

基质固相分散-反相高效液相色谱 特征指纹图谱鉴别渤海原油

赵恒强^{1,2}, 陈军辉², 张道来², 程红艳², 杨佰娟², 黎先春², 王小如^{2,3}

(1 中国海洋大学 化学化工学院, 山东 青岛 266100 2 国家海洋局第一海洋研究所海洋生态研究中心, 山东 青岛 266061;

3. 厦门大学 化学化工学院化学系, 福建 厦门 361005)

摘要: 建立渤海原油的高效液相色谱 (HPLC) 特征指纹图谱, 为渤海原油的鉴别提供一种新方法。以氧化铝作为基质固相分散剂进行样品处理, 采用 HPLC 法进行分析, 双反相 C₁₈ 色谱柱串联, 以乙腈-水为流动相, 二元线性梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 20℃, 双波长检测 226 nm、254 nm, 进样量 10 μL; 采用所发展的方法对 10 批渤海原油样品进行分析, 建立渤海原油的 HPLC 特征指纹图谱, 结合相似度分析用于渤海原油的鉴别。该方法具有很好的精密性、重复性和稳定性, 10 批渤海原油特征指纹图谱有 13 个共有峰, 结合相似度分析可以用于渤海原油样品的鉴别, 说明 HPLC 特征指纹图谱是渤海原油鉴别的有力工具。

关键词: 渤海原油; 基质固相分散; 高效液相色谱; 特征指纹图谱

中图分类号: P734.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-6336(2011) 01-0105-05

Identification of Bohai Sea crude oil based on characteristic fingerprinting by MSPD-RP-HPLC

ZHAO Heng-qiang^{1,2}, CHEN Jun-hui², ZHANG Dao-lai², CHENG Hong-yan², YANG Bai-juan²,

LIX ian-chun², WANG X iao ru^{2,3}

(1 College of Chemistry and Chemical Engineering Ocean University of China Qingdao 266100 China 2 Research Center for Marine Ecology The First Institute of Oceanography, SOA, Qingdao 266061, China 3. Department of Chemistry of College of Chemistry and Chemical Engineering Xiamen University, Xiamen 361005 China)

Abstract Based on the high performance liquid chromatography (HPLC) characteristic fingerprinting a new method for crude oil identification of Bohai Sea was developed. The sample pretreatment was done using matrix solid phase dispersion and Al₂O₃ was used as the dispersant. The chromatographic fingerprints were determined by injecting 10 L sample solution each time on two reverse phase C₁₈ columns in series with the gradient elution solvent system composed of water and acetonitrile. The flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was maintained at 20°C and the signals were acquired at 226 nm and 254 nm. The characteristic fingerprints of crude oil were established by analysis of ten representative samples derived from Bohai Sea and identification was carried out by the similarity analysis of the characteristic fingerprints. The method was ideally suited for the fingerprinting of Bohai Sea crude oil with good precision, repeatability and stability. 13 peaks were selected as the common peaks of the characteristic fingerprint and used for the similarity analysis which could be applied to distinguish crude oil of Bohai Sea from that of other sources. The characteristic HPLC fingerprinting technique thus was a powerful tool for the identification of crude oil originated from Bohai Sea.

Key words Bohai Sea crude oil; matrix solid phase dispersion; HPLC; characteristic fingerprints

目前, 用于油指纹鉴别的方法有特征法和非特征法两大类^[1]。特征方法主要包括气相色谱和气相色谱-质谱

法, 非特征法包括高效液相色谱法及一系列光谱法等; 以上方法各有优缺点, 其中高效液相色谱法具有受风化影

收稿日期: 2009-06-16; 修订日期: 2009-09-14

基金项目: 海洋公益性行业科研专项 (200705011, 201005034-3); 中国海监技术支撑体系项目; 2008 年海洋环境保护及节能减排专项

作者简介: 赵恒强 (1980-), 男, 山东省泰安市人, 博士研究生, 主要从事海洋环境分析研究

通讯作者: 陈军辉, 男, 博士, E-mail: jchen@fi. org. cn

响小,适于分离石油中极性大、沸点高的组分等优点。国内外学者对 HPLC 鉴别海面溢油做了部分研究工作。SANER^[2]等建立了石油中甲醇提取物的液相色谱分离方法。PASADAK IS 等优化了石油中芳香组分的 HPLC 分离方法,并进行了准确测定^[3,4]。许乙烈^[5]、徐恒振^[6]等发展 HPLC 法用于溢油的鉴别。以上文献多采用提取溶剂与油样直接混合提取,用单正相柱或反相柱分离。由于石油是由数千种不同浓度的有机化合物组成的复杂混合物^[7],含有烷烃、芳烃、胶质、沥青等成分,直接提取会造成提取溶液组成复杂,另外,采用单柱难以有效分离,不利于后续的指纹鉴别。

基质固相分散 (matrix solid-phase dispersion MSPD) 是一种新样品处理技术,其基本原理是将样品与固相分散剂或支持体一起研磨,使样品中各组分与具有较大比表面积分散剂充分接触和作用。从而使基质干扰物吸附在分散剂中,以达到降低基质干扰的目的。目前,该方法已被广泛应用于蔬菜、水果和植物中农药、杀虫剂等残留的分析^[8-10],但在原油化学成分提取净化中应用较少。本研究首次采用基质固相分散法提取净化原油样品,采用双 C₁₈柱串联进行分析,开展渤海原油的 HPLC 特征指纹图谱研究,为辨别渤海原油、海面溢油鉴别及海洋生态影响评估提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

甲醇(色谱纯)购于美国 Tedia 公司,乙腈(色谱纯)购于德国 Merck 公司,其余试剂均为分析纯,中性氧化铝(100~200目,分析纯),实验用水为 Milli-Q 超纯水(18.2 MΩ)。

本研究用于建立渤海原油特征指纹图谱的 10 个原油样品信息见表 1。

表 1 渤海原油样品来源

Tab 1 Crude oil samples originated from Bohai Sea used in this work

编号	油样	产地
1	绥中油田	渤海
2	赵东油田	渤海
3	绥中油田	渤海
4	锦州油田	渤海
5	锦州油田	渤海
6	渤中油田	渤海
7	渤中油田	渤海
8	海洋石油储油轮	渤海
9	海洋石油储油轮	渤海
10	埕岛油田	渤海

1.2 仪器与设备

1100 型高效液相色谱仪,配有四元泵, DAD 检测器,自动进样器等(美国 Agilent 公司); KQ-400KDE 型大功率数控超声波仪(昆山市超声仪器有限公司); R201 型旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司); FA 1104 型电子天平

(上海精天电子仪器厂); TH Z-8 恒温水浴锅(中国浙江嘉兴电热仪器厂); Milli-Q(18.2 MΩ)超纯水处理系统(美国 Millipore 公司)。

1.3 供试品溶液的制备

取 0.5 g 原油样品置于玻璃培养皿中,加入 5 mL CHCl₃ 使油样充分溶解,加入 10 g 中性 Al₂O₃, 混匀, N₂ 气吹干。将样品转入具塞锥形瓶中,加入 30 mL 95% 乙醇,于超声提取器中提取 30 min, 重复提取一次,合并提取液,过滤,滤液在 50℃ 条件下进行旋转蒸发浓缩至干,加入 6 mL 乙腈超声溶解,再加 4 mL 超纯水超声 1 min, 13 000 r/min 离心分离 3 min 过 0.45 μm 微孔滤膜后作为供试品溶液。

1.4 色谱条件

Agilent ZORBAX SB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 美国 Agilent 公司) 串联 Agilent Eclipse C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm, 美国 Agilent 公司), 流动相 A 为水, 流动相 B 为乙腈, 流速为 1.0 mL/min, 柱温 20℃, 检测波长为 226 nm, 254 nm, 带宽 16 nm, 进样量为 10 μL, 梯度洗脱程序为 T: 0 min-25 min-30 min-55 min-70 min-95 min, B%: 65%-65%-80%-80%-100%-100%。

2 结果与讨论

2.1 基质固相分散提取条件优化

基质固相分散法是类似于固相萃取的一种提取、净化、富集技术,1989 由 Steven Barber^[11]首次提出并给于理论解释。本文尝试用基质固相分散法提取净化原油样品,以期达到降低基质干扰、提高色谱分离的效果。

2.1.1 固相分散剂种类及用量的选择

在基质固相分散中,固相分散剂同时起着吸附剂和净化剂的作用,因而其选择非常重要。本研究以 95% 乙醇为提取溶剂,采用 1.3 节样品溶液制备方法进行制备,以 1.4 节色谱条件进行分离测定,考察了几种常用的固相分散剂硅藻土、活性炭、中性 Al₂O₃、大孔树脂等的提取分离效果,如图 1 所示。

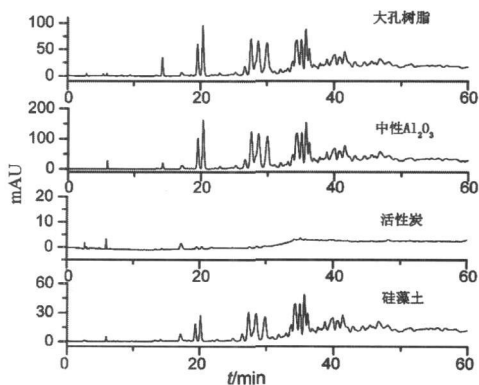


图 1 不同固相分散剂条件下的色谱

Fig 1 HPLC chromatograms of extracts prepared with different matrix solid-phase dispersants

从图 1 可以看出: 以硅藻土为分散剂时, 所得色谱图有适量色谱峰, 但色谱峰强度较低; 以活性炭为分散剂时, 所得色谱图色谱峰较少, 峰强度较低, 指纹特征不明显; 以大孔树脂和中性 Al_2O_3 为分散剂时, 所得色谱图峰强度稍高, 分离度较好、基线平稳, 指纹特征明显, 且以中性 Al_2O_3 为分散剂时峰强度较高, 因此选择中性 Al_2O_3 作为原油液相指纹样品固相分散剂。

在 MSPD 法中, 固相分散剂的用量是一个至关重要的因素, 用量过少, 净化效果差; 用量过多, 则消耗较多的溶剂, 增加成本。本文考察了中性 Al_2O_3 用量对净化效果的影响, 如表 2 所示。当中性 Al_2O_3 与原油样品 $CHCl_3$ 溶液质量比为 1:1 时, 提取液色谱图 4 个特征峰 (峰 4 5 8 9) 含量较高; 当质量比为 3:1 时, 提取液色谱图 4 个特征峰相对峰面积最低, 说明中性 Al_2O_3 的量增加对待测组分的吸附也明显增加; 当质量比为 2:1 时, 提取液色谱图 4 个特征峰相对峰面积最高, 且基线噪音低。因此选择中性 Al_2O_3 的量为原油样品 $CHCl_3$ 溶液的 2 倍。

表 2 固相分散剂不同用量时各特征峰相对峰面积

Tab 2 Relative peak areas of the characteristic peaks with different amount of dispersants

中性 Al_2O_3 : 石油 $CHCl_3$ 溶液 (g: g)	峰 4	峰 5	峰 8	峰 9
1: 1	0.9740	0.9775	0.9901	0.9829
2: 1	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
3: 1	0.7249	0.7098	0.8138	0.8166

2.1.2 提取溶剂、方式、时间及次数的优化

提取溶剂是影响原油化学成分提取率的重要因素, 本研究采用 1.4 节色谱条件, 首先对原油不同提取溶剂 (乙腈、甲醇、二甲基甲酰胺、乙腈 (0.5% HAc)、甲醇 (0.5% HAc)、乙醇 (0.5% HAc)、乙腈 (5% H_2O)、甲醇 (5% H_2O)、乙醇 (5% H_2O)、二甲基甲酰胺 (5% H_2O)) 提取物溶液进行分析, 结果显示, 用乙醇 (5% H_2O) 作提取溶剂时, 所得色谱图色谱峰较多、各峰分离度好、基线平稳, 指纹特征明显, 因此选择乙醇 (5% H_2O) 作为原油液相指纹图谱样品提取溶剂。

比较了超声辅助提取法、水浴回流提取和索式提取法对样品进行提取的效果。如图 2 所示, 索式提取法提取效率最高, 但提取时间非常长 (12 h); 水浴回流提取时间长 (1 h) 且提取效率低; 超声提取法提取效率仅次于索式提取, 且提取时间短 (30 min), 因此选择超声提取法用于后续样品提取。

在已经优化的参数条件下, 对原油样品连续进行了 3 次提取, 提取时间为 30 min, 然后按 1.4 色谱条件进行测定。如图 3 所示, 前两次提取原油液相指纹中 4 个特征峰 (峰 4 5 8 9) 的提取率较为接近, 第 3 次提取率明显较低。这说明提取条件优化较好, 2 次提取 4 个特征峰基本达到提取充分。为了节省时间和资源, 本文选择 2 次提取。

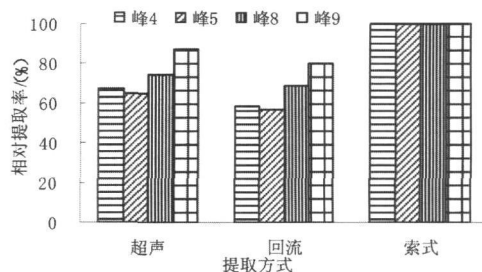


图 2 不同提取方式下 4 个特征峰提取效率的比较

Fig. 2 Comparison of extraction efficiency of the four characteristic peaks with different extraction methods

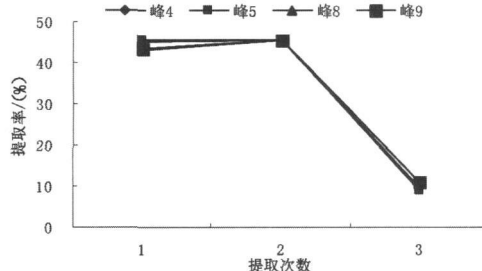


图 3 提取次数对 4 个特征峰提取效率的影响

Fig. 3 Effect of extraction times on extraction efficiency of the four characteristic peaks

在已经优化的参数条件下, 考察了不同提取时间 (20 min, 30 min, 40 min) 对提取率的影响, 如图 4 所示, 20 min 时提取效率较低, 30 min 时 4 个特征峰 (峰 4 5 8 9) 的提取率可达 97.16% ~ 98.35%, 与 40 min 时较为接近, 为节省时间, 实验最后选择 30 min 提取。

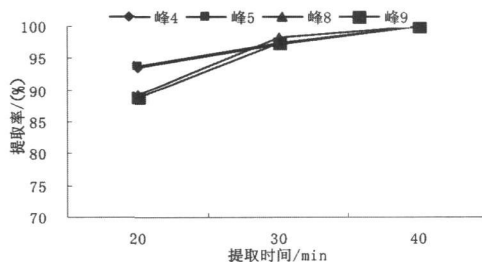


图 4 提取时间对 4 个特征峰提取效率的影响

Fig 4 Effect of extraction time on extraction efficiency of the four characteristic peaks

2.2 色谱条件优化

近年来, 液相色谱法发展迅速, 在石油化学组分分离测定中也得到一定应用^[5, 6, 12, 13]。本研究采用基质固相分散法净化原油样品, 采用 95% 乙醇为提取溶剂, 考察了 C_{18} 柱、氰基柱、氨基柱等对分离测定的影响。结果发现: 采用双 C_{18} 柱串联时石油提取物中各峰分离度高, 色谱峰分布均匀, 谱图信息量大, 特征性强, 具有较好的代表性 (见图 5)。因此, 本文采用双 C_{18} 柱串联法用于原油 HPLC 特征指纹图谱研究。本研究通过二极管阵列检测器全波段扫描, 选择 226 nm、254 nm 双波长检测作为原油

HPLC 特征指纹图谱研究的检测波长。考察了流动相组成对分离的影响,最终选用乙腈-水作为流动相。考察了不同柱温 (15℃, 20℃, 25℃, 30℃) 对分离的影响,选择 20℃ 作为分离温度。此外,对方法的重复性和供试品溶液 48 h 稳定性进行了考察,结果显示 4 个主峰 (峰 4、5、8、9) 峰面积的 RSD 值分别小于 4.80%、7.32%, 保留时间的 RSD 值分别小于 0.66% 和 1.06%, 说明该方法重复性良好, 供试品溶液在 48 h 内化学性质稳定。

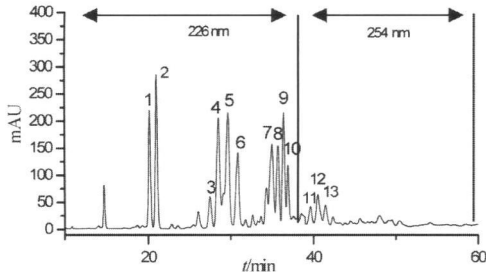


图 5 渤海原油 HPLC 图谱 (226 nm, 254 nm)

Fig 5 HPLC chromatogram of Bohai Sea crude oil detected at 226 and 254 nm

2.3 渤海原油液相特征指纹图谱的建立

取 10 批不同的渤海原油样品,按 1.3 处理方法将其制备成供试品溶液,按 1.4 色谱条件进样分析,获得各样品的 HPLC 特征指纹图谱 (见图 6)。在本研究所建立的分析系统下,10 批渤海原油 95% 乙醇提取物成分出峰时间均在 60 min 之前,主要有 13 个共有峰。这 13 个色谱峰即构成渤海原油指纹图谱的指纹特征,也是鉴别渤海原油真伪的主要变量。其中,特征性明显的主要有 4 个色谱峰,这 4 个色谱峰即构成渤海原油 HPLC 特征指纹图谱的特征峰,见

表 3 10 批渤海原油相似度计算结果

Tab 3 Results of similarity analysis of ten crude oil samples originated from Bohai Sea

Na	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
相似度	0.982	0.979	0.992	0.994	0.992	0.989	0.974	0.913	0.900	0.991

2.4 渤海原油样品鉴别

为了探讨采用原油 HPLC 特征指纹图谱辨别渤海原油的可行性,本文采用 1.3 供试品处理方法,对另外 18 种常见石油样品进行处理,按 1.4 色谱条件进样分析,得到各样品的 HPLC 特征指纹图谱,采用 2.3 相似度计算方法

表 4 18 批不同原油相似度计算结果

Tab 4 Results of similarity analysis of eighteen crude oil samples obtained from different sources

编号	油样	产地	相似度	编号	油样	产地	相似度
1	上扎库姆原油	阿联酋	0.825	10	旅大油田原油	渤海	0.901
2	科威特原油	科威特	0.847	11	渤西平台原油	渤海	0.986
3	沙中原油	沙特	0.873	12	锦州油田原油	渤海	0.928
4	沙轻原油	沙特	0.795	13	胜利原油 1	胜利油田	0.397
5	ORIENTE 原油	厄瓜多尔	0.755	14	胜利原油 2	胜利油田	0.208
6	沙重原油	沙特	0.778	15	胜利原油 3	胜利油田	0.141
7	燃料油 #	中东	0.598	16	胜利原油 4	胜利油田	0.118
8	燃料油 #	中东	0.582	17	胜利原油 5	胜利油田	0.171
9	绥中油田原油	渤海	0.945	18	胜利原油 6	胜利油田	0.007

图 5 (分别为峰 4、5、8、9)。如图 6 所示,不同渤海原油样品谱图中各共有峰的保留时间变化较小,其 RSD 值为 0.08% ~ 0.17%, 而各共有峰峰面积变化较大,其 RSD 值为 28.94% ~ 46.77%, 但不同渤海原油样品指纹图谱的轮廓特征一致。为了建立渤海原油的参照特征指纹图谱,采用平均矢量法对 10 批渤海原油的特征指纹图谱进行计算,得到 10 批渤海原油的平均特征指纹图谱,作为渤海原油的参照特征指纹图谱用于渤海原油的鉴别。

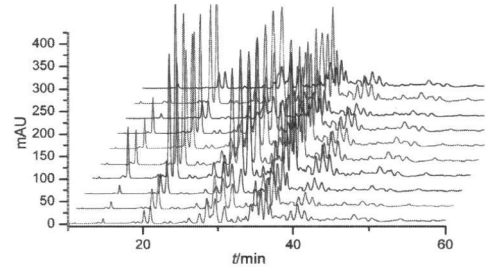


图 6 10 批渤海原油样品 HPLC 特征指纹图谱

Fig 6 HPLC characteristic fingerprints of ten Bohai Sea crude oil samples

相似度分析可以定量的描述比较指纹图谱,可以客观的对各样品进行评价。根据文献^[14]报道,本文采用 EXCEL 2002 办公软件,采用相关系数法计算 10 个批次渤海原油的特征指纹图谱与参照特征指纹图谱之间的相似度,结果见表 3。从表 3 可以看出,各批渤海原油样品的相似度值均在 0.90 以上,说明本文建立的渤海原油 HPLC 特征参照指纹图谱能反映各渤海原油样品的共有化学特征,能反映渤海产区原油的固有化学特性,可以用于渤海原油的鉴别。

进行计算,结果如表 4 所示。由表 4 可以看出,4 个渤海原油样品相似度均在 0.900 以上,可以正确辨别;中东地区原油样品与渤海原油相似度较高,其值在 0.755 ~ 0.873 之间;燃料油样品与渤海原油样品相似度次之,其值在 0.582 ~ 0.598 之间;胜利油田原油样品与渤海原油样

品相似度最低, 其值在 0.007~0.397 之间。说明本文建立的原油 HPLC 特征指纹图谱结合相似度分析不但可以鉴别渤海原油, 还可以将不同地区的原油样品辨别开来。以上研究结果说明 HPLC 特征指纹图谱结合相似度分析可以成功区分渤海原油, 那么该方法能否为海洋溢油鉴别提供科学依据呢? 在下一步研究中我们将进行讨论。

3 结 论

本文发展的基质固相分散处理原油样品的方法, 能有效降低石油中其它化学成分的干扰, 能达到进一步提取和净化的效果, 且方法简便、样品和溶剂用量少, 提取和净化可一步完成, 分析速度提高。采用双 C_{18} 柱串联, 双波长检测的反相 HPLC 方法分离测定, 原油提取物中各类成分分离良好, 方法重复性和稳定性较高, 能满足指纹图谱方法的基本要求。根据 10 个批次渤海原油的指纹图谱特征所建立的渤海原油 HPLC 特征参照指纹图谱能反映各渤海原油样品的共有化学特征, 能反映渤海产区原油的固有化学特性, 结合相似度分析, 实现了渤海原油的快速、有效鉴别, 并可将渤海原油与不同地区的原油区分开来, 说明 HPLC 特征指纹图谱技术是渤海原油鉴别的有力工具。

参考文献:

[1] 孙培艳, 包木太, 王鑫平. 国内外溢油鉴别及油指纹库建设现状及应用 [J]. 西安石油大学学报 (自然科学版), 2006, 21 (5): 72-78

[2] SANER W A, FITZGERAID G E, WELSH J P. Liquid chromatographic identification of oils by separation of the methanol extractable fraction [J]. Analytical Chemistry, 1976, 48 (12): 1747-1754

[3] PASADAK ISN, VAROTSISN. Optimization of the HPLC separation of aromatic groups in petroleum fractions [J]. Fuel, 2000,

79: 1455-1459

[4] PASADAK ISN, GAGAN SV, VAROTSISN. Accurate determination of aromatic groups in heavy petroleum fractions using HPLC-UV-DAD [J]. Fuel, 2001, 80: 147-153

[5] 许乙烈, 张有恩. 反相高效液相色谱鉴别海面溢油源的方法研究 [J]. 海洋环境科学, 1989, 8(4): 80-89

[6] 徐恒振, 周传光, 尚龙生, 等. 溢油指示物 (指标) HPLC-UV-D 研究 [J]. 交通环保, 1999, 20(5): 7-9

[7] 陈伟琪, 张珞平. 气相色谱指纹法在海上油污污染源鉴别中的应用 [J]. 海洋科学, 2003, 27(7): 67-70

[8] BARKER S A. Matrix solid-phase dispersion [J]. Journal of Chromatography A, 2000, 885(1): 115-127

[9] TANG F, YUE Y D, HUA R, et al. Matrix solid-phase dispersion microextraction and determination of pesticide residues in medicinal herbs by gas chromatography with a nitrogen-phosphorus detector [J]. Journal of AOAC International, 2006, 89(2): 498-502

[10] FURUSAWA LN. Determination of DDT in animal fats after matrix solid-phase dispersion extraction using an activated carbon filter [J]. Chromatographia, 2005, 62(5-6): 315-318

[11] BARKER S A, LONG A R, SHORT C R. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion [J]. Journal of Chromatography A, 1989, 475(1): 353-361

[12] GURUSANKAR S, ANJALIH, PETER VH, et al. A multidimensional high performance liquid chromatographic method for fingerprinting polycyclic aromatic hydrocarbons and their alkyl homologs in the heavy gas oil fraction of Alaskan North Slope crude [J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1156: 124-133

[13] 陈培榕, 刘密新, 吴筑平, 等. 石油卟啉在反相 C_{18} -CN 组合柱高效液相色谱中的分离与分析 [J]. 色谱, 1994, 12(6): 426-428

[14] 苗爱东, 孙殿甲. Excel 2002 在中药指纹谱相似度计算中的应用 [J]. 药学进展, 2003, 27(1): 51-54