

南京附近下蜀黄土内腹足类化石的氨基酸外消旋年代测定

王金权

(中国科学院南京地质古生物研究所)

李立文

(南京师范大学)

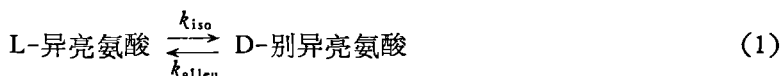
一、引言

自 Bada, Wehmiller 和 Hare 等首先使用氨基酸外消旋反应测定贝壳化石年龄以来,随着实验仪器和实验技术的改进,这一方法得到了较快发展和应用,为第四纪地质古生物的研究提供了新的途径。甚至还有可能为较老地层的划分对比及生态环境的研究提供证据。因此,氨基酸外消旋年龄测试技术逐渐受到人们的关注。自 1979 年 Bada 在中国科学院南京地质古生物研究所讲授“贝壳化石的氨基酸外消旋年龄测定”以后,刘德明等(1987)较成功地进行了福建沿海全新世贝壳沉积物的氨基酸外消旋年代测定。本文报道的是南京附近三山矶下蜀黄土内腹足类化石的氨基酸外消旋年代测定,以及氨基酸组份含量与其生态环境的关系。

承唐天福教授审阅文稿并提出宝贵建议,臧晓泉绘制图表,笔者在此表示衷心感谢。

二、基本原理

在现生生物体内,除甘氨酸外氨基酸几乎均以 L-型储藏。但是在古生物中出现了 D-及 L-氨基酸旋光异构体。由于在漫长的地质历史进程中 L-氨基酸可能受温度和金属元素等的影响, L-氨基酸逐步向 D-氨基酸转化(亦称外消旋化),直至达到最终的外消旋反应平衡。可用下式来表示异亮氨酸的外消旋反应:



k_{iso} 和 $k_{\text{all eu}}$ 分别代表异亮氨酸和别异亮氨酸的转化常数。L-异亮氨酸和 D-别异亮氨酸可以通过氨基酸自动分析仪的缓冲柱得到分离,同样可以将氨基酸旋光异构体与 TPC 反应,制备成氨基酸二甲甲酯衍生物进行气相色谱分析(刘德明,王金权,1987)。本文着重介绍将氨基酸衍生为七氟丁酰基氨基酸异丁酯,并通过旋光性玻璃毛细管柱在气相色谱上的分离(插图 1)。根据分析图谱确定 D/L 比率,然后按氨基酸外消旋可逆第一动力学方程计算标本的年龄(在讨论中将给予详述)。

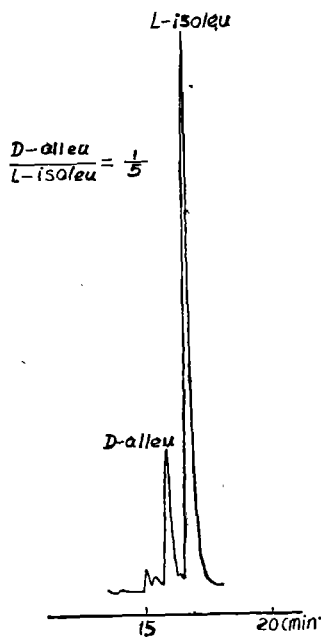


插图1 D-别异亮氨酸和 L-异亮氨酸在旋光性毛细管柱上的气相色谱分离
Gas chromatographic separation of D-alloisoleucine and L-isoleucine on optically active capillary column

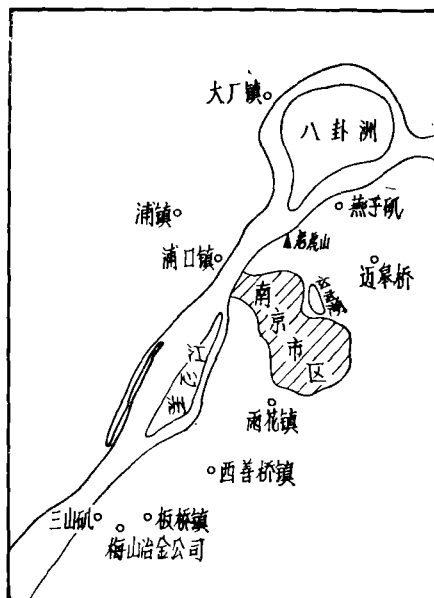


插图2 三山矶交通位置图
Sketch map showing the locality of Sanshanji near Nanjing

三、三山矶地质概况

三山矶位于南京西南 10 多公里, 滨临长江, 因矶有 3 个小山峰而得名 (插图 2)。其下游为冶金公司码头。下蜀组在三山矶西北侧和三山矶水塔旁出露较好。

从矶的西北开山所揭露的悬崖剖面观察, 下蜀黄土厚约 6—8m, 基岩为闪长斑岩 (插图 3)。

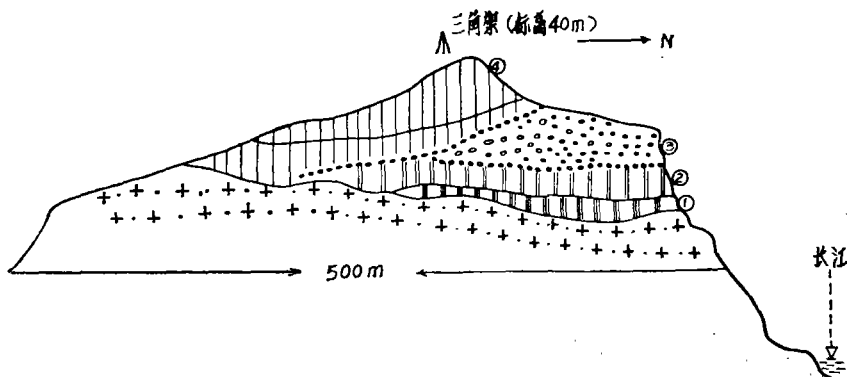


插图3 三山矶西北侧剖面示意图
Section at the northwest end of Sanshanji near Nanjing.

该剖面自上而下为:

4. 坡积物。
3. 钙质结核层, 向南尖灭, 为搬运坡积物, 约 3m。
2. 棕黄色土, 约 3m。
1. 棕红色土覆盖于闪长斑岩上, 约 2m。

三山矶水塔旁的下蜀黄土剖面, 以棕黄色下蜀黄土为主, 富含钙质结核, 产腹足类化石, 依岩性可分为上、中、下三层, 大约相当于下蜀组的中上部。

该剖面如下所述:

上层: 淡黄色黄土, 垂直节理发育, 结核呈层, 较坚硬。含腹足类化石 *Bradybaena rauida* 和 *Hemiphaedusa heudeana*。厚约 60cm。

中层: 棕黄色粉砂土, 钙质结核较下部为少。含腹足类化石 *Bradybaena rauida* 和 *Buliminus cantori*。厚约 70cm。该层位与老虎山“下蜀组”相当, ^{14}C 年龄为 16620 ± 200 年(李立文, 方邳森, 1985)。

下层: 棕黄色土, 由粉砂组成, 土质较松, 富含钙质结核。含腹足类化石 *Bradybaena rauida* 和 *Buliminus cantori*。厚约 40cm。(未见底)。

南京老虎山下蜀组鹿角结核 ^{14}C 年龄为 16620 ± 200 年(李立文, 方邳森, 1985), 江阴长山下蜀组钙质年龄为 18700 ± 500 年(李立文, 方邳森, 1986), 并据三山矶剖面所含的腹足类化石综合分析, 可以看出三山矶剖面的下蜀黄土相当于下蜀组的中上部。

四、分析方法

1. 试剂

3mol/L 盐酸异丁醇, 分析纯氯化钠滴加优级纯硫酸, 产生盐酸气体酸化重蒸异丁醇; 大于 99% 的七氟丁酸酐; 2mol/L 氢氧化铵, 优级纯氢氧化铵经蒸馏产生气体溶解于无离子二次蒸馏水中, 然后用盐酸标定到所需浓度; 6mol/L 二次蒸馏盐酸, 优级纯浓盐酸加入等体积无离子二次蒸馏水, 稀释后重蒸馏。其它所需试剂均需达到无水级。

2. 标本预处理

腹足类化石用自来水冲洗后, 依次用 0.5mol/L 二次盐酸、无离子水和无离子二次蒸馏水超声清洗, 置于干燥箱中 50°C 恒温干燥, 冷却到室温后精确称取适量的样品待水解。

3. 样品的水解

样品(每个样品加入适量的色谱纯正亮氨酸作为内标)置于烧杯内滴加 6mol/L 二次盐酸, 待赶走二氧化碳后转移到玻璃安瓿瓶内, 再适当滴加 6mol/L 二次盐酸, 封口后在 110°C 条件下恒温水解 24 小时。水解液在减压条件下旋转蒸发, 加入适量的无离子二次蒸馏水离心分离。弃去残渣, 保留上清液, 待离子交换脱盐。

4. 离子交换

脱盐方法和以往使用的脱盐方法(刘德明、王金权, 1987)相同。但在脱盐过程中要注意以下几个问题, 一是离子交换柱要经过充分转型; 二是离子交换树脂的交换量一定要大于样品中含盐量; 其次是样品在离子交换过程中变色范围不能超过离子交换柱底部。否则, 将会给气相色谱的定量分析带来麻烦, 甚至影响定量分析的结果。

5. 氨基酸衍生物的制备

洗脱液经减压旋转蒸发、离心后, 振动搅拌均匀, 每个样品分装在两个锥形瓶内(便于重分析), 然后分别进行衍生化。制备氨基酸衍生物方法有多种, 本文介绍的方法是把氨基酸衍生

为七氟丁酰基氨基酸异丁酯(Mackenzie and Tenaschuk, 1979)。实施方法是,先将样品置于加热块上,干燥氮气流 50℃恒温蒸发干燥,再加入适量的醋酸乙酯通氮气干燥。注入 3mol/L 盐酸异丁醇 150 μ l,置于加热块上 120℃恒温酯化 30 分钟,冷却到室温。使用氮气流在 50℃条件下蒸发掉剩余试剂,注入适量的醋酸乙酯,氮气流干燥。加入 100 μ l 七氟丁酸酐,在 90℃油浴上恒温酰化 20 分钟。待冷却到室温后,50℃恒温氮气流干燥。最后加入适量的醋酸乙酯定容到一定的体积,待气相色谱分析。

6. 气相色谱分析

1) 三山矶下蜀黄土内腹足类化石氨基酸旋光异构体的分离

氨基酸旋光异构体通过旋光性玻璃毛细管柱在气相色谱仪上可得到分离。柱长 25 m,内径 0.25mm,线速度为 14.4cm/s,分流比 1:78。ECD:280℃。柱温 120—200℃,2℃/min。氨基酸旋光异构体分离图谱见插图 4。

2) 腹足类化石中氨基酸组份含量的分析

在分析、测定过程中,笔者不仅进行了腹足类贝壳的氨基酸旋光异构体的分离,同时还进行了氨基酸各组份含量的测定,以便对南京附近三山矶下蜀黄土内腹足类化石的生态环境提供讨论的依据。氨基酸各组份含量的测定可在 OV-101 石英毛细管柱上进行。ECD 温度为 300℃,柱温 90℃—210℃,6℃/分。线速度为 16cm/秒,分流比为 1:75 (插图 5)。

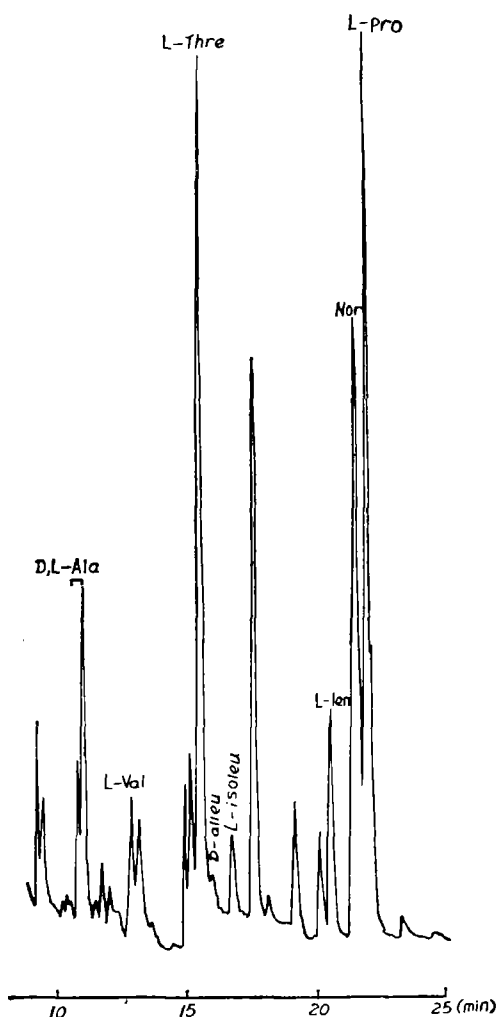


插图 4 腹足类化石中氨基酸旋光异构体在旋光性毛细管柱上的分离

Gas chromatographic separation of amino acid enantiomers from fossil gastropods on optically active capillary column

五、结果与讨论

1. 氨基酸外消旋 D/L 比率与地层的相互关系

在地质体内,L-氨基酸可能受温度、金属元素的影响及时间的推移,向 D-氨基酸转化,这是进行氨基酸外消旋年代测定的基本理论依据。D/L 比率越大,相应的沉积年龄越老,即 D/L 比率与相应的沉积物年龄成正比关系。笔者在三山矶剖面下蜀黄土的上、中、下 3 个层位(三山矶水塔旁)各采集 1 个试样(腹足类贝壳化石),然后进行氨基酸外消旋比率的测定。为了达到准确测定之目的,每个试样均进行了重复测定。氨基酸外消旋比率测定结果见表 1。

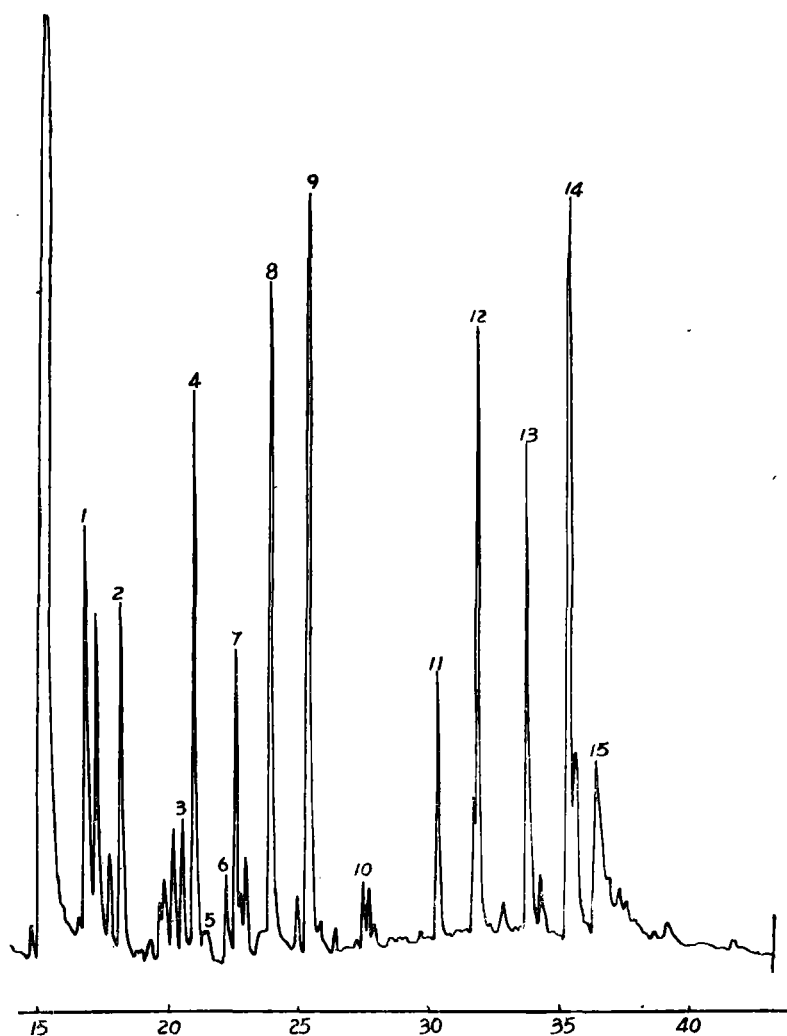


插图 5 腹足类化石中氨基酸的气相色谱分离
Separation of amino acids from fossil gastropods by
capillary gas chromatography.

表 I 三山矶腹足类化石的氨基酸外消旋比率测定结果
Ratios of amino acid enantiomers in fossil gastropods from Sanshanji

氨基酸种类	层位 测定值	上			中			下		
		D/L			D/L			D/L		
		第一次 分析	第二次 分析	平均值	第一次 分析	第二次 分析	平均值	第一次 分析	第二次 分析	平均值
D-别异亮氨酸 L-异亮氨酸					0.216	0.246	0.231	0.245	0.263	0.254
D-丙氨酸 L-丙氨酸		0.127	0.145	0.136	0.361	0.341	0.351	0.458	0.474	0.468

从表 I 所列的 D/L 比率来看, D/L 比率与相应的地层时代成正比关系。D/L 比率越大, 相应的沉积物年龄越老。由此可以证实使用 D/L 比率测定贝壳化石或钙质沉积物年龄的可靠性, 同时也可以从 D/L 比率考察氨基酸外消旋比率与相应地层的相互关系。

2. 关于氨基酸外消旋年龄的计算

确定了贝壳化石或钙质沉积物的氨基酸外消旋比率之后, 就可以根据氨基酸外消旋可逆第一动力学方程计算该标本的年龄。在进行氨基酸外消旋年龄测定过程中, 可以使用 L-异亮氨酸对 D-别异亮氨酸的差向异构体 D/L 比率计算年龄, 也可以使用天门冬氨酸、谷氨酸、缬氨酸等氨基酸的对应体比率测定标本的年龄。究竟使用哪一种氨基酸外消旋比率计算标本的年龄, 这要看被测标本的具体情况而定。一般情况下, 要考虑以下几个问题。

首先要考虑氨基酸在地质体内的外消旋速率。外消旋速率比较缓慢的氨基酸适用于测定较古老的标本年龄。反之, 外消旋速率较快的氨基酸适用测定较年轻的标本。一般来说, 天门冬氨酸外消旋速率较快, 异亮氨酸外消旋速率较缓慢 (Bada and Protsch, 1973)。

其次要考虑被测样品的氨基酸含量。假如选择天门冬氨酸 D/L 比率测定标本的年龄, 可是该标本中天门冬氨酸含量甚少, 甚至不含天门冬氨酸, 那么就不可能使用天门冬氨酸外消旋比率测定出该标本的年龄。

除考虑以上两个因素外, 同时要考虑使用的仪器和检测器的灵敏度对氨基酸(或氨基酸衍生物)的影响。例如, 使用异亮氨酸外消旋比率测定标本的年龄, 尽管标本中富含异亮氨酸, 但是使用的仪器(或仪器的灵敏度)对它的应答值不足以定量, 其结果还是测定不出该标本的年龄。所以要根据具体情况来对待。

三山矶下蜀黄土内腹足类化石的氨基酸外消旋年代测定, 笔者使用了 L-异亮氨酸对 D-别异亮氨酸的外消旋比率测定标本的年龄。这是因为 L-异亮氨酸外消旋速率相当缓慢。在正常自然环境下, 当外消旋反应接近平衡时大约需要 200 多万年, 其实测可信年龄约 35 万年, 如果被测试样是化石中结合蛋白, 它的可测年龄更长 (Belknap and Wehmiller, 1978)。其次, 由于这两种氨基酸经异丁醇和七氟丁酸酐衍生后, 可在旋光性玻璃毛细管柱上(气相色谱分析)得到很好的分离(插图 1)。

从表 I 中所列数据可以看出, 三山矶水塔旁剖面的下层 D-别异亮氨酸对 L-异亮氨酸的 D/L 比率为 0.254(取平均值), 中层 D-别异亮氨酸对 L-异亮氨酸的 D/L 比率为 0.231(取平均值)。但是在上层中, 这两种氨基酸在图谱上基本没出峰(不足以定量), 因此不能对该层位进行外消旋年龄测定。产生这种情况的主要原因可能是该层位标本中异亮氨酸甚少, 检测器所产生的信号不能足在气相色谱上表现出来。但是在上层中丙氨酸的外消旋比率(D/L)比下层和中层中丙氨酸的外消旋比率要小。由此可以推知上层的腹足类化石要比中层和下层的腹足类化石年轻。

在计算氨基酸外消旋年代过程中, 通常先要解决 4 个问题。

(1) 外消旋平衡常数 (K')。

(2) 积分常数。

(3) 反应速率常数 (k_{iso})。

(4) D/L 比率。

如果以上 4 个问题都解决之后, 可按以下氨基酸外消旋可逆第一动力学方程 (Bada and Schroeder, 1972) 计算标本的年龄。

$$\ln \left[\frac{1 + (\text{alleu/iso})}{1 - K'(\text{alleu/iso})} \right]_t - \ln \left[\frac{1 + (\text{alleu/iso})}{1 - K'(\text{alleu/iso})} \right]_{t=0} = (1 + K') \cdot k_{\text{iso}} \cdot t \quad (2)$$

三山矾下蜀黄土内腹足类贝壳的 D/L 比率测定结果见表 I。其余 3 个问题下面将分别给予阐述。

方程(2)中 K' 是 $K_{\text{平衡}}$ 的倒数。

即:

$$K' = 1/K_{\text{平衡}} = (\text{异亮氨酸})_{\text{平衡}} / (\text{别异亮氨酸})_{\text{平衡}}$$

1972 年, Bada 和 Schroeder 做过这样的实验, 在 148.7℃ 条件下, 连续恒温加热钙质沉积物(岩芯含有孔虫)504 个小时后, 测定 alleu/iso 比值接近 1.4, 即 K' 值为 0.715。在三山矾腹足类贝壳的氨基酸外消旋年代计算过程中, 使用的 K' 值为 0.715。

$$\text{方程式(2)中: } \ln \left[\frac{1 + (\text{alleu/iso})}{1 - K'(\text{alleu/iso})} \right]_{t=0}$$

为积分常数项 ($t = 0$ 时)。由于沉积物最初可能含有极微量的别异亮氨酸, 因此积分常数项不可能是零值。1972 年, Bada 和 Schroeder 通过分析最年轻的钙质沉积物(化石有孔虫, 仅水解、脱盐不加热), 确定 alleu/iso 比值为 0.02。把 0.02 代入常数项, 经计算后积分常数为 0.034。当然, 最好采一个相应的现生的腹足类标本分析测定, 这样可以提高氨基酸外消旋年龄测定的准确性。如果做这项工作, 必须具备高灵敏度现代仪器和高精度测试技术, 方可顺利进行。

反应速率常数 k_{iso} 代表 L-异亮氨酸向 D-别异亮氨酸转化的速率。我们选择三山矾水塔旁剖面中层腹足类化石的 D-别异亮氨酸对 L-异亮氨酸的比率 (0.231) 计算 k_{iso} 值, 并且把相应的 ^{14}C 年龄 (16620) 一并代入方程式(2)中, 经计算后 k_{iso} 值为 $1.24 \times 10^{-5} \text{年}^{-1}$ 。

以上 4 个问题解决之后, 同时又测定了三山矾剖面下层中腹足类化石的 D-别异亮氨酸对 L-异亮氨酸比值为 0.254 (平均值), 就可以计算该标本的年龄。方程式(2)可写为:

$$t (\text{年龄}) = \left\{ \ln \left[\frac{1 + (\text{alleu/iso})}{1 - 0.715(\text{alleu/iso})} \right] - 0.034 \right\} \div [(1 + 0.715) \times 1.24 \times 10^{-5}] \quad (3)$$

经计算后, 三山矾水塔旁剖面下层中腹足类贝壳的氨基酸外消旋年龄为 18468 年 (表 II)。

表 II 三山矾 *Bradybaena rauida* 等的异亮氨酸外消旋年龄

Isoleucine epimerization ages of fossil *Bradybaena rauida* shells from Sanshanji

层位	^{14}C 年龄(年)	alleu/iso	k_{iso} (年 $^{-1}$)	计算年龄(年)
中层	16620 ± 200	0.231	1.24×10^{-5}	
下层		0.254		18468

^{14}C 年代测定与氨基酸外消旋年代测定, 都同是测定年代的方法, 但又不能互相取代。这是因为氨基酸外消旋反应属分子级相互转化, 而不是元素的衰变。 ^{14}C 年代测定根据被测样品中碳的浓度为依据, 由于被测样品中碳可能和非原生碳发生交换作用(如地下水中的碳交换, 气体 CO_2 的交换、成岩作用伴随着碳物质交换等), 可能影响 ^{14}C 年代的准确性 (Masters and Bada, 1977)。鉴于以上原因, 可以把氨基酸外消旋年龄看作“校正年龄”。前面已经提到 L-异亮氨酸外消旋化相当缓慢, 当反应接近平衡时, 大约需要 200 多万年, 其可测年龄约 35 万年, 大

大超过 ^{14}C 年代测定的半衰期,可以测定 ^{14}C 年代测定法所不能测定的古老样品。这也是氨基酸外消旋年代测定优于 ^{14}C 年代测定的一个重要因素。其次 ^{14}C 年代测定所需试样量远大于氨基酸外消旋年代测定所需的试样用量。一般情况下,氨基酸外消旋年代测定所需试样量为 5—10g。

3. 三山矶腹足类化石中氨基酸组份含量与其生态环境的关系

从表 III 所列数据可以看出,中层腹足类贝壳的氨基酸总量为 $742\mu\text{g/g}$ 。其中碱性氨基酸为 8.8%,酸性氨基酸为 13%,中性氨基酸为 78.2%。在地质体内,通常酸性氨基酸在碱性条件下以碱式盐存在,酸性氨基酸得到了较好的储存;反之,碱性氨基酸在酸性条件下以酸式盐存在,碱性氨基酸得到了较好保存;在中性条件下,氨基酸是以稳定盐形式而得到较好储藏,并且具有一定的生物化学稳定性(F. M. 斯温著,1979)。根据这一原理,可以认为三山矶腹足类化石是在中性微偏碱性环境下储藏的。

表 III 三山矶腹足类化石中氨基酸含量
Contents of amino acids in fossil gastropods from Sanshanji near Nanjing

出峰号	氨基酸种类	响应值	校正因子	含量 ($\mu\text{g/g}$)
1	丙氨酸	7.60	0.68	65.1
2	甘氨酸	5.96	0.86	64.5
3	缬氨酸	2.46	1.44	44.6
4	苏氨酸	10.51	0.32	42.3
5	丝氨酸	0.68	0.33	2.80
6	亮氨酸	1.66	1.11	23.2
7	异亮氨酸	5.98	1.49	112.2
8	正亮氨酸	12.73		内标
9	脯氨酸	14.35	0.54	97.6
10	羟脯氨酸	1.27	0.32	5.1
11	天门冬氨酸	5.09	0.47	30.1
12	苯丙氨酸	11.51	0.73	105.8
13	谷氨酸	9.14	0.58	66.7
14	赖氨酸	13.97	0.37	65.1
15	酪氨酸	3.27	0.41	16.9
总 量				742.0

六、结 论

根据南京附近三山矶下蜀黄土内腹足类贝壳的氨基酸外旋年代测定,及其氨基酸各组份含量的测定结果,可以说明以下几个问题。

- 1) 三山矶腹足类贝壳化石的氨基酸外消旋比率 (D/L) 与相应的地层时代成正比关系, D/L 比率越大,相应的地层时代越老。
- 2) 从三山矶剖面的腹足类贝壳氨基酸外消旋年龄测定结果(18 468 年)来看,进一步证实三山矶剖面下蜀黄土属下蜀组的中上部。这个结果与南京老虎山和江阴长山的下蜀组 ^{14}C 年代非常一致。
- 3) 从三山矶腹足类贝壳的氨基酸组份含量看,可以证实三山矶腹足类化石是在中性微偏

碱性环境下储藏的。碱性环境有利于碳酸钙的聚集,并在碱性较强的位置围绕沉淀中心聚集。于是就形成了各种不同的钙结核。

本文仅报道了下蜀黄土内腹足类贝壳的氨基酸外消旋年代测定的初步工作。由于“下蜀土”在长江下游地区分布较广,同时与国民经济有密切关系。因此几十年来一直是许多地质、古生物工作者研究的典型层位。但对“下蜀土”的成因及形成的时代尚存不同看法。为推动“下蜀土”地质年代学的研究及开发利用,进一步对南京附近下蜀黄土内生物化石的氨基酸外消旋年代及其生态环境的分析研究,将有助于上述问题的解决。

参 考 文 献

- 李立文、方邳森,1985: 南京老虎山“下蜀组”钙质结核的成因与时代的探讨。地层学杂志,9(1): 53—56。
 李立文、方邳森,1986: 江苏江阴长山下蜀组钙质结核的初步研究。南京师大学报(自然科学版),第二期,89—96 页。
 刘德明、王金权,1987: 化石贝壳中氨基酸对映体的毛细管气相色谱分离。色谱,5(2): 105—110。
 刘德明、蓝琇、王金权,1987: 福建沿海全新世贝壳沉积物的氨基酸外消旋年代测定。古生物学报,26(3): 345—353 页。
 F. M. 斯温著,钱吉盛等译,1979: 陆相有机地球化学。科学出版社。
 Bada, J. L. and Reiner Protsch, 1973: Racemization reaction of aspartic acid and its use in dating fossil bones. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70(5): 1331—1334.
 Bada, J. L. and R. A. Schroeder, 1972: Racemization of isoleucine in calcareous marine sediments: kinetic and mechanism. Earth and Planetary Science Letters. 15: 1—11.
 Belknap, D. F. and J. F. Wehmiller, 1978: Amino acid racemization in Quaternary mollusks: examples from Delaware, Maryland, and Virginia. Edited by P. E. Hare, T. C. Hoering and K. King, Jr., Biogeochemistry of Amino Acids, 401—414.
 Mackenzie, S. L. and D. Tenaschuk, 1979: Quantitative formation of N (O, s) -heptafluorobutyl isobutyl amino acids for gas chromatographic analysis. Journal of chromatography, 173: 53—63.
 Masters, P. M. and J. L. Bada, 1977: Racemization of isoleucine in fossil molluscs from Indian Middens and Interglacial Terraces in Southern California. Earth and Planetary Science Letters. 37: 173—183.

[1988年9月30日收到]

AMINO ACID RACEMIZATION DATING OF LATE PLEISTOCENE GASTROPOD SHELLS FROM SANSHANJI NEAR NANJING

Wang Jin-quan

(Nanjing Institute of Geology and Palaeontology, Academia Sinica)

Li Li-wen

(Nanjing Teachers University)

Summary

This paper deals with problems on amino acid racemization dating by means of D-alloisoleucine to L-isoleucine ratios and geochemical characters of amino acid shown by results from analysis on the total content of amino acids. The samples analysed were shells of *Bradybaena rauida* collected from the Pleistocene deposits at Sanshanji near Nanjing. The results indicate an evident increase in the D/L ratios with the deepening of deposits in the section. The alleu/iso ratio of 0.254 from the bottom of the section indicates an age of 18 468 yrs. While results from the determination on the total content of amino acids in the shell samples from the middle part of the section suggest a neutral by basic environment.