

固相萃取法提取典型海水溶解有机质及其 红外光谱和固态¹³C 核磁共振表征^{*}

武奕鑫¹ 王孝聪^{1, 2, 3} 周振淞¹ 何 晨³ 潘良浩⁴ 宋桂雪^{1①}

(1. 山东大学(青岛)海洋研究院 山东青岛 266237; 2. 中国石油大学(北京)理学院 北京 102249; 3. 中国石油大学(北京)重
质油国家重点实验室 北京 102249; 4. 广西科学院广西红树林研究中心 广西北海 536000)

摘要 由于海水盐度大、有机质含量低,从海水中提取和纯化克级溶解性有机质(dissolved organic matter, DOM)一直十分困难。基于 Bond Elut PPL 固相萃取小柱法进行海水 DOM 固体样品提取的放大试验,建立 DOM 自动化调酸、PPL 树脂吸附技术,最后形成提纯、冷冻干燥 PPL-DOM(通过 PPL 树脂提取的 DOM)完整工艺。采用元素分析、三维荧光光谱、红外光谱和固态¹³C 核磁共振(NMR)波谱法进行样品表征。结果表明:(1)该方法对近海表层海水 DOM 回收率稳定在 50%以上,搭建的提取装置 DOM 日吸附量可达 230 mg;(2)鳌山湾四个季节批次 PPL-DOM 整体分析结果表明,样品的元素组成和光谱特征相似,表明方法适用性和稳定性较好;(3)三种水生态环境的 PPL-DOM¹³C NMR 谱图显示样品的基本特征相似,以烷基碳、碳水化合物碳、芳香碳和羧基碳/酰胺碳为主,其中偶极去相(dipolar dephasing)谱显示了 DOM 前体化合物来源的差异。多种结果表明放大后的 PPL 固相萃取法可稳定提取克级 DOM 样品。

关键词 海洋溶解性有机质; 固相萃取; Bond Elut PPL; 固态¹³C 核磁共振; 红外光谱

中图分类号 X132 **doi:** 10.11693/hyh20220300047

海水中可通过 0.45 μm 滤膜的天然有机物被定义为溶解性有机质(dissolved organic matter, DOM)。DOM 是海洋有机碳库的主体组分(>95%) (Hansell *et al*, 2013), 在海洋生物地球化学循环中起着重要作用。海洋中大量的 DOM 分子耐受生物降解,周期可长达数千年,被称为惰性有机质(refractory DOM, rDOM)。微型生物碳泵(microbial carbon pump, MCP)理论框架提出海洋中的活性 DOM 可以通过微生物代谢活动被转化为 rDOM,是研究海洋碳汇的基础(蔡阮鸿等, 2021), 研究 DOM 和 rDOM 分子组成及有机分子结构有助于深入理解海洋碳汇过程及形成机制和生物效应。但由于 DOM 是由成千上万个分子组成的复杂天然有机质混合物,解析其结构和分子组成一直是个难题和巨大挑战(Arakawa *et al*, 2017; Zhang *et al*, 2018a)。

海水中 DOM 含量低(0.5~2.0 mg C/L),化学成分复杂、盐度高(30~35),受海水 DOM 提取技术的限制,常见分析海水有机质的方法有海水总碳总氮分析、紫外可见光谱(UV-vis)、三维荧光光谱(EEM)、分子排阻色谱(HP-SEC-TOC)、同位素分析($\delta^{13}\text{C}$ 和 $\Delta^{14}\text{C}$)、溶解氨基酸等。但大多分析技术只能对 DOM 整体组成、光敏成分(如有色溶解性有机质 chromophore DOM, cDOM; 荧光溶解性有机质 fluorescent DOM, fDOM)的大概类别及其初步来源等信息进行分析,想得到分子水平的组成和分子有机结构等仪器表征信息,还需借助超高分辨率质谱和核磁共振波谱(NMR)等最先进的分析技术(Song *et al*, 2018; Li *et al*, 2019), 这些表征技术均需要大量的 DOM 样品。此外,不同实验室间的分析比对、微生物培养等也需要克级标准品/对照品的 DOM 样品,这就需要高效富集提取

^{*} 国家重点研发计划项目, 2018YFA0605800 号。武奕鑫, 硕士研究生, E-mail: 3147549097@qq.com

① 通信作者: 宋桂雪, 硕士生导师, 副研究员, E-mail: songgx@sdu.edu.cn

收稿日期: 2022-03-03, 收修改稿日期: 2022-06-14

出纯度高(低盐分)且性质稳定的 DOM 固体样品。

自 20 世纪 70 年代末开始采用 XAD 系列大孔树脂提取地表水 DOM 以来, 研究人员陆续开发了超滤法(ultrafiltration, UF)、电渗析耦合反渗透法(reverse osmosis/electrodialysis, RO/ED)以及固相萃取法(solid-phase extraction, SPE)等富集提取技术(Green *et al.*, 2015)。相较于其他固相萃取如 C_{18} 富集方法, Bond Elut PPL 树脂(安捷伦, 经修饰的苯乙烯-二乙烯基苯共聚物)固相萃取法在海水 DOM 分析中的应用最为广泛。Dittmar 等(2008)曾比较 6 种固相萃取树脂对海水 DOM 的富集效果, 结果表明 PPL 固相萃取(PPL-SPE)法更具有代表性, 且提取效率不随盐度变化降低, 此外该树脂还适用于其他水体环境(Chen *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016)。将 SPE 小柱方法扩大, 使用填充 PPL (500 g)定制树脂(玻璃柱)处理大体积海水已有报道(Green *et al.*, 2014), 但该方法的一些关键参数对回收率的影响未见报道。

基于 PPL 小柱富集 DOM 的原理, 本文进行了海水 PPL-DOM (通过 PPL 树脂提取的 DOM)富集放大实验, 搭建了小型自动化两级过滤、调酸、树脂柱提取富集装置, 完善了提取纯化工艺; 同时, 本文测试了 PPL 树脂长期使用的稳定性、重复性, 研究了上样速率、洗脱体积等影响参数。应用该技术提取 2 个近岸表层海水和 1 个红树林湿地潮沟水等多个批次水样的 DOM, 装置均运行可靠, 方法回收率稳定。同时本文使用元素分析、荧光分析、红外光谱、固态 ^{13}C 核磁共振仪分析了样品基本成分和结构特征, 证明所提取样品的可靠性和稳定性。

1 材料与方法

1.1 水样信息

鳌山湾表层海水: 夏季批次, 2019 年 8 月 1~8 日, 青岛鳌山湾北湾($36^{\circ}22'55''\text{N}$, $120^{\circ}49'35''\text{E}$); 秋冬春季批次, 分别于 2020 年 10 月 7~21 日、2020 年 12 月 3~28 日和 2021 年 4 月 1~20 日在鳌山湾南湾($36^{\circ}20'03''\text{N}$, $120^{\circ}42'27''\text{E}$)采集; 威海市桑沟湾贝藻养殖区表层海水(采样点以海带养殖为主): 2021 年 6 月 26 日采集, 位置 $37^{\circ}05'51''\text{N}$, $122^{\circ}34'40''\text{E}$ 。海水用聚乙烯水桶运回实验室处理。红树林湿地潮沟水: 2021 年 5 月 7~12 日, 位置为北海市峒尾红树林自然保护区落潮潮沟($21^{\circ}29'47''\text{N}$, $108^{\circ}59'44''\text{E}$)。潮沟水样采集后立即在广西红树林研究中心处理。提取富集装置流程图见图 1。

1.2 DOM 提取流程

DOM 提取的自动化装置包括过滤、泵送、调酸、树脂柱吸附以及流出液酸碱中和等系统, 以及 DOM 的洗脱、浓缩、纯化和冻干过程(图 1)。

提取流程包括: (1) 树脂活化: 中压玻璃层析柱(高 50 cm, 内径 5 cm)填装 200 g 新购 Bond Elut PPL 树脂[柱床高度 30 cm, 柱体积(BV) 600 mL]后, 3 倍柱体积(用 3 BV 表示, 下文同)甲醇(色谱纯)活化和 3 倍柱体积酸化水(优级纯盐酸酸化的超纯水, pH 2.0)淋洗。

(2) 过滤和上样(步骤 1~3): 精密蠕动泵(BT100-2J, 保定兰格恒流泵有限公司)泵送水样过孔径 $5\ \mu\text{m}$ 聚乙烯熔喷棉滤芯净水过滤器和混合纤维素酯滤膜(MCE,

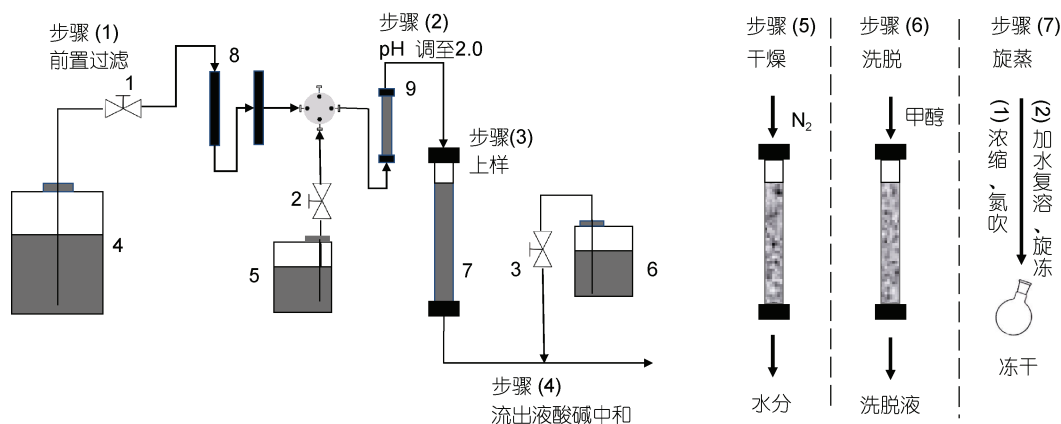


图 1 DOM 提取、富集和冻干流程示意图

Fig.1 Schematic diagram of the procedure of DOM extraction, purification and freeze-drying

注: 1~3: 蠕动泵; 4: 海水; 5: 酸液; 6: 碱液; 7: PPL 树脂玻璃柱; 8: 净水过滤器(PP 棉滤芯孔径 $5\ \mu\text{m}$)与精密过滤盘(滤膜孔径 $0.45\ \mu\text{m}$); 9: 酸液混合柱

孔径 0.45 μm , 美国默克公司), 管线中水样与 0.1 mol/L 稀盐酸在线调节(混合瓶)酸化海水 pH 至 2.0, 随后水样中的极性有机分子经 PPL 树脂柱后被吸附, 流出液与碱液中性后排放。

(3) 脱盐、干燥、洗脱和旋蒸(步骤 4~7): 吸附完成后的树脂柱用 pH 值为 2.0 的水淋洗除去树脂中的绝大多数盐分, 将柱子在真空干燥器(45 $^{\circ}\text{C}$)干燥, 再使用高纯氮(>99.999%)彻底吹干树脂。最后干燥后的树脂经甲醇(3~4 BV)洗脱得黄色洗脱液, 再经减压旋转蒸发(40 $^{\circ}\text{C}$)去除大部分甲醇近干(剩约 20~30 mL), 残余甲醇用氮气吹干, 加少量水稀释混匀后冻干得淡黄色粉末状 PPL-DOM。

(4) 树脂清洗: 洗脱后的 PPL 树脂使用甲醇(约 15 BV)进行淋洗, 初步清洗(0~8 BV)可使用重蒸甲醇, 最后使用色谱纯甲醇(约 7 BV)完成树脂清洗, 若后续处理样品为深远海的低溶解有机碳(dissolved organic carbon, DOC)浓度海水, 建议整个清洗过程均使用色谱纯甲醇进行清洗。清洗后的树脂可使用高纯氮吹干其中甲醇, 用于下一批次水样的处理。

1.3 分析仪器与方法

1.3.1 DOC 测定 总有机碳分析仪(Shimadzu TOC-L, 日本)测定水样 DOC, 测定 DOC 前需在约 30 mL 样品中添加 40 μL 磷酸(85%~90%, HPLC 级)清除样品中的无机碳。

1.3.2 甲醇洗脱液中 DOC 浓度的估算 紫外分光光度计(Shimadzu UV2700, 日本)测定 PPL-DOM 甲醇溶液中 DOM 浓度; 标准溶液配制: 取已知碳含量 PPL-DOM (碳含量 46.7%)复溶于甲醇中, 配置成系列有机碳(OC)标准溶液(线性范围 1.0~20.0 mg/L)。测定溶液 254 nm 吸光度(A), 经计算得标准曲线:

$$C_{\text{OC}} = 73.935A - 0.0387 \quad (R^2 = 0.9888), \quad (1)$$

式中, C_{OC} 为甲醇溶液中 PPL-DOM 有机碳浓度, A 为 DOM 甲醇溶液在 254 nm 吸光度。该方法检出限为 0.5 mg C/L。

有色溶解性有机质(cDOM)代表了 DOM 中可吸收紫外可见光的组分, 一定程度上 cDOM 的紫外吸收系数可以反映水体 cDOM 的丰度(郭卫东等, 2018)。但不同环境水体 cDOM 的吸光系数受有机质结构的影响, 而 cDOM 的化学结构主要与其来源有关(李奕洁等, 2015), 如河口区 cDOM 存在更多的陆地维管植物代谢产物贡献, 而在远海以浮游植物代谢产物贡献为主, 这种 cDOM 来源差异会导致不同水体 DOM 的吸光度与 DOC 浓度之间的关系不一致。因此使用该方法只是用来估算甲醇中 DOC 含量(半定量), 建

议使用同一海域海水的 DOM 配制标准溶液参比样品来计算标准曲线公式。

1.3.3 元素分析 采用元素分析仪(Unicube, Elementar Analysensysteme GmbH, 德国)测定, 结果均已扣除样品水分与灰分(水分: 马弗炉 75 $^{\circ}\text{C}$, 两次测定, 直到恒重; 灰分: 马弗炉 550 $^{\circ}\text{C}$, 灼烧 5 h)。

1.3.4 红外光谱(FTIR) 采用傅里叶变换红外光谱仪(Nicolet iS50, Thermo Scientific, 美国)测定, 光谱采集范围 4 000~500 cm^{-1} , 取约 1 mg 样品与 100 mg KBr 研磨压片; Nicolet 软件包 Omnic 8.1 采集和处理。

1.3.5 三维荧光光谱 使用荧光光谱仪(HORIBA Aqualog[®], HORIBA Scientific, 日本)进行 EEM 分析, 激发波长 λ_{Ex} 240~600 nm, 发射波长 λ_{Em} 246~600 nm, 扫描间隔 3 nm, 扫描速度 300 nm/min。样品溶液中 DOM 浓度为 5 mg/L, 超纯水作空白对照。

1.3.6 固态 ^{13}C NMR 波谱 使用 NMR 波谱仪(Avance NEO 600, Bruker, 德国; 150.90 MHz ^{13}C NMR)。样品填充于 3.2 mm 圆柱氧化锆转子中测试, 获得全边带抑制交叉极化(Cross Polarization/Total Suppression of Sidebands, CP/TOSS)和偶极去相(dipolar dephasing, DD) ^{13}C NMR 谱图(DD 谱图中可以观察未被 H 取代的碳(non protonated)和易活动基团(如-OCH₃ 和 C-CH₃)的信号), 谱图使用金刚烷作标定。CP/TOSS 谱图积分: 烷基碳(alkyl), 化学位移 $0 \times 10^{-6} \sim 45 \times 10^{-6}$, 氮碳/甲氧基(-NCH/-OCH₃) $45 \times 10^{-6} \sim 60 \times 10^{-6}$, 碳水化合物(-OCH-, HOCH₂-) $60 \times 10^{-6} \sim 94 \times 10^{-6}$, 碳水化合物端头碳(-OCHO-) $94 \times 10^{-6} \sim 110 \times 10^{-6}$, 烯烃碳/芳烃碳(olefins, aryl) $117 \times 10^{-6} \sim 150 \times 10^{-6}$, 取代芳香碳(aryl C-O/N-) $150 \times 10^{-6} \sim 164 \times 10^{-6}$, 羧基/酰胺(COO-, -NC=O) $164 \times 10^{-6} \sim 191 \times 10^{-6}$, 酮/醛/蒽醌 $191 \times 10^{-6} \sim 230 \times 10^{-6}$ (Mao *et al.*, 2012a)。

2 结果与讨论

2.1 PPL 固相萃取法主要影响参数

研究了 PPL 小柱法放大的 PPL 柱实验参数, 如控制吸附效率最关键的上样速率、洗脱体积, 并评估了 PPL 树脂的重复使用性。

首先进行 PPL 树脂的空白测试。使用过滤后的超纯水过清洗干净的 PPL 树脂柱, 流出液 DOC 0.08 mg C/L (RSD 12.0%), 该值接近测定低限(LOD) 0.040 mg/L, 未发现有污染引入和树脂流失。使用马弗炉灼烧除碳的海盐配置成人工海水(DOC 0.71 mg C/L, 相对标准偏差 RSD 13.3%, 盐度为 34~35)泵送入清洗干净的

PPL 树脂柱, 取流出液测定 DOC ($n=3$), 人工海水流出液 DOC 0.85 mg C/L (RSD 11.5%)。

2.1.1 上样流速 不同上样流速对 PPL 玻璃柱的 DOC 吸附效率和 DOC 回收率的影响见图 2。DOC 回收率为树脂吸附前后水样 DOC 的差值与原水样 DOC 值之比, 单位时间内的 DOC 回收率作为 DOC 吸附效率。当流速从 13 BV/h 降低到 4 BV/h 时, DOC 吸附效率下降, 从 5.52 mg C/h 减少到 2.82 mg C/h; 而 DOC 回收率升高较快, 从 35% 升高到 56%, 即上样较慢时, 虽然 DOC 吸附效率稍低但回收率较高。流速在 6~8 BV/h 时, DOC 吸附效率有较大幅度的下降, 回收率均超过 50%, 但回收率增长较缓。经综合考虑, 优选 8 BV/h 的上样流速, DOC 吸附效率可达 4.8 mg C/h, 一天(24 h)吸附有机碳 115.2 mg (DOM 约 230 mg)。

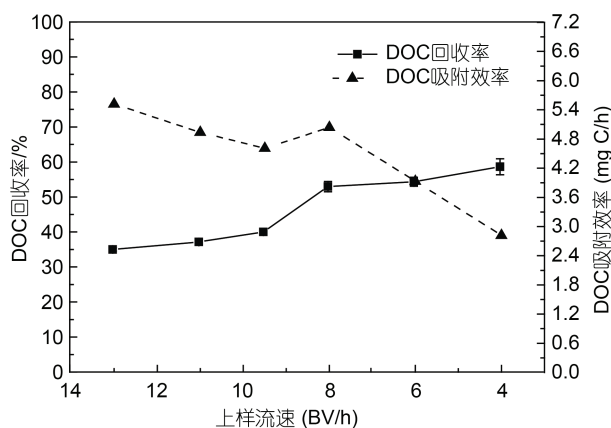
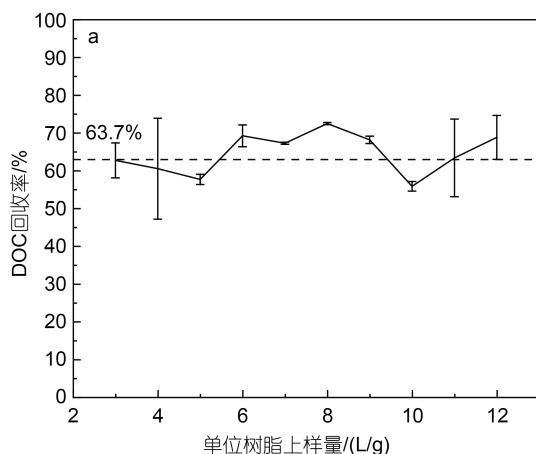


图 2 上样流速对有机碳回收率及吸附效率的影响

Fig.2 Effects of flow rate on DOC recovery and adsorption efficiency

注: BV: 倍柱体积; DOC: 溶解有机碳



2.1.2 洗脱液体积 评估甲醇的洗脱体积对 DOM 回收率的影响。首先使用 PPL 树脂柱(200 g)富集 2 400 L 鳌山湾海水(冬季批次), 随上样量增加每克 PPL 树脂 DOC 回收率如图 3a 所示, 结果显示 DOC 回收率稳定在 60% 左右, 表明 PPL 树脂未达到饱和吸附容量, 水样中的大部分 DOM 均被有效吸附至树脂上。值得注意的是, 在以往的 PPL 小柱研究中, 当 PPL 树脂负载过多即所吸附的 DOM 过多时, 会导致后续被吸附 DOM 的荧光信号和吸光度发生明显变化, 并导致回收率降低(Kong *et al*, 2021)。这种树脂过载导致的 DOM 荧光和化学分馏的变化会影响 PPL-DOM 后续的分析, 因此 PPL-DOM 样品比较的前提是保持树脂上的相对 DOM 负载量相似, 避免吸附率降低导致的化学分馏。

采用 Dittmar 等(2008)的小柱方法中的甲醇作为洗脱溶剂, 甲醇相较于其他常见可与水混溶的有机溶剂(如乙醇、正己烷、乙腈等)极性最高, 可以洗脱 PPL 树脂上更多的被吸附的 DOM 组分, 并且在后续旋蒸中极易被去除。每洗脱 1.67 BV (即 1L) 甲醇, 取 10 mL 的洗脱液, 测定其 UV_{254} 值, 并根据公式(1)计算得到洗脱液中 DOC 浓度(图 3b), 通过对图 3b 中曲线峰面积进行积分, 计算得用 7 BV 可以将树脂中 75% 以上的 DOC 有效洗脱, 17 BV 的甲醇可以洗脱 99% 的 DOM。图 3b 中可看出 4~6 BV 洗脱体积时洗脱效率明显降低, 为得到高浓度浓缩液, 本实验室常选取前 4 BV 的甲醇洗脱液进行旋蒸冻干, 4 BV 后的甲醇洗脱液则被收集重蒸(除去 DOM), 重蒸甲醇可用于下一批次树脂的初步清洗。

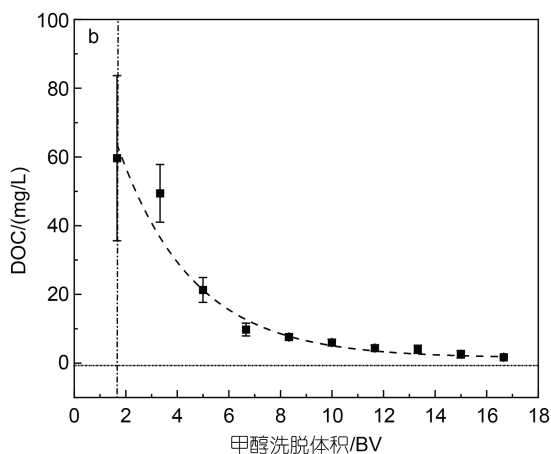


图 3 定制 PPL-树脂柱的 DOC 回收率随上样海水体积的变化(a); 不同柱体积甲醇洗脱后中 PPL-DOM 有机碳浓度(b)

Fig.3 The DOC recovery in customized PPL-resin column with increase in seawater loading volume (a); DOC concentration of PPL-DOM in eluent after eluting with different bed volumes of methanol (b)

除上样流速、上样体积以及洗脱溶剂用量等因素,水样 pH 值也影响 DOC 回收率。DOM 可以看作是富含多元羧酸的弱电解质(Ramos *et al*, 1999; Hertkorn *et al*, 2006), 水样充分酸化后有助于质子化的 DOM 分子在树脂上的有效吸附和提高回收率。水样酸化(pH=2.0)依照国际腐殖质学会(IHSS)地表水 DOM 的标准提取方法(Thurman *et al*, 1981)以及文献方法(Lara *et al*, 1994; Zhang *et al*, 2018b)和 Dittmar 等(2008)的 PPL-SPE 小柱方法。

2.1.3 树脂重复使用性 选择 SPE 小柱(Bond Elut PPL, 500 mg, 6 mL)测试 PPL 树脂重复使用性。连续提取洗脱 10 次北京十三陵水库水(每次 1 L)并监测每次固相萃取前后水样的 DOC; 结果表明 10 次重复使用后, PPL-SPE 小柱的回收率依然稳定在 30%~35%, 并没有随着树脂使用次数增多而下降。使用本文定制 PPL 柱(1.2 小节)多批次提取对近岸海水, 处理海水量在两年内累积达 10 000 L 以上, 而 DOC 回收率均稳定在 50%以上。

实验数据表明, DOM 吸附率和时间相关, 属于动态吸附率。较慢的上样流速(充分吸附)可以提高 DOM 的回收率, 但吸附效率会下降, 6~8 BV/h 可以满足常规要求; 200 g PPL 树脂柱实现了 2 500L 海水

DOM 的高效富集, 回收率可达 60%。以安捷伦提供的 PPL 树脂可吸附树脂质量>5%的目标物计算, 200 g PPL 树脂柱可用于 5 000 L 以上大体积海水[以总有机碳(TOC) 1.5 mg/L、DOM 碳含量 50%和 DOC 回收率 60%计算]有机碳的富集, 但为避免 DOM 分子在树脂上负载过大, 尤其饱和吸附影响 DOM 的吸附和化学分级(Kong *et al*, 2021), 建议处理水量达到饱和量的 50%~80%即可; 长期使用结果表明填充的 PPL 树脂柱可以反复使用(三年测试均未见同一 PPL 柱吸附率明显下降)。

2.2 DOM 分析表征

将该工艺和装置应用于鳌山湾四个季节海水, 处理水量、DOC 含量、DOC 回收率和 PPL-DOM 元素分析结果见表 1。上样流速(11~12 BV/h)过快导致有机碳回收率偏低(见春季批次), 流速参数为 7.5~8 BV/h 时 DOC 回收率 52%~56%, 比文献报道稍低, Green 等(2014)用放大的 PPL 树脂柱法(双柱串联, 每个填装 500 g)处理北太平洋和夏威夷海水, DOC 回收率 61%。

2.2.1 元素分析 鳌山湾春夏秋冬 PPL-DOM 样品水分依次为 2.59%、4.04%、1.92%、4.70%; 灰分依次为 6.21%、6.40%、7.29%、6.82%。PPL-DOM 样品灰分含量为 6.68%±0.47%。

表 1 鳌山湾海水信息和 PPL-DOM 元素分析结果
Tab.1 Information of sample at Aoshan Bay and elemental analysis of PPL-DOM samples

批次	处理水量 /L	DOC 浓度 /(mg/L)	$R_{\text{DOC}}^{\#}$ /%	流速 /(mL/min)	C 含量 /%	H 含量 /%	O 含量 /%	N 含量 /%	S 含量 /%	C/N*
春季	900	2.05	38.00	112	50.10	5.98	35.2	3.13	1.26	18.70
夏季	1 125	1.81	56.00	75	52.00	6.61	37.6	2.94	0.84	20.50
秋季	2 300	2.03	53.00	80	46.70	6.11	36.8	3.00	0.88	18.20
冬季	4 000	2.05	52.00	80	52.10	6.59	37.3	3.04	0.92	20.00

注: #: 有机碳回收率 $R_{\text{DOC}} = \text{DOC}_{\text{流出液}} / \text{DOC}_{\text{原水}} \times 100\%$; *: C/N 为碳氮元素摩尔原子比; 元素分析结果已扣除水分及灰分

四个季节 PPL-DOM 元素分析结果相对稳定, 扣除水分及灰分后, C、H、N、O 含量分别在 46.7%~52.1%、5.98%~6.95%、2.94%~3.31%、35.2%~37.6%。PPL-DOM 的元素分析结果与 IHSS 用 XAD-8/4 树脂法提取的淡水溶解性有机质或富里酸(FA)存在一定差异(humic-substances.org), 淡水 NOM 中 H 含量更低(一般为 4%), N 元素含量也较低(一般为 1%~2.5%), O 元素则较高(一般为 40%), C 含量与本文所提的 PPL-DOM 无明显差异; 使用 XAD-8/XAD-4 法提取的海洋 DOM 元素组成与本文提取的 DOM 结果相近(Green *et al*, 2014)。淡水与海水 DOM 在 H、N、O 元素组成上的

差异与两水体中有机质的来源差异有关, 淡水 DOM 中存在大量的丹宁、木质素(贫氧)以及纤维素(贫氮)等物质的降解产物, 海水 DOM 中则存在更多藻类代谢所产生的类脂质、蛋白质等富氢富氮组分(Emerson *et al*, 2008)。此外, 鳌山湾 PPL-DOM 的 C/N 值(摩尔比)为 19.4±1.2, 与 Dittmar 等(2008)采用 PPL-SPE 小柱法提取的海水 DOM 的 C/N 值(21±1)(挥发甲醇后, 复溶后测定)接近, 也表明使用该相同方法提取的样品与同类方法有很高的可比性。

2.2.2 EEM 分析 对鳌山湾春冬两季的海水水样及 PPL-DOM 复溶溶液(浓度 5 mg/L)的 EEM 光谱进

行比较, EEM 谱图见图 4。海水样品中除了明显的类腐殖质 A 峰和 M 峰外(Coble, 1996; 郭卫东等, 2018), 类蛋白 B 峰和 T 峰信号也十分明显(Nelson *et al*, 2013), 而 PPL-DOM 样品中荧光组分则主要以类腐

殖质 A 峰信号为主, B 峰与 T 峰两种类蛋白荧光信号有明显降低, 表明 PPL 树脂在对海水 DOM 吸附过程中可能选择吸附一些有机氮组分, 某些分子量小极性较强的氨基酸类分子难以回收。

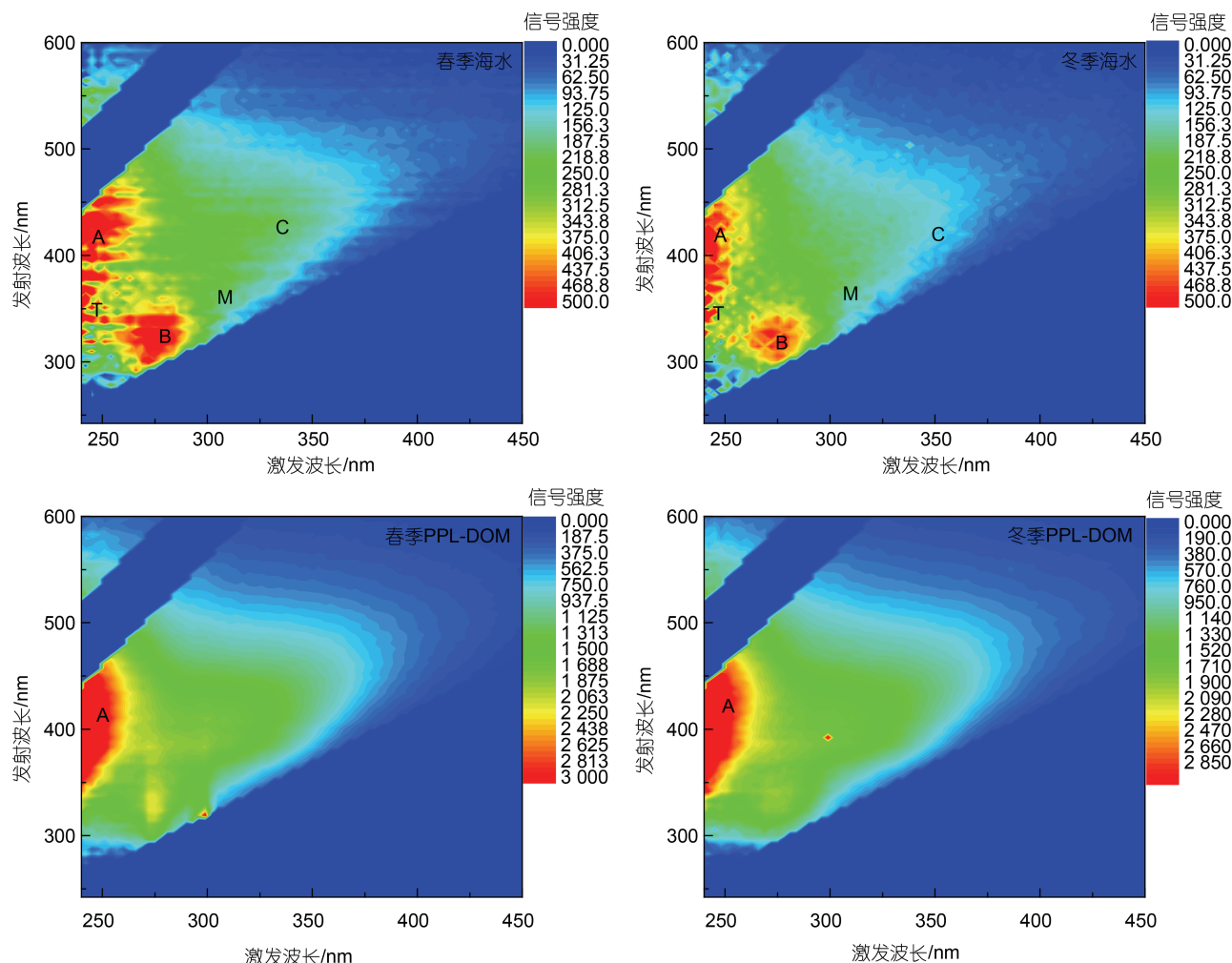


图 4 鳌山湾春冬两季海水及 PPL-DOM 复溶液的荧光 EEM 谱图

Fig.4 The excitation-emission matrix (EEM) fluorescence spectra of original seawaters in spring and winter batches and two seasonal PPL-DOMs from Aoshan Bay

注: A 峰、C 峰为陆源类腐殖质荧光峰, M 峰为海源类腐殖质荧光峰, B 峰为类络氨酸荧光峰, T 峰为类色氨酸荧光峰

2.2.3 FTIR 分析 图 5 为鳌山湾四个季节 PPL-DOM 的 FTIR 谱图, 四个批次 PPL-DOM 的有机官能团红外吸收峰基本特征十分相似, 但也存在差异。在 $3\,430\text{ cm}^{-1}$ 附近均存在一个强吸收峰, 属于酚类、碳水化合物和羧酸类等组分中的羟基缔合羰基后的 O-H 伸缩振动的吸收峰(Zhang *et al*, 2018a); $2\,960\text{ cm}^{-1}$ 处的双峰可归属为长链烷烃类的 $-\text{CH}_3$ 和 $-\text{CH}_2-$, $1\,390\text{ cm}^{-1}$ 峰也归属于 $-\text{CH}_3$ 吸收峰; 春、秋、冬季批次在 $1\,729\text{ cm}^{-1}$ 附近均存在一个尖峰(夏季批次光谱在 $1\,719\text{ cm}^{-1}$ 发生红移), 可归属为羧酸或羧

基的 $\text{C}=\text{O}$ 键的伸缩振动(Abdulla *et al*, 2010); $1\,232\text{ cm}^{-1}$ 峰为 C-O 官能团或羧基中 OH 基团平面变角振动形成的弱峰, 在 $1\,080\sim 1\,051\text{ cm}^{-1}$ 附近峰为碳水化合物中 C-O 伸缩振动。

2.2.4 固态 ^{13}C NMR 分析 由于 DOM 成分和结构复杂, 吸收峰重叠, FTIR 光谱的定性分析也受到一定限制, 而 NMR 技术作为一种对样品中有机碳官能团定量的分析技术(Mao *et al*, 2012b; Tfaily *et al*, 2013; Venel *et al*, 2021), 对 DOM 分析有很大优势, 尤其是固态 ^{13}C 核磁共振分析。图 6 展示了鳌山湾冬季、红

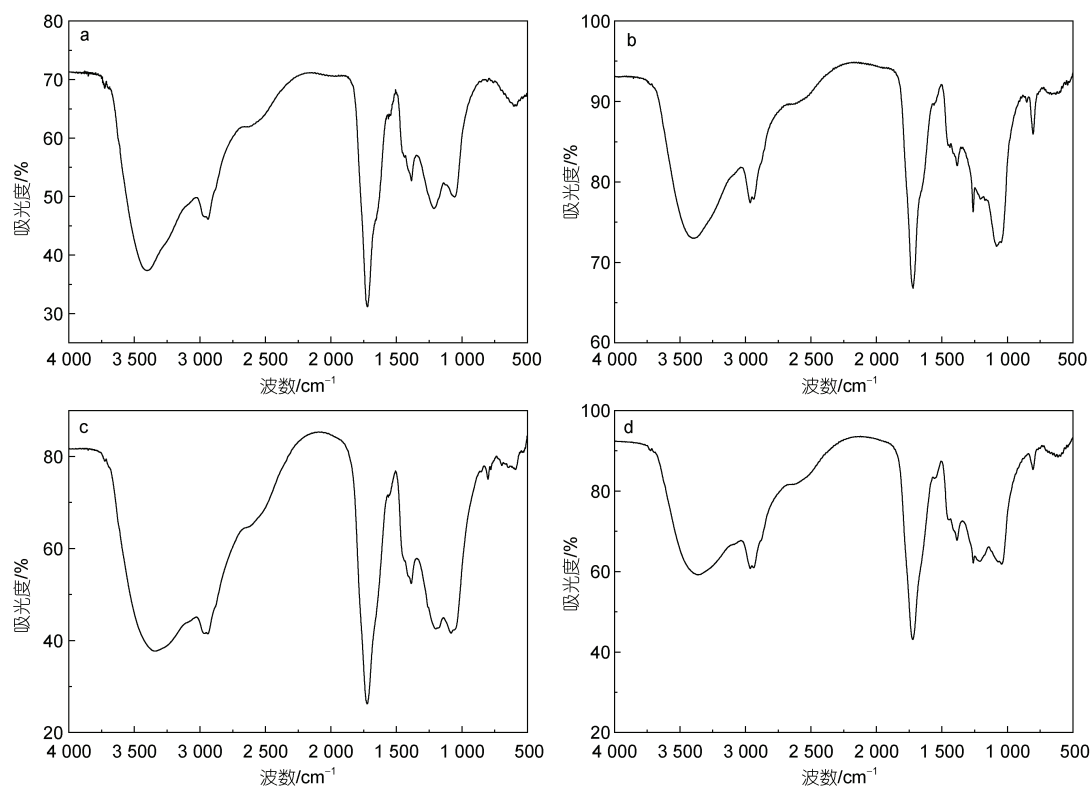


图 5 鳌山湾四个季节次 PPL-DOM 的 FTIR 谱图

Fig.5 The FTIR spectra of PPL-DOM extracted from water in different seasons of Aoshan bay

注: a. 春季; b. 夏季; c. 秋季; d. 冬季

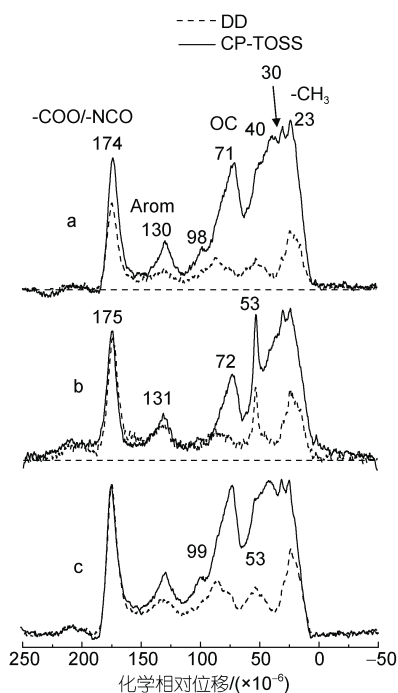


图 6 PPL-DOM 固态 ^{13}C CP/TOSS NMR 谱图

Fig.6 Solid-state ^{13}C NMR spectra of different PPL-DOM samples

注: a. 鳌山湾冬季海水; b. 红树林湿地潮沟水; c. 桑沟湾养殖海水; 虚线为 DD 谱图, 实线为 CP-TOSS 谱图

树林湿地潮沟水以及威海桑沟湾 PPL-DOM 的固态 ^{13}C CP/TOSS NMR 谱图, 其 DD 谱图显示了非 H-C 的碳(non-protonated C)和活动(mobile)甲氧基/甲基(-OCH₃/CCH₃)碳(图 6), 谱图积分结果见表 2。

三个不同来源的 PPL-DOMs 谱图均显示较强的烷烃、碳水化合物、芳烃、羧基/酰胺信号, 与典型海水 DOM 基本特征相同(Mao *et al.*, 2012a; Zhang *et al.*, 2018b)。DOM 中烷基碳信号($0\sim 45\times 10^{-6}$, 其中 30×10^{-6} 为长链烷烃的-CH₂-)较强, 羰基(醛/酮, $191\times 10^{-6}\sim 230\times 10^{-6}$)在样品中则含量较少。根据表 3 中 DOM 的亲水性指数(Hydrophilicity Index, HI)和芳香碳含量(Aromaticity), 桑沟湾 PPL-DOM 显示更强的亲水性(HI 值为 1.51), 其芳香族碳含量(12.5%)略高于鳌山湾(9.07%)和红树林(10.1%)样品。湿地和近岸海水 PPL-DOM 在有机碳组成上也存在明显差异: 红树林湿地 PPL-DOM 的 DD 谱图在 53×10^{-6} 处存在一个明显的尖峰, 该信号归属于木质素中甲氧基的信号, 表明样品中丰富的木质素来源物质, 这些信号来源于湿地红树林植物降解产物(Zhang *et al.*, 2013); 鳌山湾和桑沟湾 PPL-DOM 存在较高的氧烷基信号($60\times 10^{-6}\sim 94\times 10^{-6}$), 结合 98×10^{-6} 附近的 O-C-O (anomeric C)信

表 2 PPL-DOM 固态 ¹³C CP-TOSS NMR 谱图积分表
Tab.2 Integration results of ¹³C CP/TOSS NMR of PPL-DOM samples

化学位移范围 (×10 ⁻⁶)	不同官能团碳含量/%								#HI	*Arom./%
	C=O	NC=O/COO	O-aryl	Aryl C	O-CH-O	O-Alkyl	OCH ₃ /NCH	Alkyl		
	191~230	164~191	150~164	110~150	94~110	60~94	45~60	0~45		
鳌山湾样品	0.43	12.0	1.19	7.88	4.00	23.0	13.2	38.8	1.14	9.07
红树林湿地样品	4.96	14.3	1.34	8.62	2.52	16.0	12.6	39.6	1.07	10.1
桑沟湾样品	0.28	11.9	1.83	10.7	11.1	25.2	13.5	31.4	1.51	12.5

注: #: 亲水性指数 HI = [(45~60) + (60~94) + (94~110) + (150~164) + (164~190) + (191~230)]/[(0~45) + (110~150)]; *: 芳香碳含量 Arom.= aryl(110~150) + O-aryl(150~164)

号, 表明样品中含较多的碳水化合物, 可能来源于大型藻类(如海带)代谢产生的多糖类物质(房景辉等, 2021)。

使用该放大的 PPL-SPE 法和装置及优化的工艺提取富集纯化的多批次 PPL-DOM 结果显示, DOC 回收率稳定, 且样品的元素组成与文献结果相近(Dittmar *et al*, 2008; Green *et al*, 2014), 样品 C 含量也与 IHSS 河水和湖水富里酸(如 1R101F、1R105H)相近, 但相比淡水, 海水 DOM 的 O 元素含量稍低, 而 H、N 元素含量稍高, 反映出海水与淡水水体有机质来源的差异; FTIR 和 NMR 结果表明 DOM 结构组成以羧基、羰基、烷烃类(类脂质)以及碳水化合物等为主。不同水生态系统 PPL-DOM 的固态 ¹³C NMR 结果表明不同样品间碳官能团存在明显差异, 显示出 DOM 陆源和生源前体化合物来源的差异。

比较 PPL-DOM 与原海水水样荧光 EEM 谱图, 可以看出 PPL 树脂对某些含氮组分存在一定的选择吸附。但目前几种常用海水 DOM 树脂提取方法中, XAD 大孔树脂以及 C18 固相萃取树脂等对海水 DOM 的回收率明显低于 PPL 树脂法, 膜法中超滤法也只能实现高分子量 DOM 的富集, 电渗析耦合反渗透(RD/ED)技术虽然可以实现较高的 DOC 回收率(70%以上)(Chen *et al*, 2014), 但该方法制备的固体样品依然灰分很高。综合对比, 放大的 PPL 树脂固相萃取法能得到纯度较理想的低灰分 DOM 样品, 同时 PPL-DOM 中有机成分能代表海水 DOM 的主要特征。将来可通过多种树脂或技术联用的方法提高 DOM 的回收率, 如 Green 等(2014)报道了 PPL 树脂与电渗析耦合反渗透技术联用。

3 结论

本文对 PPL 固相萃取(小柱)法进行放大, 建立了大体积海水中 DOM 的提取工艺, 搭建提取装置, 简化调酸步骤, 优化上样和洗脱技术参数, 并成功应用于多批次海水克级 DOM 的富集提取和纯化。分析表

征结果表明 PPL-DOM 样品性质稳定, 不同来源海水 DOM 中的前体化合物信息也能得到保留。该技术提取的大体积海水 DOM, 可广泛用于数据比对、DOM 结构分析、微生物培养实验等工作。PPL-SPE 方法是目前 DOM 富集纯化最为有效的方法之一, 下一步将开展 PPL-SPE 法与其他提取技术联用的工作以提高方法的回收率。

致谢 感谢山东大学结构成分与物性测量平台董姝丽教授和于群博士在论文中样品的固态 ¹³C NMR 数据测定和分析中所提供的帮助; 感谢山东大学海洋研究院海洋碳汇仪器测试平台老师和同学的大力协助。

参 考 文 献

李奕洁, 宋贵生, 胡素征, 等, 2015. 2014 年夏季长江口有色溶解有机物(CDOM)的分布、光学特性及其来源探究[J]. 海洋与湖沼, 46(3): 670-678.

房景辉, 何为, 毛玉泽, 等, 2021. 桑沟湾标准化与传统养殖模式海带的营养成分比较[J]. 渔业科学进展, 42(2): 170-175.

郭卫东, 王超, 徐静, 等, 2018. 海洋有机质的光谱分析方法评述[J]. 海洋通报, 37(6): 601-614.

蔡阮鸿, 郑强, 陈晓炜, 等, 2021. 微型生物碳泵研究进展[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 60(2): 355-366.

ABDULLA H A N, MINOR E C, DIAS R F, *et al*, 2010. Changes in the compound classes of dissolved organic matter along an estuarine transect: a study using FTIR and ¹³C NMR [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74(13): 3815-3838.

ARAKAWA N, ALUWIHARE L I, SIMPSON A J, *et al*, 2017. Carotenoids are the likely precursor of a significant fraction of marine dissolved organic matter [J]. *Science Advances*, 3(9): e1602976.

CHEN M L, KIM S, PARK J E, *et al*, 2016. Effects of dissolved organic matter (DOM) sources and nature of solid extraction sorbent on recoverable DOM composition: implication into potential lability of different compound groups [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(17): 4809-4819.

CHEN H M, STUBBINS A, PERDUE E M, *et al*, 2014. Ultrahigh

- resolution mass spectrometric differentiation of dissolved organic matter isolated by coupled reverse osmosis-electrodialysis from various major oceanic water masses [J]. *Marine Chemistry*, 164: 48-59.
- COBLE P G, 1996. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy [J]. *Marine Chemistry*, 51(4): 325-346.
- 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 [J]. *Limnology and Oceanography: Methods*, 6(6): 230-235.
- EMERSON S, HEDGES J, 2008. *Chemical Oceanography and the Marine Carbon Cycle* [M]. Cambridge: Cambridge University Press.
- GREEN N W, MCINNIS D, HERTKORN N, *et al*, 2015. Suwannee river natural organic matter: isolation of the 2R101N reference sample by reverse osmosis [J]. *Environmental Engineering Science*, 32(1): 38-44.
- GREEN N W, PERDUE E M, AIKEN G R, *et al*, 2014. An intercomparison of three methods for the large-scale isolation of oceanic dissolved organic matter [J]. *Marine Chemistry*, 161: 14-19.
- HANSELL D A, 2013. Recalcitrant dissolved organic carbon fractions [J]. *Annual Review of Marine Science*, 5: 421-445.
- HERTKORN N, BENNER R, FROMMBERGER M, *et al*, 2006. Characterization of a major refractory component of marine dissolved organic matter [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70(12): 2990-3010.
- KONG X, JENDROSSEK T, LUDWICHOWSKI K, *et al*, 2021. Solid-Phase Extraction of aquatic organic matter: loading-dependent chemical fractionation and self-assembly [J]. *Environmental Science & Technology*, 55(22): 15495-15504.
- LARA R J, THOMAS D N, 1994. Isolation of marine dissolved organic matter: evaluation of sequential combinations of XAD resins 2, 4, and 7 [J]. *Analytical Chemistry*, 66(14): 2417-2419.
- LI Y, HARIR M, LUCIO M, *et al*, 2016. Proposed guidelines for solid phase extraction of Suwannee River dissolved organic matter [J]. *Analytical Chemistry*, 88(13): 6680-6688.
- LI P H, TAO J C, LIN J, *et al*, 2019. Stratification of dissolved organic matter in the upper 2000 m water column at the Mariana Trench [J]. *Science of the Total Environment*, 668: 1222-1231.
- MAO J D, KONG X Q, SCHMIDT-ROHR K, *et al*, 2012a. Advanced solid-state NMR characterization of marine dissolved organic matter isolated using the coupled reverse osmosis/electrodialysis method [J]. *Environmental Science & Technology*, 46(11): 5806-5814.
- MAO J D, JOHNSON R L, LEHMANN J, *et al*, 2012b. Abundant and stable char residues in soils: implications for soil fertility and carbon sequestration [J]. *Environmental Science & Technology*, 46(17): 9571-9576.
- NELSON N B, SIEGEL D A, 2013. The global distribution and dynamics of chromophoric dissolved organic matter [J]. *Annual Review of Marine Science*, 5: 447-476.
- RAMOS A, LÓPEZ S, LÓPEZ R, *et al*, 1999. Ionization constants of a soil fulvic acid[J]. *Analisis*, 27(5): 418-420.
- SONG G X, NOVOTNY E H, RICHARDS K G, *et al*, 2018. Characteristics of hydrophobic and hydrophilic acid fractions in drainage waters of undisturbed soil lysimeters [J]. *Journal of Soils and Sediments*, 18(11): 3197-3214.
- TFAILY M M, HAMDAN R, CORBETT J E, *et al*, 2013. Investigating dissolved organic matter decomposition in northern peatlands using complimentary analytical techniques [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 112: 116-129.
- THURMAN E M, MALCOLM R L, 1981. Preparative isolation of aquatic humic substances [J]. *Environmental Science & Technology*, 15(4): 463-466.
- VENEL F, NAGASHIMA H, RANKIN A G M, *et al*, 2021. Characterization of functional groups in estuarine dissolved organic matter by DNP-enhanced ¹⁵N and ¹³C solid-state NMR [J]. *ChemPhysChem*, 22(18): 1907-1913.
- ZHANG Y L, DU J Z, PENG B, *et al*, 2013. Chemical and spectroscopic characterization of dissolved humic substances in a mangrove-fringed estuary in the eastern coast of Hainan Island, China [J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 31(2): 454-463.
- ZHANG Y L, YANG K L, DU J Z, *et al*, 2018a. Chemical characterization of fractions of dissolved humic substances from a marginal sea—a case from the Southern Yellow Sea [J]. *Journal of Oceanology and Limnology*, 36(2): 238-248.
- ZHANG C L, DANG H Y, AZAM F, *et al*, 2018b. Evolving paradigms in biological carbon cycling in the ocean [J]. *National Science Review*, 5(4): 481-499.

EXTRACTION OF REPRESENTATIVE MARINE DISSOLVED ORGANIC MATTER BY SOLID PHASE EXTRACTION AND CHARACTERIZATION IN INFRARED SPECTROMETRY AND SOLID-STATE ^{13}C NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE

WU Yi-Xin¹, WANG Xiao-Cong^{1, 2, 3}, ZHOU Zhen-Song¹, HE Chen³, PAN Liang-Hao⁴, SONG Gui-Xue¹

(1. *Institute of Marine Science and Technology, Shandong University, Qingdao 266237, China*; 2. *College of Science, China University of Petroleum (Beijing), Beijing 102249, China*; 3. *State Key Laboratory of Heavy Oil Processing, China University of Petroleum (Beijing), Beijing 102249, China*; 4. *Guangxi Mangrove Research Center of Guangxi Academy of Sciences, Beihai 536000, China*)

Abstract Due to high salinity and low concentration of marine dissolved organic carbon, it becomes a great challenge to extract and purify representative marine dissolved organic matter (DOM) in a gram-scale. We carried out a scale-up experiment based on the solid phase extraction (Bond Elut PPL) from seawaters, developed a set of customer-made device, and optimized the automatic procedure of SPE extraction, and finally PPL-DOMs were purified and freeze-dried. Elemental analysis, EEM (excitation emission matrix) fluorescence spectroscopy, Fourier transformed infrared spectroscopy and solid-state ^{13}C NMR (nuclear magnet resonances) spectroscopy were used to characterize PPL-DOM samples. Results indicate that the extraction method was reliable with DOC recovery of greater than 50% and about 230 mg of DOM could be absorbed per day using the developed extraction device. In addition, the bulk analyses of elemental composition and spectral characteristics of DOM samples isolated from seawaters of the Aoshan Bay (Qingdao, China) in four seasons showed overall similarity, indicating in general that our method was applicable and reliable. Moreover, the ^{13}C NMR spectra of PPL-DOM from samples of three different aquatic ecosystems showed similar characteristics to some extents in terms of aliphatic C, carbohydrate, aromatics, and carboxylis/amides, of which differences in the dipolar dephasing spectra stood out, reflecting different sources of precursor compounds in DOM. A variety of results show that the enlarged PPL solid phase extraction method can obtain DOM samples of gram magnitude with stable properties.

Key words marine dissolved organic matter (DOM); solid Phase Extraction; Bond Elut PPL; ^{13}C NMR; fourier transform infrared spectroscopy