

沉积物中溶解性有机质的提取

Extraction of Dissolve Organic Matter from Sediment Samples

袁海军 1,2, 胡盎 3, 刘金福 4, 耿梦蝶 1,5, 刘勇勤 6, 王建军 1,*

¹ 湖泊与环境国家重点实验室,中国科学院南京地理与湖泊研究所,南京; ² 环境地球化学国家重点实验室,中国科学院地球化学研究所,贵阳; ³ 资源环境学院,湖南农业大学,长沙; ⁴ 水利与生态工程学院,南昌工程学院,南昌; ⁵ 环境与土木工程学院,江南大学,无锡; ⁶ 青藏高原环境变化与地表过程重点实验室,中国科学院青藏高原研究所,北京

*通讯作者邮箱: jiwang@niglas.ac.cn

引用格式: 袁海军, 胡盎, 刘金福, 耿梦蝶, 刘勇勤, 王建军. (2021). 沉积物中溶解性有机质的提取. *Bio-101* e2104386. Doi: 10.21769/BioProtoc.2104386.

How to cite: Yuan, H. J., Hu, Y., Liu, J. F., Geng, M. D., Liu, Y. Q. and Wang, J. J. (2021). Extraction of Dissolve Organic Matter from Sediment Samples. *Bio-101* e2104386. Doi: 10.21769/BioProtoc.2104386. (in Chinese)

摘要:本实验基于 Hu et al. (2021)的研究方案,构建了超声-固相萃取 (SPE)方法,以提取沉积物中的溶解性有机质 (DOM)。与传统方法相比,超声法能够加速沉积物中DOM 的溶解,从而减少因提取时间过长而导致的有效组分降解。相对于液相萃取等技术,SPE 的固相与基液呈不同状态,且其吸附力大于样品基液,故 DOM 更易于从固体填料表面分离、纯化出来。SPE 以质谱级甲醇为洗脱液,将 DOM 从吸附剂中洗脱而出。再通过超纯氮气吹除质谱甲醇,从而使 DOM 得以纯化。此方法适用于不同环境中的沉积物样品,如沿海拔梯度与营养盐梯度的山地微宇宙实验体系的成功应用。

关键词: 超声, 固相萃取, 溶解性有机质, 沉积物

研究背景

溶解性有机质 (dissolve organic matter, DOM),是水陆生态系统中一类能溶于水、酸或碱溶液的复合有机组分的统称,在生物地球化学循环过程中扮演着十分重要的角色。在水生生态系统中,沉积物 DOM 主要来源于腐殖质、植物残体或凋落物、根系分泌物以及微生物生物量等。研究表明,DOM 是湖泊沉积物中活性较高的复合物,且对物质



与能量的转化或迁移具有很强的积极作用 (Chen and Hur, 2015)。特别是,DOM 中含有多种官能团,可以通过独特的方式与其他物质如重金属元素以及抗生素等污染物结合,从而影响水体或沉积物中生物群落的组成与结构。

目前,尽管相对氮、磷等营养元素,有关 DOM 对水体富营养化作用机理的研究并不多见,但随着 DOM 与水体富营养化之间的密切关联被揭示,DOM 逐渐成为湖沼学和生态学领域研究的热点。作为影响水陆环境的关键参数,DOM 频繁参与微生物群落的复杂代谢过程。同时,微生物对其大小、组成以及周转等方面也表现出很强的调节作用。相应地,在不同气候下,Hu et al. (2021) 通过构建能量-多样性-形状综合分析框架,揭示了 DOM 与细菌沿不同温度以及营养梯度的关系。其研究表明,在分子水平上,DOM 与细菌的正关联强烈依赖于 DOM 的分子特征,而负关联表明分子随着生物活性变强而分解。在亚热带气候下,营养富集促进细菌与 DOM 正关联的专一化,而在较暖温度下降低其负关联的专一性。因此,DOM 在很大程度上与环境中有机体的生物降解性以及营养有效性着存在密切关联,是生物地球化学循环中不可或缺的组成部分。

材料与试剂

- 1. 40 ml, 2 ml 棕色瓶
- 2. 针式过滤器 (水系 0.45 μm, 25 mm, 津隆)
- 3. 5 ml 注射器
- 4. 50 ml 离心管
- 5. 铝箔纸
- 6. 保鲜膜
- 7. 甲醇 (LC-MS, Merck KGaA, Germany)
- 8. 无水乙醇
- 9. 1 mol/L 盐酸
- 10.超纯氮气
- 11. 超纯水

仪器设备

1. 移液枪 (1 ml & 5 ml, EPPENDORF, Germany)



- 2. 瓶口分液器 (10-60 ml)
- 3. 固相萃取柱 (Waters Oasis® HLB Extraction Cartridge)
- 4. 5 L 烧杯
- 5. 超声波清洗仪 (PM2-600TD, Prima, UK)
- 6. 真空固相萃取装置 (5982-9120, Agilent VacElut, USA)
- 7. 真空泵 (DOA-P604A-BN, GAST Manufacturing, INC, USA)
- 8. 干式氮吹仪 (LC-DCY-12GP, 上海力辰仪器科技有限公司)
- 9. 超纯水机 (PURELAB Chorus 1, ELGA LabWater, France)
- 10. 低速离心机 (5702R, EPPENDORF, Germany)
- 11. 冰箱 (BD-226WG,青岛海尔特种电冰柜有限公司)
- 12. 电热恒温鼓风干燥箱 (ED53, BINDER, Germany)
- 13. 电子天平 (ME104/02, METTLER TOLEDO, USA)
- 14. 马弗炉 (ELF11/23B, CARBO LITE, UK)
- 15. 通风橱

原理与方法

本实验将超声技术与固相萃取技术有效结合,以促进沉积物中溶解性有机质 (DOM) 的提取。其中,称取一定量沉积物样品于带特氟龙盖子的棕色瓶,加入适量超纯水,通过超声震荡,使沉积物中 DOM 充分溶入水中。经过离心、过滤以及酸化等处理后,获得的清液通过 Waters Oasis® HLB 萃取柱,不可溶性组分与水溶液从萃取柱吸附剂的空隙流出,而 DOM 被吸附在萃取柱的填料 (吸附剂) 表面。其中,酸化是为了促进 H+与 CO₃2-充分接触,使得一些难溶性的 CO₃2-盐转变为易溶性的 HCO₃-盐;同时,也促进部分 HCO₃-盐转化为 CO₂ 而排出滤液,从而达到除去部分无机碳以及防止空气中的 CO₂溶入滤液的目的。

Waters Oasis[®] HLB 萃取柱中的吸附剂是由亲脂性的二乙烯苯与亲水性的 N-乙烯基吡咯烷酮聚合而成的大孔聚合物,适用于酸、碱及中性化合物的提取。Dittmar et al. (2008)的研究显示,二乙烯苯聚合物是固相萃取 DOM 回收率最高的吸附剂,且相比硅结构吸附剂更具有代表性和高吸附容量。其研究表明,在咸水沼



泽和河水中,二乙烯苯聚合物对溶解性有机碳 (DOC) 的提取率分别高达 65%和 62%; 而对于南极洲和深海的纯海洋 DOM, 平均提取效率虽然只有 43%, 但其能够使样品达到完全脱盐。Waters Oasis® HLB 吸附剂是利用反相固相萃取原理来保留 DOM 的,即固定相上非极性大孔聚合物 (吸附剂) 通过对有机溶质的亲和力而将其从极性的水相中分离出来,而这种亲和力主要源于聚合物较强的疏水性以及其内部所受的范德华力。

对于吸附在填料表面的 DOM,在利用超纯氮气吹除附在填料上的水分后,以质谱级甲醇为洗脱液,将 DOM 洗脱至小棕色瓶中。最后,对于洗脱液,再次进行氮吹,以除去挥发性的质谱级甲醇,从而获得纯净的 DOM。基于 Dittmar *et al.* (2008)的研究,超声-固相萃取沉积物中 DOM 的原理大体如图 1 所示。



图 1. 沉积物中 DOM 提取的超声-固相萃取原理

实验步骤

本实验大体流程如图 2 所示,详细步骤如下:

1. 充分混匀冷冻干燥后的样品, 称取 0.70 g 沉积物于 40 ml 带特氟龙盖子的棕色



瓶中。

- 2. 通过瓶口分液器吸取 30 ml 超纯水于上述棕色瓶中,充分混匀后超声 2 h。每超声半小时需充分混匀溶液一次,至瓶底无沉积物依附后继续超声,共计超声 4 次。
 - 注意:由于超声过程中水温会持续上升,为防止瓶内 DOM 受热分解,需向超 声仪内注入流动的自来水,同时,保持排水速率与水体流入速率相当。
- 3. 取出超声后的棕色瓶, 充分混匀溶液, 将悬浊液转移至 50 ml 离心管中, 4,000 r/min 离心 20 min。
- 4. 另取一个新的 40 ml 带特氟龙盖子的棕色瓶, 称取其质量 mo, 并记录。
- 5. 将真空固相萃取装置与 0.45 μm, 25 mm 针式过滤器连接,过滤器下端连接第 4 步中的棕色瓶,注射器吸取离心液后连接过滤器,启动真空泵,将溶液过滤 入棕色瓶内里。每次过滤离心液 5 ml 左右,共计过滤 6 次。
- 6. 过滤完后, 称取滤液和棕色瓶的总质量 m₁, 并记录。
- 7. 向滤液中加入 1 mol/L 盐酸,调节 pH 至 2.0 左右,称取滤液、盐酸和棕色瓶的总质量 m₂,并记录。通常,30 ml 的滤液需加入 300 μl 盐酸,且酸化是为了除去滤液中的部分无机碳和防止空气中的 CO₂溶入滤液。
- 8. 取 3.5 ml 质谱级甲醇于固相萃取柱中,清洗 3 次,然后取 3.5 ml pH=2.0 的超 纯水 (V_{维*}: V_{盐酸}=100: 1),继续清洗柱子 3 次。其中,选用 pH=2.0 的超纯水 是为了防止空气中的 CO₂ 溶入超纯水而干扰实验。
- 9. 清洗完后,向柱中加入滤液进行萃取,每次取 3 ml,共计萃取 5 次。
- 10. 萃取完后, 称取棕色瓶与剩余滤液的总质量 m3, 并记录。
- 11. 对于萃取完的柱子,继续用 3.5 ml 超纯水 (pH = 2.0) 清洗 2 次,以除去吸附在萃取柱内的少量无机碳。
- **12**. 柱子清洗完后,固定于干式氮吹仪上,用超纯氮气吹干萃取柱,当吸附剂变为白色时,即视为完全吹干。
- 13. 将吹干后的萃取柱固定于 2 ml 的棕色样品瓶上,向柱中加入质谱级甲醇,以洗脱吸附在萃取柱吸附剂中的有机物,每次加入 0.5 ml 甲醇,共计洗脱 3 次。
- 14. 将 2 ml 棕色样品瓶置于氮吹仪上,至瓶内液体全部吹干后,将 2 ml 棕色瓶与第 10 步中的棕色瓶置于-20 °C 下保藏。



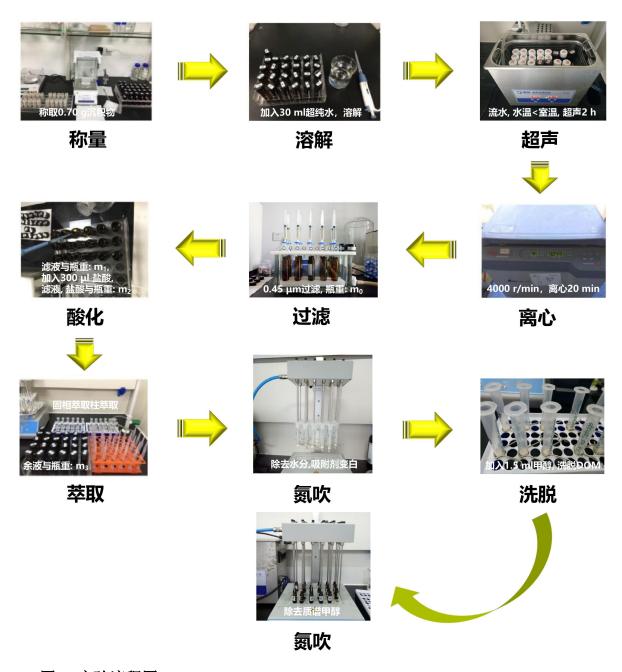


图 2. 实验流程图

注意事项

- 1. 棕色瓶等玻璃仪器清洗干净后,需用纯水润洗三遍,烘干,然后用铝箔纸将瓶子包好,在马弗炉中550°C煅烧5h,以除去仪器自身携带的有机物。
- 2. 非玻璃仪器,如离心管、注射器、枪头以及瓶盖等,需用酒精浸泡 3 h,再用纯水清洗三遍后,置于烘箱中烘干备用。



- 3. 实验过程中,实验者应注意戴好手套、口罩以及护目镜等,做好防护工作。
- 4. 质谱级甲醇为易燃、高挥发性有毒液体,可通过人体呼吸道以及皮肤等摄入人体内, 从而引起视神经炎以及酸中毒等。因此,质谱级甲醇的使用必须在通风橱中进行。
- 5. 盐酸为挥发性酸,需在通风橱中进行操作。
- 6. 无水乙醇为挥发性有机物,浸泡实验仪器过程中,需用保鲜膜对烧杯口进行密封, 防止酒精挥发。

致谢

本工作得到国家自然科学基金(91851117)的支持。

参考文献

- Chen, M. and Hur, J. (2015). <u>Pre-treatments, characteristics, and biogeochemical dynamics of dissolved organic matter in sediments: A review.</u> Water Res 79: 10-25.
- 2. Hu, A., Choi, M., Tanentzap, A. J., Liu, J., Jang, K. S., Lennon, J. T., Liu, Y., Soininen, J., Lu, X., Zhang, Y., Shen, J. and Wang, J. (2021). Quantifying microbial associations of dissolved organic matter under global change. bioRxiv
- 3. Dittmar, T., Koch, B., Hertkorn, N. and Kattner, G. (2008). <u>A simple and efficient method for the solid-phase extraction of dissolved organic matter (SPE-DOM) from seawater</u>. *Limnol Oceanogr-Meth* 6(6): 230-5.