

湖泊磷的核磁共振(NMR)分析——1 环境标准样品的 ^{31}P -NMR 表征*

王晓钧¹, 丁士明^{2**}, 蒋海青¹, 白秀玲², 范成新²

(1: 南京工业大学材料科学与工程学院, 南京 210009)

(2: 中国科学院南京地理与湖泊研究所湖泊与环境国家重点实验室, 南京 210008)

摘要: 通过对环境标准样进行 ^{31}P -NMR 测试, 研究了磷的化学结构与化学位移的关系. 结果表明: 无机正磷酸盐(PO_4^{3-})化学位移在 6.412×10^{-6} , 焦磷酸盐的化学位移在 -4.353×10^{-6} ; 多聚磷的化学位移分布特点是: 主链末端磷化学位移在 -3.53×10^{-6} 至 -4.40×10^{-6} 之间, 中间磷在 -18.159×10^{-6} 至 -20.246×10^{-6} 之间, 有机磷中单酯和二酯的化学位移分别在 4.3540×10^{-6} 至 6.3652×10^{-6} 和 -0.107×10^{-6} 至 2.195×10^{-6} 之间, 部分二酯不稳定, 会降解为单酯; 磷酸盐的化学位移在 18.670×10^{-6} 至 21.460×10^{-6} 之间, 磷酸肌酸位于 -0.380×10^{-6} , 有机多聚磷中 α -P 的化学位移在 -8.833×10^{-6} 至 -9.449×10^{-6} 之间, 由于偶合作用产生 P 峰的裂分, P 峰的偶合符合核磁中 $n+1$ 的规则. 结构环境影响 ^{31}P 的化学位移值的偏移.

关键词: 环境标准样; ^{31}P 核磁共振; 化学位移; 沉积物

Characterizing phosphorus in environmental model samples by ^{31}P -NMR

WANG Xiaojun¹, DING Shiming², JIANG Haiqing¹, BAI Xiuling² & FAN Chengxin²

(1: *College of Material Science and Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, P.R. China*)

(2: *State Key Laboratory of Lake Science and Environment, Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, P.R. China*)

Abstract: By testing a series of solution ^{31}P -NMR spectroscopy of model phosphorus compounds including inorganic phosphate, orthophosphate monoesters and diesters, and organic polyphosphate(determined in 1mol/L NaOH and 16.7% D_2O), standard phosphorus spectra were obtained as references for solution ^{31}P -NMR studies of sediment phosphorus. The results showed that the ^{31}P -NMR signals of phosphorus compounds interested in environmental studies generally fall between 6.5×10^{-6} and -25×10^{-6} , including orthophosphate at 6.412×10^{-6} , pyrophosphate at -4.353×10^{-6} , polyphosphate at -18.159×10^{-6} to -20.246×10^{-6} (middle group P) and -3.53×10^{-6} to -4.40×10^{-6} (terminal P), orthophosphate monoesters at 4.3540×10^{-6} to 6.3652×10^{-6} , orthophosphate diesters at -0.107×10^{-6} to 2.195×10^{-6} , and organic polyphosphate at -8.833×10^{-6} to 9.499×10^{-6} for the α -P. Structure surroundings effect the chemical shifts of phosphorus compounds.

Keywords: Environmental model compounds; ^{31}P -NMR; chemical shift; sediment

我国湖泊富营养化日趋严重, 磷是导致这一问题的关键因素, 对其开展研究尤为重要. 现有的工作主要集中于湖泊磷的地球化学特征、水体磷循环与富营养化关系、沉积物磷形态与生物有效性、界面磷的再生与迁移机制、内源磷负荷的估算与污染治理等方面^[1-2], 主要围绕无机磷展开, 缺乏对有机磷的深入探讨. 有机磷(一般包括多聚磷)作为湖泊磷的主要组成部分, 其含量可占到水体总磷(包括溶解态和颗粒态)的80%以上^[1]. 由于能被浮游植物直接利用的溶解态正磷酸根磷仅为溶解态总磷的5%, 沉积物和悬浮颗粒物中有机磷的降解是维持其生长最重要的补偿途径之一^[3]. 以有机磷为参与主体的湖泊磷循环过程因而在很大程度上决定了水体初级生产力的水平, 研究有机磷的组成及转化特征是深入了解这一过

* 国家自然科学基金项目(40611087)、中国科学院优秀博士学位论文、院长奖获得者科研启动专项资金和中国科学院南京地理与湖泊研究所所长科研专项基金联合资助. 2007-04-25 收稿, 2007-07-30 收修改稿. 王晓钧, 男, 1963 生, 博士, 教授.

** 通讯作者; E-mail: smding@niglas.ac.cn.

程及其对富营养化贡献的重要环节。

以钼蓝比色法为基础的传统方法只能分析得到有机磷的总量,不能获取组成信息。针对这一不足,已发展了 ^{31}P 核磁共振(Nuclear Magnetic Resonance, NMR)^[4]、软X射线荧光光谱显微技术(Soft X-ray fluorescence Spectromicroscopy)^[5]、高效液相色谱(HPLC)^[6]、酶解^[7-8]、化学分离和提纯^[9]等方法用于分析有机磷的组成及其成份。 ^{31}P 核磁共振与其他方法相比,由于样品前处理简单、分析时破坏性小及组分分辨完全等优点而受到多数研究者的重视^[10]。利用 ^{31}P -NMR研究土壤有机磷已有大量报道^[11],针对湖泊样品的研究则处于起步阶段^[12-18]。本文利用NMR表征与环境样品有关的 ^{31}P -NMR谱,为进一步分析湖泊样品提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 磷标准化合物与实验仪器

环境样品中磷化合物主要有正磷酸、焦磷酸盐(二链的多聚磷)、多聚磷、单酯、二酯、磷酸盐和有机多聚磷等^[11],采用的标准化合物名称及厂家见表1。核磁共振仪为BRUKER AV400(SB),瑞士BRUKER公司。

表1 磷标准化合物
Tab.1 Model compounds of phosphorus

中文名称	英文名称	表征化合物	产地
磷酸氢二钾	Orthophosphate	正磷酸	国产
焦磷酸钠	Pyrophosphate	焦磷酸	国产
无机多聚磷	Polyphosphate	多聚磷	Sigma, 美国
5'-腺嘌呤核苷酸	Adenosine- 5'-monophosphate (AMP)	单酯	Amresco, 美国
β -甘油磷酸	β -glycerophosphate	单酯	Sigma, 美国
脱氧核糖核酸	Deoxyribonucleic acid (DNA)	二酯	Sigma, 美国
核糖核酸	Ribonucleic acid (RNA)	二酯	Sigma, 美国
磷脂酰胆碱, 卵磷脂	L-a phosphatidyl choline	二酯	Sigma, 美国
腺苷-5'-二磷酸二钠盐	Adenosine 5' diphosphate (ADP)	有机多聚磷	Sigma 美国
腺苷-5'-三磷酸二钠盐	Adenosine 5' triphosphate (ATP)	有机多聚磷	Amresco, 美国
羟基亚乙基二膦酸	HEDP	膦酸	国产
2-膦酰基丁烷-1,2, 4-三羧酸	PBTCA	膦酸	国产
磷酸肌酸	Phosphocreatine	膦酸	国产

1.2 样品制备与 NMR 实验

将磷标准化合物按 1mg/L 用 1mol/L NaOH 溶解,取 500 μl 加入到 NMR 样品管中,同时加入 100 μl D_2O ,充分混合后进行 NMR 实验。液相 NMR 实验经过优化,采用 BRUKER 标准腔 5mm BBO 探头, ^{31}P 谱的脉冲 $\text{P1}=5.90 \mu\text{s}$,脉冲功率 $\text{PL1}=-1.00 \text{ dB}$,谱宽 $\text{SW}=10.013 \times 10^{-6}$, ^{31}P 的共振频率为 161.98 MHz,循环延迟 $\text{d1}=3\text{s}$,扫描 3000 次左右。所有 ^{31}P 化学位移均参照了 85%的正磷酸,环境温度为 21 $^\circ\text{C}$ 。样品前处理及 NMR 参数设置参照同类研究^[19-21]。

2 结果与讨论

2.1 无机磷 ^{31}P -NMR 表征

无机磷样品是磷酸氢二钾、焦磷酸钠和多聚磷,核磁共振谱见图 1。在碱性溶液中,正磷酸是以 PO_4^{3-}

离子存在的, 只有唯一状态的磷, 所以在化学位移 6.412×10^{-6} 处表现为尖锐的单峰. 焦磷酸盐中的两个磷原子核是等价的, 焦磷酸也只有 -4.353×10^{-6} 处峰. 正磷酸因与三个羟基直接相连, 原子核的电子云密度较小, 核的磁屏蔽减小, 谱线向低场方向移动, 化学位移增大, 达到正的化学位移值.

无机多聚磷(含 P-O-P 键)由于磷原子在其分子链上所处位置的不同, 磷原子核的结构不是同一状态, 因此在 -3.533×10^{-6} 、 -3.794×10^{-6} 和 -4.400×10^{-6} 处, 以及 -18.159×10^{-6} 、 -18.798×10^{-6} 、 -19.859×10^{-6} 和 -20.05×10^{-6} 等处出现一系列的峰. 在无机多聚磷分子链上, 末端磷原子与焦磷酸中的磷原子都受两个羟基的吸电子效应; 中间的磷原子只与一个羟基直接相连, 磷原子上的电子受羟基的吸电子效应较小, 磷原子核上的电子云密度较大, 导致中间原子核的磁屏蔽增加, 谱线向高场方向移动, 化学位移减小, 因此化学位移集中在高场处的峰归属为无机多聚磷中的中间磷, 化学位移在 -3.647×10^{-6} 和 -3.794×10^{-6} 处的峰归属为多聚磷分子链上的末端磷, 末端磷的裂分是中间磷耦合的结果. 因为中间磷的个数多, 次末端磷与中间磷的差异在低场核磁谱仪中还暂时无法分辨, 同时两端磷对中间磷的偶合作用不能表现, 因此中间磷的谱峰表现在单一的 -20.05×10^{-6} 处峰. 旁侧 -18.159×10^{-6} 、 -18.798×10^{-6} 和 -19.859×10^{-6} 的小峰和 -4.400×10^{-6} 处的小峰被认为是分子链上磷原子个数不同的少量无机多聚磷或焦磷酸等. 末端磷和中间磷的积分比例为 1:27, 由此估算出多聚磷的链长为 56, 即中间有 54 个磷原子.

2.2 有机磷酸酯 ^{31}P -NMR 表征

磷酸单酯类样品为 β -甘油磷酸和 5'-腺嘌呤核苷酸(AMP), 其核磁共振谱见图 2 和图 3. β -甘油磷酸的图谱表现为两组峰, 一组为四重峰, 化学位移值分别是: 5.04×10^{-6} 、 5.09×10^{-6} 、 5.16×10^{-6} 、 5.21×10^{-6} , 一组为二重峰, 化学位移值分别是 5.52×10^{-6} 、 5.56×10^{-6} . AMP 的 NMR 图谱表现是一组三重峰, 峰值在化学位移 5.08×10^{-6} 、 5.05×10^{-6} 和 5.02×10^{-6} , 这是 *C 具有三种结构构象的缘故.

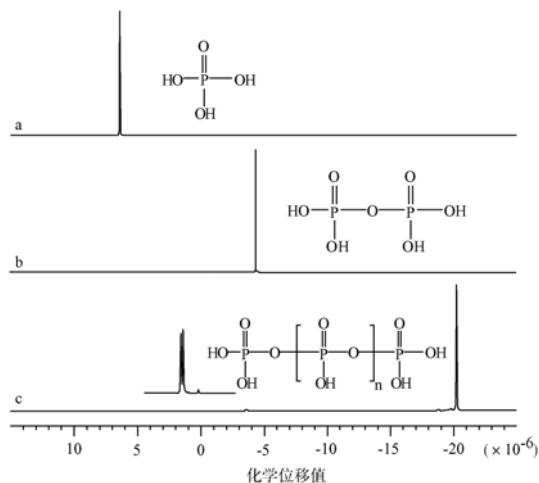


图 1 无机磷核磁共振谱(a: 正磷酸; b: 焦磷酸; c: 多聚磷)
Fig.1 ^{31}P -NMR spectra of model inorganic P compounds
(a: orthophosphate; b: Pyrophosphate; c: Polyphosphate)

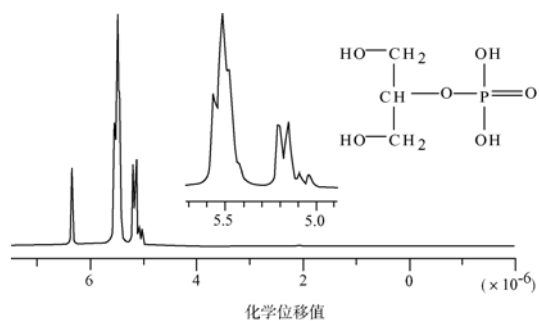


图 2 β -甘油磷酸核磁共振磷谱
Fig.2 ^{31}P -NMR spectra of β -glycerophosphate

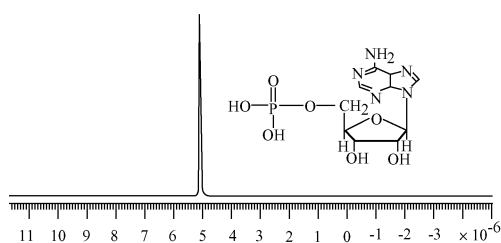


图 3 AMP(单酯)核磁共振磷谱
Fig.3 ^{31}P -NMR spectra of AMP for model
orthophosphate monoesters

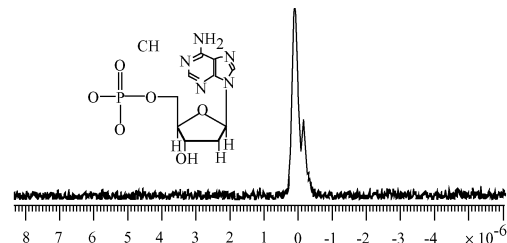


图 4 DNA 核磁共振磷谱
Fig.4 ^{31}P -NMR spectra of DNA

磷酸二酯类样品为脱氧核糖核酸(DNA)、酵母核糖核酸(RNA)和磷脂酰胆碱(俗称卵磷脂). DNA 在化学位移 -0.107×10^{-6} 和 0.160×10^{-6} 处出现了二个单峰(图 4); RNA 则表现出了降解的性质, 化学位移从以 0.94×10^{-6} 为主逐步变为 4.64×10^{-6} 、 4.73×10^{-6} 、 4.85×10^{-6} 和 5.15×10^{-6} 等单酯的特征谱带内, 这是 RNA 从二酯降解为单酯的特征(图 5). 卵磷脂同样表现出降解的性质, 从以化学位移为 1.121×10^{-6} 的二酯峰, 变为以化学位移 5.136×10^{-6} 、 5.185×10^{-6} 和 5.500×10^{-6} 为特征的单酯峰(图 6). 从三种标样的波谱可看出, 二酯的化学位移在 -0.107×10^{-6} 至 2.195×10^{-6} 之间, RNA 和卵磷脂在实验条件下表现出明显的降解行为.

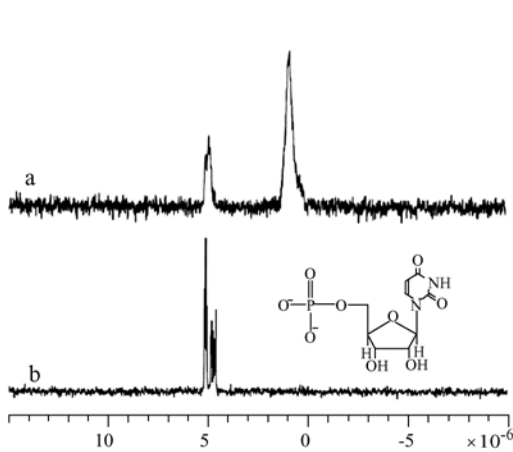


图 5 RNA 核磁共振谱 (a: 制备后 0.5h; b: 制备后 24h)
Fig.5 ^{31}P -NMR spectra of RNA
(a: 0.5h after preparation; b: 24h after preparation)

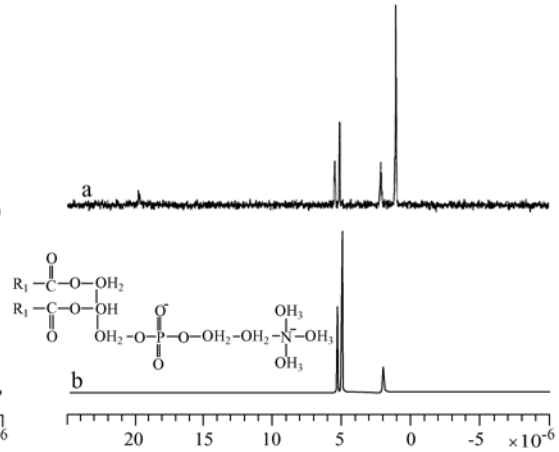


图 6 卵磷脂核磁共振谱 (a: 制备后 5h; b: 制备后 48h)
Fig.6 ^{31}P -NMR spectra of L-a phosphatidyl choline
(a: 5h after preparation; b: 48h after preparation)

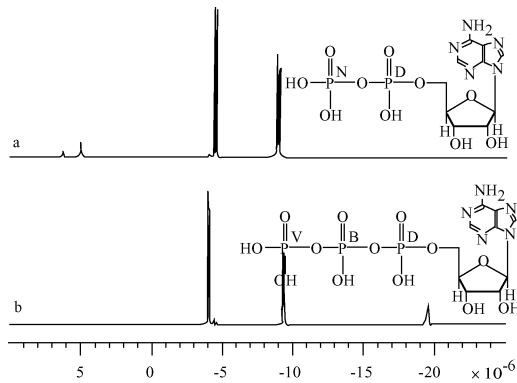


图 7 有机多聚磷核磁共振谱(a: ADP; b: ATP)
Fig.7 ^{31}P -NMR spectra of model organic Polyphosphate
(a: ADP; b: ATP)

α -P 的特征峰, 其裂分由 γ -P 对 α -P 的偶合作用加上 α -P 的三种不同结构状态共同决定的. 在 6.320×10^{-6} 、 5.031×10^{-6} 、 -19.351×10^{-6} 、 -19.579×10^{-6} 和 -19.464×10^{-6} 处同时出现微小峰, 这是样品中少量其它磷酸盐的谱峰.

ATP 的 α -P 峰位置在 -9.339×10^{-6} 和 -9.449×10^{-6} 处, 表现为多重峰, 多重峰产生的原因与 ADP 中 α -P 的裂分原因相同; γ -P 峰的位置在 -3.988×10^{-6} 和 -4.105×10^{-6} 处, 由偶合作用导致一双重峰产生; 但是由于结构中插入的 β -P 使得这两类 P 的化学位移值有差异; ATP 谱图中 -19.412×10^{-6} 、 -19.525×10^{-6} 、 -19.641×10^{-6} 处有三重峰, 文献[22]也认为这是有机多聚磷中的 β -P 被 α -P 和 γ -P 共同偶合产生的特征峰, 这种

将酯类与正磷酸比较, 由于酯类中的烷氧基取代了正磷酸中的羟基, 吸电效应变为供电效应, 且随着羟基被烷氧基取代个数的增加, 这种变化趋势趋于明显, 所以酯类的化学位移值比正磷酸的低, 也正是这样的因素, 使得在有机磷酸酯中, 二酯的化学位移较单酯的化学位移值低.

2.3 有机多聚磷 ^{31}P -NMR 表征

有机多聚磷样品为 ADP 和 ATP(图 7). ADP 在 -4.414×10^{-6} 和 -4.543×10^{-6} 处的峰为 γ -P, 它与无机多聚磷中末端磷的结构环境有相似性, 也产生偶合裂分. 由于它的斥电子烷基的作用, 使得 ADP 端基 P 的化学位移向高场方向偏移.

-8.833×10^{-6} 和 -9.000×10^{-6} 处的两个三重峰为

耦合符合核磁中 $n+1$ 的规则, 峰的强度依照多项式系数分布.

因 ADP 和 ATP 属于磷酸单酯(含有一个 P-O-C 键), 故将其与有机磷酸单酯 AMP 比较. ADP 和 ATP 的 α -P 其化学位移较 AMP 中的磷化学位移值向高场偏移了 13×10^{-6} 至 15×10^{-6} , 这是因为 AMP 中的磷原子与两个羟基直接相连, 而 ADP 和 ATP 中的 α -P 只与一个羟基直接相连, 所以 ADP 和 ATP 中 α -P 受羟基的吸电子效应小, 其原子核上的电子云密度大, 屏蔽效应增加, 谱线向高场移动, 化学位移值减小.

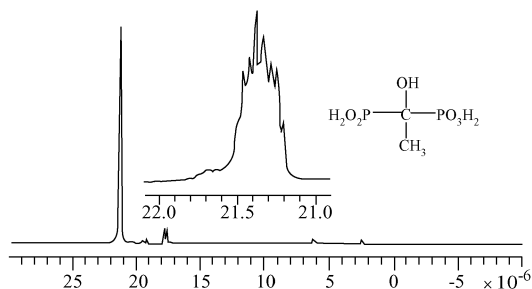


图 8 HEDP 核磁共振磷谱
Fig.8 ^{31}P -NMR spectra of HEDP

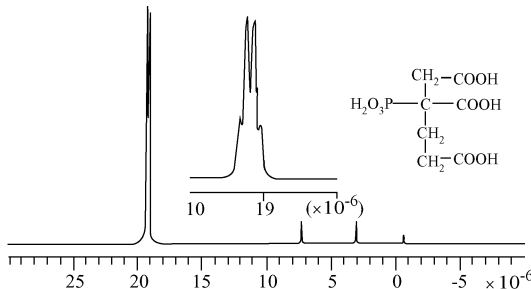


图 9 PBTCA 核磁共振磷谱
Fig.9 ^{31}P -NMR spectra of PBTCA

2.4 磷酸酯 ^{31}P -NMR 表征

磷化合物样品为羟基亚乙基二磷酸(HEDP), 2-膦酰基丁烷-1,2,4-三羧酸(PBTCA)和磷酸肌酸, 核磁共振谱如图 8、9 和 10 所示. HEDP 的化学位移在 21.460×10^{-6} 、 21.424×10^{-6} 、 21.380×10^{-6} 、 21.337×10^{-6} 、 21.291×10^{-6} 、 21.253×10^{-6} 和 21.209×10^{-6} 处, 表现为一组多重峰, 每端 P 的结构有 3 种不同态, 每端选出 1 种结构态同另一端选出的 1 种结构态组合, 可以出现 $C_{31} \times C_{31} = 9$ 种结构组合态, 所以该多重峰精细状态应当为 9 重峰. PBTCA 的化学位移在 19.328×10^{-6} 、 19.233×10^{-6} 、 19.136×10^{-6} 、 19.045×10^{-6} 处, 且为一对称的四重峰, 比例为 1:3:3:1, 说明该结构具有弱耦合的裂分性. 磷酸肌酸在化学位移 -0.380×10^{-6} 处是一个多重峰, 产生的原因同 PBTCA. 由于磷酸肌酸的分子比 PBTCA 大, 所以该分子的峰形裂分度没有 PBTCA 的裂分度清楚.

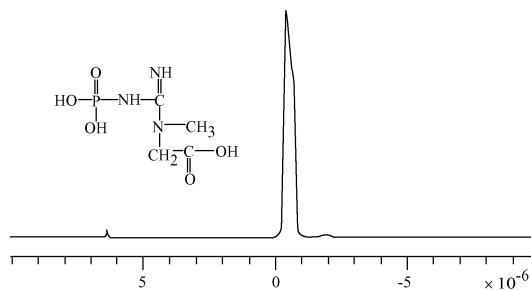


图 10 磷酸肌酸核磁共振谱
Fig.10 ^{31}P -NMR spectra of phosphocreatine

致谢: 感谢匿名审稿专家提出的宝贵意见.

3 参考文献

- [1] Wetzel RG eds. Limnology: lake and river ecosystems. 3rd edition. San Diego: Academic Press, 2001: 239-288.
- [2] 范成新, 王春霞. 长江中下游湖泊环境地球化学与富营养化. 北京: 科学出版社, 2007.
- [3] 高光, 秦伯强, 朱广伟等. 太湖梅梁湾中碱性磷酸酶的活性及其与藻类生长的关系. 湖泊科学, 2004, 16(3): 245-251.
- [4] New RH, Tate KR. Soil phosphorus characterization by ^{31}P nuclear magnetic resonance. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 1980, 11: 835-842.
- [5] Brandes JA, Ingall E, Paterson D. Characterization of minerals and organic phosphorus species in marine sediment using X-ray fluorescence spectromicroscopy. *Marine Chemistry*, 2007, 103: 250-265.
- [6] Nanny MA, Kim S, Minear RA. Aquatic soluble unreactive phosphorus: HPLC studies on concentrated water samples. *Water Research*, 1995, 29(9): 2138-2148.
- [7] Dao TH. Ligands and phytase hydrolysis of organic phosphorus in soils amended with dairy manure. *Agronomy Journal*, 2004,

- 96:1188-1195.
- [8] Zhong QH, Gupal ST, Honeycutt CW *et al.* An enzymatic hydrolysis approach for characterizing labile phosphorus forms in dairy manure under mild assay conditions. *Bioresource Technology*, 2006, **97**(14): 1660-1668.
- [9] Masahiro S, Akiyoshi K. Origin and distribution of inositol hexaphosphate in estuarine and coastal sediments. *Limnol Oceanogr*, 1995, **40**(7): 1254-1261.
- [10] Turner BL. Optimizing phosphorus characterization in animal manures by solution phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Environment Quality*, 2004, **33**: 757-766.
- [11] Cade-Menun BJ. Characterizing phosphorus in environmental and agricultural samples by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Talanta*, 2005, **66**: 359-371.
- [12] Ahlgren J, Tranvik L, Gogoll A *et al.* Sediment depth attenuation of biogenic phosphorus compounds measured by ³¹P NMR. *Environmental Science & Technology*, 2005, **39**: 867-872.
- [13] Ahlgren J, Reitzel K, Danielsson R *et al.* Biogenic phosphorus in oligotrophic mountain lake sediments: Differences in composition measured with NMR spectroscopy. *Water Research*, 2006, **40**: 3705-3712.
- [14] Reitzel K, Ahlgren J, De Brabandere H *et al.* Degradation rates of organic phosphorus in lake sediment. *Biogeochemistry* (DOI 10.1007/s10533-006-9049-z).
- [15] Carman R, Edlund G, Damberg C. Distribution of organic and inorganic phosphorus compounds in marine and lacustrine sediments: A ³¹P NMR study. *Chemical Geology*, 2000, **163**:101-114.
- [16] Reitzel K, Ahlgren J, Gogoll A *et al.* Effects of aluminum treatment on phosphorus, carbon, and nitrogen distribution in lake sediment: A ³¹P NMR study. *Water Research*, 2006, **40**: 647-654.
- [17] Hupfer M, Gächter R, Rügger H. Polyphosphate in lake sediments: ³¹P NMR spectroscopy as a tool for its identification. *Limnol Oceanogr*, 1995, **40**(3): 610-617.
- [18] Hupfer M, Rube B, Schmeider P. origin and diagenesis of polyphosphate in lake sediments: A ³¹P NMR study. *Limnol Oceanogr*, 2004, **49**(1): 1-10.
- [19] Turner BL, Mahieu N, Condron LM. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectral assignments of phosphorus compounds in soil NaOH-EDTA extracts. *Soil Science Society of America Journal*, 2003, **67**: 497-510.
- [20] McDowell RW, Stewart I, Cade-Menun BJ. An examination of spin-lattice relaxation times for analysis of soil and manure extracts by liquid state phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Environmental Quality*, 2006, **35**: 293-302.
- [21] Crouse DA, Siczputowska-Gracz H, Mikkelsen RL. Optimization of sample pH and temperature for phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy of poultry manure extracts. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 2000, **31**(1-2): 229-240.
- [22] 赵玉芬, 赵国辉, 麻 远. 磷与生命化学. 北京: 清华大学出版社, 2005: 57-58.