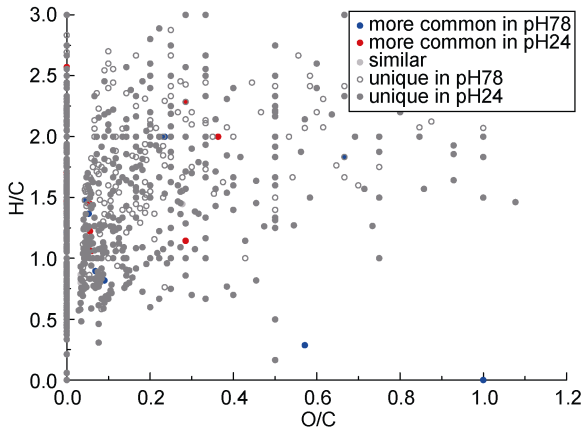


图 5 中性组与强酸组测得分子峰的响应强度比例图

Fig.5 The peak magnitude ratios of seawater in the neutral and strongly acidic groups

注: 红色圆点表示该分子在强酸性条件下检出的几率更高, 蓝色圆点表示该分子在中性条件下检出几率更高, 浅灰色圆点表示该分子在两种条件下检出的几率一致。只在中性组中出现的分子式用深灰色中空圆点表示, 而只在强酸性组中出现的分子式用深灰色实心圆点表示

在归一化质量相同的前提下, 较高的 Kendrick 质量亏损(KMD)值表示该分子有更高的氧化程度或不饱和度, 由 KMD 值推导出的分子信息用 Kendrick 图可以有效描述(Liu *et al.*, 2011)。Kendrick 图以归一化质量为横坐标, KMD 值为纵坐标。在图中, 双键当量(DBE)或氧含量不同的分子由于 KMD 值不同, 从而在垂直方向上区分开来, 而 DBE 和氧含量相同的  $\text{CH}_2$  同系物则出现在同一行中(间隔 14Da)。对只在强酸组出现、只在中性组出现和二者共有的 DOM 分子作 Kendrick 图(图 6), 图 6a 是常规 Kendrick 图, 即 KMD 值由将  $\text{CH}_2$  结构单元质量视为 14.00 计算得到。随着归一化质量的增加, KMD 值也随之增加, 这是因为高质量的分子通常具有更高的芳香化或氧化程度。两种 pH 条件提取得到的 DOM 分子有一定程度的重叠, 在两种 pH 条件下都能提取出的分子主要是不饱和度和氧化度较低的小分子。在较低 pH 条件下提取得到的 DOM 分子具有更高的 KMD 值(代表强酸

性组分子的点出现在 Kendrick 图的上方), 表示较低的样品 pH 有利于提取具有高不饱和度和氧化程度的分子, 这些分子中含有芳环和羰基、羧基等不饱和和含氧基团的可能性更高。图 6b 是将 O 原子质量视为 16.00 计算得到 KMD 值作出的 Kendrick 图, 这种改良的 Kendrick 图能够区分氧含量或不饱和度增加导致的 KMD 值升高。两组样品的重叠部分与图 6a 一致, 都是不饱和度和含氧量较低的小分子物质。但代表强酸性组分子的点出现在图的上方, 表示低 pH 条件下提取得到的 DOM 分子不饱和度主要由含氧基团贡献, 而中性 pH 条件下得到的 DOM 分子不饱和度主要由双键、芳环等不饱和碳链结构贡献。结合两种 Kendrick 图可以推测, 较低的 pH 条件更有利于提取带有含氧不饱和基团(如: 羧基、羰基)和环氧结构的分子, 而这些结构容易形成活性位点, 更有可能具有生物活性。

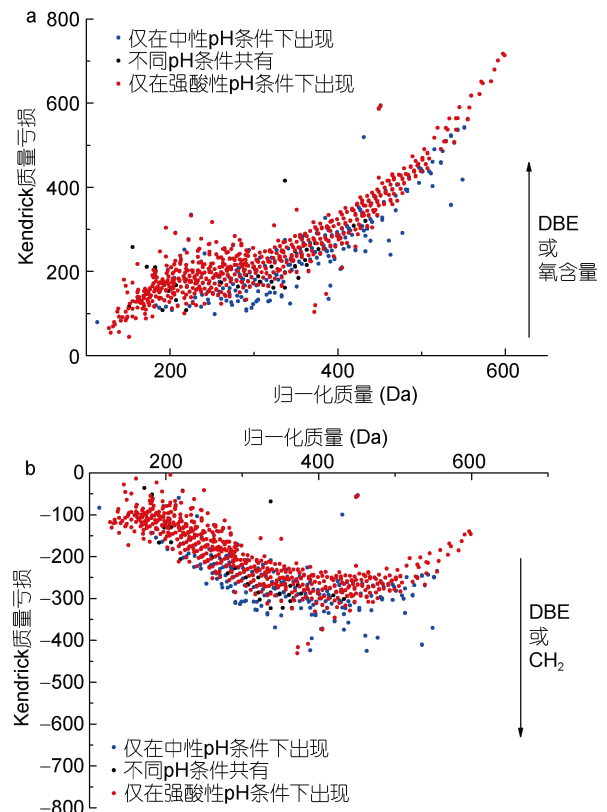


图 6 中性组和强酸组组分子的 Kendrick 图

Fig.6 The Kendrick mass defect plots of extracts of the neutral and strong acidic seawater

注: a: 将  $\text{CH}_2$  结构单元的质量归一化为 14.00; b: 将 O 原子的质量归一化为 16.00。蓝色的点表示只在中性组中出现的分子, 红色的点表示只在强酸性组中出现的分子, 黑色的点表示在两组都出现的分子。DBE: 双键当量;  $\text{CH}_2$ : 分子结构相差一个或几个  $\text{CH}_2$  结构单元

### 2.3 不同 pH 条件下 HPLC-ESI-Q-TOF-MS 的汇泉湾海水定性结果差异

HPLC-ESI-Q-TOF-MS 数据由 XCMS 在线数据处理平台分析, 对保留时间进行校正后的总离子流色谱图(TIC)如图 7 所示, 虚线表示强酸组提取物, 实线表示中性组提取物。样品 pH 为 2、3、4 的 TIC 较为重合, 样品 pH 为 7 和 8 的 TIC 出峰相似, 两组间则有明显差异, 保留时间在 2—8min 和 16min 左右时差异最为显著。

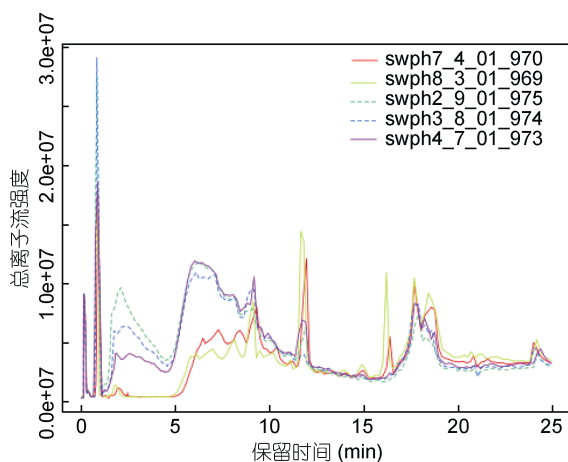


图 7 进行保留时间校正后中性组和强酸组 DOM 提取物的总离子流色谱图

Fig.7 Total ion chromatogram of seawater extracts in the neutral and strong acidic groups after retention time correction  
注: 图中红色实线表示 pH 为 7 的海水提取物, 黄色实线表示 pH 为 8 的海水提取物, 绿色虚线表示 pH 为 2 的海水提取物, 蓝色虚线表示 pH 为 3 的海水提取物, 紫色实线表示 pH 为 4 的海水提取物

排除保留时间小于 0.3min、峰高相差小于 4 倍和没有对应的同位素或加合离子峰的特征离子, 通过

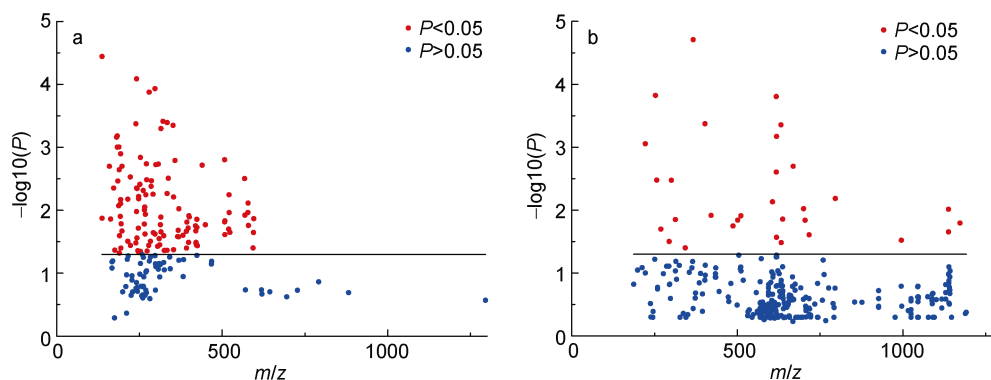


图 8 强酸组(a)和中性组(b)中的显著特征离子

Fig.8 The significant characteristic ions in seawater extract in the strong acidic (a) and neutral (b) groups  
注: 图中每个点代表一个具有特定保留时间和  $m/z$  值的特征离子, 其中蓝色的点表示  $t$ -检验中  $P$  值大于 0.05(不具有统计学差异)的特征离子, 红色的点表示  $P$  值小于 0.05(具有统计学差异)的特征离子

XCMS 进行两组对比共找出 150 个具有统计学差异 ( $P < 0.05$ ) 的特征, 其中 66 个具有显著差异 ( $P < 0.01$ ), 20 个具有极显著差异 ( $P < 0.001$ )。在所有具有统计学差异的特征离子中, 在强酸组中更显著的特征离子有 119 个, 在中性组中更显著的有 31 个(图 8), 表明较低的样品 pH 条件对更多种有机物有较好的提取表征效果, 这些有机物的特征离子  $m/z$  通常小于 600。观察这些具有显著差异的特征离子在保留时间上的分布(图 9)发现, 强酸组的差异特征离子出峰较早, 保留时间多小于 10min, 说明较低的样品 pH 条件对于极性较大的分子有更好的提取效果, 其中样品 pH 值为 2 时响应值最高, 更适合从天然水体中提取活性分子。

用 DataAnalysis 软件指认以上差异特征离子对应的分子式, 用二级质谱推断其结构并通过 Chemspider、Pubchem、Metlin 和 KEGG 等数据库检索验证, 解析出以下 19 种有机分子在中性和强酸性海水 pH 条件下提取和表征效果有显著差异(表 3), 其中只有两种在中性 pH 条件下提取效果更好, 其余 17 种有机物均更适宜在强酸性 pH 条件下提取。强酸组提取物中含有的有机物种类丰富, 包括常与生物活动相关的糖苷、脂肪酸、甾酮、胺等, 这也证明了强酸性海水 pH 条件更适合从海水中提取生物活性分子。

### 3 结论

本文研究探讨了海水 7 种不同 pH 条件下 HLB 小柱对近海海水中活性分子的提取效率, 发现中性 pH 条件和强酸性 pH 条件都能获得较高提取效率, pH

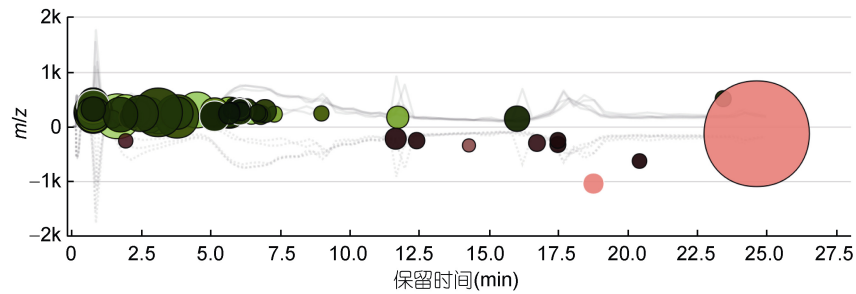


图9 强酸组(绿色)和中性组(红色)的差异特征离子分布图

Fig.9 Differential significant characteristic ions of strong acidic (green) and neutral (red) groups  
注: 横坐标为保留时间, 纵坐标为  $m/z$ 。图中表示差异离子的点颜色的深浅表示  $P$  值大小, 点的直径大小表示两组间该特征离子峰高的差异倍数

表3 汇泉湾海水不同 pH 下提取出有机物的种类差异

Tab.3 The organic compounds extracted from seawater of different pH values in Huiquan Bay, Qingdao

pH	名称	类别	分子式	保留时间(min)	定性离子( $m/z$ )	误差 (ppm)
中性	醋酸-13-十四烯酯	酯	$C_{16}H_{30}O_2$	17.7	253.2173	3.7
	{1-[5-(6-氨基-2-丁氧基-8-氧代-7,8-二氢-9H-嘌呤-9-基)戊基]-3-哌啶基}乙酸	酸	$C_{21}H_{34}N_6O_4$	18.6	433.2568	-3.1
	1-{2-[2-(2-羟乙氧基)乙氧基]乙氧基}-5-己烯-2-醇	醇	$C_{12}H_{24}O_5$	3.9	247.1551	1.7
	(1S)-1,5-脱水-2,6-二脱氧-2-(羟甲基)-1-(3-甲氧基-3-氧代丙基)-L-甘露醇	醇	$C_{11}H_{20}O_6$	2.4	247.1187	0.5
	3-(2,2-二甲基-4-氧代-4H-1,3-二恶英-6-基)-2-羟基-2-甲基丙酸甲酯	酯	$C_{11}H_{16}O_6$	2.0	243.0874	-1.0
	邻苯二甲酸单丁酯	酯	$C_{12}H_{14}O_4$	6.6	221.0819	-0.1
	水杨酸苄酯	酯	$C_{14}H_{10}O_4$	5.8	241.0506	1.6
	9-醛基壬酸	脂肪酸	$C_9H_{16}O_3$	5.3	171.1027	0.5
	(2Z,6Z)-8-乙酰氧基-5-羟基-2,6-十二碳二烯酸	脂肪酸	$C_{14}H_{22}O_5$	6.2	269.1394	2.2
	酸性	2,4-二氯苯甲酸	酸	$C_7H_3Cl_2O_2$	5.2	188.9516
3-(1-甲基-2-氧代环己基)丙酸		酸	$C_{10}H_{16}O_3$	5.8	183.1027	1.7
辛基丙二酸		酸	$C_{11}H_{20}O_4$	6.5	215.1289	-0.1
3-[2-(甲氧基甲氧基)乙氧基]-2-氧代丁醛		醛	$C_8H_{14}O_5$	1.6	189.0768	1.1
6-过氧羟基-6-甲氧基-5-甲基-4-(2-甲基-1,3-二氧戊环-2-基)己醛		醛	$C_{12}H_{22}O_6$	3.2	261.1344	0.6
4,4-二甲基-5-[(3R)-1,2,4-三氧戊环-3-基]-2-戊酮		酮	$C_9H_{16}O_4$	3.8	187.0976	0.8
17-羟基-16-甲基-19-硫烷-4-雄烯酮		甾酮	$C_{20}H_{30}O_2S$	5.7	333.1894	-4.9
辛基葡萄糖苷		糖苷	$C_{14}H_{28}O_6$	5.3	291.1813	1.1
辛基-6-O-乙酰- $\alpha$ -D-吡喃半乳糖苷		糖苷	$C_{16}H_{30}O_7$	6.2	333.1919	0.4
6-{4-[4-环丙基-5-(1H-1,2,4-三唑-1-甲基)-4H-1,2,4-三唑-3-基]-1-哌啶基}-4-噻啶胺		胺	$C_{17}H_{22}N_{10}$	6.2	365.1956	-0.6

为 5 和 6 时提取效率不佳。随着海水 pH 的降低, 质谱图上可识别的谱峰数目增加, 样品 pH 为 2 时有效峰数目最多, 即能表征出的分子种类最多, 更适合分析海水 DOM 的分子组成特征。不同样品 pH 条件下提取物的分子组成有所差异, 中性 pH 条件适合提取饱和度较高的小分子有机物, 而强酸性 pH 条件提取

出的物质分子异质性更高, 不但能提取出部分高饱和和小分子, 对带有含氧不饱和基团的酸、酮等活性小分子和木质素、蛋白质、糖类生物分子的提取效果尤其好, 更适合用以分析近海水中的小分子活性有机物。当样品 pH 为 2 时, HPLC-ESI-Q-TOF-MS 对极性分子的响应值最高, 尤其适于从海水中分离提

取活性物质。综合提取效率、有效峰数目和分子组成特征考虑,用 HLB 固相萃取小柱提取海水中小分子活性物质时,将海水样品 pH 调节为 2 较为适宜。现有文献分析远离人为因素影响的大洋或极地水体 DOM 组成时常将海水 pH 值酸化至 2,有机物来源多样、受人类影响较多的近海水体则没有统一的处理标准。本文结果表明将水样 pH 值酸化至 2 这一处理条件在分析海水 DOM 组成时具有一定程度上的通用性,此时对近海水体样品总体 DOM 的提取效率较高,通过 HPLC-Q-TOF-MS 在 ESI(-)模式下检测解析出的分子种类最多,尤其有利于分析带有生物活性基团或能形成生物活性位点的有机分子。

### 参 考 文 献

- 刘清泉,陈景文,蔡喜运,2016. Fe-TAML 催化降解水体中含硫污染物的研究. 见:中国化学会第十三届全国水处理化学大会暨海峡两岸水处理化学研讨会论文集. 南京:中国化学会,224
- 孙 静,徐 雄,李春梅等,2015. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法同时检测地表水中的 35 种农药及降解产物. 分析化学,43(8):1145—1153
- 孙玲玲,宋金明,于 颖等,2018. 荣成湾 14 种海洋经济生物体中的重金属水平与食用风险初步评价. 海洋与湖沼,49(1):52—61
- 吴春英,白 鹭,谷 风等,2016. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定地表水中的 18 种酰胺类除草剂. 理化检验-化学分册,52(5):602—606
- 吴梧桐,王友同,吴文俊,2000. 海洋活性物质研究若干进展. 药物生物技术,7(3):179—183
- 汪 珊,孙继朝,张宏达等,2005. 我国水环境有机污染现状与防治对策. 海洋地质动态,21(10):5—10
- 宋金明,2004. 中国近海生物地球化学. 济南:山东科学技术出版社,14
- 宋金明,徐永福,胡维平等,2008. 中国近海与湖泊碳的生物地球化学. 北京:科学出版社,1—533
- 宋金明,李学刚,2018. 海洋沉积物/颗粒物在生源要素循环中的作用及生态学功能. 海洋学报,40(10):1—13
- 宋金明,李学刚,袁华茂等,2018. 渤海东海生源要素的生物地球化学. 北京:科学出版社,1—859
- 张 金,宗栋良,常爱敏等,2015. 水环境中典型抗生素 SPE-UPLC-MS/MS 检测方法的建立. 环境化学,34(8):1446—1452
- 张 倩,宋金明,李学刚等,2017. 水环境中的信息有机物与“水域生态讯息学”的提出. 海洋科学,41(3):138—150
- 张耀玲,2013. 近海环境中天然有机质的分离与表征. 上海:华东师范大学博士学位论文,6—138
- 陈 猛,陆婉清,韩 燕等,2009. 固相萃取-气相色谱法对河水与海水中 36 种农药残留的同时测定. 分析测试学报,28(12):1378—1383
- 陈玫宏,徐怀洲,宋宁慧等,2017. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定水体和沉积物中 12 种有机磷酸酯类化合物. 分析化学,45(7):987—995
- 洪家俊,陈秋兰,易启同等,2013. 海水中多种类兽药残留测定准确度的评价和改善方法. 厦门大学学报(自然科学版),52(5):675—683
- 袁圣柳,李晓锋,姜晓满等,2013. 自动固相萃取-高效液相色谱串联质谱法测定生活污水中 13 种抗精神药物. 分析化学,41(1):49—56
- 顾佳萍,2011. 记忆缺失性贝毒—软骨藻酸新型固相萃取材料的制备及其应用. 上海:上海交通大学硕士学位论文,79—86
- 梁宪萌,宋金明,段丽琴等,2016. 胶州湾沉积物重金属形态不同浸取方法的比较与污染讯息指示作用初探. 海洋学报,38(10):12—21
- 彭全材,宋金明,李 琛等,2014. 胶州湾 5 种海藻中的多不饱和脂肪酸与有机氯农药共摄入风险的评估研究. 海洋与湖沼,45(1):80—87
- 韩典峰,宫向红,刘小静等,2016. 固相萃取/气相色谱-质谱法测定海水中 16 种除草剂. 分析测试学报,35(7):839—843
- 廖 涛,吴晓翠,王少华等,2013. 固相萃取-气相色谱/质谱联用法同时检测水体中 9 种环境雌激素. 分析化学,41(3):422—426
- Assunção J, Guedes A C, Malcata F X, 2017. Biotechnological and pharmacological applications of biotoxins and other bioactive molecules from dinoflagellates. Marine Drugs, 15(12):393
- Benton H P, Ivanisevic J, Mahieu N G *et al*, 2015. Autonomous metabolomics for rapid metabolite identification in global profiling. Analytical Chemistry, 87(2):884—891
- Cawley K M, Murray A E, Doran P T *et al*, 2016. Characterization of dissolved organic material in the interstitial brine of Lake Vida, Antarctica. Geochimica et Cosmochimica Acta, 183:63—78
- Derrien M, Lee Y K, Hur J, 2017. Comparing the spectroscopic and molecular characteristics of different dissolved organic matter fractions isolated by hydrophobic and anionic exchange resins using fluorescence spectroscopy and FT-ICR-MS. Water, 9(8):555
- Dittmar T, Koch B, Hertkorn N *et al*, 2008. A simple and efficient method for the solid-phase extraction of dissolved organic matter (SPE-DOM) from seawater. Limnology and Oceanography: Methods, 6(6):230—235
- Gowda H, Ivanisevic J, Johnson C H *et al*, 2014. Interactive XCMS online: simplifying advanced metabolomic data processing and subsequent statistical analyses. Analytical Chemistry, 86(14):6931—6939
- Hertkorn N, Harir M, Cawley K M *et al*, 2016. Molecular characterization of dissolved organic matter from subtropical wetlands: a comparative study through the analysis of optical properties, NMR and FTICR/MS. Biogeosciences, 13(8):2257—2277
- Koprivnjak J F, Pfromm P H, Ingall E *et al*, 2009. Chemical and spectroscopic characterization of marine dissolved organic matter isolated using coupled reverse osmosis- electro dialysis. Geochimica et Cosmochimica Acta, 73(14):4215—4231
- Kujawinski E B, Longnecker K, Blough N V *et al*, 2009. Identification of possible source markers in marine dissolved

- organic matter using ultrahigh resolution mass spectrometry. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 73(15): 4384—4399
- LaRowe D E, Koch B P, Robador A *et al*, 2017. Identification of organic compounds in ocean basement fluids. *Organic Geochemistry*, 113: 124—127
- Li Y, Harir M, Uhl J *et al*, 2017. How representative are dissolved organic matter (DOM) extracts? A comprehensive study of sorbent selectivity for DOM isolation. *Water Research*, 116: 316—323
- Liu Z F, Sleighter R L, Zhong J Y *et al*, 2011. The chemical changes of DOM from black waters to coastal marine waters by HPLC combined with ultrahigh resolution mass spectrometry. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 92(2): 205—216
- Rathgeb A, Causon T, Krachler R *et al*, 2017. From the peat bog to the estuarine mixing zone: common features and variances in riverine dissolved organic matter determined by non-targeted analysis. *Marine Chemistry*, 194: 158—167
- Song J M, 2010. *Biogeochemical Processes of Biogenic Elements in China Marginal Seas*. Springer-Verlag GmbH & Zhejiang University Press, 1—662
- Song J M, Qu B X, Li X G *et al*, 2018. Carbon sinks/sources in the Yellow and East China Seas—Air-sea interface exchange, dissolution in seawater, and burial in sediments. *Science China Earth Sciences*, 61. <https://doi.org/10.1007/s11430-017-9213-6>
- Tautenhahn R, Cho K, Uritboonthai W *et al*, 2012. An accelerated workflow for untargeted metabolomics using the metlin database. *Nature Biotechnology*, 30(9): 826—828

## EFFECT OF pH ON EXTRACTION OF SMALL-MOLECULAR BIOACTIVE SUBSTANCES FROM SEAWATER BY SPE-HPLC-ESI-Q-TOF-MS

ZHANG Qian<sup>1, 2, 3, 4</sup>, SONG Jin-Ming<sup>1, 2, 3, 4</sup>, LI Xue-Gang<sup>1, 2, 3, 4</sup>, PENG Quan-Cai<sup>1, 2, 3, 4</sup>,  
YUAN Hua-Mao<sup>1, 2, 3, 4</sup>, LI Ning<sup>1, 2, 3, 4</sup>, DUAN Li-Qin<sup>1, 2, 3, 4</sup>

(1. CAS Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

**Abstract** Marine dissolved organic matter (DOM) contains a large number of bioactive substances. However, lacking suitable separation and extraction methods impedes seriously the exploration of what role different components play in the ecosystem. The solid-phase extraction (SPE) is a very effective method for extracting marine DOM from seawater. While extracting marine DOM in the SPE method, the pH of seawater is critical to the extraction efficiency of bioactive molecules. In this paper, HLB (hydrophilic-lipophilic balance) solid-phase extraction column was used to extract the bioactive substance from seawater under 7 different pH values, the extraction efficiency was measured, and detailed molecular composition was detected in HPLC-Q-TOF-MS in ESI (-) mode. The result shows that good extraction efficiency can be obtained when seawater pH is neutral or strongly acidic. When seawater was acidified to pH 5 or 6, the extraction efficiency of marine DOM was very low. With the decrease of seawater pH value, the signal intensities of the mass spectrum reduced, but more spectrum peaks occurred, and the molecular mass and property of extracts were widely dispersed. When the seawater sample was acidified to pH 2, most numbers of spectrum peaks could be identified. As shown in the van Krevelen and *m/z*-H/C diagrams, the molecular compositions of the extracts differed significantly under different seawater pH values. A neutral pH condition is suitable for the extraction of small molecular and high saturation substances. Strong acidic conditions are good to extract efficiently a variety of substances in high heterogeneity and high resolution, especially those bioactive molecules with unsaturated groups such as acid and ketone, and biological macromolecules such as protein and sugar. When the seawater samples were acidified to pH 2, HPLC-ESI-Q-TOF-MS had the highest response intensity in polar molecules, and this pH condition was especially suitable for extracting bioactive substances from seawater. Therefore, in terms of extraction efficiency, the number of identifiable peaks, and molecular composition of extracts, pH 2 is suggested for the best performance of extracting small molecular bioactive substances by HLB SPE.

**Key words** organic small molecular bioactive substance; solid-phase extraction; seawater pH; HPLC-ESI-Q-TOF-MS