

用气相色谱法测定沉积岩 中氨基酸的试验研究

宋振亚

(成都地质学院)

近两年来,我们开展了有关氨基酸地球化学方面的研究,在研究过程中,就用气相色谱法测定沉积岩中个别氨基酸的有关问题也进行了研究和探讨。本试验是根据李仕佛、林大兴^[2]同志工作的基础上进一步改进的。①对离子交换柱的有关性能作了大量的对比试验,为拟定脱盐步骤提供依据;②对氨基酸的酯化、酰化反应的有关条件进行了试验,提出了改进意见;③通过固定液对氨基酸衍生物的分离情况的对比试验,上海试剂总厂生产的己二酸新戊醇聚酯(NGA)具有较好的分离性能,101白色担体可以代替进口的Chromosorb, W/NAW;④据文献资料记载,并通过试验,用消旋的2-丁醇与氨基酸酯化,再经酰化,把具不对称碳原子的氨基酸衍生为N-三氟乙酰基-(±)-2-丁酯衍生物,这两个衍生物在色谱图上形成“双峰”,为鉴定个别氨基酸提供结构上的信息。

一、基本原理和主要操作程序

1.基本原理:

以正丁醇与氨基酸中的羧基进行酯化反应、以三氟醋酸酐(TFAA)与氨基酸中的氨基进行酰化反应,把氨基酸转化为较易挥

发的N-三氟乙酰基-n-丁酯衍生物,然后用气相色谱法进行分离和鉴定。

2.操作程序:

方法的整个分析程序包括样品的制备、水解、脱盐、酯化、酰化、色谱分析等。

(1)样品的制备和水解:磨样前要用切削或酸洗等方法除去样品表面可能存在的污染。对于碳酸盐岩样品,用稀盐酸分解;对于含泥量较多或泥岩样品,用氢氟酸和盐酸混合液分解(HF为5N、HCl为1N)。样品的水解在封闭管内进行,水解时盐酸浓度调至6N左右,温度为105~110℃,时间为24小时(水解前,加入10μg正亮氨酸以作内标物)。水解后,进行离心除去残渣,并缓缓蒸发试液,除去过量的盐酸。

(2)脱盐:采用上海试剂厂的732型阳离子交换树脂脱盐,交换柱长为25Cm内径为1.8Cm。试液转移到交换柱内后,用二次蒸馏水洗涤交换柱至无氯离子(流速为1.5~2ml),再用2N氢氧化铵溶液(约200ml)洗脱氨基酸,收集全部洗脱液并缓缓蒸发除氨,转入“酯化管”中(一种带磨口盖的小离心管)。

(3)氨基酸的N-三氟乙酰基-n-丁酯衍生物的制备:进行酯化、酰化反应前,应除去样品中存在的水分,置真空干燥箱内

于60℃下蒸发,并辅以多次加入二氯甲烷(每次0.3ml)共沸以保证水分的完全除去。酯化时,加入0.3ml正丁醇的盐酸溶液,并用超声波(30kc)处理3分钟,于105℃酯化一小时;酰化时,加入0.3ml二氯甲烷和0.1ml三氟醋酸酐,用超声波处理5分钟,放入真空干燥器中,抽出空气并充入氮气,于室温下过夜,备作色谱分析。

(4) 氨基酸衍生物的气相色谱分析

分析前,让样品中的三氟醋酸酐在室温下自行挥发至干,然后加入0.4ml二氯甲烷重新溶解衍生物,数分钟后即可进行色谱分析。

图1所示是一个灰岩样品的氨基酸色谱图。分析条件如下:

色谱柱: $\phi 4\text{mm} \times 2\text{m}$, 固定液为1%的NAG,担体为60~80目101白色担体;

柱温: 始温80℃(保持5分钟), 终温210℃, 程序升温4℃/分;

检测室温度: 250℃;

气化室温度: 200℃; 载气(N_2)流速: 40ml/分;

氢气流速: 40ml/分;

空气流速: 400ml/分。

(仪器: SP-2305全型, 氢焰鉴定器)

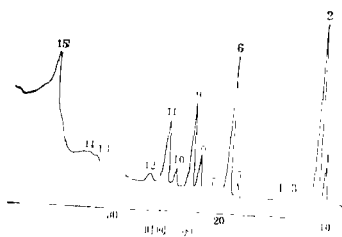


图1 四川马角坝地区中三迭统雷口坡组二段灰岩中氨基酸色谱图

- 5——丙氨酸 6——缬氨酸
8——别异亮氨酸及异亮氨酸
9——甘氨酸 10——亮氨酸
11——正亮氨酸(内标物)

- 12——脯氨酸 15——天冬氨酸
14——谷氨酸 15——赖氨酸
(其余的色谱峰未鉴定)

氨基酸的定性是以标准氨基酸的保留时间来确定的,存在干扰图谱复杂时,还可辅以其它方法(见后);氨基酸的定量分析是通过加入内标物,对各氨基酸作相应的工作曲线而求得,图2为其示意图。

测定过程中所用的试剂均应优级纯,或重蒸提纯,其配制方法可参考文献^[2]。

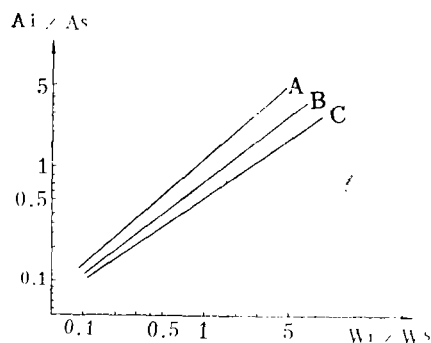


图2 氨基酸的定量工作曲线示意图

- A_i ——某氨基酸的峰面积
 W_i ——某氨基酸的重量
 A_s ——内标的峰面积
 W_s ——内标的重量
A——天冬氨酸
B——丙氨酸 C——脯氨酸

二、若干测定条件的研究

1. 关于脱盐条件的选择

岩样经水解后,在试液中含有大量的无机盐类,必须在制备氨基酸衍生物之前通过脱盐手续除去全部盐分,这是氨基酸分析中必不可少的步骤。经反复试验,以离子交换法为宜。

脱盐时,为了使脱盐、洗脱氨基酸和再生树脂等操作建立在可靠的基础上,我们对

制备的离子交换柱的有关性能作了各种对比试验,求出在室温下(15℃左右)交换柱对 Ca^{+2} 的始漏量(又称为突破量)、不同浓度的氢氧化铵对氨基酸的洗脱曲线、不同浓度的盐酸对钙离子的洗脱曲线等。(图3,图4,图5)

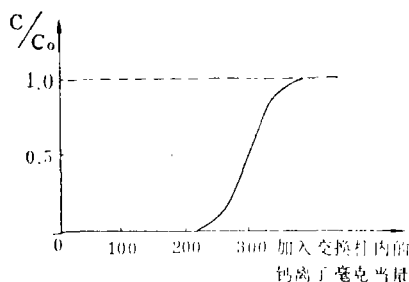


图3 交换柱(长25cm内径1.8cm)对 Ca^{+2} 的交换量

C ——表示从柱内流出液中 Ca^{+2} 的浓度
 C_0 ——表示原溶液中 Ca^{+2} 的浓度

从图3可以看出,我们所采用的交换柱对 Ca^{+2} 的始漏量约为200毫克当量,相当于10克左右的碳酸钙。实践表明,对于碳酸盐岩样品,只要称样量不大于8克,在脱盐时不会产生盐类突破树脂的现象。

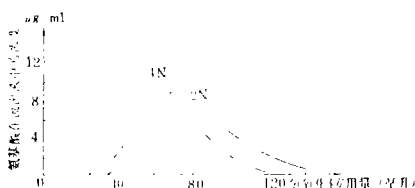


图4 用不同浓度的 NH_4OH 溶液洗脱氨基酸的洗脱曲线

(交换柱长25cm内径1.8cm,试液中氨基酸总量为0.5mg)

从图4、图5可以看出,不同浓度的洗脱液,对氨基酸或阳离子的洗脱效率各不相同。一般说来,洗脱液的浓度增大,则洗脱曲线从右向左移动,洗脱效率增高,洗脱液用量减少。但是在实际工作中,浓度必须适

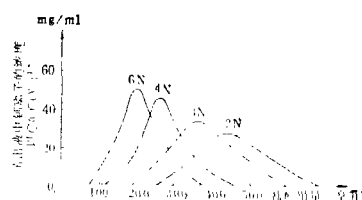


图5 用不同浓度的 HCl 洗脱 Ca^{+2} 的洗脱曲线

(交换柱同图2 试液中 CaCO_3 重量为8g)

当不能太大,否则适得其反。根据对交换柱所测定的有关洗脱曲线,在洗脱氨基酸时采用2N氢氧化铵,洗脱效率接近4N氢氧化铵,同时,空白值较小,而且氨基酸的回收率较高;再生交换树脂以4N盐酸为宜。

还须指出,离子交换树脂对某离子的交换总量是一定的,但始漏量却是变化的,它和很多操作因素有关,除了交换柱的形状大小和树脂充填紧密程序以外,还和树脂粒度,交换溶液的酸度、流速、温度等有关。

2.关于酯化、酰化的条件选择

氨基酸的酯化、酰化反应,要求在一定温度和无水的条件下进行。

据多数文献记载,酯化反应的温度,一般在100—105℃之间(反应时间则有所不同,有的是30分钟,有的长达3小时);酰化反应一般在室温下进行。经试验效果良好,没有再做对比试验。

关于脱水条件,目前国内外采用的方法较多,有的是在100℃下用氮气流去水,有的采用旋转蒸发器等。根据目前具体条件,我们试验了在较低的温度下(60℃)真空蒸发去水,蒸发过程中还辅以多次加入二氯甲烷共沸以彻底除去水分,与用氮气流去水的方法比较,发现两者的结果在多数情况下是一致的,图6是同一个灰岩岩样用这两种不同的去水方式所得的色谱图。我们感到在真空干燥箱内采用低温真空蒸发去水的方法,优点较多,操作条件易于控制,方法的本身有

较好的重复性, 适于成批处理样品。

3. 关于气相色谱分析中固定液和担体的选定

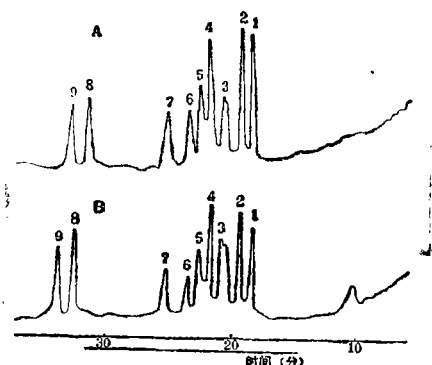


图6 同一个岩样(四川马角坝地区中三迭统雷口坡一段)在两种不同去水条件下所制备的氨基酸生物色谱图

A在真空干燥箱内 60°C 下蒸发去水

B在氮气流及 100°C 下除水

1——丙氨酸 2——缬氨酸

3——别异亮氨酸及异亮氨酸

4——甘氨酸 5——亮氨酸

6——正亮氨酸(内标) 7——脯氨酸

8——苯丙氨酸 9——天冬氨酸

氨基酸的N—三氟乙酰基—n—丁酯衍生物的气相色谱分析, 国外多采用毛细管色谱柱, 它具有很高的分离能力, 可以用来进行氨基酸对映体的研究。在没有毛细管色谱仪的情况下, 我们采用常规气相色谱法, 选择合适的固定液和担体, 同样达到了提高色柱的分离效果。

为了提高色谱柱的分离效率, 我们试验了一些聚酯类固定液, 如PEGA^[2]、NGA以及BDS(丁二酸丁二醇聚酯)等, 在相同的条件下, NGA具有较好的分离效率, 并不逊于PEGA。同时, NGA的使用温度较高, 使用寿命较长。

值得提出的是, 以NGA为固定液, 柱温在 $80-120^{\circ}\text{C}$ 区间, 若温度程序选为 2°C

/分, 则非对映体的异亮氨酸和别异亮氨酸的衍生物可以得到部分分离(图7), 如果进一步改进分离条件, 可取得完全分离的可能。对地质年代学的研究有着重要意义。

我们还试用了上海试剂总厂生产的101白色担体以代替进口的Chromosorb. W. 实验结果表明, 二者以NGA为固定液时, 对氨基酸衍生物的分离有相近似的性能。

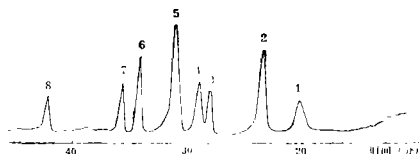


图7 当以NGA为固定液升温速度为 $2^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 时, 别异亮氨酸和异亮氨酸衍生物可以部分分离(配制样品)

1——丙氨酸 2——缬氨酸

3——别异亮氨酸 4——异亮氨酸

5——甘氨酸 6——亮氨酸

7——正亮氨酸 8——脯氨酸

关于固定液和担体的比例对分离性能的影响问题, 我们的工作做得不够, 只对NGA的各种浓度(0.3%, 0.5%, 1.0%、1.5%等)的分离情况进行了对比, 实验结果以1.0%为宜。

4. 氨基酸的非对映体衍生物, 在氨基酸鉴定上的应用

气相色谱分析中, 对色谱峰的定性通常是以保留值来确定的。但是, 当样品组分复杂时, 一致的保留值不一定是同一化合物, 可能会造成对色谱峰的错误鉴定。为在色谱图上能正确地鉴定氨基酸, J. K. Whelan在研究海相沉积物的氨基酸时, 提出了通过制备氨基酸的非对映体衍生物用气相色谱法所得到的部分分离来鉴别氨基酸^[5]。

J. K. Whelan所采用的方法要点是:

由于2-丁醇是具有不对称碳原子的光学活性试剂,因此,以消旋化的2-丁醇代替正丁醇与氨基酸进行酯化反应,然后经过酰化反应,则每一种具有不对称碳原子的氨基酸可被衍生为N-三氟乙酰基-(+)-2-丁醇和N-三氟乙酰基-(-)-2-丁酯。这两个非对映体衍生物在数量上是相等的(二者可写成,N-三氟乙酰基-(±)-2-丁醇),它们在短色谱柱上能得到部分分离,而形成“双峰”。同时这种N-三氟乙酰基-(±)-2-丁酯衍生物和其相应的N-三氟乙酰基-n-丁酯衍生物具有几乎一致的保留值,所以这种“双峰”能对N-三氟乙酰基-n-丁酯衍生物色谱图所反映出的氨基酸成分提供验证依据,对于消除样品中的一些非氨基酸成分的干扰是有意义的。例如J.K.Whealan指出,r-氨基丁酸和丝氨酸的N-三氟乙酰基-n-丁酯衍生物具有很接近的保留值而难以鉴别,但当用消旋的2-丁醇衍生时,r-氨基丁酸不存在不对称碳原子,在色谱图上仍然为一个较陡的峰,丝氨酸有一个不对称的碳原子,在色谱图上可产生“双峰”,易于辨认。

用消旋化的2-丁醇进行氨基酸的酯化其操作条件与用正丁醇酯化的相同。图8是用消旋化的2-丁醇与数种已知的标准氨基酸进行酯化后再经过酯化所得的衍生物色谱图,从图中可以看到“双峰”的存在。我们认为进一步完善测试条件,这种“双峰”可以作为氨基酸的标志(甘氨酸例外),为排除干扰正确地鉴定氨基酸提供了一个验证手段。

三、结论和建议

1.用气相色谱法分析沉积岩中以及其它

地质体中的氨基酸是近年来广泛采用的方法。即使是用常规的气相色谱法也可进行个别氨基酸的分离和鉴定,这是经典的纸层析、薄板层析法难以实现的。

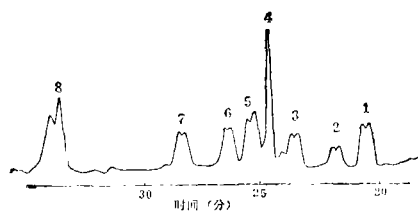


图8 一些具有不对称碳原子的氨基酸用2-丁醇酯化后所制备的衍生物色谱图有“双峰”特征(配制样品)

- | | |
|---------|---------|
| 1——丙氨酸 | 2——缬氨酸 |
| 3——异亮氨酸 | 4——甘氨酸 |
| 5——亮氨酸 | 6——正亮氨酸 |
| 7——脯氨酸 | 8——脯氨酸 |

2.采用气相色谱法测定地质中个别氨基酸的对映体在国外已很广泛,它主要通过两个途径来进行的:(1)把氨基酸对映体的衍生物在具有光学活性的固定相上进行色谱分离;(2)将氨基酸的羧酸与光学活性试剂反应(如(+)-2-丁醇),生成具有光学活性的酯,再对氨基酸的氨基进一步乙酰化,把氨基酸对映体转化成非对映异构体的衍生物,在不具有光学活性的固定相上进行色谱分离。为开展氨基酸地球化学研究充分发挥气相色谱技术的特点,是有重要意义的。

(收稿日期:1980.1.28)

参考文献

- [1] 胡成一, 阎佐鹏, (1977) 氨基酸地球化学的进展, 地质地球化学, 1977年第三期。
- [2] 李任佛, 林大兴, (1977) 氨基酸的气相色谱

(下转第62页)

注: 先后参加过本试验的有贝丰、栗时英、周文姬、陆祥兴、黄志琦等同志, 贝丰老师审阅了本文。

3. 根据孢粉资料, 沉积物中尚见有 *Pteris* Lauraceae、Magnoliaceae 及 Rhododendraceae 等热带、亚热带花粉。

4. 地层中夹有含膏泥岩及石膏层沉积。

这些迹象表明当时的气候条件较干、热、蒸发量大, 水介质中PH值高, 碱性大等, 因此可以设想, 盐度也应该是较高, 至少不会是完全淡水的湖泊沉积环境。

五、几点认识

1. 运用沉积磷酸盐方法分析古盐度有助于区分海陆相地层和地层的含盐度, 认识沉积环境, 为沉积相的研究提供某些定性的或定量的标志。但是必须考虑自然环境因素的复杂性, 应尽量防止干扰因素造成错觉,

因此在应用时必须和其他指标结合在一起进行综合分析。

2. 分析的样品必须是泥质样品。如果样品中混有碎屑的磷灰石, 或者沉积物有含磷酸钙的生物化石, 如海豆芽 (*Lingula*)、鱼骨等。将使磷酸钙组份值增高, 造成虚假的古盐度值。

样品分析是在余源盛同志帮助下进行的, 朱莉莉、吴素华两位同志一起加参分析, 在此谨致谢意。

收稿日期: (1980.1.12)

参考文献

- [1] B. Nelson 1967, Sedimentary phosphate method for estimating paleosalinity. Science Vol. 158 № 3803, p. 917—920.

(上接第57) 页

谱分析法。分析化学, 1977年第五期

- [3] C.W. Gehrke, and D. Roach, (1969): Direct esterification of the protein amino acids gas-liquid chromatography of N-TFA-n-butyl esters. J. Chromatogr., Vol. 44, pp. 269—278
- [4] K.A. Kvenvalden, E. Petersen, and G.E. Pollock, (1972): Geochemistry of amino acid enantiomers, gas chro-

matography of their diastereomeric derivatives. In: H.R. von Gaerther and H. Wehner (Editors), Advances in Organic Geochemistry, 1971, Pergamon, Oxford, pp. 387—401.

- [5] J.K. Whelan, (1975): Gas chromatographic confirmation of amino acid structure via diastereomeric preparation. J. Chromatogr. Vol. 111, No. 2, pp. 337—346.