

УДК 550.47;631.417.7

ОПТИМИЗИРОВАННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ *n*-АЛКАНОВ И *n*-МЕТИЛ-КЕТОНОВ В ПОДСТИЛКАХ И ПОЧВАХ

© 2020 г. Ю. А. Завгородняя^а, * , Н. А. Анохина^а, Л. Г. Богатырев^а, В. В. Демин^а^аМГУ им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия

*e-mail: zuu99@mail.ru

Поступила в редакцию 14.05.2019 г.

После доработки 10.07.2019 г.

Принята к публикации 21.10.2019 г.

Предложена методика выделения липидных биомаркеров (*n*-алканов и *n*-метил-кетонров) из лесных подстилок и почв. Выделение выполняется методом ускоренной экстракции растворителями ASE (Accelerated Solvent Extraction). Показано, что максимальный выход *n*-алканов и *n*-метил-кетонров достигается при последовательной экстракции с использованием смеси растворителей хлороформ : метанол в соотношении 3 : 1 (v/v) в первые два цикла экстракции и хлороформа – в последующие 2 цикла. Экстракция идет при температуре 100°C и давлении 10.3 МПа, время выдержки в статических условиях – 5 мин. Показано, что использование повторной обработки хлороформом увеличивает выход высокомолекулярных гомологов *n*-алканов и *n*-метил-кетонров.

Ключевые слова: ускоренная экстракция растворителями, метод ASE, липидные биомаркеры

DOI: 10.31857/S0032180X20030119

ВВЕДЕНИЕ

Сохранение пула углерода является одной из важнейших экологических функций почвы [12]. Органическое вещество почвы – входит в число основных резервуаров $C_{\text{орг}}$ в биосфере [4]. Неразветвленные линейные углеводороды являются частью природного органического вещества почв (до 2 мг/г $C_{\text{орг}}$), поступаая в него в составе растительного опада и микробной плазмы [11, 13, 18] и подвергаясь в дальнейшем биохимической трансформации. Динамика содержания *n*-алканов с числом углеродных атомов C_{19} – C_{35} и соответствующих продуктов их окисления *n*-метил-кетонров (*n*-алкан-2-онов) характеризует скорость биодеградации липидов в подстилках и почвах [2]. Получаемые корреляции между спектром *n*-алканов в образцах почв и типом наземного растительного покрова позволяют использовать эти соединения в качестве биомаркеров для палеорекоkonструкций и моделирования климатических изменений [8, 10, 15–17, 21, 23].

Предложено несколько методов выделения алифатических компонентов липидов из растений, почв и осадочных пород. Процедуры включают исчерпывающую экстракцию различными органическими растворителями с последующим разделением на фракции и очисткой на силикагеле или оксиде алюминия методом адсорбционной хроматографии. Полнота выделения целевых компонентов из почв и растительных мате-

риалов достигалась разными методами: обработкой ультразвуком в ходе экстракции [15], экстракцией в микроволновых установках [5], экстракцией в аппарате Сокслета [16, 17, 23], экстракцией субкритическими растворителями [9, 10, 14, 22]. Из перечисленных наиболее эффективными оказались методы экстракции в аппарате Сокслета и экстракции субкритическими растворителями или ускоренной автоматической экстракции растворителями (Accelerated Solvent Extraction – ASE).

В настоящий момент метод ASE рассматривается как наиболее перспективный для экстракции биомаркеров типа алканов, спиртов, кетонров, жирных кислот из твердых и полутвердых образцов с использованием традиционных растворителей (гексана, дихлорметана, хлороформа, метанола и др.).

Экстракция субкритическими растворителями рекомендована Агентством по охране окружающей среды США в качестве метода выделения широкого набора полуволетучих органических соединений различной полярности из твердых матриц [7]. Повышение температуры (до 75°C и выше) ускоряет процесс экстракции, в то время как высокое давление (до 20 МПа) позволяет сохранять растворитель в жидком состоянии, обеспечивая безопасное и полное извлечение анализируемого вещества, которое достигается, в том числе за счет дополнительной промывки образца в автоматическом режиме [19, 20]. Объем получа-

емого экстракта не превышает 60–80 мл, что позволяет в ряде случаев использовать его для непосредственного анализа без дополнительной очистки и концентрирования.

Потенциальные преимущества метода ASE перед другими способами выделения могут быть реализованы только за счет тщательного выбора условий экстракции: типа используемых растворителей, температуры и времени экстракции, количества циклов обработки и промывки образцов. Поэтому основной задачей настоящей работы являлся подбор оптимальных условий для одновременной эффективной экстракции из подстилок и верхних горизонтов почв *n*-алканов и *n*-метил-кетон в целях их дальнейшего количественного определения.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Объекты

Для отработки и апробации методики использовали образцы почвы и подстилки, отобранные в Центрально-лесном государственном биосферном заповеднике (Нелидовский район, Тверская область). Образцы отбирали в вегетационный период в 5 точках в пределах одного фитоценоза – ельника (*Picea abies*) чернично-зеленомошного (*Vaccinium myrtillus*, *Hylocomium splendens*, *Pleurozium schreberii*). Тип почвы – подзолистая грубогумусовая (Eutric Retisols). Изучали образцы горизонта FH подстилки (содержание C = $35.4 \pm 0.9\%$) и верхнего минерального горизонта AO (содержание C = $3.4 \pm 0.8\%$). Из точечных проб образцов готовили смешанные пробы, которые высушивали на воздухе и гомогенизировали: подстилку – в мельнице с ножевыми лезвиями, почву – в фарфоровой ступке, с последующим просеиванием через сито с диаметром отверстий 1 мм.

Методы

За основу взяли методику экстракции из почв *n*-алканов, *n*-спиртов и *n*-жирных кислот [10, 22]. Приведенные в методике параметры экстракции с использованием автоматического экстрактора ASE200 (Dionex, США): смесь CH_2Cl_2 : CH_3OH 93 : 7 (v/v), стальные ячейки объемом 11 мл, температура – 75°C, время статической экстракции – 20 мин, давление 17 МПа (2500 psi). Смесь растворителей близкого состава (CH_2Cl_2 : CH_3OH = 9 : 1 v/v) использовали для экстракции методом ASE C_{23} – C_{31} *n*-метил-кетон из торфа и сфагнома [14].

Во всех вариантах экспериментов использовали одни и те же процедуры подготовки образцов к экстракции, хранения и концентрирования проб после экстракции, выделения слабополярной и неполярной фракций липидов методом адсорбции

онной хроматографии и количественного определения *n*-алканов и *n*-метил-кетон методом ГХ-МС. Квалификация использованных реактивов: “эталонный” или “для ВЭЖХ”. Аналитическая повторяемость трехкратная.

Подготовка образцов к экстракции. 2.0 г образца почвы или 0.2 г подстилки для обеспечения равномерности заполнения перемешивали в фарфоровой ступке с 2 г прокаленного кварцевого песка (размер зерна 0.25–0.3 мм), переносили в ячейку для экстракции (11 мл) с помещенным на дно целлюлозным фильтром, оставшийся свободный объем заполняли кварцевым песком. Различные варианты экстракции исследовали с использованием прибора ASE 200 (Dionex, США), оборудованного контроллером смешивания растворителей [1].

Очистка и концентрирование экстрактов. Для удаления следов воды флаконы с экстрактами на 1.5–2 ч помещали в морозильную камеру (–20°C). Затем экстракты аккуратно переносили в сердцевидную колбу на 100 мл (кристаллы воды оставались на стенках и дне флакона) и отгоняли растворитель под вакуумом на роторном испарителе при температуре 40°C, концентрируя пробу до объема 0.05 мл. К концентрату добавляли 0.5 мл хлороформа для растворения пробы и количественно переносили на заранее подготовленную стеклянную колонку ($d = 10$ мм), заполненную 4 г оксида алюминия Диасорб-А (БиоХимМак, РФ) II степени активности по Брокману, насыщенно-го *n*-гексаном.

В качестве элюента для *n*-алканов использовали *n*-гексан, для более полярной фракции – смесь 1 : 1 (v/v) *n*-гексан : хлороформ. Пропускали через колонку 10 мл *n*-гексана и собирали элюат в отдельную пробирку. Затем повторяли промывку колонки 10 мл смеси 1 : 1 (v/v) *n*-гексан : хлороформ и также собирали элюат в отдельную пробирку. Используемые для элюирования целевых компонентов объемы растворителей определяли в серии предварительных экспериментов с дробным отбором элюата порциями по 1 мл.

Каждую из полученных фракций упаривали до объема примерно 0.25 мл, количественно переносили в хроматографическую виалу и доводили до объема 1 мл *n*-гексаном. В первой неполярной фракции определяли *n*-алканы, во второй, более полярной – *n*-метил-кетоны. Раздельный анализ фракций позволяет значительно улучшить качественную идентификацию и количественное определение *n*-алканов и *n*-метил-кетон методом ГХ-МС с использованием фрагмент-ионов с m/z 57 для *n*-алканов и m/z 59 для *n*-метил-кетон. Указанные ионы присутствуют в масс-спектрах гомологов обоих классов целевых компонентов, что из-за недостаточного разрешения их хроматографических пиков осложняет определение

n-метил-кетон в пробах на фоне содержащихся в значительно более высоких концентрациях *n*-алканов.

Определение *n*-алканов и *n*-метил-кетон. Качественную идентификацию и количественное определение целевых компонентов в пробах проводили методом капиллярной газо-жидкостной хроматографии на газовом хроматографе Agilent 6890N (Agilent Technologies, США) с квадрупольным масс-селективным детектором MSD5973N (Agilent Technologies, США) и системой обработки данных ChemStation, MSDChem. Параметры газохроматографического процесса: колонка – DB1-ms 30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм; инжектор – испаритель, режим – без деления потока, температура инжектора – 320°C; объем пробы – 1 мкл; газ-носитель – гелий, скорость потока газа-носителя – 1 мл/мин; температурная программа термостага – 60–320°C; температура трансфера – 300°C. Параметры масс-спектрометра: тип ионизации – электронный удар; ионизирующее напряжение – 70 эВ; режим сканирования – полный ионный ток; скорость сканирования – 2.2 спектр/с; диапазон регистрируемых масс – 30–600 *m/z*.

Идентификацию *n*-алканов и *n*-метил-кетон проводили по временам удерживания и масс-спектрам (библиотека NIST Mass Spectral Library, 2.0 ver., 2008, 986100 соединений). Количественное определение проводили по доминирующим фрагмент-ионам (базовым пикам) с *m/z* 57 для *n*-алканов, *m/z* 59 для *n*-метил-кетон. В качестве внешнего стандарта для калибровки детектора использовали стандарт для количественного анализа *n*-алканов C₁₀–C₃₆ (Connecticut *n*-Hydrocarbon Mix, Supelco). Калибровку проводили по четырем уровням, отклонения от линейности не превышали 10%.

Параметры оптимизации методики ускоренной экстракции

Модернизацию исходной процедуры экстракции проводили последовательно через ряд этапов:

1. Предварительные эксперименты показали, что при использовании на ASE в качестве экстрагента смеси дихлорметан : метанол при 75°C даже при давлении 17 МПа (2500 psi) часто происходит разгерметизация экстракционных ячеек, что связано с высоким давлением насыщенных паров дихлорметана. Поэтому дихлорметан заменили на хлороформ – растворитель, широко используемый в классических процедурах экстракции липидов [6]. Это позволило существенно (до 10.3 МПа) снизить давление в системе ASE при экстракции.

В методике ASE экстракции, приведенной US EPA [7], а также в технических рекомендациях фирмы-производителя Dionex [3] температура экстракции 100–180°C приведена как оптималь-

ная для извлечения полуволетучих органических соединений (в том числе углеводородов) из твердых матриц. Так как в литературе отсутствуют какие-либо указания на трансформацию (деструкцию или окисление) *n*-алканов и *n*-метил-кетон при температуре экстракции выше 75°C использовали температуру 100°C. Были опробованы следующие варианты экстрагентов: 1 – CHCl₃; 2 – CHCl₃ : CH₃OH 3 : 1 (v/v); 3) CHCl₃ : CH₃OH 1 : 1 (v/v). Время статической экстракции – 20 мин, давление 10.3 МПа (1500 psi).

2. Температура, при которой ведется экстракция, может заметно влиять на полноту извлечения *n*-алканов и *n*-метил-кетон, поэтому определяли выход целевых компонентов при 100, 125 и 150°C.

3. При использовании метода ASE [3] рекомендуется сокращать время статического нагрева экстракционной ячейки, увеличивая при этом число циклов экстракции. Поэтому исследовали выход *n*-алканов и *n*-метил-кетон в процессе четырех последовательных обработок образцов растворителем.

4. В работе [10] обнаружено, что относительный выход соединений разной полярности (*n*-алканов и *n*-жирных кислот) очень чувствителен к небольшим изменениям полярности растворителя. Поэтому исследовали выход целевых компонентов при последовательной экстракции различными растворителями (градиентная экстракция).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изменение состава растворителя

Замена дихлорметана на хлороформ в смеси с метанолом приводит к увеличению выхода *n*-алканов из образцов почвы и подстилки на 5–7%, выход *n*-метил-кетон увеличивается на 4–5%. Использование чистого хлороформа приводит к незначительному снижению выхода анализируемых компонентов из образцов почвы и подстилки. Так как наблюдался только небольшой тренд в сторону увеличения выхода *n*-алканов и *n*-метил-кетон с увеличением доли метанола в экстракционной смеси, в дальнейших экспериментах использовалась система CHCl₃ : CH₃OH 3 : 1 v/v.

При использовании в качестве экстрагента смеси CH₂Cl₂ : CH₃OH 93 : 7 v/v при 17 МПа (2500 psi) в ряде случаев происходила разгерметизация ячеек, в то время как для вариантов экстракции смесью CHCl₃ и CH₃OH при 10.3 МПа (1500 psi) этого явления не наблюдалось.

Влияние температуры на полноту экстракции

При использовании для экстракции смеси CHCl₃ : CH₃OH (3 : 1 v/v) при давлении 10.3 МПа и времени статической выдержки 20 мин досто-

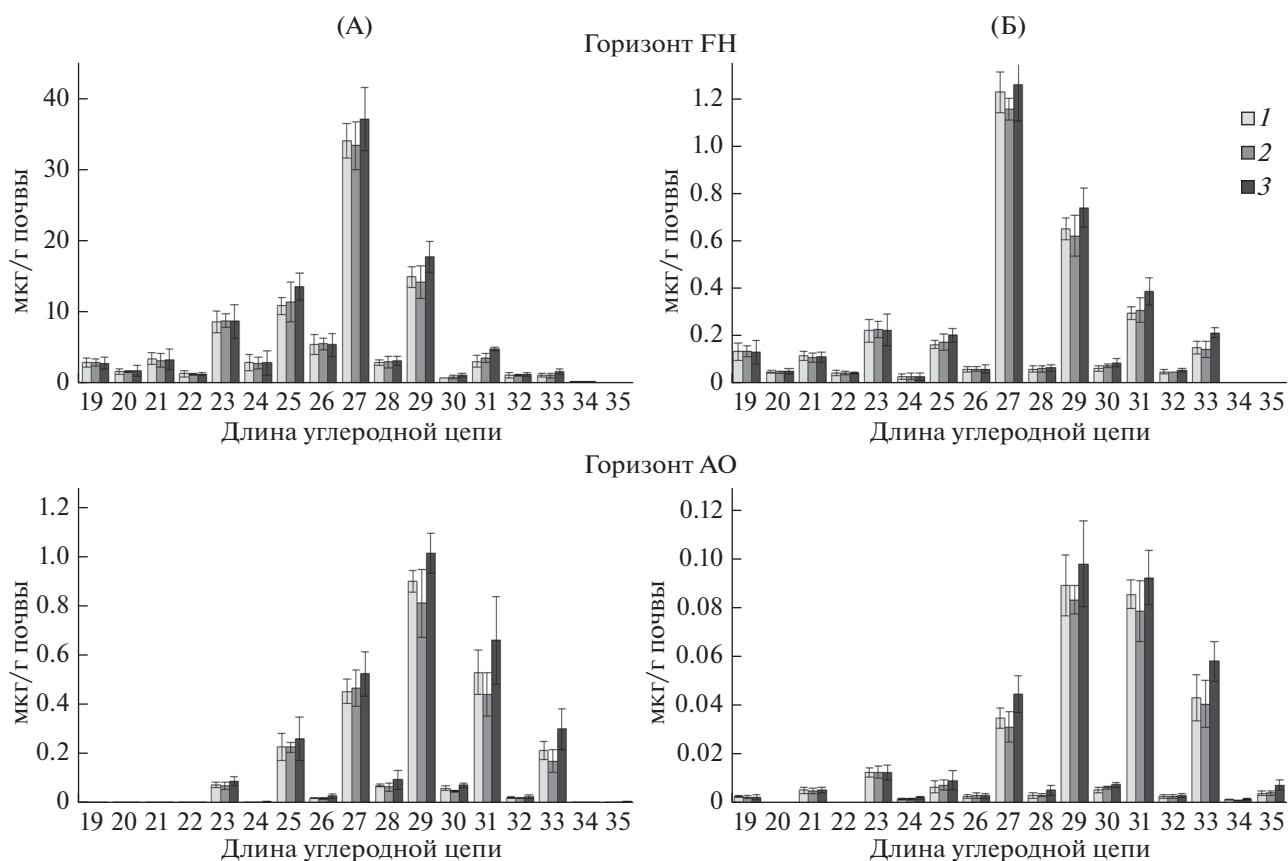


Рис. 1. Влияние количества повторных обработок экстрагентом на выход *n*-алканов (А) и *n*-метил-кетон (Б) из образцов подстилки и почвы (среднее значение \pm стандартное отклонение, $n = 5$). Условия экстракции: 1 – CHCl_3 : CH_3OH 3 : 1 v/v, 100°C, 10300 кПа, 20 мин, 1 цикл; 2 – CHCl_3 : CH_3OH 3 : 1 v/v, 100°C, 10300 кПа, 5 мин, 2 цикла; 3 – CHCl_3 : CH_3OH 3 : 1 v/v, 100°C, 10300 кПа, 5 мин, 4 цикла.

верных различий между выходом *n*-алканов и *n*-метил-кетон для температур экстракции 100, 125 и 150°C обнаружено не было. Дальнейшие эксперименты проводились при 100°C.

Влияние повторной экстракции на выход *n*-алканов и *n*-метил-кетон. Известно, что увеличение циклов экстракции может существенно повысить полноту извлечения анализируемых компонентов. Система ASE200 Dionex позволяет в автоматическом режиме выполнять необходимое количество повторных обработок, при этом экстракты собираются в отдельные флаконы. Было проведено 4 цикла экстракции смесью CHCl_3 : CH_3OH 3 : 1 v/v (100°C, 10.3 МПа) по 5 мин статической выдержки каждый. Полученные результаты были сопоставлены с результатами однократной экстракции в тех же условиях со временем статической выдержки 20 мин.

Анализ графиков (рис. 1) показывает, что уже после второй пятиминутной обработки суммарный выход как *n*-алканов, так и *n*-метил-кетон достигает величин, полученных в экспериментах со временем статической выдержки 20 мин. В по-

следующих двух циклах экстракции извлекается дополнительно еще 10–15% *n*-алканов и *n*-метил-кетон.

Градиентная экстракция. В экспериментах по экстракции липидных биомаркеров из почв методом ASE обнаружено, что увеличение давления в системе от 6.9 (1000 psi) до 17 МПа (2500 psi) приводит, с одной стороны, к увеличению выхода *n*-алканов, а с другой – к небольшому снижению выхода нормальных жирных кислот [10]. Авторы приписывают этот эффект уменьшению полярности растворителя при увеличении давления в системе.

Для того чтобы извлечь наиболее гидрофобные высокомолекулярные фракции *n*-алканов и *n*-метил-кетон из образцов почвы и подстилки в третьем и четвертом циклах экстракции смесь CHCl_3 : CH_3OH 3 : 1 v/v была заменена на чистый CHCl_3 . Использование менее полярного растворителя на заключительной стадии экстракции позволило выделить на 25% больше *n*-алканов и *n*-метил-кетон из образцов почвы, главным образом, за счет компонентов с длиной цепи C_{27} – C_{35} . Извлечение

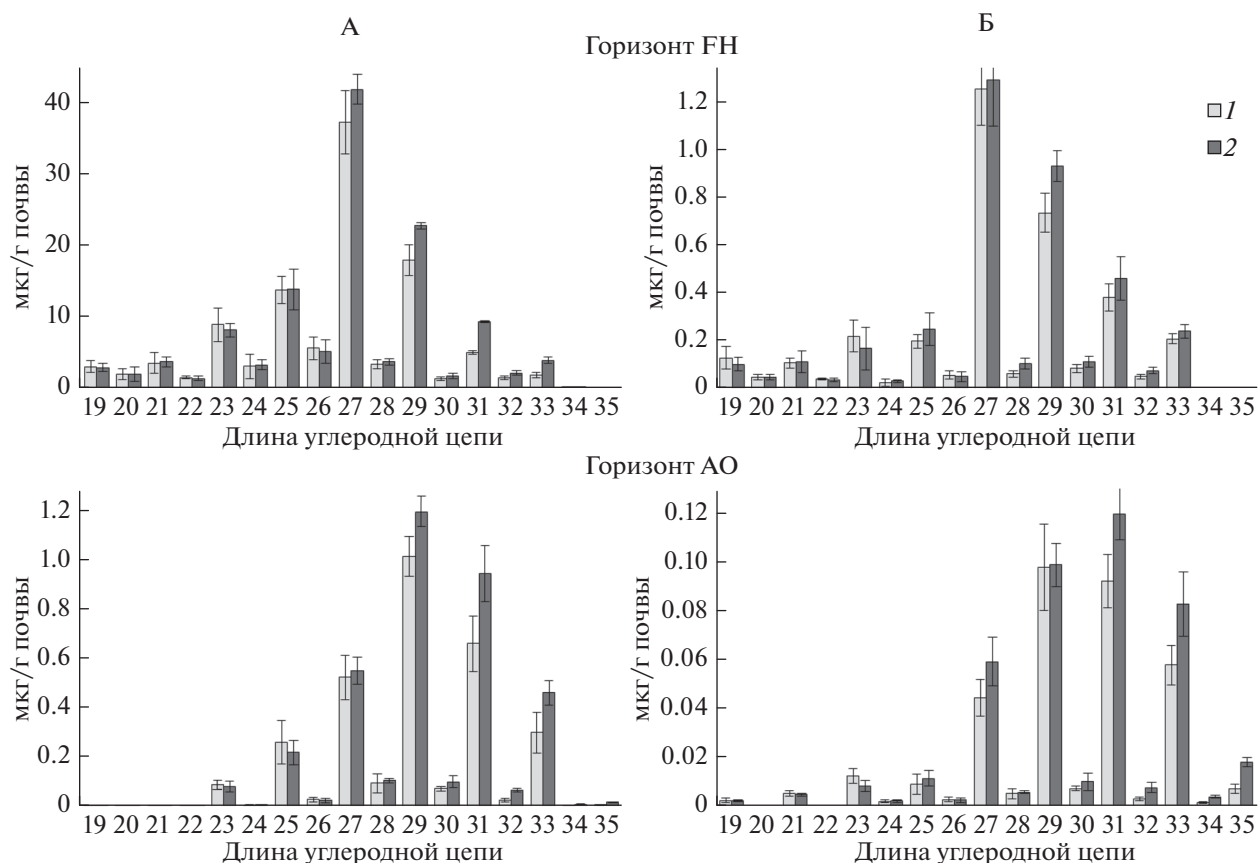


Рис. 2. Влияние градиентной экстракции на выход *n*-алканов (А) и *n*-метил-кетонов (Б) из образцов подстилки и почвы (среднее значение \pm стандартное отклонение, $n = 5$). Условия экстракции: 1 – $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} 3 : 1 \text{ v/v}$, 100°C , 10300 кПа, 5 мин, 4 цикла; 2 – $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} 3 : 1 \text{ v/v}$, 100°C , 10300 кПа, 5 мин, 2 цикла + CHCl_3 , 100°C , 10300 кПа, 5 мин, 2 цикла.

липидных компонентов из образцов подстилки увеличилось на 15% (рис. 2).

В целом по сравнению с оригинальной методикой изменение параметров экстракции позволило увеличить выход липидных компонентов из исследованных образцов почвы и подстилки на 51–56 и 28–35%, соответственно, преимуще-

ственно за счет лучшей экстракции гомологов с длиной цепи $>C_{25}$ (табл. 1).

*Оптимизированный метод анализа *n*-алканов и *n*-метил-кетонов в образцах почв и подстилок*

Навески почвы 2.0 г или подстилки 0.2 г в воздушно-сухом состоянии тщательно перемешива-

Таблица 1. Величины выхода липидных биомаркеров из образцов почвы и подстилки при разных процедурах экстракции, мкг/г образца

| Показатель | Суммарный выход | | | |
|--|-----------------------------------|-----------------|---|-----------------|
| | $C_{19}-C_{35}$ <i>n</i> -алканов | | $C_{19}-C_{35}$ <i>n</i> -метил-кетонов | |
| Образец из горизонта | FN | АО | FN | АО |
| Оригинальная процедура экстракции ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} 93 : 7 \text{ v/v}$, 75°C , 17 МПа, 1 цикл по 20 мин) | 92.9 ± 4.2 | 2.44 ± 0.13 | 3.19 ± 0.13 | 0.29 ± 0.02 |
| Оптимизированная процедура экстракции ($\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} 3 : 1 \text{ v/v}$, 100°C , 10.3 МПа, 2 цикла по 5 мин; CHCl_3 , 100°C , 10.3 МПа, 2 цикла по 5 мин) | 125.5 ± 4.5 | 3.82 ± 0.18 | 4.08 ± 0.26 | 0.44 ± 0.02 |

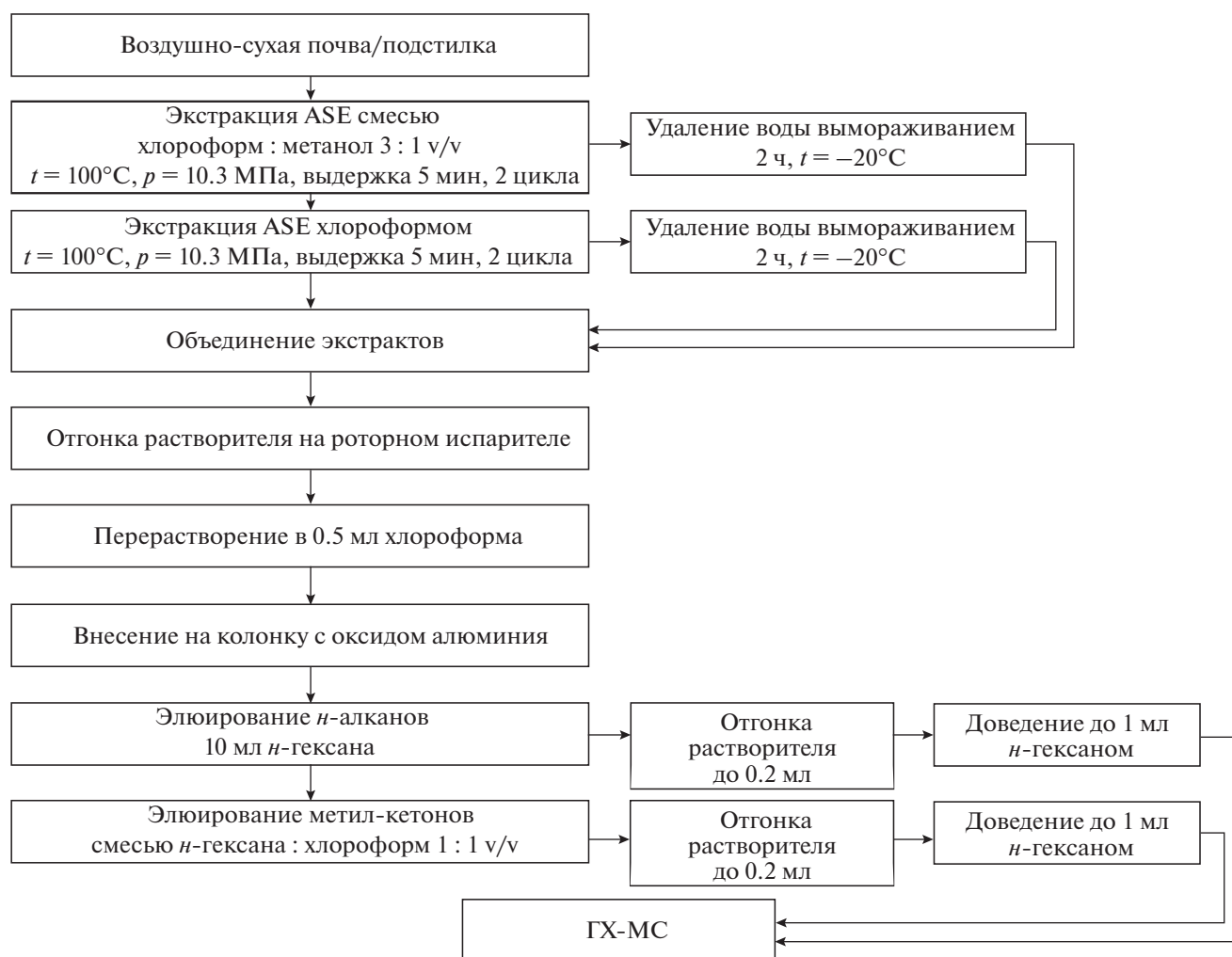


Рис. 3. Схема анализа образцов почв и подстилок при определении состава и содержания липидных биомаркеров методом ГХ-МС.

ют с 2 г прокаленного кварцевого песка (размер зерна 0.25–0.3 мм) и помещают в экстракционную ячейку для системы ASE объемом 11 мл. Экстракция проводится при следующих условиях (для ASE200, Dionex): температура 100°C, давление 10.3 МПа (1500 psi), время предварительного нагрева – 1 мин, время статической выдержки – 5 мин, объем промывки растворителем 120%, время продувки инертным газом – 60 с, 2 цикла обработки смесью растворителей хлороформ : метанол 3 : 1 v/v и 2 цикла – хлороформом.

Полученные экстракты вымораживают при (–20°C) в течение 1.5–2 ч, затем органические фазы объединяют, перенося в одну отгонную колбу, и упаривают под вакуумом на роторном испарителе при 40°C до объема 0.05 мл. Остаток растворяют в 0.5 мл хлороформа и переносят в стеклянную колонку $d = 10$ мм, заполненную 4 г оксида алюминия (II по Брокману) хроматографической градации. Пропускают через колонку

10 мл *n*-гексана, затем 10 мл смеси *n*-гексан : хлороформ 1 : 1 v/v, собирая элюаты в отдельные пробирки.

Полученные фракции упаривают до объема ~0.2 мл, количественно переносят в хроматографические виалы и доводят до объема 1 мл *n*-гексаном. Полученные пробы анализируют методом ГХ-МС (рис. 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Преимущества метода ASE при выделении липидов из почв и подстилок по сравнению с классической экстракцией в аппарате Сокслета, продемонстрированные ранее [10, 14, 22], оценивались авторами, главным образом, по увеличению полноты, скорости и экономичности процедуры экстракции. Селективность процедуры по отношению к гомологам одного класса соединений, например, в рядах *n*-алканов и *n*-метил-кетонів,

практически не рассматривалась. Использование предложенной в данном исследовании процедуры повторной экстракции с градиентом полярности растворителя, выполняющейся в автоматическом режиме, позволяет устранить этот недостаток и создавать методики экстракции, оптимальные для выделения различных компонентов комплекса липидных биомаркеров из почв и подстилок. Градиентная экстракция повышает по сравнению с применением одного типа экстрагента извлечение из почвенных образцов наиболее гидрофобных гомологов *n*-алканов и *n*-метил-кетонов с длиной цепи $>C_{25}$, количественное определение которых имеет значение для оценки стабилизации органического углерода в почвах [12].

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 17-14-01120. Работа была выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования факультета почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Zavgorodnyaya Yu.A., Bosharova E.A., Kolytsov G.I.* Определение уровня загрязнения почв углеводородами методом автоматизированной ускоренной экстракции в субкритических условиях // *Экология и промышленность России*. 2012. № 2. С. 30–33.
2. *Anokhina N.A., Demin V.V., Zavgorodnyaya Yu.A.* Compositions of *n*-Alkanes and *n*-Methyl Ketones in Soils of the Forest-Park Zone of Moscow // *Eurasian Soil Science*. 2018. V. 51. № 6. P. 637–646. <https://doi.org/10.1134/S1064229318060030>
3. Application Note 338. Dionex Extraction of Total Petroleum Hydrocarbon Contaminants (Diesel and Waste Oil) in Soils by Accelerated Solvent Extraction. <http://www.dionex.com>
4. *Batjes N.H.* Total carbon and nitrogen in the soils of the world // *Eur. J. Soil. Sci.* 2014. V. 65. № 328. P. 4–21.
5. *Bush R.T., McInerney F.A.* Leaf-wax *n*-alkane distributions in and across modern plants: implications for paleoecology and chemotaxonomy // *Geochim. Cosmochim. Acta*. 2013. V. 117. P. 161–179. <https://doi.org/j.gca.2013.04.016>
6. *Christie W.W., Han X.* Lipid analysis – Isolation, Separation, Identification and Lipidomic analysis. The Oily Press, Bridgwater, U.K. and Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, U.K. 2010. 446 p.
7. EPA Methods. Method 3545A (SW-846). Pressurized Fluid Extraction (PFE). Revision 1. 2007.
8. *Griepentrog M., Bodü S., Boeckx P., Wiesenberg G.L.B.* The fate of plant wax lipids in a model forest ecosystem under elevated CO₂ concentration and increased nitrogen deposition // *Organic Geochemistry*. 2016. V. 98. P. 131–140. <https://doi.org/j.orggeochem.2016.05.005>
9. *Hepp J., Tuthorn M., Zech R., Mugler I., Schlutz F., Zech W., Zech M.* Reconstructing lake evaporation history and the isotopic composition of precipitation by a coupled $\delta^{18}O$ – δ^2H biomarker approach // *J. Hydrology*. 2015. V. 529. № 2. P. 622–631. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2014.10.012>
10. *Jansen B., Hausmann N.S., Tonnejck F.H., Verstraten J.M., de Vooght P.* Characteristic straight-chain lipid ratios as a quick method to assess past forest – paramo transitions in the Ecuadorian Andes // *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. 2008. V. 262. P. 129–139. <https://doi.org/j.orggeochem.2008.09.006>
11. *Kögel-Knabner I.* The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter // *Soil Biol. Biochem.* 2002. V. 34. P. 139–162. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00158-4](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00158-4)
12. *Lehmann J., Kleber M.* The contentious nature of soil organic matter // *Nature*. 2015. V. 528. P. 60–68. <https://doi.org/10.1038/nature16069>
13. *Lehtonen K., Ketola M.* Solvent-extractable lipids of *Sphagnum*, *Carex* and *Carex-Bryales* peats: content and compositional features vs peat humifications // *Organic Geochemistry*. 1993. V. 20. № 3. P. 363–380.
14. *Nichols J.N., Huang J.* C₂₃–C₃₁ *n*-alkane-2-ones are biomarkers for the genus *Sphagnum* in fresh-water peatlands // *Organic Geochemistry*. 2007. V. 38. P. 1972–1976. <https://doi.org/j.orggeochem.2007.07.002>
15. *Nguen Tu Th.Th., Egasse C., Zeller B., Bardoux G., Biron Ph., Ponge J.-F., David B., Derenne S.* Early degradation of plant alkanes in soil: a litterbag experiment using ¹³C-labelled leaves // *Soil Biol. Biochem.* 2011. V. 43. P. 2222–2228. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.07.009>
16. *Norris C., Dungait J., Joynes A., Quideau S.* Biomarkers of novel ecosystem development in boreal forest soils // *Organic Geochemistry*. 2013. V. 64. P. 9–18.
17. *Ortiz J.E., Borrego A.G., Gallego J.L.R., Sanchez-Palencia Y., Urbanczyk J., Torres T., Domingo L., Estebanez B.* Biomarkers and inorganic proxies in the paleoenvironmental reconstruction of mires: The importance of landscape in Las Conchas (Asturias, Northern Spain) // *Organic Geochemistry*. 2016. V. 95. P. 41–54. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2016.02.009>
18. *Pikovskii Yu.I., Smirnova M.A., Gennadiev A.N., Zavgorodnyaya Yu.A., Zhidkin A.P., Kovach R.G., Koshovskii T.S.* Parameters of Native Hydrocarbon Status of Soils of Different Bioclimatic Zones // *Eurasian Soil Science*. 2019. V. 52. № 11. P. 1333–1346. <https://doi.org/10.1134/S1064229319110085>
19. *Popp P., Keil P., Möder M., Paschke A., Thuss U.* Application of accelerated solvent extraction followed by gas chromatography, high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, chlorinated pesticides and polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in solid wastes // *J. Chromatogr. A*. 1997. V. 774. № 1–2. P. 203–211.
20. *Richter B.E., Jones B.A., Ezzell J.L., Porter N.L., Avdalovic N., Pohl C.* Accelerated Solvent Extraction: A

- Technique for Sample Preparation // *Anal. Chem.* 1996. V. 68. P. 1033–1039.
21. *Tipple B.J., Berke M.A., Doman C.E., Khachaturyan S., Ehleringer J.R.* Leaf-wax *n*-alkanes record the plant-water environment at leaf flush // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2013. V. 110. P. 2659–2664.
22. *Wiesenberg G.L.B., Schwark L., Schmidt M.W.I.* Improved automated extraction and separation procedure for soil lipid analyses // *European J. Soil Sci.* 2004. V. 55. P. 349–356.
23. *Zech M., Rass S., Buggle B., Loscher M., Zoller L.* Reconstruction of the late Quaternary paleoenvironments of Nussloch loess paleosol sequence, Germany, using *n*-alkane biomarkers // *Quaternary Res.* 2012. V. 78. P. 226–235.
<https://doi.org/j.yqres.2012.05.006>

Improved Method for Determination of *n*-Alkanes and *n*-Methyl-Ketones in Litters and Soils

Yu. A. Zavgorodnyaya^{1,*}, N. A. Anokhina¹, L. G. Bogatyrev¹, and V. V. Demin¹

¹*Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: zyu99@mail.ru*

A new technique to extract lipid biomarkers (*n*-alkanes and *n*-methyl-ketones) from forest litters and soils using the accelerated solvent extraction (ASE) method was developed. The maximum output of *n*-alkanes and *n*-methyl-ketones was obtained by sequential extraction using the chloroform : methanol mixture (3 : 1 (vol)) in the first two extraction cycles and chloroform in the subsequent two cycles. The extraction was carried out at a temperature of 100°C, a pressure of 10.3 MPa, and a static extraction time of 5 min. The repeated chloroform treatment by ASE was shown to increase the output of long-chain *n*-alkanes and *n*-methyl-ketones.

Keywords: accelerated solvent extraction, ASE technique, lipid biomarkers