

杨建勃, 陈军辉, 何秀平, 等. 超高效液相色谱-高分辨质谱法测定海洋沉积物中的木质素分解产物酚类化合物[J]. 岩矿测试, 2023, 42(3): 548-562. doi: 10.15898/j.ykcs.202209160172.

YANG Jianbo, CHEN Junhui, HE Xiuping, et al. Determination of Phenolic Compounds from Lignin Decomposition Products in Marine Sediments by Ultra-High Performance Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry[J]. Rock and Mineral Analysis, 2023, 42(3): 548-562. doi: 10.15898/j.ykcs.202209160172.

超高效液相色谱-高分辨质谱法测定海洋沉积物中的木质素分解产物酚类化合物

杨建勃¹, 陈军辉^{1,2,3*}, 何秀平^{1,2,3}, 王九明¹, 辛明^{1,2,3}, 孙霞^{1,3}, 王保栋^{1,2,3}

(1. 自然资源部第一海洋研究所, 自然资源部海洋生态环境科学与技术重点实验室, 山东 青岛 266061;

2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋生态与环境科学功能实验室, 山东 青岛 266071;

3. 青岛市现代分析技术及中药标准化重点实验室, 山东 青岛 266061)

摘要: 木质素分解产物酚类化合物是指示海洋环境中陆源有机碳来源的重要生物标志物, 因此, 开发检测海洋沉积物中木质素分解产物酚类化合物的简便方法, 对研究海洋有机碳的来源及生物地球化学循环过程具有重要意义。本文采用固相萃取(SPE)和超高效液相色谱-飞行时间质谱技术(UHPLC-TOF/MS), 建立了一种同步测定海洋沉积物中木质素分解产物酚类化合物(11种)的方法。首先对海洋沉积物样品进行氧化铜氧化碱分解和 SPE 净化处理, 再采用填料粒径为 1.8 μ m 的反相 C₁₈ 柱进行分离, 电喷雾 TOF/MS 全扫描模式检测, 内标法定量。结果表明: 沉积物中木质素的 11 种主要分解产物酚类化合物在 20min 内分离良好; 方法具有良好的精密度(相对标准偏差 RSD 均小于 9.0%), 在线性范围内相关系数(R^2)均不小于 0.9989, 加标回收率在 86.8%~93.2% 之间。应用该方法对莱州湾表层沉积物中木质素分解产物酚类化合物进行测定, 12 个表层沉积物样品中 11 种目标化合物的检出率均为 100%; 相关诊断比值: 肉桂基酚系列单体总量与香草基酚系列单体总量的比值 C/V 在 0.18~0.81 之间, 均值为 0.38; 丁香基酚系列单体总量与香草基酚系列单体总量的比值 S/V 在 0.18~0.45 之间, 均值为 0.26; 对羟基酚系列单体中酮的量与对羟基酚系列单体总量的比值 PON/P 在 0.01~0.07 之间, 均值为 0.03; P 系列单体总量与 V 和 S 系列单体总量之和的比值 P/(V+S) 在 0.55~3.77 之间, 均值为 1.44; V 系列中酸类单体与醛类单体的比值 (Ad/Al)_V 在 0.12~1.07 之间, 均值为 0.49; S 系列单体中酸类单体与醛类单体的比值 (Ad/Al)_S 在 0.15~1.26 之间, 均值为 1.02。表明莱州湾表层沉积物中的木质素主要来源于被子植物草本组织, 并且具有中等或偏高程度的降解, 但仍有少量新鲜植物有机质。本研究也表明 UHPLC-TOF/MS 是测定海洋沉积物中木质素分解产物酚类化合物的高效方法, 能对沉积物中木质素含量和有机质来源进行有效指示。

关键词: 电喷雾飞行时间质谱法; 木质素; 酚类化合物; 有机碳; 莱州湾

要点:

(1) 与传统方法相比, 固相萃取法结合超高效液相色谱-质谱分析无需衍生化处理, 操作简单、高效。

(2) 在莱州湾所有表层沉积物样品中均检出了木质素分解产物 11 种酚类化合物。

(3) 基于木质素分解产物酚类化合物的诊断比值, 对莱州湾沉积物中木质素的含量水平和来源进行了有效指示。

中图分类号: Q503; O657.72

文献标识码: A

收稿日期: 2022-09-16; **修回日期:** 2022-11-30; **接受日期:** 2023-03-11

基金项目: 全球变化与海气相互作用(二期)专项(GASI-01-ATP-STwin); 中国大洋矿产资源研究开发协会——大洋“十三五”资源环境类项目(DY135-E2-1-03); 国家自然科学基金-山东省联合基金项目(U1706217)

第一作者: 杨建勃, 硕士研究生, 从事海洋环境化学研究。E-mail: yangjianbo@fio.org.cn。

通信作者: 陈军辉, 博士, 研究员, 从事海洋分析/环境化学研究。E-mail: jhchen@fio.org.cn。

木质素是由苯丙烷基团通过醚键或碳键连接而成的含有酚结构单元的生物高分子聚合物^[1],是构成植物细胞壁的主要成分之一,约占木本植物干生物量的20%~30%、禾本植物干重的15%~20%,对土壤、泥炭和陆地水环境和海洋沉积物中保存的天然有机碳有重要贡献^[2-3]。木质素作为维管植物的特有成分,在沉积环境中天然丰度高、来源单一,用作天然有机质生物标志物具有参数信息丰富、指示性强等特点^[4]。与沉积环境中的许多其他植物成分相比,木质素对微生物降解的抵抗力更强;因此,海洋沉积物中木质素的组成会保留陆地输入有机质的植被信息,既包括新鲜植物组织的原始组成,也包括进入水和沉积物之前在土壤中降解的有机质组织信息^[2]。由于组成海洋沉积物中木质素的不同类型单体酚类化合物,不仅可以定量评估陆源输入对海洋总有机质的贡献,还可推断母源植物类型和有机质降解程度,从而成为提取环境演变信息、追溯环境有机质来源的重要生物标志物,并被广泛应用于湖泊和近海陆源有机碳的示踪和古环境的重建^[5-8]。因此,开发检测海洋沉积物中木质素分解产物酚类化合物的高效方法,对探究海洋沉积环境有机质来源以及认识环境演变过程具有重要意义。

木质素是结构稳定的高分子聚合物,未经分离和化学转化,采用现有的分析技术很难直接测定^[4]。因此,学术界普遍采用测定海洋沉积物中木质素分解产物酚类化合物的含量,对木质素的含量及有机质来源进行指示。海洋沉积物样品中的木质素经分解处理后,会产生11种特征的小分子酚类化合物,分别为:丁香基酚系列(S),包括丁香酸、丁香醛和乙酰丁香酮;香草基酚系列(V),包括香草酸、香草醛和香草乙酮;肉桂基酚系列(C),包括阿魏酸和对羟基肉桂酸;对羟基酚系列(P),包括对羟基苯甲酸、对羟基苯甲醛和对羟基苯乙酮。海洋沉积物中单体酚类化合物的总含量常用于反映木质素的含量,此外,通过计算单体酚类化合物诊断比值,还提供了海洋沉积物中陆源有机质的分类、来源和成岩作用等重要信息^[9-11]。

沉积物中木质素分解产物酚类化合物检测方法的研究,已有部分报道,自Hedges(1982)等^[12]成功建立了碱性氧化铜裂解-气相色谱测定木质素分解产物酚类化合物的方法以来,该方法被广泛应用于沉积物中木质素分解产物酚类物质的测定^[1,13],即沉积物样品在碱性溶液中经氧化铜氧化裂解处理后,采用气相色谱法测定木质素分解产生的4类单酚类化

合物。然而,这些单酚类化合物具有极性高、不易挥发的特点^[14],无法采用气相色谱法直接检测,需先进行衍生化处理,致使样品处理过程复杂,还经常产生衍生化不彻底的问题。高效液相色谱法也常用于木质素分解产物酚类化合物的检测,并且无需进行衍生化和严格的样品脱水处理^[14-15]。但是,由于木质素分解产物酚类化合物结构相似、组成相对复杂,只依靠高效液相色谱紫外检测器分析,对于木质素含量相对较低的环境样品,常常存在各种酚类化合物难以准确性、定量的问题^[16-17]。

近年来,液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)因其检测灵敏度高、选择性好、可提供待测物结构信息等优点,已被广泛用于环境科学、生命科学和地球科学等领域物质分析^[18-20],用于木质素分解产物酚类化合物的测定亦有报道^[16,21-25]。例如,Owen等^[16]采用液相色谱与高分辨多级串联质谱联用,建立了测定植物组织木质素分解产物酚类化合物的方法。欧阳新平等^[17]采用液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(LC-Q-TOF/MS)建立了测定麦草碱木质素分解产物酚类化合物的方法,获得良好的色谱分离度和检测灵敏度。然而,由于海洋沉积物中木质素的含量远低于植物组织,并且样品性质、组成与植物组织也不同,因此,现有文献方法不宜直接用于海洋沉积物中木质素分解产物酚类化合物的测定。基于此,本文在前期研究的基础上,采用超高效液相色谱-飞行时间质谱法(UHPLC-TOF/MS),通过对样品前处理方法和色谱-质谱条件的进一步优化,建立了一种适用于海洋沉积物中木质素分解产物酚类化合物同步测定的新方法,并应用于中国近海典型海湾(莱州湾)表层沉积物中木质素分解产物酚类化合物的含量测定。

1 实验部分

1.1 仪器与主要试剂

1220型高效液相色谱仪(美国Agilent公司),配有四元高压梯度泵、自动进样器、柱温箱;G1969A型高分辨飞行时间质谱仪(美国Agilent公司),配有电喷雾离子源(ESI);FA1104型电子天平(上海精天电子仪器厂);Milli-Q超纯水处理系统(美国Millipore公司);KQ-400KDE型高功率数控超声波仪(昆山市超声仪器有限公司);RE100-pro旋转蒸发器(北京大龙公司);Binder ED系列烘箱(德国Binder公司);VisiprepTM SPE固相萃取装置(美国Supelco公司);HC-3018高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司)。

色谱纯甲醇和乙腈(上海麦克林生化科技有限公司);色谱纯三氟乙酸、乙酸和甲酸(瑞士Fluka公司);优级纯盐酸、氧化铜、硫酸亚铁铵(国药集团化学试剂有限公司);木质素分解酚类化合物:丁香醛、香草乙酮、丁香酸、香草酸、阿魏酸、对羟基肉桂酸、香草醛、对羟基苯甲醛、对羟基苯乙酮、对羟基苯甲酸、乙酰丁香酮以及乙基香兰素(内标)标准品:纯度 $\geq 98\%$,购自上海Sigma-Aldrich公司;实验用水为实验室自制超纯水($18.25\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$)。

HLB固相萃取小柱:200mg填料,6mL柱管,购自纳谱分析技术(苏州)有限公司。

空白样品:以从西南印度洋获得的深海沉积物样品作为空白沉积物样品,该样品中木质素含量极低,各种酚类化合物的含量达不到方法的检出限。

1.2 沉积物样品采集与保存

实验用海洋沉积物样品,为2018年7月搭载渔船在莱州湾进行科学考察时利用箱式采样器获取的表层沉积物(5cm以内),采样站点按照纬度从高到低的规律进行布设,详见图1,按照采样规范每个站点采集0.2kg代表性样品,通过充分地搅拌使其混合均匀,所有沉积物样品在 -20°C 冰箱中冷冻保存。在检测之前,通过冷冻干燥制备得到沉积物干粉样品,研磨后过筛(粒度 $\leq 0.25\text{mm}$),并置于 4°C 冰箱中保存备用。空白沉积物样品为2021年11月至2022年2月期间搭载西南印度洋科学考察航次,利用箱式采样器获取的表层沉积物样品(5cm以内)。

1.3 对照品溶液的配制

精密称取木质素分解产物酚类化合物标准品各1.00mg,用5%乙腈-水溶液($V:V$)稀释溶解后分别转移至10mL容量瓶中准确定容,振荡摇匀,得浓

度均为 0.1mg/mL 的11种木质素分解酚类化合物标准储备液(记作混标a)。吸取 $100\mu\text{L}$ 混标a,置于10mL容量瓶中,以5%乙腈-水溶液($V:V$)稀释并准确定容,振荡摇匀,得11种木质素分解产物酚类化合物的混合标准工作液(记作混标b),其浓度均为 $1.0\mu\text{g/mL}$ 。混标a和b溶液于 -20°C 条件下保存,备用。

1.4 样品前处理

分别准确称取1.00g沉积物样品、500mg氧化铜和100mg硫酸亚铁铵,置于聚四氟乙烯消化罐中,混匀,然后转移至充满氮气的手套箱中,向罐中加入8.0mL经过 N_2 曝气的浓度为8.0%的氢氧化钠溶液,盖紧消化罐后并转移至烘箱中 150°C 加热3h,待消化罐冷却至室温后,小心旋开,加入内标(乙基香兰素)溶液;随后,将水解液转移到离心管中,以8000r/min离心10min后,分离上清液和反应残留物。再向反应残留物中加入2.0mL 1.0%的氢氧化钠溶液,重新振荡、离心,固液分离。合并2次获得的离心上清液,用盐酸调节 $\text{pH}=1$,静置30min,然后采用HLB固相萃取柱进行富集、净化处理。

首先对HLB固相萃取柱进行活化处理:加入5.0mL甲醇,以 1.0mL/min 的流速通过HLB柱,待甲醇溶液只剩大约1.0mL时,加入5.0mL超纯水,同样以 1.0mL/min 的流速通过HLB柱,待柱内保留大约1.0mL水时,HLB柱完成活化。

取上述调节好 pH 的样品溶液,以 1.0mL/min 的流速通过HLB柱,然而加入10.0mL超纯水对HLB柱进行淋洗,真空抽干3min;使用10.0mL乙酸乙酯对各种目标化合物进行洗脱,收集洗脱液,采用旋转蒸发仪在 50°C 下将洗脱液进行浓缩至干,用1.0mL

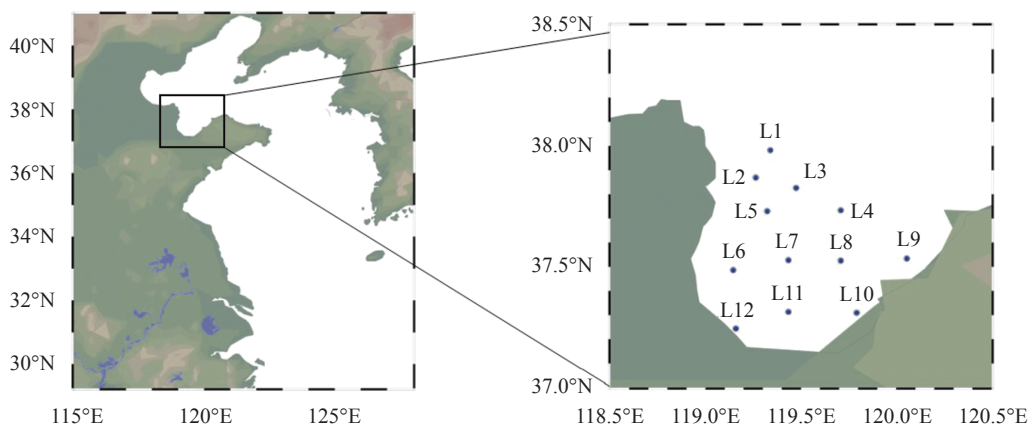


图1 中国莱州湾表层沉积物采样站位图

Fig. 1 Surface sediment sampling station in the Laizhou Bay, China.

水-乙腈-乙酸溶液(93.5:5:1.5, $V:V:V$)复溶、过滤,转移到进样小瓶中,待测。

1.5 色谱-高分辨质谱分析条件

色谱柱:ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(2.1mm×100mm, 1.8 μ m);流动相:A相为0.1%甲酸溶液,B相为甲醇和乙腈的混合溶液(1:9, $V:V$);进样量 5 μ L;柱温 28 $^{\circ}$ C;梯度洗脱程序:0~7min, 8%~13% B; 7~12min, 13%~15% B; 12~15min, 15%~25% B; 15~20min, 25%~35% B; 20~25min, 35%~80% B;流速为 0.25mL/min。

飞行时间质谱测定条件:电喷雾电离源正离子模式,以全扫描模式(scan)对各组分进行质谱检测;扫描范围 m/z 为 100~1000。雾化气(N_2)压力为 35psi;干燥气(N_2)流速 10L/min;干燥气(N_2)温度 350 $^{\circ}$ C;毛细管电压 4000V,破碎电压 130V。

各目标化合物的保留时间、分子式、精确分子量等信息见表1。

通过比较沉积物样品提取液与标准溶液各目标化合物的色谱峰保留时间及高分辨质谱测定精确质量数进行目标化合物的定性(相关信息见表1)。定性依据为:在相同的测试条件下被测样品色谱峰的保留时间与标准工作液相比,变化必须在 ± 0.20 min以内;目标化合物精确质量数的测量值与理论值的相对偏差在百万分之五以内。以内标法定量,以各目标化合物峰面积/内标峰面积比值为纵坐标,目标化合物进样浓度为横坐标(μ g/mL),得到各个单体化合物的标准曲线方程。用标准曲线法对试样中目标化合物进行定量,试样溶液中待测物的响应值均应

在本方法线性范围内。

1.6 质量控制

实验所用容器均用甲醇和去离子水交替清洗3次。在每一批样品UHPLC-TOF/MS分析的过程中,每进样10个样品后测定试剂空白样品、标准校正和平行样品,检查仪器方法是否正常,以保证实验结果的可靠性。

2 结果

2.1 色谱质谱条件的优化

本文采用超高效液相色谱用于海洋沉积物木质素分解产物酚类化合物的色谱分离,对水-乙腈、水-甲醇和水-甲醇-乙腈这3种流动相体系的分离效果进行了比较。结果表明,采用水-甲醇-乙腈三元流动相体系时各种化合物的分离度优于文献中常用的水-乙腈或水-甲醇二元流动相体系;此外,分别考察了流动相中添加三氟乙酸、甲酸和乙酸对各种酚类化合物分离的影响,结果表明,流动相添加一定浓度的三种酸后均能获得较好的分离结果,考虑到与质谱的兼容性,最终确定流动相中添加0.1%的甲酸,能获得较好的峰型和分离度。此外,通过优化梯度洗脱程序,在20min内实现了海洋沉积物木质素酚类化合物的分离。11种木质素分解产物酚类化合物标准品和加标海洋沉积物实际样品中木质素分解产物酚类化合物分离提取离子色谱图(EIC)见图2,各化合物分离良好、色谱峰尖锐对称。

为了确定适于海洋沉积物中木质素分解产物酚类化合物分析的离子化模式,分别在ESI⁺和ESI⁻模

表1 超高效液相色谱-飞行时间质谱分析木质素主要分解产物酚类化合物和内标物的分子式、保留时间及精确分子质量

Table 1 Molecular formulas, retention times and exact molecular mass of the main decomposition products of lignin (phenolic compounds) and the internal standard analyzed by ultra-high performance liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-TOF/MS).

序号	酚类化合物	分子式	保留时间 (min)	精确分子量 [M+H] ⁺	精确分子量 [M-H] ⁻
1	对羟基苯甲酸	C ₇ H ₆ O ₃	5.14	139.0395	137.0244
2	香草酸	C ₈ H ₈ O ₄	7.37	169.0495	167.0272
3	对羟基苯甲醛	C ₇ H ₆ O ₂	8.08	123.0441	121.0295
4	丁香酸	C ₉ H ₁₀ O ₅	9.35	199.0601	197.0455
5	对羟基苯乙酮	C ₈ H ₈ O ₂	11.46	137.0597	135.0452
6	香草醛	C ₈ H ₈ O ₃	11.61	153.0546	151.0401
7	对羟基肉桂酸	C ₉ H ₈ O ₃	12.90	165.0546	163.0401
8	丁香醛	C ₉ H ₁₀ O ₄	13.91	183.0652	181.0506
9	香草乙酮	C ₉ H ₁₀ O ₄	14.65	167.0703	165.0557
10	阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	15.89	195.0652	193.0506
11	乙酰丁香酮	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	16.68	197.0808	195.0663
12	乙基香兰素	C ₉ H ₁₀ O ₃	19.08	167.0703	165.0557

式下对各目标化合物进行一级质谱分析,对羟基苯甲酸、香草酸、阿魏酸等化合物在 ESI 模式下灵敏度更高,对羟基苯甲醛、对羟基苯乙酮、香草醛、香草乙酮、丁香醛、丁香酸、乙酰丁香酮、对羟基肉桂酸、乙基香兰素等化合物在 ESI⁺模式下灵敏度更好;由于沉积物粗提物溶液中有些基质成分会与目标化合物在色谱分离时共流出,会影响部分化合物的质谱信号,总体而言,在 ESI⁺模式下,目标待测物质都可以与基质中的干扰物质的离子峰实现分离,并且质谱响应值相比于 ESI 模式更高,最终确定采用 ESI⁺模式用于海洋沉积物中木质素分解产物酚类化合物的 LC-MS 分析。随后,对影响目标化合物定量的主要质谱条件——破碎电压进行了优化,以获得最高

的灵敏度。在 80~200V 范围内考察了破碎电压对各目标化合物质谱检测信号的影响,综合考虑各目标化合物 [M+H]⁺ 离子峰的检测灵敏度,选择 130V 作为木质素分解产物酚类化合物测定的破碎电压。

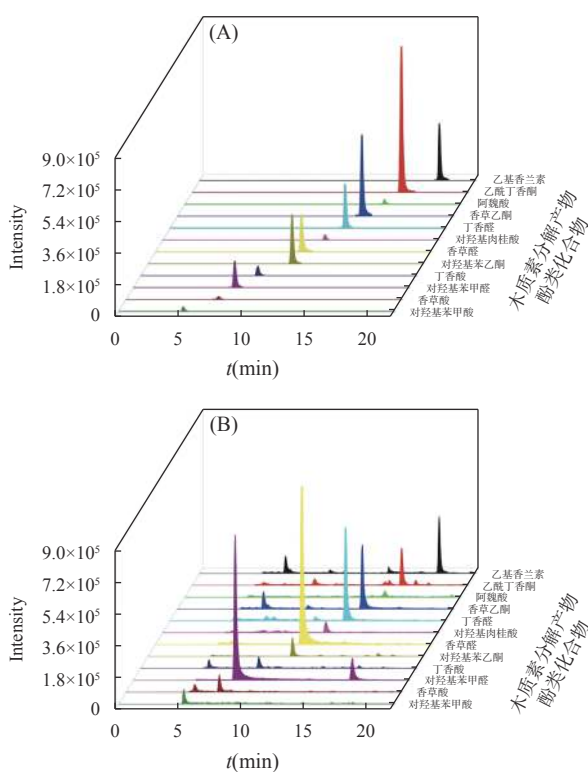
2.2 固相萃取条件的优化

为了确保海洋沉积物木质素分解产物酚类化合物在固相萃取处理过程中都获得较好的回收率,本研究系统考察了固相萃取上样溶液 pH(1.0~2.5)对各种目标化合物萃取效率的影响,结果如图 3 所示。上样溶液 pH 为 1.0 和 1.5 时,HLB 固相萃取柱对各种酚类化合物的回收率分别明显高于上样溶液 pH 为 2.0 和 2.5 时的回收率;而上样溶液 pH 为 1.0 和 1.5 时,虽然丁香醛和香草乙酮的回收率较为相近,但其他的酚类化合物均是在 pH 为 1.0 时回收率最高,并且二者之间有明显差异,综合考虑方法回收率和适用性,最终确定将上样溶液的 pH 调至 1.0。本文使用填料为 200mg 的 HLB 固相萃取小柱,通常 5~10mL 洗脱溶剂即可保证所有目标化合物的充分洗脱。因此,在文献研究结果的基础上,最终确定以乙酸乙酯为洗脱溶剂,用量为 10mL。

2.3 方法学考察

2.3.1 方法特异性、线性方程、检出限和定量限

通过对空白溶剂(甲醇)、过程空白样品(不加入沉积物样品)以及加标沉积物样品分别进行分析,根据不同样品中木质素主要分解产物酚类化合物的检测结果,评价该方法的特异性。结果表明各种酚类化合物和内标物均只在加标沉积物样品中检出



(A) 11 种目标化合物和内标物的混合标准溶液; (B) 海洋沉积物样品提取溶液。按照保留时间从前到后依次排序: 对羟基苯甲酸、香草酸、对羟基苯甲醛、丁香酸、对羟基苯乙酮、香草醛、对羟基肉桂酸、丁香醛、香草乙酮、阿魏酸、乙酰丁香酮、乙基香兰素(内标)。

(A) Mixed standard solution of 11 target compounds and internal standard; (B) Extraction solution of marine sediment sample. Sort by retention time from front to back: *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, *p*-hydroxybenzaldehyde, syringic acid, *p*-hydroxyacetophenone, vanillin, *p*-hydroxy-cinnamic acid, syringaldehyde, acetovanillone, ferulic acid, acetosyringone and ethyl vanillin (internal standard).

图2 UHPLC-TOF/MS 全扫描分析提取离子色谱图

Fig. 2 UHPLC-TOF/MS full-scan analysis extraction ion chromatogram (EIC).

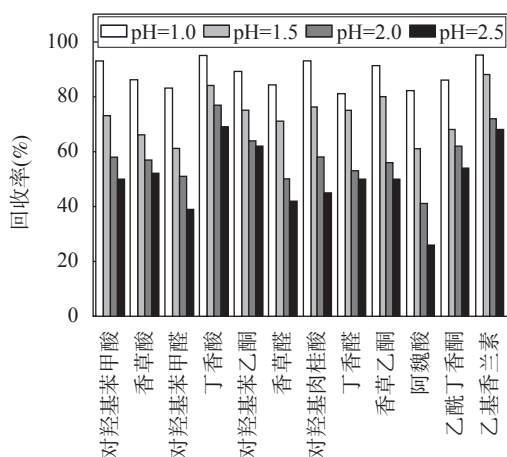
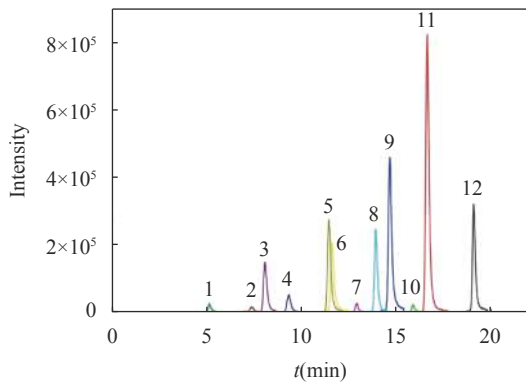


图3 固相萃取过程中不同 pH(pH=1.0、1.5、2.0、2.5) 上样溶液对各种目标化合物回收率的影响

Fig. 3 Effect of different pH of the sample solution on the recovery of various target compounds during solid phase extraction: pH=1.0, pH=1.5, pH=2.0, pH=2.5.

(图4),在空白试剂和过程空白样品中均未检出,表明该方法具有较好的特异性。

为了降低基质效应等作用对各种酚类化合物定量结果的影响,采样基质标准曲线用于实际海洋沉积物样品中目标化合物的定量。按1.4节样品处理方法制备空白海洋沉积物样品萃取液,并用其配制酚类化合物混合标准溶液,对羟基苯甲醛、对羟基苯乙酮、对羟基苯甲酸、香草醛、香草乙酮、香草酸、丁香醛、丁香酸、乙酰丁香酮、对羟基肉桂酸、阿魏酸以及乙基香兰素等11种目标化合物和内标物的浓度均为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。然后使用空白沉积物样品萃取液对其进行梯度稀释,稀释倍数分别为1、2、5、10、20、50、100,按1.5节的分析条件进行测定。以被测组分的峰面积为纵坐标,所测目标物的质量浓度为横坐标绘制基质标准曲线。采用空白海洋沉积物样品萃取液,通过对加标空白沉积物样品提取液逐级稀释的方法,对方法的检出限(LOD)和定量限(LOQ)进行考察,将加标空白沉积物样品溶液(低浓度)质谱检测信噪比(S/N)为3对应的目标化合物浓度作为方法 LOD,将 S/N 为 10 对应的浓度作为方法的 LOQ,方法的检出限(LOD)和定量限(LOQ)所对应的具体的加标浓度为 0.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。



1—对羟基苯甲酸; 2—香草酸; 3—对羟基苯甲醛; 4—丁香酸; 5—对羟基苯乙酮; 6—香草醛; 7—对羟基肉桂酸; 8—丁香醛; 9—香草乙酮; 10—阿魏酸; 11—乙酰丁香酮; 12—乙基香兰素(内标)。
1—*p*-hydroxybenzoic acid; 2—vanillic acid; 3—*p*-hydroxybenzaldehyde; 4—syringic acid; 5—*p*-hydroxyacetophenone; 6—vanillin; 7—*p*-hydroxycinnamic acid; 8—syringaldehyde; 9—acetovanillone; 10—ferulic acid; 11—acetylsyrinone; 12—ethyl vanillin (internal standard).

图4 方法的专属性考察结果(沉积物加标样品 UHPLC-TOF/MS 分析 EIC 图)

Fig. 4 Results for the specificity validation of the method (UHPLC-TOF/MS EIC chromatogram of the spiked sediment sample).

表2列出了各种目标化合物 UHPLC-TOF/MS 线性方程的相关系数、LOD 和 LOQ 等结果,11种目标化合物在 0.1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度范围内线性相关系数(R^2)均 ≥ 0.9989 ,表明各化合物在定量线性范围内线性关系良好,能满足对目标化合物定量的要求;11种木质素分解酚类化合物的检出限在 0.13~7.27 ng/g 范围内,尽管各种化合物的检测灵敏度不尽相同,但总体而言,方法的灵敏度较好,优于其他文献方法的检测灵敏度^[14,17,20]。

2.3.2 方法回收率和精密度

采用空白沉积物标准加入法,对海洋沉积物中木质素分解产物酚类化合物检测方法回收率进行考察,在空白沉积物样品中分别按 50.0 ng/g 、100.0 ng/g 和 400.0 ng/g 的低、中和高水平添加 11 种单酚类化合物标准物质,然后按照 1.4 节的样品进样方法进行处理,每个浓度水平分别平行处理 6 份样品,按 1.5 节的仪器条件进行样品测定,使用未加标的空白沉积物样品作对比。首先对加标空白沉积物样品中 11 种单酚类化合物的含量进行测定,然后计算 11 种目标化合物的方法回收率;再采用 6 份平行样品 11 种目标化合物测定峰面积的相对标准偏差(RSD),用于评价方法的精密度。方法回收率和精密度实验结果如表3所示,海洋沉积物中木质素各种分解单酚类化合物的回收率在 86.8%~93.2% 的范围内,并且各种目标化合物测定峰面积 RSD 值均低于 9.0%,表明方法的回收率和精密度较好,能满足实际海洋沉积物

表2 最佳实验条件下 11 种目标化合物的线性方程相关系数及方法的检出限和定量限

Table 2 Correlation coefficients for linear analysis, detection limits and quantification limits of the method for UHPLC-TOF/MS determination of 11 target compounds under the optimal experimental conditions.

序号	酚类化合物	R^2	方法检出限 (ng/g)	方法定量限 (ng/g)
1	对羟基苯甲酸	0.9989	5.34	17.80
2	香草酸	0.9989	7.27	24.23
3	对羟基苯甲醛	0.9991	0.67	2.13
4	丁香酸	0.9996	1.79	5.98
5	对羟基苯乙酮	0.9991	0.38	1.25
6	香草醛	0.9997	0.49	1.64
7	对羟基肉桂酸	0.9989	4.16	13.95
8	丁香醛	0.9993	0.47	1.58
9	香草乙酮	0.9994	0.23	0.76
10	阿魏酸	0.9994	5.13	17.1
11	乙酰丁香酮	0.9997	0.13	0.42

样品中各种木质素分解产物酚类化合物的检测要求。

样品的 $\Sigma 8$ 在 0.001mg/10g ds ~ 0.019mg/10g ds 之间。

2.4 方法应用

为了进一步考察方法的适用性,将本文建立的测定方法用于莱州湾表层沉积物中木质素分解产物酚类化合物分析,结果如表 4 所示,在 12 个采样站点样品中均检出 11 种目标化合物,表明本文建立的分析方法具有较好的适用性。沉积物中木质素的含量一般用 $\Sigma 8$ 来表示, $\Sigma 8$ 代表的是 10g 干沉积物样品中 V、S 和 C 系列单体酚类化合物的总含量,计量单位为 mg/10g ds。基于表 4 中各单酚类化合物含量,计算得到莱州湾表层沉积物 $\Sigma 8$ 及用于指示木质素植被来源的相关参数,结果如表 5 所列,12 个沉积物

3 讨论

3.1 色谱分离条件比较

在采用 LC-MS 分析复杂基质样品的过程中,液相色谱柱对基质干扰组分和目标化合物的充分分离对提高质谱检测灵敏度和方法稳定性起到了重要作用^[26]。本文采用超高效液相色谱柱 Zorbax Eclipse XDB-C₁₈(填料粒径 1.8 μ m)用于海洋沉积物木质素分解产物酚类化合物的色谱分离,与江智婧等^[14]、欧阳新平等^[17]采用的常规高效液相色谱柱,包括 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 以及 Agilent SB-C₁₈

表 3 三种不同添加浓度水平下 11 种目标化合物的回收率和回收率的 RSD(n=6)

Table 3 The recovery rate and its RSD of 11 target compounds under three different spiked levels (50.0ng/g, 100.0ng/g, 400.0ng/g) in the spiked recovery experiment with blank marine sediment (n=6).

酚类化合物	不同加标浓度水平下目标化合物回收率(%)(n=6)			不同加标浓度水平下目标化合物回收率的 RSD(%)(n=6)		
	加标 50.0ng/g	加标 100.0ng/g	加标 400.0ng/g	加标 50.0ng/g	加标 100.0ng/g	加标 400.0ng/g
对羟基苯甲酸	87.8	90.1	91.9	8.4	7.0	5.8
香草酸	89.3	87.7	87.4	6.4	6.0	6.1
对羟基苯甲醛	86.8	90.0	88.9	7.0	7.2	6.3
丁香酸	88.7	88.1	89.4	8.3	6.3	7.5
对羟基苯乙酮	89.5	91.1	92.3	7.3	6.5	5.5
香草醛	87.4	88.5	87.8	5.2	5.5	4.6
对羟基肉桂酸	88.9	89.3	89.6	6.2	6.5	4.6
丁香醛	89.1	90.7	91.5	8.2	8.5	6.5
香草乙酮	87.5	88.9	89.5	7.4	5.3	5.5
阿魏酸	86.9	89.9	91.0	6.1	8.1	6.2
乙酰丁香酮	90.8	91.2	93.2	8.8	6.2	4.1

表 4 莱州湾表层沉积物中 11 种木质素主要分解产物酚类化合物的含量

Table 4 Content of 11 main phenolic compounds from lignin decomposition products of the surface sediment samples collected from the Laizhou Bay, China.

站点	酚类化合物含量 (ng/g)(ds)										
	对羟基苯甲酸	香草酸	对羟基苯甲醛	丁香酸	对羟基苯乙酮	香草醛	对羟基肉桂酸	丁香醛	香草乙酮	阿魏酸	乙酰丁香酮
L1	62.33	26.08	136.41	5.98	3.48	20.65	17.75	5.60	2.33	22.17	0.50
L2	324.43	100.31	425.50	108.50	53.58	671.40	243.67	265.19	110.36	113.53	25.96
L3	350.21	507.56	511.59	119.13	39.5	481.33	297.51	233.46	79.82	122.80	26.18
L4	101.58	204.40	254.26	7.73	16.47	195.19	86.06	64.19	31.78	20.14	7.76
L5	176.82	326.83	425.68	46.14	25.88	317.00	74.67	99.34	46.57	50.57	9.33
L6	223.73	408.17	381.33	86.76	39.31	393.35	249.20	176.55	77.37	112.05	29.02
L7	114.31	73.84	297.40	9.86	5.17	69.67	39.80	22.06	7.27	34.99	2.23
L8	214.02	414.12	419.47	62.57	22.06	303.95	135.91	127.37	48.75	34.99	11.52
L9	180.05	195.33	421.15	29.25	14.86	188.62	110.52	70.42	22.43	32.43	6.37
L10	193.59	255.99	401.93	26.20	15.22	256.06	79.62	67.27	37.39	32.44	5.40
L11	156.60	57.41	325.48	5.83	5.39	47.84	33.30	12.90	4.06	28.22	1.42
L12	147.93	101.40	317.60	13.95	5.56	96.48	26.98	25.10	9.89	31.64	2.66

表 5 莱州湾表层沉积物样品中 11 种木质素的分解产物酚类化合物的各项特征参数

Table 5 Characteristic parameters of 11 phenolic compounds from lignin decomposition products in surface sediment samples of the Laizhou Bay, China.

站位	木质素不同分解产物酚类化合物的各项特征参数										
	C(ng/g)	S(ng/g)	V(ng/g)	P(ng/g)	C/V	S/V	P/(V+S)	PON/P	(Ad/Al) _v	(Ad/Al) _s	Σ8(mg/10g ds)
L1	39.92	12.08	49.06	202.23	0.81	0.25	3.31	0.02	1.07	1.26	0.0010
L2	357.19	399.65	882.06	803.50	0.40	0.45	0.63	0.07	0.41	0.15	0.016
L3	420.31	378.76	1068.71	901.30	0.39	0.35	0.62	0.04	0.51	1.05	0.019
L4	106.20	79.68	431.38	372.31	0.25	0.18	0.73	0.04	0.12	1.05	0.0062
L5	125.24	154.82	690.40	628.38	0.18	0.22	0.74	0.04	0.46	1.03	0.0097
L6	361.24	292.34	878.88	644.37	0.41	0.33	0.55	0.06	0.49	1.04	0.015
L7	74.79	34.14	150.78	416.88	0.50	0.23	2.25	0.01	0.45	1.06	0.0026
L8	170.90	201.47	766.82	655.54	0.22	0.26	0.68	0.03	0.49	1.36	0.011
L9	142.95	106.03	406.39	616.06	0.35	0.26	1.20	0.02	0.42	1.04	0.0066
L10	112.06	98.87	549.43	610.75	0.20	0.18	0.94	0.02	0.39	1.00	0.0076
L11	61.51	20.16	109.31	487.46	0.56	0.18	3.77	0.01	0.45	1.20	0.0019
L12	58.61	41.72	207.77	471.09	0.28	0.20	1.89	0.01	0.56	1.05	0.0031
平均值	169.24	151.64	515.92	567.49	0.38	0.26	1.44	0.03	0.49	1.02	0.0083

等的分离结果相比, 各种目标化合物获得的色谱峰明显变窄, 响应值更好。采用本研究优化得到的水-甲醇-乙腈三元流动相体系, 仅需添加 0.1% 的甲酸, 各种目标化合物亦能获得较好的峰型和分离度, 与凌媛等^[11]在流动相中需添加 1.5% 的乙酸相比, 本方法中流动相与质谱的兼容性更好, 并且在 20min 内实现了海洋沉积物木质素分解产物酚类化合物的分离, 较凌媛等^[11]采用普通 HPLC C₁₈ 柱分离(用时 40min)的分析效率提升了 2 倍。

3.2 样品制备方法的确定

木质素的分解方法主要包括热化学分解法和氧化法^[1], 而碱性氧化铜氧化分解法自 1982 年 Hedges 等^[12]开发至今, 经过不断的优化改进, 方法稳定、木质素分解效率高, 已成为土壤、沉积物等环境样品中木质素分解分析最为可靠的处理方法, 特别适用于有机质含量较低的沉积物中木质素的分解^[12], 在海洋沉积物木质素分解产物酚类化合物检测领域应用最为广泛^[27]。因此, 本文采用碱性氧化铜氧化分解法对海洋沉积物中的木质素进行分解, 参考相关文献实验条件, 确定反应温度为 150℃, 反应时间为 3h。

对于沉积物木质素分解产物酚类化合物的萃取, 通常采用液液萃取法^[28]或固相萃取法^[1,29-30]进行处理。与传统的液液萃取法相比, 固相萃取法操作更方便、快捷, 而且溶剂消耗少, 因此, 本文采用固相萃取法用于木质素分解产物酚类粗提物的净化。

关于固相萃取法净化木质素分解产物酚类化合

物的实验条件, 相关文献^[30-31]已作过部分优化, HLB 固相萃取柱对木质素分解产物酚类化合物有良好的吸附和净化作用, 因此, 本文采用 HLB 固相萃取小柱用于海洋沉积物木质素分解产物酚类化合物的萃取。对于含有酚羟基的化合物而言, 固相萃取上样溶液 pH 是影响其富集效率的关键因素, 然而, 相关文献^[1,30-31]并未对上样溶液 pH 的影响进行系统优化和讨论, 所采用的上样溶液 pH 也不一致, 或者只给出模糊的 pH 范围(pH<2)。采用本文优化得到的最佳上样溶液 pH, 11 种目标化合物都获得了良好的回收率, 并且方法的可操作性明显提高。此外, 固相萃取洗脱溶剂的种类和用量也是影响方法回收率的重要参数, 甲醇是 HLB 小柱的常用洗脱溶剂, 然而使用甲醇作为洗脱溶剂时会导致部分种类的目标化合物发生氧化和异构化^[1], 而采用乙酸乙酯作为洗脱溶剂时可以避免氧化和异构化发生, 并且具有极性杂质的共洗脱较少、干扰较小的优点^[1]。

3.3 莱州湾表层沉积物中木质素的来源及降解程度分析

莱州湾表层沉积物中木质素的含量与文献中报道的海洋沉积物木质素含量结果^[28,32-35]相比, 莱州湾表层沉积物中木质素的含量较低, 这可能受到复杂水动力搬运的影响。S/V 值常用来区分木质素是来源于裸子植物还是被子植物; C/V 值用于区分木质素是来源于植物的草本组织还是木本组织; PON 代表的是 P 系列单体酚中酮类化合物的量, PON/P 值用来区分是否来自陆源维管植物; (Ad/Al)_v 和

(Ad/Al)_v 分别是 V 或 S 系列中酸类单体酚与醛类单体酚的含量比,这两个参数常用来评估木质素经历的氧化降解程度;P/(V+S)值用来评估木质素去甲基/去甲氧基作用的强度^[30,36]。莱州湾表层沉积物 C/V 值在 0.18~0.81 之间,均值为 0.38;S/V 值在 0.18~0.45 之间,均值为 0.26,由此可以推断莱州湾表层沉积物中的木质素主要来源于被子植物草本组织。PON/P 值在 0.01~0.07 之间,均值为 0.03,相对较低,指示莱州湾表层沉积物中陆源维管植物有机质占比较低。P/(V+S)值在 0.55~3.77 范围内,均值为 1.44,指示莱州湾表层沉积物中的木质素有较高强度的去甲基/去甲氧基降解。(Ad/Al)_v 值在 0.12~1.07 之间,均值为 0.49;(Ad/Al)_s 值在 0.15~1.26 之间,均值为 1.02,指示莱州湾表层沉积物中大部分陆源有机物的降解程度中等偏高,但仍有少量新鲜植物碎屑。此外,S 系列的酸醛比值比 V 系列高,反映出 S 系列降解程度比 V 系列高,这是由于 S 系列单体比 V 系列单体更容易受到早期成岩作用影响。综上所述,采用本文建立的测定方法实现了对莱州湾表层沉积物中木质素分解产物酚类化合物的测定,并且能对莱州湾表层沉积物中木质素的来源和降解程度进行指示,说明固相萃取结合 UHPLC-TOF/MS 是海洋沉积物中木质素分解产物酚类化合物测定的有效方法。

4 结论

基于超高效液相色谱-飞行时间质谱分析技术,

通过对实验条件的优化,建立了一种适用于海洋沉积物中木质素分解产物酚类化合物同步测定的新方法。采用所建立的检测方法,检测了 11 种木质素分解产物酚类化合物在渤海莱州湾表层沉积物中的含量,并对渤海莱州湾沉积物中木质素的含量水平和来源进行了有效指示。在莱州湾表层沉积物中,11 种木质素分解产物酚类化合物的检出率为 100%,木质素的含量($\Sigma 8$)处于中等偏低水平;C/V 值在 0.18~0.81 之间;S/V 值处于 0.18~0.45 之间;PON/P 值在 0.01~0.07 之间;P/(V+S)值在 0.55~3.77 范围内;(Ad/Al)_v 值在 0.12~1.07 之间;(Ad/Al)_s 值处于 0.15~1.26 之间。以上相关诊断比值结果指示莱州湾表层沉积物中的木质素主要来源于被子植物草本组织,而且维管植物来源的陆源有机物占比较低,莱州湾表层沉积物中大部分陆源有机物的降解程度中等偏高,但仍有少量新鲜植物碎屑,同时也说明莱州湾表层沉积物中的木质素有较高强度的去甲基/去甲氧基降解。

该方法的建立可为海洋沉积物中木质素的分布、有机质的溯源以及有机碳矿化作用研究提供一种可靠的液相色谱-质谱检测技术方法,拓宽了液质联用技术在海洋有机碳检测领域的应用。在后续工作中可以继续开发在线固相萃取-液相色谱-质谱联用技术检测不同海洋环境介质中木质素分解产物酚类化合物的方法,进一步提升方法的自动化程度和检测效率,为中国海洋碳汇相关研究工作提供技术支持。

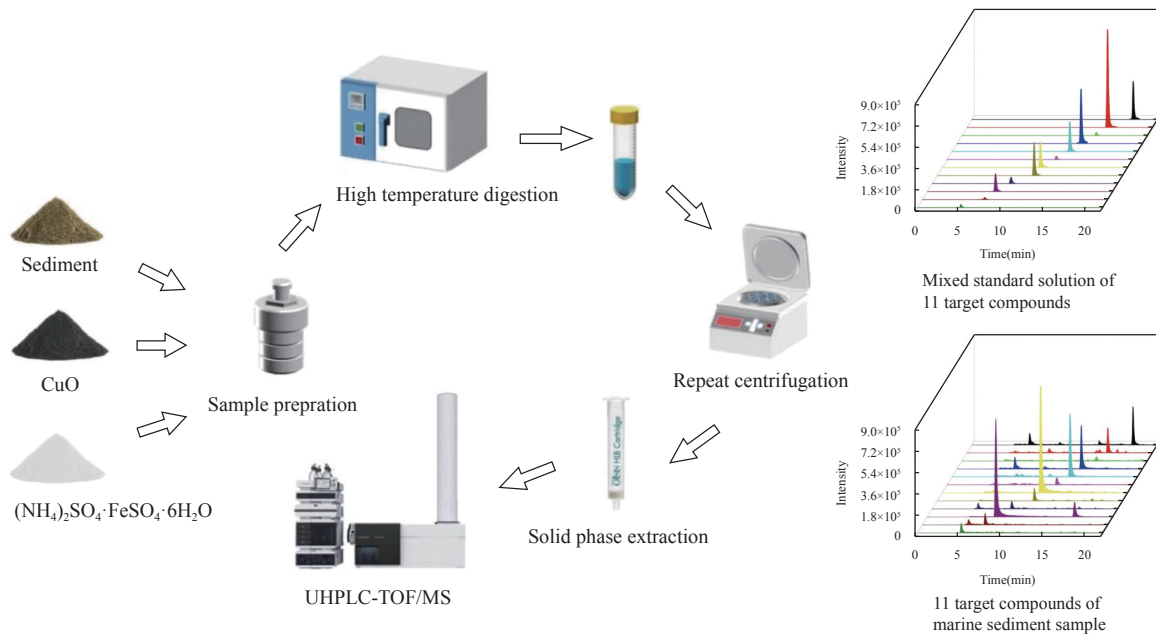
Determination of Phenolic Compounds from Lignin Decomposition Products in Marine Sediments by Ultra-High Performance Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry

YANG Jianbo¹, CHEN Junhui^{1,2,3*}, HE Xiuping^{1,2,3}, WANG Jiuming¹, XIN Ming^{1,2,3}, SUN Xia^{1,3}, WANG Baodong^{1,2,3}

- (1. Key Laboratory of Marine Eco-Environmental Science and Technology, The First Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Qingdao 266061, China;
2. Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071, China;
3. Qingdao Key Laboratory of Analytical Technology Development and Standardization of Chinese Medicines, Qingdao 266061, China)

HIGHLIGHTS

- (1) Compared with traditional methods, solid phase extraction combined with UHPLC-TOF/MS does not require a derivatization process, and the operation is simple and efficient.
- (2) Eleven target phenolic compounds of lignin decomposition products were detected in all the surface sediment samples from Laizhou Bay, China.
- (3) Based on the diagnostic ratio of lignin decomposition product to phenolic compounds, the content level and source of lignin in the sediments of Laizhou Bay in China were effectively identified.



ABSTRACT

BACKGROUND: Lignin is an important component of marine organic carbon. It is also an important biomarker for extracting information on the evolution of the land and marine environment and tracking the source of organic marine matter. However, the existing analytical techniques are difficult to determine lignin directly. So, the content of phenolic compounds in the decomposition products of lignin in marine sediments were generally determined to indicate the content of lignin and the source of organic matter. The content of phenolic compounds in the decomposition products of lignin in marine sediments is often used to reflect the content of lignin. In addition, by calculating the diagnostic ratio of individual phenolic compounds, it also provides important information about the classification, source, and diagenesis of terrestrial organic matter in marine sediments. However, phenolic compounds in the decomposition products of lignin have the characteristics of strong polarity and low volatility, so they cannot be directly detected by gas chromatography and need to be derivatized first, which makes the sample processing complicated and often results in incomplete derivatization. Therefore, it is of great significance to develop a simple and reliable method for determination of phenolic compounds of the lignin decomposition products in marine sediments to explore the source of organic matter and understand the environmental evolution process.

OBJECTIVES: To establish a simple and reliable method for the determination of phenolic compounds of lignin decomposition products in marine sediments using solid phase extraction (SPE) combined with ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, and to trace the content level and source of lignin in the sediments of Laizhou Bay in China.

METHODS: Marine sediment samples were first decomposed with oxidative-alkaline CuO and extracted by solid phase extraction. Briefly, the oxidation was carried out in a polytetrafluoroethylene digestion tank. 1.00g of sediment sample, 500mg of copper oxide, and 100mg of ammonium ferrous sulfate were accurately weighed and placed in the tank. The components were thoroughly mixed with the sample and then the digestion tank was transferred to a glove box filled with nitrogen. 8.0mL of aqueous sodium hydroxide solution with a concentration of 8.0% (bubbled with N₂ to remove dissolved oxygen) was added to the tank. The digestion tank was covered tightly and transferred to an oven heating to 150°C for reaction, which was terminated after 3h. After the digestion tank cooled to room temperature, it was carefully unscrewed, and an internal standard (ethyl vanillin) solution was added. Subsequently, the hydrolysate was transferred to a centrifuge tube, spun at 8000r/min for 10min, and the supernatant and reaction residue was separated. 2.0mL of 1.0% sodium hydroxide solution was added to rinse the residue, and centrifuged at 8000r/min for 10min. Combining the centrifuged supernatant obtained twice, the solution was acidified to pH=1 with hydrochloric acid. After the solution was left to stand for 30 minutes, solid phase extraction was performed.

The SPE procedure was as follows: A hydrophilic-lipophilic balance (HLB) SPE cartridge (200mg, 6mL) was conditioned with 5mL of methanol and 5mL of ultrapure water. Sample solution was passed through the cartridge in a flow rate 1.0mL/min, and then the cartridges were rinsed with 10mL water, and dried under vacuum for about 3min. Phenolic compounds were eluted with 10mL ethyl acetate, and were evaporated by a rotary evaporator, reconstituted with sample solvent. Then, ultra-high performance liquid chromatography using ZORBAX Eclipse XDB-C18 column with packing particle size of 1.8μm was used to directly separate all target compounds at 28°C, with gradient elution. The mobile phase was composed of ultrapure water with 0.1% formic acid (*V/V*) and acetonitrile/methanol (9:1, *V/V*), and the flow rate was set to 0.25mL/min. Electrospray ionization (in positive) time of flight mass spectrometry was applied to detect target compounds in full scan mode, and quantification was performed using an internal standard determination.

RESULTS: Firstly, chromatographic conditions and solid phase extraction conditions were systematically optimized. Ultra-high performance liquid chromatography was used for the chromatographic separation of phenolic compounds from lignin decomposition products in marine sediments. The separation effects of three mobile phase systems, namely, water-acetonitrile, water-methanol, and water-methanol-acetonitrile, were compared. When using a water-methanol-acetonitrile ternary mobile phase system, the resolution of various phenolic compounds was superior to the commonly used water-acetonitrile or water-methanol binary mobile phase systems in the literature. In addition, the effects of mobile phase acidity (trifluoroacetic acid, formic acid, and acetic acid were added into the mobile phase) on the separation of various phenolic compounds were investigated. The results showed that adding a certain concentration of all three acids to the mobile phase provided better separation results. Considering the compatibility with mass spectrometry, it was finally determined that adding 0.1% formic acid into the mobile phase achieved good peak patterns and resolution.

In order to determine the ionization mode suitable for the analysis of phenolic compounds from lignin decomposition products in marine sediment, electrospray ionization (ESI) mass spectrometry was performed on each target phenolic compound in ESI⁺ and ESI⁻ mode, respectively. Under ESI⁺ mode, various target phenolic compounds were less affected by interfering substances in the sample matrix, and the MS response value for most of the phenolic compounds was higher than that found in ESI⁻ mode. Hence, ESI-TOF/MS in positive mode was selected to determine phenolic compounds of lignin decomposition products in marine sediment. Subsequently, the fragmentation voltage was optimized to obtain the highest sensitivity for all target phenolic compounds, which was

the main mass spectrometric condition that affected the quantification accuracy and sensitivity. The effect of fragmentation voltage on the MS response signal of each target phenolic compound was investigated in the range of 80V to 200V. Overall, considering the detection sensitivity of the $[M+H]^+$ ion peak of each target compound, 130V was selected as the optimal fragmentation voltage to determine phenolic compounds of lignin decomposition products in marine sediment.

The effect of pH (1.0-2.5) of the loading solution for solid phase extraction on the extraction efficiency of various target phenolic compounds was systematically investigated, to ensure that the phenolic compounds of lignin decomposition products in marine sediments have a good recovery rate during the SPE process. When the pH of the loading solution was 1.0 and 1.5, the recovery rate of various phenolic compounds by using HLB solid phase extraction column was significantly higher than that of the loading solution adjusted pH to 2.0 and 2.5. When the pH of the sample solution was 1.0 and 1.5, although the recoveries of syringaldehyde and acetovanillone were relatively similar, the recoveries of other phenolic compounds were the highest at a pH of 1.0. Considering the recovery rate of all the target phenolic compounds and applicability of the method, the pH of the sample solution was confirmed to adjust to 1.0. In this study, HLB SPE column with 200mg of packing material was used to enrich phenolic compounds in sample extraction solution. Generally, 5-10mL of eluting solvent can ensure the full elution of all target phenolic compounds adsorbed on the SPE column. Therefore, based on the results of literature research, ethyl acetate was finally selected as the eluting solvent, with a dosage of 10mL.

Under the optimum experimental conditions, the 11 main decomposition phenol compounds of lignin in marine sediments were well separated within 20 minutes. The proposed method had good precision (RSD was less than 9.0%), the correlation coefficient (R^2) was not less than 0.9989 in the linear range, and the recovery rate of all spiked phenol compounds in blank marine sediment was in the range of 86.8%-93.2%, thereby indicating that the developed method would be suitable to determine the target decomposition phenol compounds of lignin in marine sediment. Subsequently, the method was used to determine the phenolic compounds of lignin decomposition products in the surface sediments of Laizhou Bay. The detection rate of 11 target phenolic compounds in 12 surface sediment samples was 100%, and the concentration of $\Sigma 8$ in 12 surface sediment samples ranged from 0.001mg/10gds to 0.019mg/10gds. The value of C/V was between 0.18 and 0.81, with an average of 0.38; the value of S/V was between 0.18 and 0.45, with an average of 0.26; PON/P value was between 0.01 and 0.07, with an average of 0.03; P/(V+S) value was between 0.55 and 3.77, with an average of 1.44; $(Ad/Al)_v$ value was between 0.12 and 1.07, with an average of 0.48; the value of $(Ad/Al)_s$ was between 0.15 and 1.26, with an average of 1.02.

CONCLUSIONS: The above diagnostic ratios indicate that the lignin in the surface sediments of Laizhou Bay originate mainly from the herbaceous tissue of angiosperms, while the proportion of organic matter in vascular plants is relatively low. The degradation degree of terrestrial organic matter in most sampling stations is medium or high, but there is still a small amount of fresh plant debris. The proposed method has the advantages of high efficiency, simple for sample pretreatment, and is a powerful technique for the determination of main decomposition product phenolic compounds of lignin in marine sediments.

KEY WORDS: electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry; lignin; monophenols; organic carbon; Laizhou Bay

参考文献

- [1] Zhang T, Li X G, Sun S W, et al. Determination of lignin in marine sediment using alkaline cupric oxide oxidation-solid phase extraction-on-column derivatization-gas chromatography[J]. *Journal of Ocean University of China*, 2013, 12(1): 63-69.
- [2] Jex C N, Pate G H, Blyth A J, et al. Lignin biogeochemistry: From modern processes to Quaternary archives[J]. *Quaternary Science Reviews*, 2014, 87: 46-59.
- [3] Sun S, Schefuß E, Mulitza S, et al. Origin and processing of terrestrial organic carbon in the Amazon system: Lignin phenols in river, shelf, and fan sediments[J]. *Biogeosciences*, 2017, 14: 2495-2512.
- [4] 王映辉, 许云平. 黄河下游—河口—邻近海域表层沉积物中木质素的特征及其示踪意义[J]. *海洋科学*, 2016, 40(2): 55-64.
Wang Y H, Xu Y P. Characteristics and environmental implications of lignin in surface sediments from the lower Yellow River—estuary—adjacent sea[J]. *Marine Sciences*, 2016, 40(2): 55-64.
- [5] 巩菲, 刘月, 张大海, 等. 黄河济南段柱状沉积物中木质素的分布特征[J]. *海洋湖沼通报*, 2017, 156(3): 53-59.
Gong F, Liu Y, Zhang D H, et al. Distribution characteristics of lignin from the core in Jinan section of the Yellow River[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2017, 156(3): 53-59.
- [6] Yang B, Ljung K, Nielsen A B, et al. Impacts of long-term land use on terrestrial organic matter input to lakes based on lignin phenols in sediment records from a Swedish forest lake[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 774: 145517.
- [7] Gordon E G, Goni M A. Sources and distribution of terrigenous organic matter delivered by the Atchafalaya River to sediments in the northern Gulf of Mexico[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2003, 67(13): 2359-2375.
- [8] 王心怡, 李中乔, 金海燕, 等. 应用木质素示踪楚科奇海表层沉积物中有机碳的来源和降解程度[J]. *海洋学报*, 2017, 39(10): 19-31.
Wang X Y, Li Z Q, Jin H Y, et al. Sources and degradation of organic carbon in the surface sediments across the Chukchi Sea, insights from lignin phenols[J]. *Haiyang Xuebao*, 2017, 39(10): 19-31.
- [9] Tolu J, Gerber L, Boily J F, et al. High-throughput characterization of sediment organic matter by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry and multivariate curve resolution: A promising analytical tool in (paleo) limnology[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 880: 93-102.
- [10] 刘月, 王敏, 张婷, 等. 杭州湾外泥质区柱状沉积物中木质素的分布特征及其环境指示意义[J]. *海洋环境科学*, 2017, 36(1): 8-14.
Liu Y, Wang M, Zhang T, et al. Distribution characteristics of lignin in sediment cores from the mud area off Hangzhou Bay and the implication for regional sedimentary environment[J]. *Chinese Journal of Marine Environmental Science*, 2017, 36(1): 8-14.
- [11] 凌媛, 王永, 王淑贤, 等. 生物标志物在海洋和湖泊古生态系统和生产力重建中的应用[J]. *地学前缘*, 2022, 29(2): 327-342.
Ling Y, Wang Y, Wang S X, et al. Application of biomarkers in reconstructing marine and lacustrine paleoecosystems and paleoproductivity: A review[J]. *Earth Science Frontiers*, 2022, 29(2): 327-342.
- [12] Hedges J I, Ertel J R. Characterization of lignin by gas capillary chromatography of cupric oxide oxidation products[J]. *Analytical Chemistry*, 1982, 54(2): 174-178.
- [13] 叶君, 胡利民, 石学法, 等. 基于木质素示踪北极东西伯利亚陆架沉积有机碳的来源、运输与埋藏[J]. *第四纪研究*, 2021, 41(3): 752-765.
Ye J, Hu L M, Shi X F, et al. Sources, transport and burial of terrestrial organic carbon in the surface sediments across the East Siberian Arctic Shelf, insights from lignin[J]. *Quaternary Sciences*, 2021, 41(3): 752-765.
- [14] 江智婧, 朱均均, 李鑫, 等. 反相高效液相色谱法定量分析木质素的主要降解产物[J]. *色谱*, 2011, 29(1): 59-62.
Jiang Z J, Zhu J J, Li X, et al. Determination of main degradation products of lignin using reversed phase high performance liquid chromatography[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2011, 29(1): 59-62.
- [15] Sun L, Spencer R G M, Hernes P J, et al. A comparison of a simplified cupric oxide oxidation HPLC method with the traditional GC-MS method for characterization of lignin phenolics in environmental samples[J]. *Limnology and Oceanography: Methods*, 2015, 13: 1-8.
- [16] Owen B C, Hauptert L, Jarrell T M, et al. High-performance liquid chromatography/high-resolution multiple stage tandem mass spectrometry using negative-ion-mode hydroxide-doped electrospray ionization for the characterization of lignin degradation products[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84: 6000-6007.

- [17] 欧阳新平,陈子龙,邱学青.超高效液相色谱/高分辨质谱法测定木质素氧化降解产物中单酚类化合物[J].分析化学,2014,42(5):723-728.
Ouyang X P, Chen Z L, Qiu X Q. Determination of monophenolic compounds from lignin oxidative degradation using ultra performance liquid chromatography/high resolution mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2014, 42(5): 723-728.
- [18] 营娇龙,秦晓鹏,郎杭,等.超高效液相色谱-串联质谱法同时测定水体中37种典型抗生素[J].岩矿测试,2022,41(3):394-403.
Ying J L, Qin X P, Lang H, et al. Determination of 37 typical antibiotics by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry[J]. Rock and Mineral Analysis, 2022, 41(3): 394-403.
- [19] 莫力佳,石勇,高建华,等.辽东半岛东岸泥区有机碳来源及其对流域和海岸环境变化的响应[J].地球化学,2021,50(2):199-210.
Mo L J, Shi Y, Gao J H, et al. Source and distribution of lignin in mud deposits along the southeastern coast of Liaodong Peninsula and its response to environmental changes of the catchment[J]. Geochimica, 2021, 50(2): 199-210.
- [20] 朱帅,沈亚婷,贾静,等.环境介质中典型新型有机污染物分析技术研究进展[J].岩矿测试,2018,37(5):586-606.
Zhu S, Shen Y T, Jia J, et al. Review on the analytical methods of typical emerging organic pollutants in the environment[J]. Rock and Mineral Analysis, 2018, 37(5): 586-606.
- [21] Heidke I, Scholz D, Hoffmann T. Quantification of lignin oxidation products as vegetation biomarkers in speleothems and cave drip water[J]. Biogeosciences, 2018, 15: 5831-5845.
- [22] 王全成,胡丹阳,杨柳明,等.固相萃取-高效液相色谱法测定森林土壤中木质素[J].实验室科学,2021,24(5):40-44.
Wang Q C, Hu D Y, Yang L M, et al. Determination of lignin in forest soil by solid phase extraction/high performance liquid chromatography[J]. Laboratory Science, 2021, 24(5): 40-44.
- [23] 于雅晨,李坤兰,马英冲,等.反气相色谱法测定有机溶剂型木质素的溶解度参数[J].色谱,2013,31(2):143-146.
Yu Y C, Li K L, Ma Y C, et al. Determination of the solubility parameter of organosolv lignin by inverse gas chromatography[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2013, 31(2): 143-146.
- [24] 李鹏辉,蒋政伟,李家全,等.木质素降解产物酚羟基测定方法研究进展[J].光谱学与光谱分析,2022,42(9):2666-2671.
Li P H, Jiang Z W, Li J Q, et al. Research progress in quantitative determination of phenolic hydroxyl groups in lignin[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2022, 42(9): 2666-2671.
- [25] Heinonen J, Tamper J, Laatikainen M, et al. Chromatographic recovery of monosaccharides and lignin from lignocellulosic hydrolysates[J]. Chemical Engineering & Technology, 2018, 41(12): 2402-2410.
- [26] Wang Y L, Chen J H, Gao L Y, et al. Determination of eight typical lipophilic algae toxins in particles suspended in seawater by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2016, 44(3): 335-341.
- [27] Tsutsuki K, Esaki I, Kuwatsuka S. CuO-oxidation products of peat as a key to the analysis of the paleo-environmental changes in a wetland[J]. Soil Science and Plant Nutrition, 1994, 40(1): 107-116.
- [28] 戴群英,邹立,彭燕.黄河口潮间带沉积物中木质素的分布以及降解特征[J].海洋环境科学,2017,36(2):210-215.
Dai Q Y, Zou L, Peng Y. Distribution and degradation of lignin in the sediment of intertidal mudflat of Yellow River Estuary[J]. Marine Environmental Science, 2017, 36(2): 210-215.
- [29] 冯朝军,潘建明,王红群,等.微波消解-气相色谱法测定沉积物中的木质素[J].岩矿测试,2011,30(1):23-26.
Feng C J, Pan J M, Wang H Q, et al. Gas chromatographic determination of lignin in sediment samples assisted with microwave digestion[J]. Rock and Mineral Analysis, 2011, 30(1): 23-26.
- [30] Kaiser K, Benner R. Characterization of lignin by gas chromatography and mass spectrometry a simplified CuO oxidation method[J]. Analytical Chemistry, 2011, 84: 459-464.
- [31] Yan G, Kaiser K. A rapid and sensitive method for the analysis of lignin phenols in environmental samples using ultra-high performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring[J]. Analytica Chimica Acta, 2018, 1023: 74-80.
- [32] 谢秀凤,郗敏,孔范龙,等.木质素作为湿地陆源性溶解性有机质(DOM)示踪剂的研究进展[J].海洋湖沼通报,2015,37(3):125-129.

- Xie X F, Xi M, Kong F L, et al. Proceedings in the application of wetland lignin to tracing terrestrial organic matters[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2015, 37(3): 125-129.
- [33] 李先国, 杜培瑞, 孙书文, 等. 山东半岛东北岸近海表层沉积物中木质素的分布特征及有机物来源[J]. *海洋湖沼通报*, 2013(2): 81-88.
- Li X G, Du P R, Sun S W, et al. Distribution characteristics of lignin and sources of organic matter in surface sediments offshore of north eastern Shandong Peninsula[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2013(2): 81-88.
- [34] 黄佳琦, 林昕, 汪福顺, 等. 乌江流域下游梯级水库沉积物中木质素的特征及有机碳来源辨析[J]. *上海大学学报(自然科学版)*, 2021, 27(2): 271-279.
- Huang J Q, Lin X, Wang F S, et al. Characteristics of lignin in sediment cores from cascade reservoirs downstream of the Wujiang River and source analysis of organic carbon[J]. *Journal of Shanghai University (Natural Science)*, 2021, 27(2): 271-279.
- [35] 李先国, 王敏, 孙书文, 等. 渤海表层沉积物中木质素的分布特征及其对陆源有机物来源的示踪意义[J]. *海洋环境科学*, 2013, 32(3): 327-332.
- Li X G, Wang M, Sun S W, et al. Distribution of lignin in the surface sediments of Bohai Sea and its implication for tracing terrigenous organic matter[J]. *Marine Environmental Science*, 2013, 32(3): 327-332.
- [36] 尚文郁, 孙青, 谢曼曼, 等. 中国东北干旱-半干旱地区湖泊沉积物木质素酚类化合物特征及其气候指示意义[J]. *岩矿测试*, 2023, 42(2): 346-360.
- Shang W Y, Sun Q, Xie M M, et al. Characteristics and climatic implications of lignin-derived phenolic compounds in Arid Lake, northeastern China[J]. *Rock and Mineral Analysis*, 2023, 42(2): 346-360.