

## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

### KVANTITATIVNÍ $^{31}\text{P}$ NMR SPEKTROSKOPIE HUMINOVÝCH KYSELIN

FRANTIŠEK NOVÁK<sup>a</sup>, RICHARD HRABAL<sup>b</sup>,  
IVANA BARTOŠOVÁ<sup>b</sup> a JIŘÍ KALČÍK<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ústav půdní biologie AV ČR, Na Sádkách 7, 370 05 České Budějovice, <sup>b</sup> NMR laboratoř, VŠCHT Praha, Technická 1905, 166 28 Praha 6 – Dejvice  
novakf@dale.uek.cas.cz

Došlo 4.7.03, přepracováno 15.3.04, přijato 31.3.04.

Klíčová slova:  $^{31}\text{P}$ -NMR, difosforečnany, fosfolipidy, fosfonáty, huminové kyseliny, monoestery kyseliny fosforečné

#### Úvod

Přeměny anorganických a organických sloučenin fosforu v přírodě jsou velmi úzce propojeny v koloběhu fosforu. Přestože některé části tohoto koloběhu byly klasickými analytickými metodami prostudovány poměrně detailně, mechanismy přeměn organického fosforu jsou známy nedostatečně, neboť většina údajů byla získána nepřímými postupy, jejichž výsledky často nelze jednoznačně interpretovat. Proto se postupně prosazuje přímé studium různých frakcí fosforu v přírodě, především humusových kyselin, metodou  $^{31}\text{P}$  NMR spektroskopie. Kvalitativně nové informace mění přežívající názory na koloběh i dostupnost fosforu v ekosystémech a mohou ovlivnit řadu oborů základního i aplikovaného výzkumu, např. pedologii, geobotaniku, lesnictví a zemědělství, i přispět k řešení tak významných problémů životního prostředí, jako je eutrofizace vod nebo sorpce a dostupnost těžkých kovů v půdě.

Huminové kyseliny jsou amorfní polydisperzní látky žlutohnědé až černé barvy s poměrně vysokou molekulovou hmotností. Jsou rozpustné v alkalickém prostředí (0,1 M-NaOH), v kyselém prostředí (pH < 2) se srážejí. Půdní huminové kyseliny (HK) obsahují přibližně 41–57 % uhlíku, 33–54 % kyslíku, 3,5–7 % vodíku a 0,7–4,5 % dusíku v bezpopelové sušině. Obsah fosforu v půdních HK je poměrně nízký, běžně se pohybuje<sup>1</sup> okolo 800–1500 mg.kg<sup>-1</sup>, avšak díky tomu, že přírodní fosfor je tvořen jediným izotopem  $^{31}\text{P}$ , jehož jádro se spinem 1/2 je navíc dostatečně citlivé (má vysoký gyromagnetický poměr), poskytuje  $^{31}\text{P}$  NMR spektroskopie významné možnosti pro studium frak-

cí fosforu v HK. Fulvokyseliny (FK), spolu s huminovými kyselinami označované souhrnně jako humusové kyseliny, obsahují fosforu méně než HK, jejich  $^{31}\text{P}$  NMR spektra však lze rovněž úspěšně měřit. Přes poměrně nízký obsah fosforu váhou humusové kyseliny značnou část jeho zásoby v půdě, takže měřením  $^{31}\text{P}$  NMR spekter HK získáme cenné informace o složení půdního fosforu.

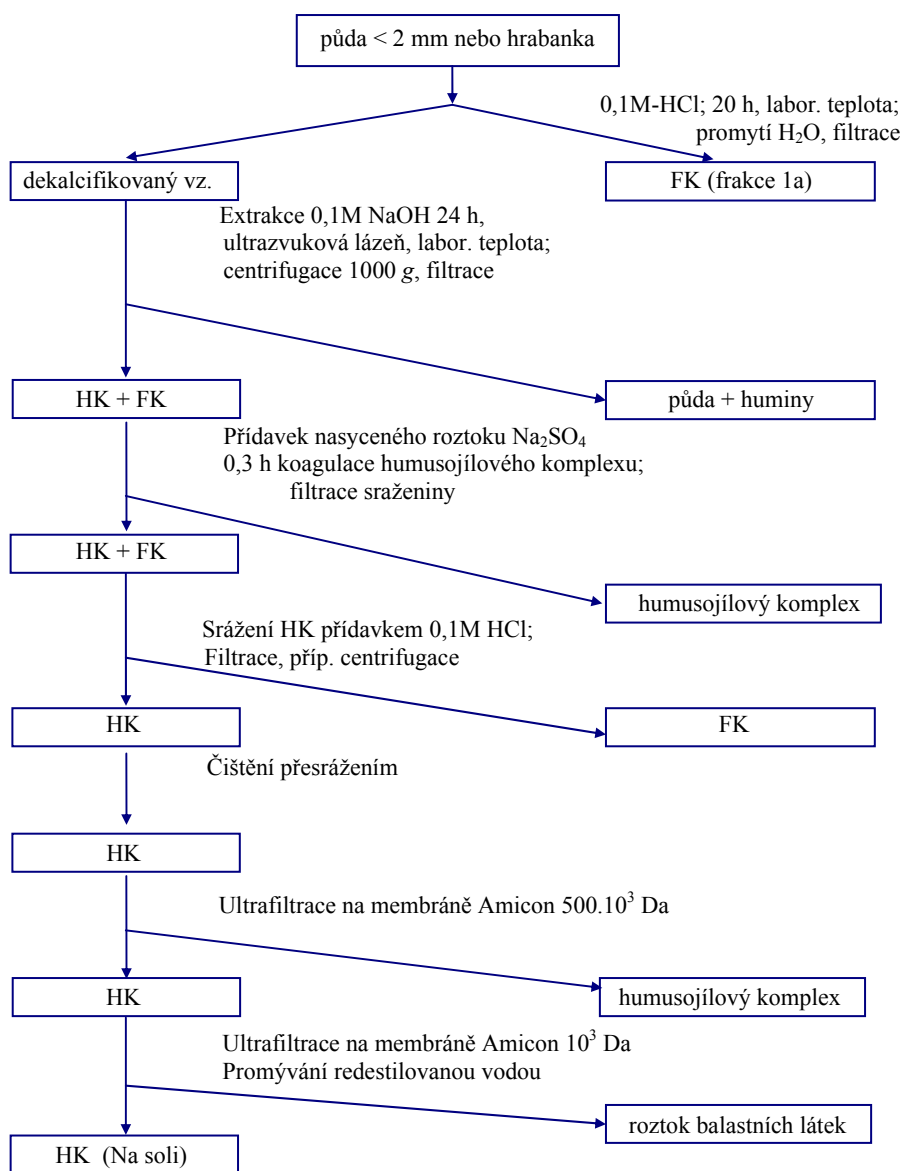
Základy pro přiřazení jednotlivých  $^{31}\text{P}$  NMR absorpčních pásů půdního organického fosforu položili Newman a Tate<sup>2</sup>. Ogner<sup>3</sup> rozlišil v  $^{31}\text{P}$  NMR spektrech čtyř HK z lesních půd 15 signálů, které přiřadil čtyřem formám organického fosforu ( $\text{P}_{\text{org}}$ ). Přestože půdy byly velmi podobné, zjistil významné rozdíly v množství i přítomnosti jednotlivých typů  $\text{P}_{\text{org}}$ . Od konce 80. let 20. století je metoda  $^{31}\text{P}$  NMR spektroskopie poměrně často využívána při studiu vazby fosforu v huminových kyselinách i různých alkalických půdních extraktech, v nichž HK tvoří podstatnou složku.

#### Materiál a metodika

Huminové kyseliny byly izolovány z půdních vzorků podle tradičního schématu (obr. 1), založeného na dekalciifikaci vzorku 0,1 M-HCl a extrakci roztokem 0,1 M-NaOH. Z alkalického výluhu, odděleného od tuhé fáze centrifugací (1000 g po dobu 30 min) a filtrací, byly HK vysráženy 0,1 M-HCl a následně čištěny přesrážením a nanofiltrací. Roztok sodných solí huminových kyselin byl zmrazen a vysušen lyofilizací. Převod sodných solí na kyseliny, obvykle prováděný na koloně plněné silně kyselým katexem Dowex, není nezbytný, protože se vzorek huminových kyselin (resp. solí) před měřením  $^{31}\text{P}$  NMR spekter rozpouští v NaOD. HK by se též částečně sorbovaly na iontoměničích a přitom by se mohl snížit obsah fosforu ve vzorku. HK izolované podle tohoto schématu jsou poměrně čisté, a proto vhodné např. pro stanovení optimálních parametrů pro měření NMR spekter. Časově náročná izolace však může vést k částečné hydrolyze HK, a tím ke ztrátě cenných informací, jež lze studiem  $^{31}\text{P}$  NMR spekter HK získat. Úprava postupu izolace humusových kyselin a jeho srovnání s dalšími užívanými metodami byly jedním z cílů této práce.

Elementární analýza HK byla prováděna na analyzátoru Carlo Erba 1108. Obsah celkového fosforu v HK byl stanoven po mineralizaci 72% kyselinou chloristou<sup>4</sup>. Fosfor převedený mineralizací na orthofosforečnan byl po reakci s molybdenanem amonným a askorbovou kyselinou stanoven spektrofotometricky jako fosfomolybdenová sůl<sup>5,6</sup>.

$^{31}\text{P}$  NMR spektra byla měřena na spektrometru Bruker AMX-3 400 s pracovní frekvencí 161,986 MHz s těmito parametry: teplota 298,15 K, průměr květy



Obr. 1. Základní schéma izolace a čištění huminových kyselin

5 mm, počet jednotlivých průchodů na jedno spektrum 10 000, délka excitačního pulsu 17,0  $\mu$ s (90°), délka akvizičního času 0,327 s, šířka spektra 50 000 Hz, relaxační prodleva  $T_d$  2 s, širokopásmový <sup>1</sup>H-decoupling (zrušení interakce spinů). FID (free induction decay, zánik volné indukce) byl zpracován s rozšířením linie 10 Hz. Chemické posuny byly měřeny vůči 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, jako externímu standardu.

## Výsledky a diskuse

### Vliv použitého extrakčního činidla na kvalitu spektra

Pro stanovení jednotlivých frakcí organického fosforu v půdě <sup>31</sup>P NMR spektroskopii se často používá extrakce 0,5 M-NaOH. Nevýhodou tohoto postupu je extrakce méně než 50 % celkového fosforu (P<sub>T</sub>) u některých půd<sup>7</sup>, možnost hydrolyzy extrahovaných huminových kyselin v silně

alkalickém roztoku a podobně jako u některých jiných extrakčních činidel současná extrakce paramagnetických iontů ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ), které snižují rozlišení NMR spekter. Ze vzorků alpských půd lze roztokem NaOH extrahovat 66–82 %  $P_t$  (horizonty A) a 28–51 %  $P_t$  (horizonty B)<sup>8</sup>; přitom 92–99 % extrahovaného fosforu připadá na organický fosfor, vázaný především v HK.

Roztokem EDTA v NaOH byl extrahován největší podíl půdního fosforu v podzolových půdách<sup>7</sup> a rovněž většina typů fosforu ve srovnání s roztokem 0,25 M-NaOH i roztokem 0,25 M-NaOH s přidávkou Chelexu X-100. Použití směsi NaOH-EDTA pravděpodobně snižuje stupeň hydrolyzy, vypočítaný z poměru obsahu diesterů a monoesterů<sup>7</sup>, nicméně rozlišení NMR spektra bývá výrazně horší než v případě jiných extrakčních činidel, protože paramagnetické ionty komplexované EDTA zůstávají v roztoku. Naproti tomu extrakce vzorků lesních půd směsí Chelex X-100 + NaOH poskytovala spektra s ostrými signály, do extraktu však bylo převedeno pouze 23–35 %  $P_t$ . Při extrakci vzorků směsí 0,5 M-NaOH + 0,1 M EDTA (1:1) přecházel do extraktu větší podíl  $\text{Mn}^{2+}$ , toto činidlo však extrahovalo nejvyšší podíl půdního fosforu (71–90 %) včetně polyfosfátů. Někteří autoři<sup>9</sup> doporučují snížit obsah  $\text{Mn}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  v extraktu na koloně plněné Chelexem X-100 nebo přidávkou tohoto sorbentu do filtrátu; nevýhodou může být částečná sorpce humusových látek na sorbentu.

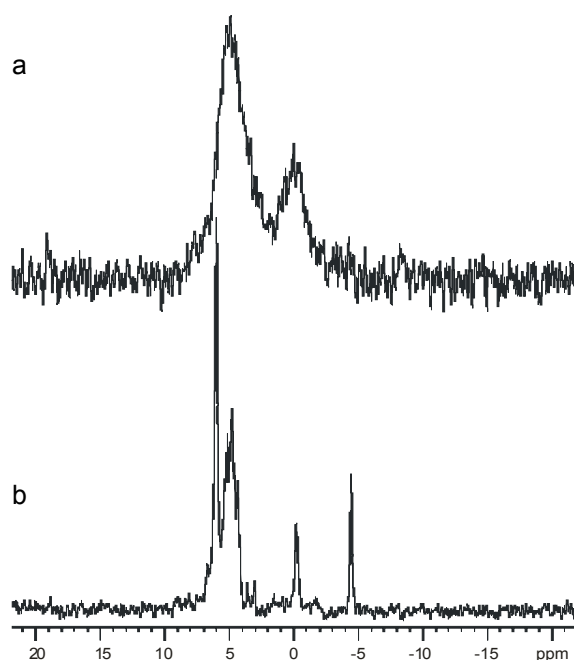
Izolace relativně čistých HK je obtížná zejména ze vzorků, pocházejících z hlubších půdních horizontů, kde je obsah HK nízký a tyto látky bývají vázány v komplexech s jílovými minerály nebo ionty  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Al}^{3+}$ , jejichž přítomnost ve vzorku může komplikovat měření NMR spekter. Pro studium frakcí organického P jsou však HK z hlubších horizontů důležité, neboť vzájemné srovnávání  $^{31}\text{P}$  NMR spekter HK izolovaných z jediného (většinou svrchního) horizontu půd, které nejsou příbuzné, má jen omezený význam<sup>10</sup>. Obsah balastních látek, které zvyšují obsah popelovin v HK, lze snížit čištěním nanofiltrací například na membráně Amicon PBVK nebo loužením vzorku v 3% HF.

Velmi dobré výsledky u kyselých půd poskytuje postup založený na extrakci 0,1 M-NaOH, podobný izolaci huminových kyselin, použitý u jednotlivých horizontů podzolu<sup>11</sup> a umožňující stanovit odděleně frakce fosforu v huminových kyselinách a fulvokyselinách. Protože extrakce a čištění huminových kyselin je časově velmi náročná procedura, při níž nelze vyloučit hydrolyzu některých sloučenin fosforu, navrhli Pant a spol.<sup>12</sup> dvojnásobnou čtyřhodinovou extrakci vzorku 0,4 M-NaOH s následným oddělením hydroxidu gelovou chromatografií. Extrakt odstředěný na centrifuze byl nanesen na kolonu plněnou Sephadexem G-25, kde se oddělily humusové kyseliny od NaOH. Eluát HK byl poté zahuštěn na vakuové odparce při 35 °C.

Nevýhodou postupu je strhávání větších molekul HK při centrifugaci (10 000 g po dobu 40 min) a sorpce části humusových kyselin na Sephadexu. Kapacita kolony je omezená a při větších objemech vzorku jsou huminové látky příliš dlouho v prostředí koncentrovaného roztoku

NaOH; navíc autory používaná poměrně vysoká teplota 35 °C může urychlovat eventuální hydrolytické reakce. Proto jsme modifikovali standardní<sup>20</sup> extrakci humusových kyselin tak, že ji provádíme po dobu 4 h v 0,1 M-NaOH. V průběhu extrakce je směs čtyřikrát vystavena 15minutovému působení ultrazvuku, aby se rozrušily agregáty a dosáhlo vyššího výtěžku HK. Po 4 hodinách je extrakt oddělen na centrifuze při 1500 g, filtrován, přidávkou HCl je sníženo jeho pH na 11,5 a je vpraven do nanofiltrací cely. Zde je extrakt při laboratorní teplotě v atmosféře dusíku promýván destilovanou vodou a koncentrován, přičemž se na ultrafiltračním nástavci s membránou Amicon YM1 oddělí nízkomolekulární látky. Koncentrát je poté zmrazen a lyofilizován stejným postupem jako huminové kyseliny.

Modifikací tohoto postupu je jeho rozšíření o dekalci-fikaci vzorku 0,1 M-HCl před extrakcí, jíž se odstraní ionty  $\text{Ca}^{2+}$ , popřípadě  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  a  $\text{Al}^{3+}$ , které vážou část fosforu, a zvýší se absolutní množství extrahovaných fosforečnanů a jejich monoesterů. Tento stupeň však má dvě nevýhody – jednak vede k zániku některých minoritních signálů v  $^{31}\text{P}$  NMR spektrech, pravděpodobně v důsledku hydrolyzy v kyselém prostředí, jednak může negativně ovlivnit následnou extrakci vzorku 0,1 M-NaOH, protože se část hydroxidu spotřebovává na titraci půdního sorpčního komplexu, který byl při dekalci-fikaci převeden do  $\text{H}^+$  cyklu. (Tento druhý vliv je patrný především u půd humu-



Obr. 2. Vliv dekalci-fikace vzorku na kvalitu  $^{31}\text{P}$  NMR spektra humusových kyselin izolovaných z humusového horizontu kambizemě; a – vzorek bez dekalci-fikace, b – vzorek před izolací dekalci-fikovaný; Obě  $^{31}\text{P}$  NMR spektra byla měřena se stejnými parametry

Tabulka I

Vliv způsobu izolace HK na frakční složení P v půdních huminových kyselinách; T55 – tradiční způsob; T550 – izolace rozšířena o působení 3% HF kvůli snížení obsahu popelovin

Oblast spektra [ppm]	T55 [%]	T55 [mg.kg <sup>-1</sup> ]	T550 [%]	T550 [mg.kg <sup>-1</sup> ]
15 – 22	34,2	589	27,5	344
5,5 – 7,5	6,2	107	2,2	28
3 – 5,5	28,1	484	31,7	398
1 – 3	17,1	294	16,7	209
0 – (-2)	14,4	248	21,9	275
Celkem	100,0	1721	100,0	1254

sem chudých, kdy je třeba použít pro izolaci určitého množství HK větší navážku vzorku. Lze jej eliminovat nadbytkem roztoku NaOH nebo kontrolou pH.) Hlavní předností tohoto stupně je výrazné zlepšení kvality spekter zejména v těch případech, kdy půda obsahuje paramagnetické ionty (kambizemě, horizonty B podzolů), které mohou rozšířením linie výrazně zhoršit rozlišení NMR spektra (obr. 2).

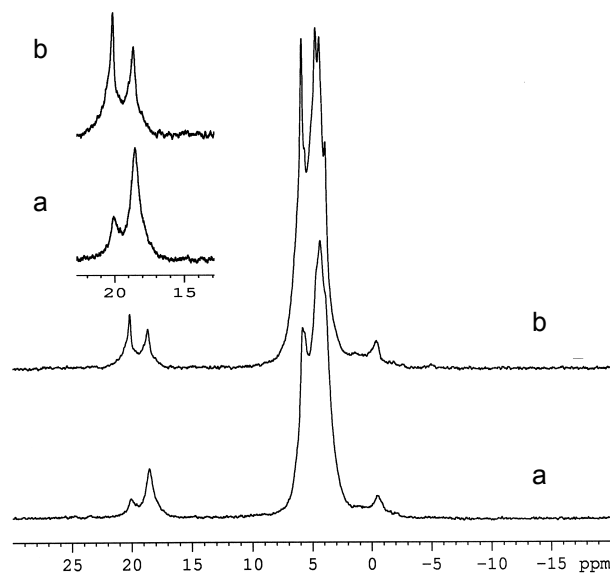
Jak již bylo zmíněno, ve zvláštních případech se používá loužení huminových kyselin v 3% HF, při kterém se snižuje obsah jílových příměsí, popřípadě i Fe<sup>3+</sup> a Al<sup>3+</sup> iontů z humusojílových komplexů. Přitom se rovněž snižuje obsah některých frakcí fosforu, zejména orthofosforečnanu (viz. tab. I), popř. dalších frakcí fosforu vázaných na minerální podíl. Toho lze využít ke stanovení minoritních frakcí P<sub>org</sub>, je-li obsah orthofosforečnanů v HK extrémně vysoký a jejich signál překrývá ostatní signály v <sup>31</sup>P NMR spektru.

#### Vliv doby měření na kvalitu spekter

Zatímco Newman a Tate<sup>2</sup> se domnívali, že alkalické extrakty půd (roztoky humusových kyselin) pro měření <sup>31</sup>P NMR spekter mohou být bez znatelných změn ve spektrech uloženy po dobu několika dnů, je dnes zřejmé, že se huminové látky v alkalickém prostředí hydrolyzují. Hydrolyzu lze omezit zkrácením doby potřebné k přípravě a čištění extraktu i zkrácením doby měření NMR spektra, největší význam však má lyofilizace vzorku a jeho rozpuštění v NaOD bezprostředně před měřením. Doba extrakce je dnes zpravidla 4 hodiny, kratší by již zřejmě vedla k neúplné extrakci. Jediným způsobem, jak dále omezit zkreslení výsledků eventuální hydrolyzou, je proto zkrácení doby měření. Toho lze teoreticky docílit zkrácením relaxační prodlevy (viz níže) nebo snížením počtu akumulací. Oba tyto postupy byly vyzkoušeny, oba však přinesly více problémů než eventuální změny ve spektrech v důsledku hydrolyzy.

Velmi malý počet 500 akumulací použili např. Pant a spol.<sup>12</sup> Při kvantitativním vyhodnocení spekter však patrně v důsledku nepříznivého poměru signál/šum dospěli k obtížně interpretovatelným výsledkům. Pokud totiž měři-

li vzorek delší dobu (3648 akumulací), získali spektrum s lepším poměrem signál/šum, současně se však podstatně zvýšila intenzita signálu, autory připisovaného fosfoenolpyruvátu, a poklesla intenzita signálů nukleosidmonofosfátů a polynukleotidů. Pokud byl do roztoku před měřením přidán toluen, užívaný v biochemii k zamezení růstu a množení bakterií, intenzita signálu žádné formy fosforu se nezměnila. Autoři se pokusili vysvětlit jev biologickou aktivitou v silně alkalickém extraktu během měření, nicméně ponechání roztoku po dobu 2 h při pokojové teplotě před měřením spektra se očekávanými změnami v intenzitě jednotlivých signálů fosforu neprojevovalo. Z těchto výsledků je zřejmé, že doba měření musí být tak dlouhá, aby se získalo dostatečně kvalitní spektrum, umožňující spolehlivé kvantitativní vyhodnocení; přitom je



Obr. 3. Vliv hydrolyzy HK v alkalickém prostředí na zastoupení jednotlivých typů P v <sup>31</sup>P NMR spektru; a – vzorek měřený ihned po rozpuštění v NaOD, b – též vzorek, měřený 7 dnů po rozpuštění; Na vloženém obrázku je detail obou spekter

ovšem nezbytné, aby měření neprobíhalo zbytečně dlouho, neboť by se vzorek mohl hydrolyzovat.

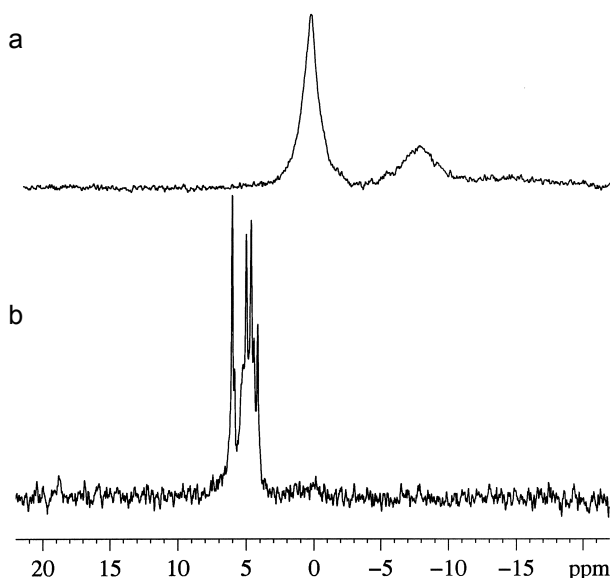
Vliv případné hydrolyzy na změny v  $^{31}\text{P}$  NMR spektru jsme testovali na vzorku huminové kyseliny rozpuštěné v 0,5 M-NaOD. Vzorek byl změřen ihned po rozpuštění a poté znovu po 7 dnech. Srovnání obou spekter je na obr. 3. Hydrolyza se projevila v oblasti fosfonátů a monoesterů kyseliny fosforečné. V oblasti fosfonátů (15–20,1 ppm) klesá v důsledku hydrolyzy intenzita signálu při 18,7 ppm a úměrně tomu roste intenzita signálu při 20,1 ppm. Součet intenzit obou signálů však při této změně zůstává stejný (tab. I) a protože oba signály přísluší téže frakci  $\text{P}_{\text{org}}$ , nemá hydrolyza v této oblasti vliv na informace získané ze spektra. Význam může mít při srovnávání spekter různých autorů, kdy lze indikovat výraznější stupeň rozkladu vzorku při izolaci nebo před měřením, jestliže intenzita signálu u vyšších posunů je srovnatelná nebo dokonce vyšší než intenzita sousedního signálu. U takto rozloženého vzorku lze očekávat mnohem závažnější hydrolyzu mono- a zejména diesterů kyseliny orthofosforečné.

Výrazně se hydrolyza HK projevuje v oblasti monoesterů kyseliny orthofosforečné. Jejich zastoupení ve spektru studované HK se po hydrolyze snížilo ze 60,2 na 36,6 % při současném nárůstu obsahu orthofosforečnanů prakticky o stejnou hodnotu z 26,3 na 50,0 %. Z toho je zřejmé, že hydrolyza vzorku může velmi výrazně zkreslit získané výsledky a že je nezbytné usilovat o maximální zkrácení doby, po kterou může hydrolyza probíhat – buď při přípravě vzorku, nebo při vlastním měření. Vzhledem k času, nezbytnému pro získání kvalitního spektra, lze považovat dobu 12 h mezi rozpuštěním lyofilizovaného vzorku a ukončením měření spektra navrženou pro roztok<sup>9</sup> v 0,5 M-NaOD za přijatelný kompromis. Autoři, kteří hydrolyzu u měřených vzorků nepozorovali, např. Makarov a spol.<sup>8</sup>, patrně měřili vzorky při izolaci natolik hydrolyzované, že v průběhu několikahodinového měření se již další rozklad neprojevil. Naše výsledky ukazují, že celý postup přípravy extraktu musí být velmi šetrný a poměrně rychlý, vzorky je třeba ihned po izolaci zmrazit, vysušit lyofilizací a v NaOD rozpouštět až krátce před měřením spektra.

#### Vliv pH roztoku na polohu

##### $^{31}\text{P}$ NMR signálů

Hodnota pH měřeného roztoku výrazně ovlivňuje polohu signálů v  $^{31}\text{P}$  NMR spektrech. Tohoto efektu se někdy využívá v biochemii ke stanovení nitrobuněčného pH z polohy  $^{31}\text{P}$  NMR signálu orthofosforečnanu. Pro měření  $^{31}\text{P}$  NMR spekter HK a FK v roztoku NaOD je optimální pH ~ 13. Pokud se vzorek HK (solí) před měřením rozpouští v poměrně koncentrovaném roztoku 3–5% NaOD, je nezbytné po rozpuštění vzorku snížit pH roztoku přidávkem několika kapek 0,5 M-HCl na 12,8–13. Výhodnější je rozpouštět humáty sodné v 0,1 M-NaOD, aby pH nepřekročilo hodnotu 13, protože při úpravě pH roztoku připraveného v komerčně dostupném 3–5% NaOD mohou nastat komplikace vyplývající z omezené životnosti skleněné elektrody, obtížné dostupnosti pufrů pro kalibraci při vysokém pH i z malého objemu roztoku. Při pH ~ 12,8



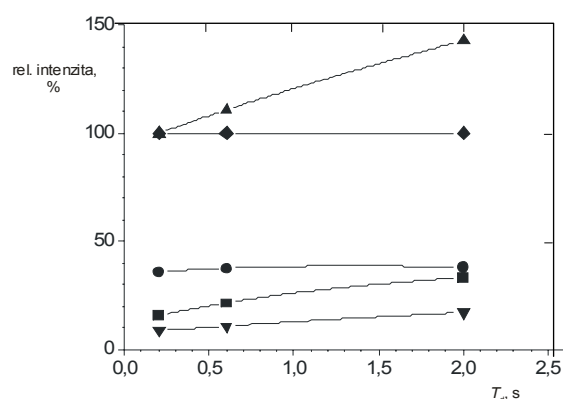
Obr. 4. Vliv pH roztoku na  $^{31}\text{P}$  NMR spektrum fulvokyseliny; a – vzorek rozpuštěný v  $\text{D}_2\text{O}$ , pH ~ 3,8; b – vzorek rozpuštěný v NaOD, pH ~ 12,5

jsou  $^{31}\text{P}$  NMR signály monoesterů orthofosfátu poměrně dobře odděleny od signálu orthofosforečného iontu; nižší pH má navíc příznivý vliv na zpomalení eventuální hydrolyzy vzorku v alkalickém prostředí. Při pH < 12,5 se mohou signály některých inositol-fosfátů překrývat se signálem orthofosfátu.  $^{31}\text{P}$  NMR spektra téže fulvokyseliny, měřená v  $\text{D}_2\text{O}$  při pH ~ 4 a v 5% NaOD při pH přibližně 12,5, jsou porovnána na obr. 4.

#### Vliv relaxační prodlevy na zastoupení jednotlivých typů fosforu

Získání NMR spektra použitelného pro kvantitativní účely vyžaduje dodržet základní podmínku – úplnou relaxaci spinu atomů fosforu v průběhu měření. Protože splnění tohoto požadavku znamená úměrné prodloužení doby měření, volí řada autorů relaxační prodlevu kratší než 1 s, v extrémních případech<sup>8,13</sup> jen 0,2 s, což se však negativně promítá do intenzit jednotlivých signálů, snižuje přesnost stanovení poměrného zastoupení jednotlivých typů fosforu a prakticky znemožňuje srovnání výsledků různých autorů. Pro stanovení vhodné relaxační prodlevy jsme použili vzorek velmi čisté huminové kyseliny, jejíž  $^{31}\text{P}$  NMR spektrum bylo charakteristické přítomností signálů většiny významných frakcí i velmi nízkým šumem, což je nezbytný předpoklad pro kvantitativní vyhodnocení. Homogenizovaný vzorek huminové kyseliny byl rozdělen na tři podvzorky, které byly postupně rozpuštěny v 5% NaOD a byla měřena jejich  $^{31}\text{P}$  NMR spektra při relaxační prodlevě 0,2 s, 0,6 s nebo 2,0 s.

Relativní intenzity jednotlivých pásů v  $^{31}\text{P}$  NMR spektru HK se s rostoucí relaxační prodlevou  $T_d$  zvyšují



Obr. 5. Závislost relativní intenzity jednotlivých signálů v  $^{31}\text{P}$  NMR spektru velmi čisté HK, izolované z podzolové půdy, na zvolené relaxační prodlevě  $T_d$ ; ▲ 3-5,5 ppm, ◆ 0-(-2) ppm, ● 5,5-7,5 ppm, ■ 15-20 ppm, ▼ 1-3 ppm

(viz obr. 5) a je tedy zřejmé, že použití prodlev  $T_d < 2$  s vede k nerovnoměrnému zkresení obsahu jednotlivých typů fosforu. Protože měření HK bylo u všech tří relaxačních prodlev prováděno po stejnou celkovou dobu (tedy s různým počtem akumulací), výsledky nejsou ovlivněny případnou hydrolyzou vzorku. Měřená HK však byla připravována tradičním postupem, v jehož průběhu je vzorek zbaven značné části paramagnetických iontů. Tím lze dosáhnout kvalitnějšího spektra, neboť nedochází k rozšiřování linie, současně se však s vyšší čistotou preparátu prodlužuje čas spin-mřížkové relaxace  $T_1$ . Protože používání různých extrakčních činidel vede u různých půd k značně odlišné koncentraci paramagnetických iontů v měřeném extraktu, je obtížné doporučit univerzální relaxační prodlevu pro měření  $^{31}\text{P}$  NMR spekter alkalických půdních extraktů. Optimální postup by měl zahrnovat vedle stanovení koncentrace paramagnetických iontů v extraktu rovněž stanovení relaxační prodlevy pro nově studovaný půdní typ nebo horizont. Při velmi nízkém obsahu těchto iontů ve vzorku lze dosáhnout zkrácení relaxační prodlevy přidávkou iontů  $\text{Cr}^{3+}$ , tento postup se však u huminových látek nepoužívá. Je-li naopak obsah paramagnetických iontů vysoký, je třeba zvolit jiné extrakční činidlo nebo úpravu extraktu před měřením.

Práce různých autorů se liší rovněž v dalších parametrech měření spektra, zejména dobou akvizice [0,1 s (cit.<sup>8,13</sup>), 0,8 s (cit.<sup>14</sup>), 1,63 s (cit.<sup>9</sup>)], úhlem pulsu (30, 45 nebo 90°), případně použitím širokopásmového  $^1\text{H}$  decouplingu a rozšíření linie při zpracování spektra (0–20 Hz).

#### Přiřazení signálů v $^{31}\text{P}$ NMR spektru huminových látek

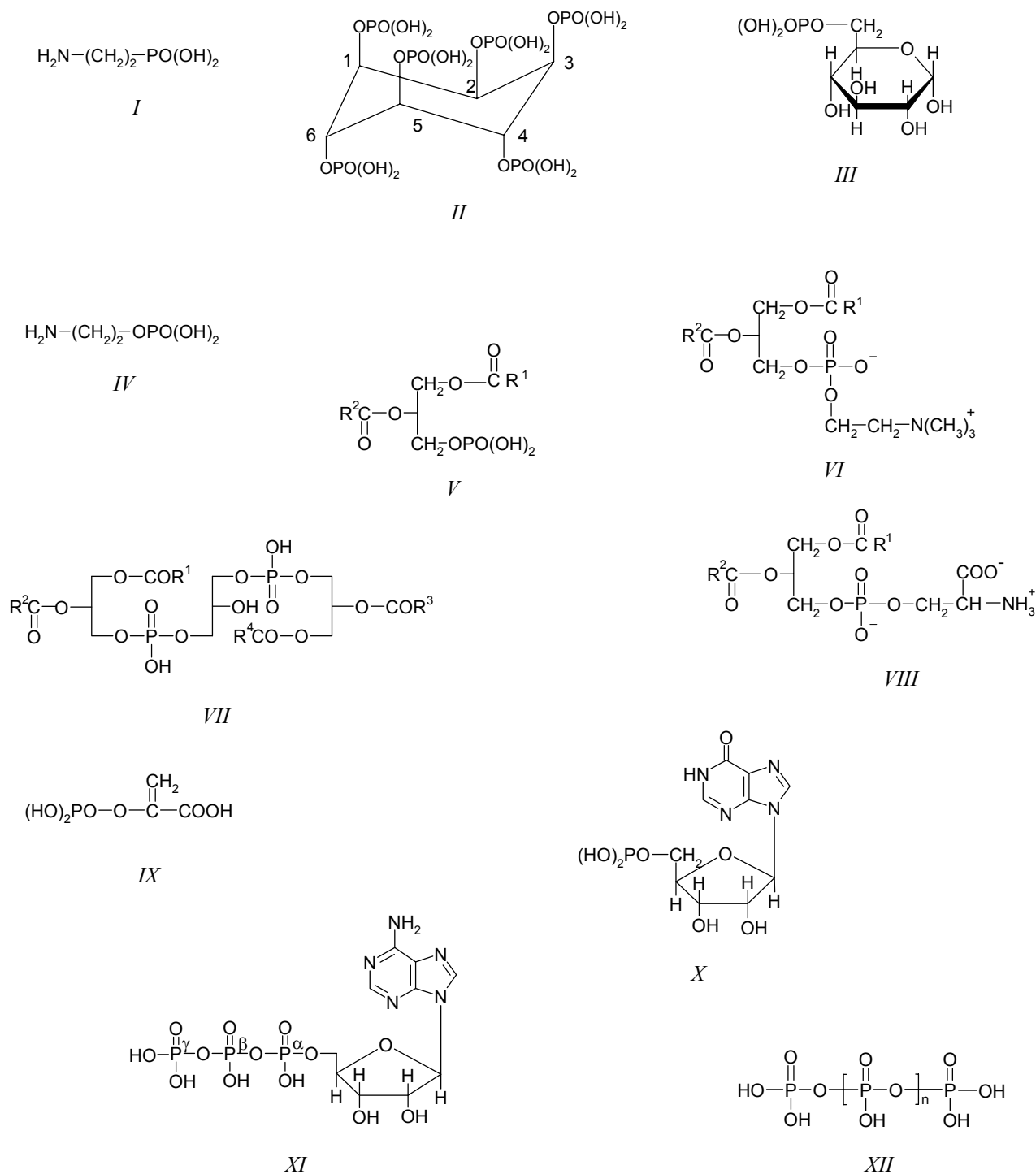
Na rozdíl od  $^{13}\text{C}$  NMR spekter huminových látek, u nichž se jednotlivé signály (pásy) vzájemně překrývají<sup>22</sup>, je v  $^{31}\text{P}$  NMR spektrech huminových látek při vhodně zvoleném pH většina pásů dobře separovaných. Chemické posuny se u  $^{31}\text{P}$  NMR spekter huminových látek zpravidla

vztahují k externímu standardu 85 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Přiřazení jednotlivých signálů (pásů) se provádí podle literárních údajů, případně se ověřuje přidávkou standardu (obsahujícího asi 1 mg P) do měřeného vzorku, aby se vyloučil vliv pH nebo iontové síly, na něž jsou některé signály citlivé. Hlavními frakcemi fosforu v HK a FK jsou především monoestery a diestery kyseliny orthofosforečné (fosfáty) a anorganické orthofosforečnany. Méně zastoupeny bývají difosforečnany, fosfonáty, polyfosforečnany a diestery kyseliny orthofosforečné vázané na sacharidy. Ve spektrech některých HK se vyskytují maxima, která dosud nebyla přiřazena, nebo přiřazení není jednoznačné. Podobně není zcela jednoznačné ani přesné rozdělení integračních mezí pro překrývající se pásy, především kvůli závislosti chemického posunu na podmínkách měření (pH). Tato nejednoznačnost může znesnadnit srovnávání výsledků různých autorů, při analýze a srovnání vlastních spekter se však neprojeví.

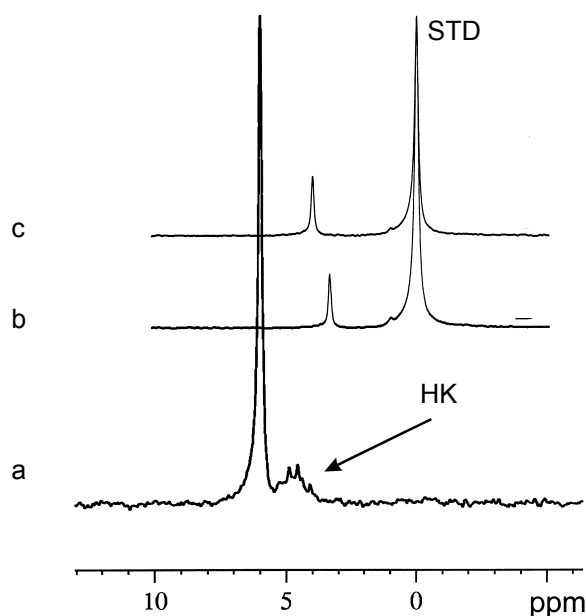
Přehled signálů v  $^{31}\text{P}$  NMR spektrech huminových kyselin a jejich přiřazení jsou shrnuty v tabulce II. Signály  $^{31}\text{P}$  NMR spekter huminových kyselin (a obecně půdního organického fosforu) se nacházejí v oblasti posunů, přibližně vymezené intervalem 21 ppm až –21 ppm. Většinou nepřilíhají intenzivní maxima v intervalu posunů 15–20 ppm přísluší fosfonátům, sloučeninám s vazbou fosforu na atom uhlíku. Kyselina (2-aminoethyl)fosfonová (obr. 6, I) s maximem při 20 ppm je patrně produktem hydrolyzy složitějších fosfonátů, nejspíše lipidů obsahujících tuto kyselinu (fosfolipidů), které se ve spektrech HK projevují signálem okolo 19 ppm. V důsledku této hydrolyzy jsou pro fosfonáty typická dvě ostrá maxima při uvedených posunech, někteří autoři však pozorovali pouze jedno maximum. Ostré a nepřilíhající intenzivní maximum při 12 ppm bývá pozorováno vzácně a dosud nebylo přiřaze-

Tabulka II  
Přiřazení  $^{31}\text{P}$  NMR signálů v roztocích huminových kyselin v NaOD; pH ~ 12,8

Signál [ppm]	Přiřazení
15–20	fosfonáty
~12	vyskytuje se vzácně, patrně aromatické fosfonáty
5,5–7	anorganický orthofosforečnan
3–5,5	monoestery kyseliny orthofosforečné (inositolfosfáty, estery kyseliny orthofosforečné se sacharidy, mononukleotidy)
1,5–3	neidentifikováno, zřejmě mono- a diestery kyseliny orthofosforečné
1,5–(-2)	převážně diestery kyseliny orthofosforečné (fosfolipidy, DNA a RNA)
-3,5–(-5)	difosforečnany a koncové atomy P anorganických polyfosforečnanů
-6–(-23)	anorganické a organické (ATP, ADP) polyfosforečnany



Obr. 6. **Strukturální vzorce studovaných látek:** kyselina (2-aminoethyl)fosfonová (*I*), *myo*-inositol-hexakis(fosfát) (kys. fytová) (*II*), D-glukosa-6-fosfát (*III*), 2-aminoethyl-dihydrogenfosfát (*IV*), *O*<sup>2</sup>, *O*<sup>3</sup>-diacylglycerol-1-fosfát (kyseliny fosfatidové) (*V*), L- $\alpha$ -fosfatidylcholin (L- $\alpha$ -lecithin) (*VI*), difosfatidylglycerol (kardiolipin) (*VII*), fosfatidylserin (*VIII*), fosfoenolpyruvát (*IX*), inosin-5'-monofosfát (*X*), adenosin-5'-trifosfát (ATP) (*XI*), kyselina polyfosforečná (*XII*)



Obr. 7. Vliv pH a HK na posun signálu orthofosforečnanů v  $^{31}\text{P}$  NMR spektru; a –  $^{31}\text{P}$  NMR spektrum HK s přidavkem  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  v roztoku NaOD při pH 12,5; b –  $^{31}\text{P}$  NMR spektrum  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  při pH ~ 7; c –  $^{31}\text{P}$  NMR spektrum  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  při pH ~ 12,5; STD – externí standard (85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ )

no, snad jde o fosfonáty aromatické povahy.

Intenzivní signál s vrcholem při posunu 6 ppm přísluší anorganickému orthofosforečnanu. Guggenberger a spol.<sup>13</sup> pozorovali maximum signálu orthofosforečnanu při 6,5 ppm, patrně vlivem vyššího pH roztoku. Pant a spol.<sup>12</sup> přiřadili toto maximum fosfoenolpyruvátům, tento názor je však ve světové literatuře ojedinělý. Přiřazení tohoto pásu, významného z interpretačních důvodů, jsme ověřili přidavkem dihydrogenfosforečnanu sodného do roztoku HK v NaOD. Odpovídající signál měl maximum při 6,0 ppm (obr. 7). Signál orthofosforečnanu se obvykle integruje v oblasti posunů 5,5–7 ppm. Přesná hranice se sousedním pásem (signálem) monoesterů kyseliny orthofosforečné se obvykle volí v minimu mezi oběma signály; například Makarov a spol.<sup>8</sup> zvolili tuto hranici u 5,8 ppm. Jiným řešením je softwarová dekonvoluce jednotlivých pásů, rozlišených druhou derivací spektra, u  $^{31}\text{P}$  NMR spekter HK se však zatím používá ojediněle. Sama přítomnost orthofosforečnanů v huminových kyselinách je do jisté míry překvapivá, neboť extrakce HK i FK je poměrně drastická a zahrnuje mj. důkladnou dialýzu proti destilované vodě nebo nanofiltraci na membránách za vyššího tlaku, při nichž je většina nízkomolekulárních látek vyloučena do dialyzátu (filtrátu). Protože hydrolyzu esterů kyseliny fosforečné na orthofosforečnan v alkalickém roztoku můžeme při rychlé izolaci i měření zanedbat, je přítomnost orthofosforečnanu v HK zřejmě důsledkem vazby (sorpcce) iontů  $\text{PO}_4^{3-}$  makromolekulami humusových kyselin, patrně

za tvorby komplexních vazeb s ionty  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  nebo  $\text{Al}^{3+}$ , které tvoří součást humusojílových komplexů. Na podobný způsob vazby můžeme soudit i ze samotného chemického posunu signálu  $\text{PO}_4^{3-}$  v přítomnosti HK, který je vyšší než posun orthofosforečnanu v NaOD při stejném pH (obr. 7). V této oblasti mohou omezeně přispívat také některé monoestery kyseliny orthofosforečné, signál při 5,8–5,9 ppm poskytuje například atom fosforu, vázaný v poloze 2 *myo*-inositol-hexakis(fosfátu) (obr. 6, II). Zpravidla však lze obě ostrá maxima dobře oddělit, nebo je příspěvek monoesterů k signálu orthofosforečnanů nevýznamný.

Výrazný pás v oblasti 3 až přibližně 5,5 ppm, obvykle s několika maximy, přísluší monoesterům kyseliny orthofosforečné<sup>2</sup>, zejména jejím esterům s cyklickými hexitoly (inositol-fosfátům) a se sacharidy, dále rovněž mononukleotidům apod. Tyto monoestery jsou poměrně rezistentní vůči rozkladu a mohou se v půdě akumulovat; někdy bývají hlavní frakcí půdního organického fosforu. Exaktní identifikace látek, jimž přísluší pásy v této oblasti, nebyla dosud u půdních extraktů provedena, zastoupení uvedených skupin monoesterů se pro různé HK liší. Podle často citovaných tradičních prací Andersona<sup>15</sup> a Islama a Ahmeda<sup>21</sup> byl za dominantní organickou sloučeninu fosforu v půdách považován *myo*-inositol-hexakis(fosfát) (obr. 6, II, kyselina fytová), jejíž smíšená vápenato-hořečnatá sůl je známa pod triviálním názvem fytin. Dalším v půdě běžným stereoisomerem je *scyllo*-inositol-hexakis(fosfát), syntetizovaný řadou půdních mikroorganismů. Inositol-fosfáty, zejména hexakisfosfáty inositolu, převažují v HK z hlubších horizontů podzolu<sup>14</sup>, v jiných HK se však mohou vyskytnout také nukleosid-monofosfáty (adenosin-monofosfát, 4,5 ppm), D-glukosa-6-fosfát (obr. 6, III, 5,3 ppm), glycerol-1-fosfát (4,7 ppm) apod., případně mohou inositol-hexakisfosfáty chybět<sup>12</sup>. V této oblasti poskytují signál rovněž některé produkty štěpení diesterů kyseliny fosforečné, např. (2-aminoethyl)-fosfát (obr. 6, IV, 4,7 ppm).

Nepřilíší výrazné signály tvořící pás v oblasti 1,5–3 ppm nebyly některými autory ve spektrech HK vůbec pozorovány<sup>14</sup>; jiné práce signály v této oblasti popisují, avšak jednoznačná identifikace tohoto typu atomů fosforu v HK dosud nebyla provedena. Fosfatidylethanolamin poskytuje signál při 1,6 ppm, některé monoestery  $\text{H}_3\text{PO}_4$  se sacharidy mají signál mezi 1,5–3 ppm. Kyseliny teichoové (diestery kyseliny orthofosforečné), významné složky např. buněčných stěn bakterií, poskytují rezonanční maxima mezi 1–2 ppm<sup>13</sup>, spíše jim však přísluší maximum při 1,9 ppm, zatímco signály pozorované při 1,5–1,7 ppm patří fosfolipidům mikrobiálního nebo rostlinného původu<sup>16</sup>. Hraniční hodnota signálu mezi touto frakcí a frakcí zahrnující monoestery kyseliny fosforečné zřejmě závisí na pH roztoku a také snad na povaze huminové kyseliny. Randall a spol.<sup>17</sup> považují za hranici mezi signály těchto frakcí 2,5 ppm, Cade-Menun a Preston<sup>7</sup> a jiní hodnotu 3,0, kterou používáme ve svých pracích.

Diesterům kyseliny orthofosforečné, k nimž patří fosfolipidy a nukleové kyseliny, náleží maxima v oblasti posunů cca 1,5 až –2. Molekula fosfolipidů (fosfatidů)



obsahuje alkoholickou složku (glycerol), na níž je vázána kyselina orthofosforečná v podobě kyseliny fosfatidové (obr. 6, *V*;  $R^1$ ,  $R^2$  = alkyly s 9 až 17 atomy C), dále je přítomna vyšší mastná kyselina a zásaditá organická složka (nejčastěji cholin nebo kolamin). Do této skupiny složených lipidů, esterů vícesytných alkoholů s mastnými kyselinami a kyselinou fosforečnou, patří důležité přírodní látky: lecithiny (obr. 6, *VI*), kardiolipin (obr. 6, *VII*), kefaliny, fosfatidylserin (obr. 6, *VIII*), sfingomyeliny a plazmalogeny. Asi 1 % fosfolipidů připadá na inositolfosfolipidy, např. fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát, přítomný v buněčných membránách. Nejběžnějšími fosfolipidy v půdě<sup>18</sup> jsou fosfatidylcholin rostlinného původu s <sup>31</sup>P NMR signálem při 0,7 ppm a fosfatidylethanolamin původu mikrobiálního se signálem při 1,7 ppm. V roztoku CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH jsou jejich <sup>31</sup>P chemické posuny nižší (fosfatidylethanolamin 0,03 ppm, fosfatidylcholin –0,84 ppm)<sup>23</sup>. Kyseliny ribonukleové (RNA, posun při 0,5 ppm) nejsou v půdním prostředí a zvláště v alkalických extraktech stabilní, v průběhu alkalické extrakce se rozkládají na mononukleotidy, a proto k signálům diesterů kyseliny orthofosforečné nepřispívají<sup>16</sup>. Stabilnější kyseliny deoxyribonukleové (DNA, posun při –0,3 ppm) jsou pravděpodobně hlavními sloučeninami, jimž v alkalických extraktech přísluší maximum při 0 ppm. Středně intenzivní signál s maximem při –1,5 ppm, pozorovaný ve spektrech některých HK<sup>8</sup>, se nevyskytuje v extraktech mikrobiálních kultur ani rostlinného materiálu<sup>16</sup> a nebyl zatím přirazen. Z nepříliš početné množiny monoesterů kyseliny orthofosforečné, jejichž <sup>31</sup>P NMR signály neleží v oblasti 3–5,5 ppm, jsou významnější fosfoenolpyruvát (obr. 6, *IX*) s posunem okolo 0,1–0,2 ppm a inosin-fosfát (obr. 6, *X*, posun 0,7 ppm).

V oblasti posunů –3,5 až –5 ppm poskytují charakteristický středně intenzivní signál difosforečnany; ve spektrech HK však nebývá pozorován pravidelně. Do této oblasti mohou zasahovat také signály P<sup>α</sup> organických polyfosfátů i koncových atomů P z řetězců anorganických polyfosforečanů, jejich příspěvek však zpravidla nebývá výrazný.

Minoritní signály v oblasti od –6 do –23 ppm patří polyfosforečanům, z nichž nejznámější adenosin-trifosfát (ATP) a adenosin-difosfát (ADP) však v mimobuněčné formě podléhají v půdě rychlému rozkladu a ve spektrech HK nebo alkalických extraktů bývají pozorovány vzácně. Zdá se, že na stabilizaci ATP v půdě by se mohla podílet tvorba komplexů s kationty kovů<sup>19</sup>. Pro ATP jsou charakteristická tři maxima s posuny okolo –4,7, –9,8 a –20,3 ppm. Pokud někteří autoři přiřadili pozorovaný izolovaný signál při –20 ppm P<sup>β</sup> adenosin-trifosfátu, jde o evidentní omyl, neboť u ATP by tento signál byl doprovázen dvojicí stejně intenzivních signálů s posuny okolo –4,7 a –9,8 ppm (P<sup>α</sup> a P<sup>γ</sup>, obr. 6, *XI*). V <sup>31</sup>P NMR spektrech anorganických polyfosforečanů (obr. 6, *XII*) chybí signál charakteristický pro organicky vázaný fosfát (P–O–C, posun –9 až –10 ppm), v závislosti na délce řetězce se v nich vyskytuje několik signálů s posuny –19 až –21 ppm i signály skupin –O–PO(OH)<sub>2</sub> na koncích polyfosfátových řetězců v oblasti charakteristické pro difosforečnany (–4 až –5 ppm).

## Závěr

Souhrnně lze konstatovat, že současná úroveň znalostí činí z <sup>31</sup>P NMR spektroskopie spolehlivý nástroj pro analýzu sloučenin (forem) fosforu v huminových kyselinách i alkalických půdních extraktech, který při dodržení standardních podmínek izolace a měření poskytuje reprodukovatelné kvantitativní výsledky. Další výzkum zřejmě přinese upřesnění informací o složení jednotlivých frakcí fosforu, což může značně napomoci při interpretaci <sup>31</sup>P NMR spekter huminových kyselin nebo alkalických extraktů pro potřeby studia koloběhu fosforu v přírodě. Současně s přesnější interpretací spekter lze očekávat také jejich preciznější kvantitativní vyhodnocování – zejména náhradu prosté integrace jednotlivých oblastí spektra dekonvolucí pásů.

*Tato práce vznikla jako součást projektu č. 206/02/1504, podporovaného Grantovou agenturou České republiky, a výzkumného plánu ÚPB AV ČR č. Z6 066 911.*

## LITERATURA

- Novák F., Kalčík J., Kalousková N., v knize: *Metody studia fosforu a dalších elementů (K, Ca, Na, Mg) v půdě*. (Kalčík J., Macháček V., ed.), str. 51. ÚPB AV ČR, České Budějovice 1995.
- Newman R. H., Tate K. R.: *Commun. Sci. Plant Anal.* 11, 835 (1980).
- Ogner G.: *Geoderma* 29, 215 (1983).
- Sommers L. E., Nelson D. W.: *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 36, 902 (1972).
- Murphy, J., Riley, J. P.: *Anal. Chim. Acta* 27, 31 (1962).
- Watanabe F. S., Olsen S. R.: *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 29, 677 (1965).
- Cade-Menun B. J., Preston C. M.: *Soil Sci.* 161, 770 (1996).
- Makarov M. I., Malysheva T.I., Haumaier L., Alt H.G., Zech W.: *Geoderma* 80, 61 (1997).
- Robinson J. S., Johnston C. T., Reddy K. R.: *Soil Sci.* 163, 705 (1998).
- Chen Z., Pawluk S.: *Geoderma* 65, 173 (1995).
- Novák F., Kalčík J., Hrabal R.: *Silva Gabreta* 5, 27 (2000).
- Pant H. K., Warman P. R., Nowak J.: *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 30, 757 (1999).
- Guggenberger G., Christensen B. T., Rubaek G., Zech W.: *Eur. J. Soil Sci.* 47, 605 (1996).
- Dai, K. H., David, M. B., Vance, G. F., Krzyszowska, A. J.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 60, 1943 (1996).
- Anderson G., v knize: *8<sup>th</sup> International Congress Soil Science*, Bucharest, Romania, sv. IV, str. 563, Bucharest 1964.
- Makarov M. I., Haumaier L., Zech W.: *Soil Biol. Biochem.* 34, 1467 (2002).
- Randall E.W., Mahieu N., Ivanova G. I.: *Geoderma*

- 80, 307 (1997).
18. Kowalenko C. G., Mc Kerchner R. B.: *Can. J. Soil Sci.* 51, 19 (1971).
  19. Meller-Harel Y., Argaman A., Ben-Bashat D., Navon G., Aharonowitz Y., Gutnick D.: *Can. J. Microbiol.* 48, 835 (1997).
  20. Ponomareva V. V., Plotnikova T. A.: v knize: *Agrochimičeskije metody issledovanija počv.* (A. V. Sokolov, ed.), str. 47. Nauka, Moskva 1975.
  21. Islam A., Ahmed B.: *J. Soil Sci.* 24, 193 (1973).
  22. Pavlíková H., Černý J.: *Chem. Listy* 89, 403 (1995).
  23. Glonek T., v knize: *Phosphorus-31 NMR Spectral Properties in Compound Characterization and Structural Analysis.* (Quin L. D., Verkade J. G., ed.), str. 283. VCH Publishers, New York 1994.

**F. Novák<sup>a</sup>, R. Hrabal<sup>b</sup>, I. Bartošová<sup>b</sup>, and J. Kalčík<sup>a</sup>** (<sup>a</sup>*Institute of Soil Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic, České Budějovice*, <sup>b</sup>*NMR Laboratory, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Quantitative <sup>31</sup>P NMR Spectroscopy of Humic Acids**

The paper deals with quantitative aspects of solution <sup>31</sup>P NMR spectra of soil humic acids (HA). The present level of knowledge makes the <sup>31</sup>P NMR spectroscopy a reliable tool for analysis of P types in HA and/or alkaline soil extracts. Observing standard conditions of HA isolation and spectra measurement, the <sup>31</sup>P NMR spectroscopy gives reproducible and quantitative results, important for studying phosphorus transformations in ecosystems. Further research will probably provide more accurate information on composition of individual P fractions of HA, which can be substantially helpful in interpretation of <sup>31</sup>P NMR spectra. Simultaneously, with more exact interpretation of the spectra, we can expect more precise quantitative analysis of their spectra – in particular replacement of integration of spectral bands by their deconvolution.

## Ústav lékařské chemie a biochemie LF UP

### nabízí doktorské studium

požadované vzdělání a zkušenosti: VŠ s titulem Mgr., práce v laboratoři, znalost angličtiny, vážný zájem o vědeckou práci, samostatnost, týmová práce; nástup 1.9.2005 na základě výsledků přijímacího řízení, které proběhne v červnu 2005; stipendium na základě platných předpisů.

**Uzávěrka přihlášek na místa doktorandů je 31.5.2005.**

Doktorandi budou vybráni pouze na základě výsledků přijímacího řízení. **Přihlášky na místa doktorandů jsou k dispozici na webovských stránkách LF UP. Podrobnější informace o vypsání tématech jsou na [www.medchem.upol.cz](http://www.medchem.upol.cz) ve složce PhD program.**

Prof. RNDr. MUDr. Vilím Šimánek, DrSc.  
přednosta Ústavu lékařské chemie a biochemie  
Hněvotínská 3  
775 15 Olomouc