

# 基于液相<sup>31</sup>P核磁共振分析的沉积物样品制备方法研究

白秀玲<sup>1,2</sup>, 周云凯<sup>3</sup>, 李斌<sup>2</sup>, 丁士明<sup>2\*</sup>

(1. 河南大学资源与环境研究所, 开封 475004; 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; 3. 河南大学环境与规划学院, 开封 475004)

**摘要:**液相<sup>31</sup>P核磁共振(phosphorus-31 nuclear magnetic resonance, <sup>31</sup>P-NMR)是近年来用于分析沉积物有机磷组成的新技术. 本研究围绕<sup>31</sup>P-NMR分析沉积物样品的制备过程(包括样品前处理方法、提取时间、提取剂比例、样品浓缩等)进行探讨. 结果表明,采用风干的沉积物样品进行提取,磷的提取效率明显提高. 提取过程中,沉积物磷的释放主要在前8 h,为提高磷的提取效率,可将提取时间延长至12~16 h. 提取比例 $[m(\text{沉积物}):V(\text{提取剂})]$ 1:8与1:20相比,在浓缩倍数相同的情况下,前者获得的<sup>31</sup>P-NMR信号峰多于后者,因此提取比例倾向于使用1:8. 提取液样品在28℃下旋转蒸发浓缩,并经低温离心后,磷无明显损失.

**关键词:**有机磷;沉积物;<sup>31</sup>P核磁共振;样品制备;方法

中图分类号:X132 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2011)07-1980-06

## Refining Sample Preparation Procedures for Solution <sup>31</sup>P-NMR Analysis of Organic P in Sediment

BAI Xiu-ling<sup>1,2</sup>, ZHOU Yun-kai<sup>3</sup>, LI Bin<sup>2</sup>, DING Shi-ming<sup>2</sup>

(1. Institute of Natural Resources and Environment, Henan University, Kaifeng 475004, China; 2. State Key Laboratory of Lake Science and Environment, Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 3. College of Environment and Planning, Henan University, Kaifeng 475004, China)

**Abstract:** Solution phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy (<sup>31</sup>P-NMR) is a novel technology in characterization of organic phosphorus (P) composition in sediments. This study was aim to refine sample preparation procedures for <sup>31</sup>P-NMR, including determination of sample pretreatment, extraction time, sample to extractant ratio and concentration method. The results showed that recovery of P with air dried sample treatment was higher than that for the fresh samples. Most of the P was extracted within the first 8 hours, and the time could extend to 12 to 16 hours in order to improve the recovery of P. Using the extraction ratio  $[m(\text{sediment}):V(\text{extractant})]$  of 1:8 received more spectral signals compared to 1:20 when both the extracts were concentrated at the same time. No evident loss of P was found when the extract was concentrated at 28℃ followed by centrifugation under low temperature.

**Key words:** organic phosphorus; sediment; phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy (<sup>31</sup>P-NMR); sample preparation; method

有机磷是沉积物磷的重要组成部分,与无机磷相比,其结构和组成更加复杂,随着现代仪器分析技术的发展,对沉积物有机磷的研究逐渐得以深入. 目前,沉积物有机磷的分析方法主要有高温燃烧法<sup>[1]</sup>、核磁共振波谱法<sup>[2]</sup>、酶解法<sup>[3]</sup>、X-射线荧光光谱法<sup>[4]</sup>及色谱与质谱联用法<sup>[5]</sup>等. 其中,液相<sup>31</sup>P核磁共振(<sup>31</sup>P-NMR)以样品前处理相对简单、有机磷组分分析完全等优点,被较多地应用到土壤、海洋沉积物、沼泽湿地和湖泊沉积物有机磷组成的分析中<sup>[6]</sup>. 该技术分析过程将涉及到样品前处理、提取试剂和提取时间的选择、样品与提取剂的比例、提取液浓缩等过程. 由于样品制备过程并不统一,不同制备方法所得到的结果缺乏可比性. Cade-Menun<sup>[7]</sup>和 Turner<sup>[8]</sup>等分别针对海洋沉积物和土壤研究了不同处理对磷回收比例及组成变化的影响,对于湖泊沉

积物,则缺乏相应的研究. 本研究选择有代表性的湖泊沉积物,采用钼酸铵比色法与液相<sup>31</sup>P-NMR分析技术,分析了<sup>31</sup>P-NMR分析样品的制备过程,以期为该技术在湖泊沉积物中的应用提供方法依据.

### 1 材料与方法

#### 1.1 样品采集

沉积物与提取剂提取比例实验:选择我国43个湖泊的45个表层沉积物,采用彼得森采样器在

收稿日期:2010-08-14;修订日期:2010-10-15

基金项目:国家自然科学基金项目(40871220,41001319);中国科学院南京地理与湖泊研究所前沿领域项目(CXNIGLAS200811)

作者简介:白秀玲(1980~),女,博士,主要研究方向湖泊污染与生态修复, E-mail:bxling@163.com

\* 通讯联系人, E-mail:smding@niglas.ac.cn

2001~2007年期间采集.上述湖泊包括东部平原的18个湖泊、云贵高原的7个湖泊、青藏高原的10个湖泊和蒙古-新疆高原的8个湖泊,沉积物样品绝大部分来自湖心.对于太湖和滇湖,在污染区和未污染区各采集一个样品,采集的样品经风干、研磨、过筛(100目)后,室温密封保存以备分析.

确定样品前处理方式与提取时间,分析浓缩过程影响实验:主要选择太湖和青海湖表层沉积物.利用柱状采泥器现场收集表层1cm沉积物,一部分经风干、研磨、过筛(100目)后,室温密封保存以供分析,剩余的样品作为新鲜样品直接进行分析.

## 1.2 实验设计

### 1.2.1 样品前处理

采用2种方法对太湖和青海湖沉积物样品进行前处理,其一是自然风干并研磨过筛,其二是新鲜沉积物样品.对于新鲜沉积物样品,提取前先离心,取出沉积物,分析含水率,折合成干重计算其提取比例.提取剂选择目前在沉积物有机磷方面应用相对广泛的0.25 mol/L NaOH + 50 mmol/L EDTA<sup>[9-11]</sup>.

将上述2种方法处理后的沉积物与提取剂按照 $m(\text{沉积物}):V(\text{提取剂})=1:8$ 混合,在20℃条件下振荡提取16h,然后在10 000 r/min下离心10 min,转移上层清液以备分析.提取液总磷采用过硫酸钾消解,钼酸铵比色方法测定,磷酸根直接用钼酸铵比色测定<sup>[12]</sup>,总磷与磷酸根之差为提取液中有机磷的含量<sup>[1]</sup>.

将不同处理的提取液各取10 mL,分别在28℃下旋转蒸发浓缩至1 mL,浓缩样品冷冻贮存直到分析.<sup>31</sup>P-NMR分析前,浓缩样品先以10 000 r/min的转速离心10 min,并在提取液中加入0.1 mL的D<sub>2</sub>O锁定信号,采用BRUKER标准腔5 mm的BBO探头,<sup>31</sup>P谱的脉冲PI = 5.9 μm,脉冲功率PLI = -1.00 dB,<sup>31</sup>P的共振频率为161.98 MHz,循环延迟dl = 3 s,扫描20 000次左右,测定温度为20℃,所有<sup>31</sup>P化学位移均参照85%的正磷酸.参考文献<sup>[13,14]</sup>确定不同化学位移磷的组成.

### 1.2.2 提取时间

采用0.25 mol/L NaOH + 50 mmol/L EDTA,将太湖沉积物与提取剂按照 $m(\text{沉积物}):V(\text{提取剂})=1:8$ 混合,在20℃条件下振荡提取,提取时间设置为2、4、8、16、24 h,然后在10 000 r/min下离心10 min,保留上层清液.提取液总磷用过硫酸钾消解,然后用钼酸铵比色<sup>[12]</sup>.

### 1.2.3 沉积物与提取剂提取比例

选择我国43个湖泊的45个沉积物表层样品,参考目前沉积物及土壤磷提取比例<sup>[14-16]</sup>, $m(\text{沉积物}):V(\text{提取剂})$ 比例设置为1:20和1:8,提取剂采用0.25 mol/L NaOH + 50 mmol/L EDTA,在20℃条件下振荡提取16 h,然后在10 000 r/min下离心10 min,转移上层清液以备分析.提取液总磷采用过硫酸钾消解,然后钼酸铵比色方法测定,磷酸根是直接采用钼酸铵比色测定<sup>[12]</sup>,总磷与磷酸根之差为提取液中有机磷的含量<sup>[1]</sup>.

同时,选择上述43个湖泊中的一个代表性湖泊沙湖沉积物,2种比例下的提取液各取10 mL,分别在28℃下旋转蒸发浓缩至1 mL,浓缩样品冷冻贮存直到分析.<sup>31</sup>P-NMR分析前操作步骤如1.2.1节.

### 1.2.4 样品浓缩与离心过程

选择太湖和青海湖沉积物,采用0.25 mol/L NaOH + 50 mmol/L EDTA进行提取,按照 $m(\text{沉积物}):V(\text{提取剂})=1:8$ 混合,在20℃条件下振荡提取16 h,然后在10 000 r/min下离心10 min后,转移上层清液.取10 mL上层清液在28℃下旋转蒸发浓缩至1 mL,将浓缩溶液全部取出,在-18℃冷冻1 h后,室温下解冻并离心,将离心后的样品稀释到浓缩前体积.采用过硫酸钾消解,钼酸铵比色方法测定浓缩前后溶液磷的变化<sup>[12]</sup>.

## 2 结果与分析

### 2.1 样品前处理对沉积物磷提取的影响

太湖和青海湖沉积物样品在2种不同的处理方法下,NaOH + EDTA提取沉积物总磷及利用液相<sup>31</sup>P-NMR测定磷的组成和含量见表1.与新鲜样品相比,太湖风干沉积物总磷提取量从1 136 mg·kg<sup>-1</sup>增加到1 226 mg·kg<sup>-1</sup>,增加了8%,而青海湖风干沉积物总磷提取量从24.8 mg·kg<sup>-1</sup>增加到32.8 mg·kg<sup>-1</sup>,增加了34%,这也和对土壤及海洋沉积物预处理研究结果类似,样品干燥改变了其渗透性和微生物细胞的溶解性,磷的提取比例就会增加;研磨作用也会破坏沉积物结构,特别对钙含量较高的湖泊沉积物,矿物质外壳的破坏促进磷的释放,风干研磨青海湖沉积物磷提取率明显增加可能和这个原因密切相关.样品干燥处理在增加磷提取率的同时也可能促使有机磷水解,如图1和表1所示,太湖沉积物风干处理后,DNA含量明显减少;并且风干后太湖和青海湖沉积物样品,单酯/二酯比例均显著增加,表明样品风干过程中二酯水解为单酯的可能性存在.本研究中,缺少对不同时期不同处理方法下样

品的比较,根据 Cade-Menun 等<sup>[7]</sup>研究发现,虽然处理方式不同会导致磷的提取及组成发生变化,但这种变化与不同时期磷组成及变化相比,可以忽略. 根据王圣瑞等<sup>[17]</sup>研究结果,新鲜样品直接用于分析,在一定程度上低估了各有机磷组分,特别是对有效性较强的活性有机磷和中等活性有机磷影响较大. 另外,由于样品含水率差别较大及样品中动植物碎屑等杂质很难用肉眼完全去除,一定程度上降低了

新鲜样品的均匀性和代表性,因此分析结果的重现性很难有保证. 针对样品干燥方式对沉积物有机磷分析的影响,周毅等<sup>[18]</sup>通过添加有机磷标样探讨了干燥温度的高低对海洋沉积物有机磷分析的影响,结果表明在较高的温度下干燥会低估有机磷的含量,建议冷冻干燥处理样品较好. 因此,为增加有机磷提取效率,沉积物样品的前处理最好是先冷冻干燥,再研磨过筛处理.

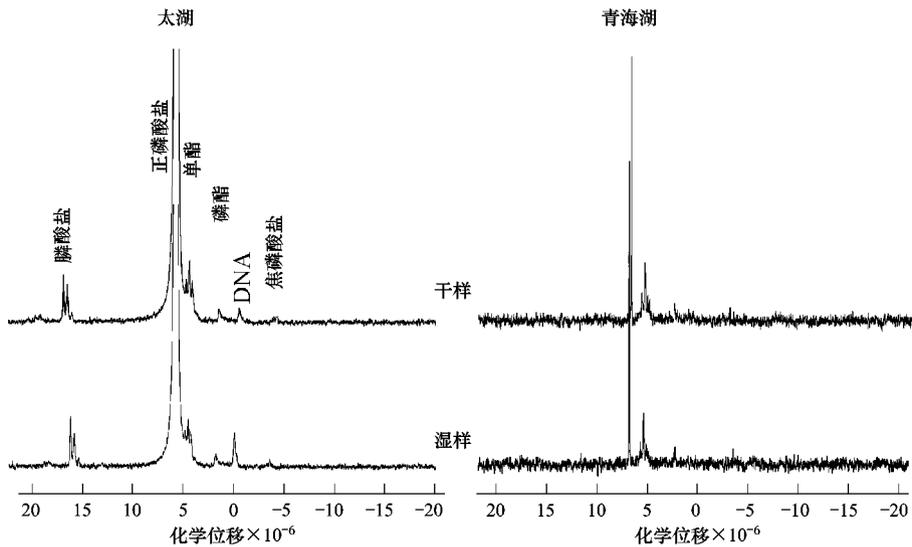


图1 太湖和青海湖沉积物样品不同处理方式下的<sup>31</sup>P-NMR 图谱

Fig. 1 <sup>31</sup>P-NMR spectra of NaOH + EDTA extracts from fresh and air-dried sediments of Lakes Taihu and Qinghai

表1 NaOH + EDTA 提取沉积物总磷 (TP) 及利用<sup>31</sup>P-NMR 测定的磷组成含量/mg·kg<sup>-1</sup>

Table 1 Concentrations of individual P compounds and total P in sediments/mg·kg<sup>-1</sup>

样品	处理方法	TP	磷酸	正磷酸	单酯	磷脂	DNA	焦磷酸	单酯/二酯
太湖	新鲜	1136	14.3	1086.9	23.2	3.4	7.2	1.1	2.2
	风干	1226	15.5	1175.2	24.7	4.1	5.1	1.4	2.7
青海湖	新鲜	24.8	n. d.	10.9	11.2	2.0	n. d.	0.8	5.6
	风干	32.8	n. d.	12.1	17.9	2.8	n. d.	0.4	6.4

## 2.2 提取时间对沉积物磷回收的影响

0.25 mol/L NaOH + 50 mmol/L EDTA 提取太湖沉积物总磷随时间的变化如图2. 前8 h 提取沉积物总磷增幅较大,提取时间从2 h 增加到8 h,沉积物总磷提取量从301 mg·kg<sup>-1</sup>增加到344 mg·kg<sup>-1</sup>;提取时间从8 h 增加到24 h,沉积物总磷提取量变化幅度较小,为340~344 mg·kg<sup>-1</sup>. 为保证沉积物磷提取充分,沉积物磷提取时间最好延长至12~16 h,这也和有机磷形态分级提取中选择 NaOH 提取中等稳定性有机磷所用时间一致<sup>[19]</sup>.

## 2.3 沉积物与提取剂提取比例对磷提取与组成的影响

从图3可以看出,对于43个湖泊的45个沉积

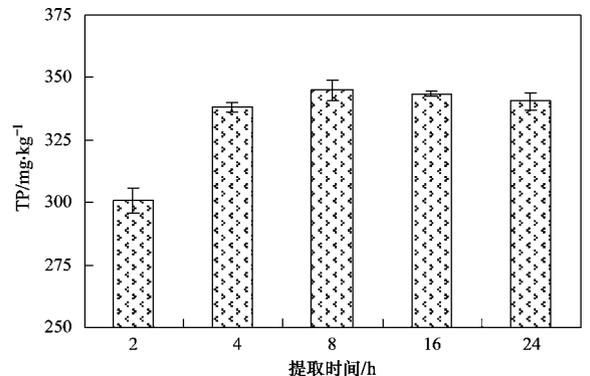


图2 NaOH + EDTA 提取沉积物总磷 (TP) 随时间变化

Fig. 2 Variation of total phosphorus in NaOH + EDTA extracts with time

物,不同提取比例提取的无机磷和有机磷均呈显著正相关,表明沉积物与提取剂的比例变化并不影响提取剂对磷的选择,即2种情况下提取剂对磷的提取具有一致性.但沉积物与提取剂的比例( $m:V$ ,下同)为1:8,其提取液中无机磷和有机磷含量均高于提取比例为1:20时,约是提取比例为1:20时的2~3倍(图4).因此,2种情况下若将提取液浓缩相同的倍数,前者溶液磷浓度明显高于后者.溶液中元素含量高会影响液相<sup>31</sup>P-NMR的灵敏度<sup>[14,20]</sup>,一些含量较低的有机磷化合物难以被液相<sup>31</sup>P-NMR检测出

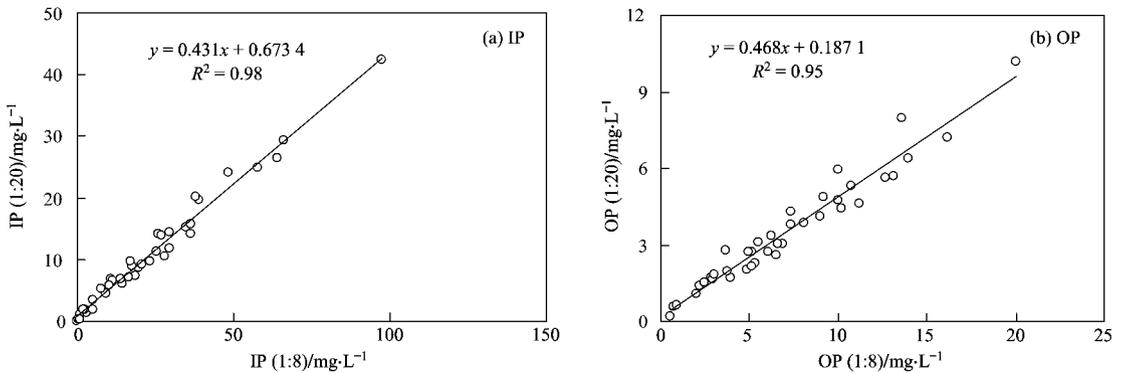


图3 沉积物与NaOH不同提取比例下,提取液中无机磷和有机磷的关系

Fig. 3 Relationships of inorganic and organic P extracted by NaOH-EDTA between using extraction ratios of 1:20 and 1:8

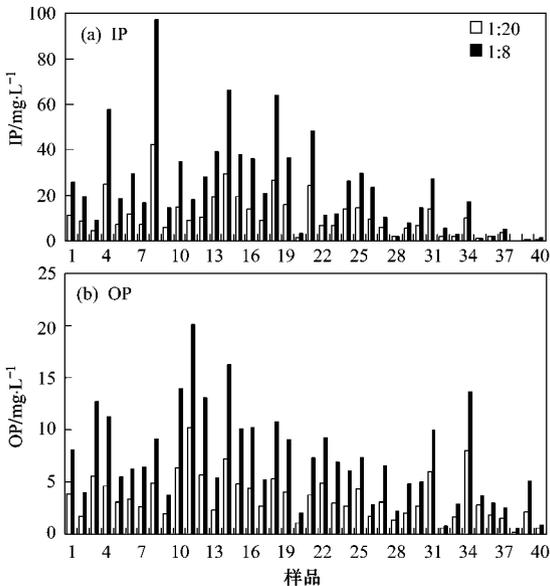


图4 沉积物与NaOH-EDTA比例为1:8和1:20情况下提取液中无机磷(IP)和有机磷(OP)含量变化

Fig. 4 Contents of inorganic and organic P extracted by NaOH-EDTA between using extraction ratios of 1:20 and 1:8

## 2.4 样品浓缩过程对提取液磷回收的影响

太湖沉积物NaOH+EDTA提取液在浓缩、离心

来.通过对沙湖沉积物液相<sup>31</sup>P-NMR分析也可以看出(图5),样品在浓缩倍数相同的情况下,与提取比例为1:8的图谱相比,提取比例为1:20的图谱中缺少磷脂,并且单酯峰跨度较宽,影响磷组成比例计算的准确性.若要液相<sup>31</sup>P-NMR测定时2种情况下磷浓度相当,则需提高比例为1:20提取液的浓缩倍数,这样样品制备需要耗费时间更长,浓缩过程中有机磷水解或与金属离子沉淀的几率会大幅度增加,因此制备液相<sup>31</sup>P-NMR分析的样品时,提取比例倾向于使用1:8.

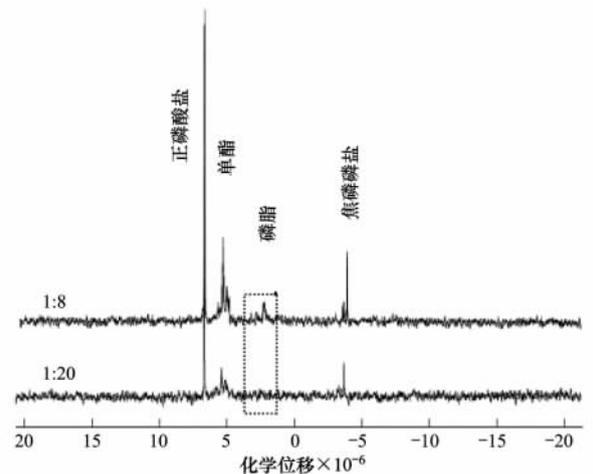
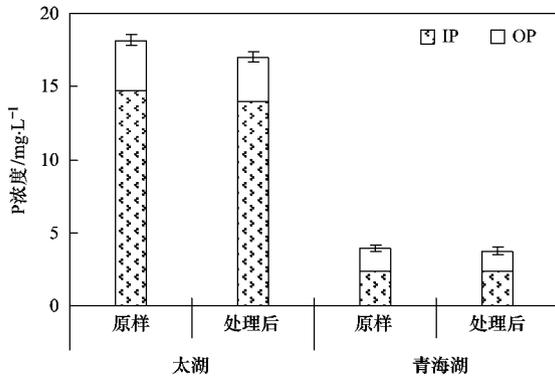


图5 沙湖沉积物与NaOH+EDTA比例为1:8和1:20情况下<sup>31</sup>P-NMR图谱

Fig. 5 <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy of NaOH + EDTA extracts from Lake Shahu, with the extraction ratios of 1:8 and 1:20

处理前后总磷平均值分别为 $18.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $17.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,有机磷平均值分别为 $3.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $3.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;青海湖沉积物NaOH+EDTA提取液在浓缩、离心处理前后总磷分别为 $3.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $3.7$

$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 有机磷平均值分别为  $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $1.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (图 6), 将处理前后样品中总磷和有机磷含量进行  $t$  检验, 结果表明处理前后差异不显著 ( $p > 0.05$ ), 这与 Hupfer 等<sup>[21]</sup> 报道的样品在冷冻和储存过程中磷的变化差异不显著一致, 说明样品浓缩和离心过程符合样品制备的标准。



处理包括浓缩和冷冻离心

图 6 样品制备过程对提取液磷的影响

Fig. 6 Influence of sample preparation including of concentration and centrifugation on phosphorus in NaOH + EDTA extracts

### 3 结论

(1) 利用液相<sup>31</sup>P-NMR 研究湖泊沉积物有机磷组成, 沉积物样品的处理方式采用自然风干要优于湿样, 自然风干可以提高磷提取效率, 同时又能保证样品均匀性和代表性, 结果重复性也较高。

(2) 提取过程中, 沉积物磷释放主要在前面 8 h, 为尽可能提高磷提取效率, 一般将提取时间延长至 12 ~ 16 h。

(3) 在浓缩倍数相同的情况下沉积物与提取剂提取比例为 1: 8 要优于 1: 20。

(4) 提取液在 28℃ 下旋转蒸发浓缩, 并低温离心, 该过程中磷的变化并不显著。

致谢: 感谢南京农业大学时丹同学和东南大学刘韬同学在实验过程中给予的帮助。

#### 参考文献:

[ 1 ] Ruban V, López-Sánchez J F, Pardo P, *et al.* Selection and evaluation of sequential extraction procedures for the determination of phosphorus forms in lake sediment [J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 1999, **1**: 51-56.

[ 2 ] Carman R, Edlund G, Damberg C. Distribution of organic and inorganic phosphorus compounds in marine and lacustrine sediments: a <sup>31</sup>P NMR study [J]. *Chemical Geology*, 2000, **163**: 101-114.

[ 3 ] He Z Q, Honeycutt C W. Enzymatic characterization of organic

phosphorus in animal manure [J]. *Journal of Environmental Quality*, 2001, **30**: 1685-1692.

- [ 4 ] Brandes J A, Ingall E, David P. Characterization of minerals and organic phosphorus species in marine sediments using X-ray fluorescence spectromicroscopy [J]. *Marine Chemistry*, 2007, **103**: 256-265.
- [ 5 ] Cooper W T, Llewelyn J M, Bennett G L, *et al.* Mass spectrometry of natural organic phosphorus [J]. *Talanta*, 2005, **66**: 348-358.
- [ 6 ] Cade-Menun B J. Characterizing phosphorus in environmental and agricultural samples by <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. *Talanta*, 2005, **66**: 359-371.
- [ 7 ] Cade-Menun B J, Benitez-Nelson C R, Pellechia P, *et al.* Refining P- 31 nuclear magnetic resonance spectroscopy for marine particulate samples: Storage conditions and extraction recovery [J]. *Marine Chemistry*, 2005, **97**: 293-306.
- [ 8 ] Turner B L, Newman S, Cheesman A W, *et al.* Sample pretreatment and phosphorus speciation in wetland soils [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2007, **71**: 1538-1546.
- [ 9 ] Zhang R Y, Wu F C, He Z Q, *et al.* Phosphorus composition in sediments from seven different trophic lakes, China: a phosphorus- 31 NMR study [J]. *Journal of Environmental Quality*, 2009, **38**: 353-359.
- [ 10 ] Ahlgren J, Reitzel K, Tranvik L, *et al.* Degradation of organic phosphorus compounds in anoxic Baltic Sea sediments: A <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance study [J]. *Limnology and Oceanography*, 2006, **51**(5): 2341-2348.
- [ 11 ] Liu J Y, Wang H, Yang H J, *et al.* Detection of phosphorus species in sediments of artificial landscape lakes in China by fractionation and phosphorus- 31 nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. *Environmental Pollution*, 2009, **157**: 49-56.
- [ 12 ] Murphy J, Riley J P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural water [J]. *Analytica Chimica Acta*, 1962, **27**: 31-36.
- [ 13 ] 王晓钧, 丁士明, 蒋海青, 等. 湖泊磷的核磁共振(NMR)分析——1 环境标准样品的<sup>31</sup>P-NMR 表征 [J]. *湖泊科学*, 2008, **20**(1): 45-50.
- [ 14 ] Turner B L, Mahieu N, Condon L M. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectral assignments of phosphorus compounds in soil NaOH-EDTA extracts [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2003, **67**: 497-510.
- [ 15 ] Cade-Menun B J, Liu C W, McColl J G. Soil and litter phosphorus- 31 nuclear magnetic resonance spectroscopy: extractants, metal, and phosphorus relaxation times [J]. *Journal of Environmental Quality*, 2002, **21**: 457-465.
- [ 16 ] Ahlgren J, De Brabandere H, Reitzel K, *et al.* Sediment phosphorus extractants for phosphorus- 31 nuclear magnetic resonance analysis: A quantitative evaluation [J]. *Journal of Environmental Quality*, 2007, **36**: 892-898.
- [ 17 ] 王圣瑞, 金相灿, 梁海清. 不同预处理方法对湖泊沉积物有机磷分级的影响 [J]. *中国农学通报*, 2007, **23**(4): 355-359.
- [ 18 ] 周毅, 张福绥, 杨红生, 等. 干燥方式对沉积物样品有机磷

- 分析的影响[J]. 海洋环境科学, 2002, **21**(1): 60-62.
- [19] Bowman R A, Cole C V. An exploratory method for fractionation of organic phosphorus from grassland soils [J]. Soil Science, 1978, **125**: 95-101.
- [20] 钱轶超,陈英旭,楼莉萍,等. 核磁共振技术在沉积物磷素组分及迁移转化规律研究中的应用[J]. 应用生态学报,2010, **21**(7):1892-1898.
- [21] Hupfer M, Rube B, Schmieder P. Origin and diagenesis of polyphosphate in lake sediments: A <sup>31</sup>P-NMR study [J]. Limnology and Oceanography, 2004, **49**: 1-10.