

文章编号 1672-6634(2021)05-0001-07

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2021.05.001

相位不敏感的 100 GHz 光子毫米波相干探测技术

许炜梁¹,周擎奕¹,王继宽¹,邹昱聪²,张 教^{1,2},朱 敏^{1,2}

(1.东南大学 移动通信国家重点实验室,江苏 南京 210096;2.网络通信与安全紫金山实验室,江苏 南京 211111)

摘 要 随着 5G 甚至是 6G 通信技术的推广和演进,数据通信流量的需求与日俱增,面对频谱资源紧张,对通信大容量、高速率和低延迟等需求逐渐迫切的现状,探寻新的频谱资源,提升系统性能成为急需解决的技术难题。于是,毫米波和太赫兹波进入了人们的视野,为未来万物互联提供了更多的可能。通过强度调制和外差相干探测仿真实现 100 GHz 相位不敏感 PAM-4 信号的产生和无线传输,用离线的数字信号处理(DSP)有效提升误比特率(BER)性能,并全面比较和分析三种比特率情形下各个设备参数与 BER 性能的关系,这对光子辅助的太赫兹波段电光器件的设计有重要的指导意义。

关键词 光子辅助;太赫兹;相位不敏感;相干探测;数字信号处理

中图分类号 TN914

文献标识码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Phase Insensitive Coherent Detection Technology for 100 GHz Photonic Millimeter-Wave

XU Weiliang¹, ZHOU Qingyi¹, WANG Jikuan¹, ZOU Yucong²,
ZHANG Jiao^{1,2}, ZHU Min^{1,2}

(1. National Mobile Communications Research Laboratory, Southeast University, Nanjing 210096, China;

2. Purple Mountain Laboratories, Nanjing 211111, China)

Abstract With the promotion and evolution of 5G or even 6G communication technology, the demand for data communication traffic is growing rapidly. In the face of scarce spectrum resources, the demand for large-capacity, high-speed, and low-latency communications has become increasingly urgent. Exploring new spectrum resources and improving system performance have become crucial technical problems. Thus, millimeter wave and terahertz wave have entered people's vision, providing more possibilities for the future interconnection of everything. This paper demonstrated phase insensitive PAM-4 signals generation and terahertz wave wireless transmission at 100 GHz based on intensity modulation and heterodyne coherent detection by simulation. The bit-error-ratio (BER) performance can be improved effectively by the offline digital signal processing (DSP). An intensive comparison of performance versus various parameters operating at three bit rates was discussed, providing significant guidance for photonics-aided THz-wave electro-optical components design.

Key words photonics-aided; terahertz; phase insensitive; coherent detection; digital signal processing

收稿日期: 2021-04-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(61571341); 江苏省重点研发计划(BE2020012); 江苏省科技成果转化计划(BA2019026)资助

通讯作者: 朱敏,男,汉族,博士,副教授,博士生导师,研究方向:光网络和光通信, E-mail: minzhu@seu.edu.cn.

0 引言

随着 5G 时代的到来,4K/8K 视频、虚拟现实、增强现实、云计算和物联网等应用在相当大的程度上对实时通信速率提出了更高的要求^[1-4]。光无线融合(FWI)技术结合了光纤通信大容量和无线通信灵活接入的优势,是满足这些应用需求的关键技术之一^[5]。在未来的 6G 时代,传统低频段通信已不能满足日益剧增的数据流量的迫切需求,载波频率向更高频率发展并逐步迈入太赫兹波段是一个必然的趋势^[6-9]。由于全电方式产生太赫兹波受制于电子器件的带宽瓶颈,一般采用光子辅助方式产生太赫兹信号^[5]。为了进一步提升传输系统容量,一般采用高频谱效率的调制格式,比如脉冲幅度调制(PAM)和正交幅度调制(QAM)。

QAM 信号的产生需要 I/Q 调制器、I/Q 不平衡的补偿和载波恢复算法,这大大增加了系统成本和 DSP 复杂度。而 PAM 信号因为仅在幅度上有信息,在相位上没有承载信息,所以通过低成本的强度调制器就可以产生^[10]。文献[11]基于强度调制-直接探测(IM-DD)实现了在城域网和接入网的 PAM4 信号传输。但是,直接检测只能用较低接收机灵敏度得到 PAM 信号的幅度信息。为了减少信道色散的影响并提高接收机灵敏度,可以使用相干探测代替直接探测并使用简单的 DSP 算法进行恢复处理^[12]。由于使用了强度调制器,相干系统的成本可以有效降低。文献[8,9]实验验证了使用强度调制相干探测实现 W 波段的 PAM-4 信号的无线传输,但是由于产生的 PAM-4 信号是相位敏感的,需要额外的载波恢复算法,增加了 DSP 复杂度。另外,以上的工作并没有对设备参数进行全面的比较和分析,比如激光器线宽,DAC 和 ADC 的分辨率等等。

在本文中,一个基于强度调制和相位不敏感的外差相干探测 100 GHz 的 PAM-4 信号无线传输仿真被实现,并对三种不同比特率情形下的设备参数进行了全面的比较和分析。在发射端,用马赫增德尔调制器实现 PAM-4 信号的强度调制,然后将两个自由运行的激光器外差拍频产生 100 GHz 的无线信号。因为只有信号的强度被调制,避免了载波恢复算法,减少了 DSP 的复杂度。本文分为 3 部分,第 1 部分对强度调制外差相干探测和 DSP 的原理进行介绍;第 2 部分展示了仿真平台和仿真结果及分析;第 3 部分对文章进行总结。

1 原理

1.1 强度调制外差相干探测

在发射端使用一个基于铌酸锂(LiNbO₃)晶体的马赫增德尔调制器(MZM),当 MZM 工作在推挽模式时,上下两臂的外接电压幅度相同但电场方向相反,即 $u_1(t) = -u_2(t) = u(t)/2$ 。MZM 的光场(P)和光功率(E)传输函数的表达式为^[1]

$$\frac{E_{\text{out}}(t)}{E_{\text{in}}(t)} = \cos\left(\frac{\Delta\varphi_{\text{MZM}}(t)}{2}\right) = \cos\left(\frac{u(t)}{2V_{\pi}}\pi\right), \quad (1)$$

$$\frac{P_{\text{out}}(t)}{P_{\text{in}}(t)} = \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \cdot \cos(\Delta\varphi_{\text{MZM}}(t)) = \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \cdot \cos\left(\frac{u(t)}{V_{\pi}}\pi\right), \quad (2)$$

式中 V_{π} 是产生 π 相移的驱动电压,称为半波电压。MZM 光场和光功率的传输响应曲线如图 1 所示。在功率的传输曲线上有两个工作点需要注意,一个是正交传输点,此时的偏置电压 $V_{\text{bias}} = -V_{\pi}/2$ 或 $V_{\pi}/2$,相应的输入电压的摆幅为 V_{π} ,输出功率为最大功率的一半;另一个是最小传输点,此时的偏置电压 $V_{\text{bias}} = -V_{\pi}$ 或 V_{π} ,相应的输入电压的摆幅为 $2V_{\pi}$,输出功率为 0。若 MZM 偏置在最小传输点,当输入电压经过该点时,除了幅度被调制以外,还发生了 π 的相位跳变,所以在接收端需要使用载波恢复算法来恢复相位,这种情况被称之为相位敏感。由图 1 的曲线可以看出 MZM 是一个非线性调制器,当最

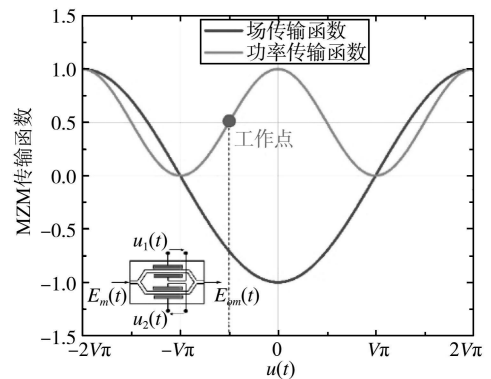


图 1 MZM 调制器的光场和光功率的传输函数曲线

小传输点的输入电压的摆幅小于 $2V_{\pi}$ 时可以避免失真。若 MZM 偏置在正交点且输入的电压摆幅小于 V_{π} , 那么就只实现了幅度调制, 避免了载波恢复算法, 减少了 DSP 复杂度, 这种情况被称之为相位不敏感, 但是该点的线性区比最小传输点的线性区要小, 从而导致该点 OSNR 的灵敏度相比最小传输点要小。

外差拍频产生 THz 信号的方案如图 2 中无线传输之前所示, 两路独立的激光器 ECL-1 和 ECL-2 各自发出光信号, 其中一路调制传输信号, 随后两路光信号耦合进入光电探测器 (PD)。利用具有平方率特性的 PD, 两路光信号之间进行拍频, 可以产生载波频率为两路光频率之差的太赫兹信号。由于两路光源独立, 因此会造成频率漂移现象, 存在相位噪声。但这种方案结构简单, 成本不高, 能灵活产生所需要的太赫兹信号, 并且产生的相位噪声在接收端可以通过数字信号处理算法补偿。下面对外差拍频产生 THz 信号进行理论分析。

假设两路激光器输出的光信号分别表示为

$$\begin{aligned} E_1(t) &= A_1 \exp[j2\pi f_1 t + j\theta_1(t)], \\ E_2(t) &= A_2 \exp[j2\pi f_2 t + j\theta_2(t)], \end{aligned} \quad (3)$$

式中 A_1 和 A_2 分别代表两路光信号的幅度, f_1 和 f_2 分别代表光信号的频率, $\theta_1(t)$ 和 $\theta_2(t)$ 分别代表各激光器的初始相位信息, 其中第一路光经过数据信息调制后, 表示为

$$E_s(t) = A_1 S(t) \exp[j2\pi f_1 t + j\theta_1(t)], \quad (4)$$

式中 $S(t)$ 代表调制的 PAM 信号, 随后两路光信号在耦合器中耦合, 信号为

$$E(t) = A_1 S(t) \exp[j2\pi f_1 t + j\theta_1(t)] + jA_2 \exp[j2\pi f_2 t + j\theta_2(t)] / \sqrt{2}。 \quad (5)$$

进入 PD 后, 两路光拍频产生的光电流可以表示为

$$I(t) = R |E(t)|^2 = RA_1^2 S^2(t) + RA_2^2 + 2RA_1 A_2 S(t) \sin\{2\pi(f_1 - f_2)t + [\theta_1(t) - \theta_2(t)]\}, \quad (6)$$

式中 R 代表 PD 的响应度。

式(6)可以简化为

$$I(t) = RA_1^2 S^2(t) + RA_2^2 + 2RA_1 A_2 S(t) \sin\{2\pi f_{\Delta} t + \theta_{\Delta}(t)\}, \quad (7)$$

式中 f_{Δ} 代表 f_1 和 f_2 之差, $\theta_{\Delta}(t)$ 代表 $\theta_1(t)$ 和 $\theta_2(t)$ 之差, 控制两路激光器输出的光频率差, 可以得到所需要的太赫兹频率 f_{THz} 。

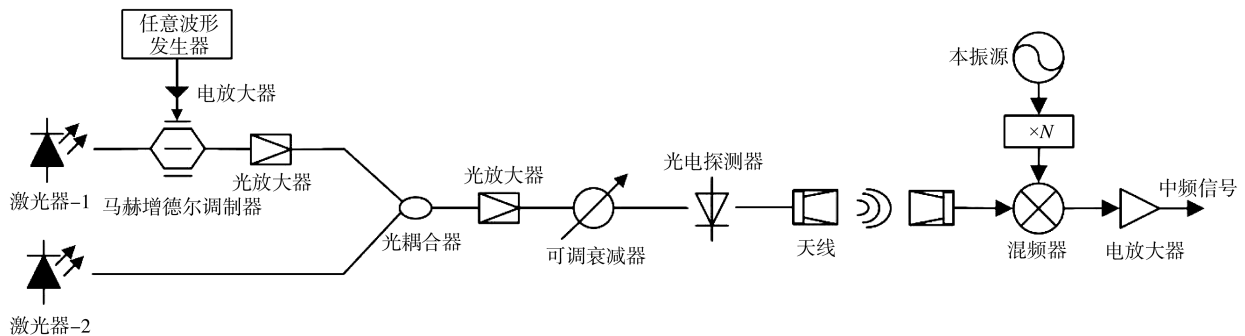


图 2 外差拍频产生太赫兹信号和外差相干探测方案

图 2 为无线传输之后外差相干探测的示意图, 利用一个本振源 RF 和一个混频器 (Mixer) 实现太赫兹信号的下变频。通常本振源的频率远低于接收到的太赫兹信号的频率, 因此需要使用额外的倍频器进行倍频, 再在混频器中与太赫兹信号混频至中频 IF, 随后中频信号 IF 经示波器采集并进行解调。外差相干探测需要额外的射频源和混频器, 成本较高, 但是具有很高的接收灵敏度, 并且在接收端可以利用 DSP 算法补偿传输中的噪声。

1.2 发送端和接收端 DSP 流程

1.2.1 发送端。发送端生成 PAM-4 符号的离线 DSP 流程图如图 3(a) 所示。首先将 PAM-4 符号映射成 $\{0, 1, 2, 3\}$, 经过 2 倍上采样后, 用一个根升余弦滤波器 (RRC) 进行脉冲成形以减少信号带宽。脉

冲成形是解决窄带宽设备的带宽受限和符号间干扰(ISI)的有效方法^[13]。成形之后的数据送入到 DAC 进行数模转换。

1.2.2 接收端。接收端恢复 PAM-4 的离线 DSP 流程图如图 3(b)所示。首先将经过 ADC 的数字中频信号进行数字下变频操作以下变频至基带信号,然后进行重采样操作使得 1 个符号有 2 个采样点。由于在实际系统中,本地的采样时钟与发射机信号时钟并不同步,所以 ADC 的采样点多数情况下并非信号的最佳采样点。采用数字平方滤波时钟恢复算法,通过提取出信号异步采样序列相应的定时误差相位来重新定义时钟,找到最佳插值点,实现信号时钟恢复^[14]。时钟恢复后,为了补偿偏振模色散,先采用恒模算法(CMA)进行预收敛,然后采用 4 个参考模值的级联多模算法(CMMA)进行进一步的信道均衡^[15,16]。其中,4 个参考模值分别为 $A_1 = 0.5(R_1 + R_2)$, $A_2 = 0.5(R_3 - R_1)$, $A_3 = 0.5(R_4 - R_2)$ 和 $A_4 = 0.5(R_4 - R_3)$, 经过迭代,最终 PAM4 信号的误差接近于零。由于相位不敏感情况下只有幅度上有信息,所以不需要使用载波恢复算法来恢复相位信息,直接可以从恢复的圆环信息中进行判决。

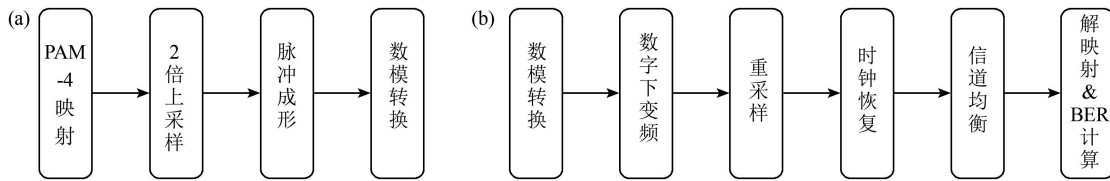


图 3 (a)相位不敏感发送端 DSP 流程图(b)相位不敏感接收端 DSP 流程图

2 仿真及结果分析

2.1 仿真平台

如图 4 所示为基于强度调制外差相干探测的相位不敏感 PAM-4 太赫兹信号产生和无线传输的仿真平台。长度为 2^{13} 的 5.75 Gb/s 的 PAM-4 信号由图 3(a)的发送端 DSP 得到,4 个符号被映射成 $\{0, 1, 2, 3\}$, 其中 RRC 的滚降因子 α 为 0.4, DAC 的分辨率为 8 位,采样率为 92 GSa/s。在中心局,激光器 ECL-1 产生稳定而连续的光载波,波长为 1553.6 nm, DAC 输出的信号经过电放大器放大后通过 MZM 调制在光载波上, MZM 被偏置在正交传输点,半波电压 V_{π} 为 2 V。被调制的光载波经过 EDFA 放大器对功率损耗进行补偿后,注入 25 km 的标准单模光纤(SSMF)链路中进行传输,再通过光衰减器 VOA-1 实现对接收光功率(ROP)的控制。在基站单元,激光器 ECL-2 作为本振光源,波长为 1552.8 nm,通过光耦合器 OC 进行耦合。图 5(a)为频率差为 100 GHz 的两束激光耦合的光谱。经过一个光衰减器 VOA-2 实现对进入 PD 的输入光功率(IOP)的控制。经过 PD 外差拍频后产生 100 GHz 的太赫兹无线信号,通过一对喇叭天线(HAs)进行太赫兹信号的无线传输。这里我们只考虑了背靠背的无线传输情况。在用户端,接收到的太赫兹信号与一个 60 GHz 的射频源通过一个混频器进行混频操作,混频之后产生 40 GHz 的中频信号。图 5(b)为 40 GHz 中频信号的电谱,图中的频率调制现象是由带通滤波器的滤波效应造成的。得到的中频信号经过电放大器放大后被采样率为 80 GSa/s 的示波器捕获,然后进行如图 3(b)所示的离线 DSP 处理。图 5(c),(d),(e)分别为经过下采样、时钟恢复和信道均衡后的星座图。可以看出,由于 $\{0, 1, 2, 3\}$ 的映射关系,最终星座点收敛成 4 个圆环,中间最小的圆环半径接近于零,激光器线宽造成的相位噪声引起了星座点的旋转。不过由于相位上没有承载信息,所以避免了载波的相位恢复,每一个环就代表 PAM-4 信号的一个幅度。

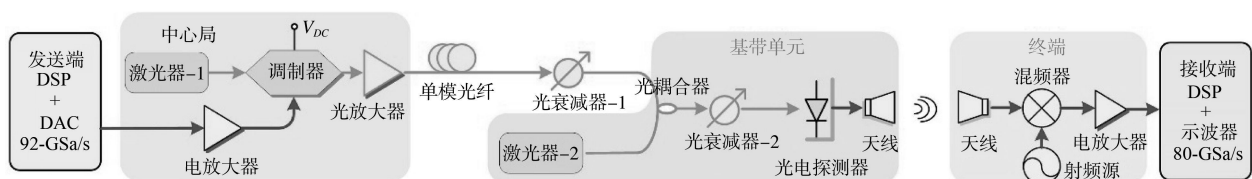


图 4 基于强度调制的相位不敏感外差相干探测的 PAM-4 太赫兹信号产生和无线传输的仿真平台

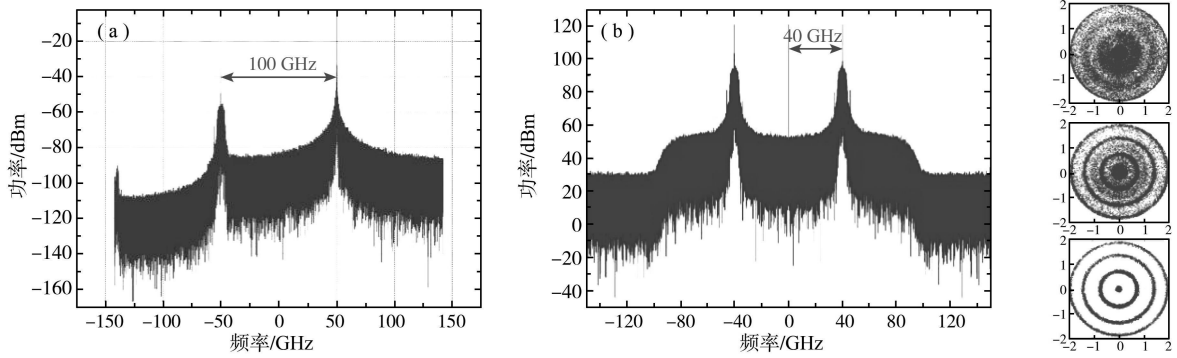


图 5 (a) 频率差为 100 GHz 的两束激光耦合的光谱; (b) 40 GHz 中频信号的电谱; (c) 下采样; (d) 时钟恢复; (e) 信道均衡

2.2 仿真结果

本论文分别对波特率为 2.875、5.75 和 11.5 GBd 的 100 GHz PAM-4 信号无线传输的 BER 性能进行了全面的仿真。仿真参数包括滚降因子、激光器线宽、DAC 分辨率、ADC 分辨率、接收光功率(ROP)和输入光功率(IOP)。这里选择 3.8×10^{-3} 作为误比特率 BER 的参考门限值。误比特率 BER 和脉冲成形滚降因子 α 的关系仿真曲线如图 6(a)所示。脉冲成形是解决带宽受限设备符号间干扰的有效方法,代价是信号的带宽增大。可以看出当 α 为 0,即信号通过一个奈奎斯特滤波器时,系统性能最差。这是因为尽管奈奎斯特滤波器可以使得信号的带宽最小,但与此同时信号也更容易受到定时误差的影响,受 ISI 的影响更大。

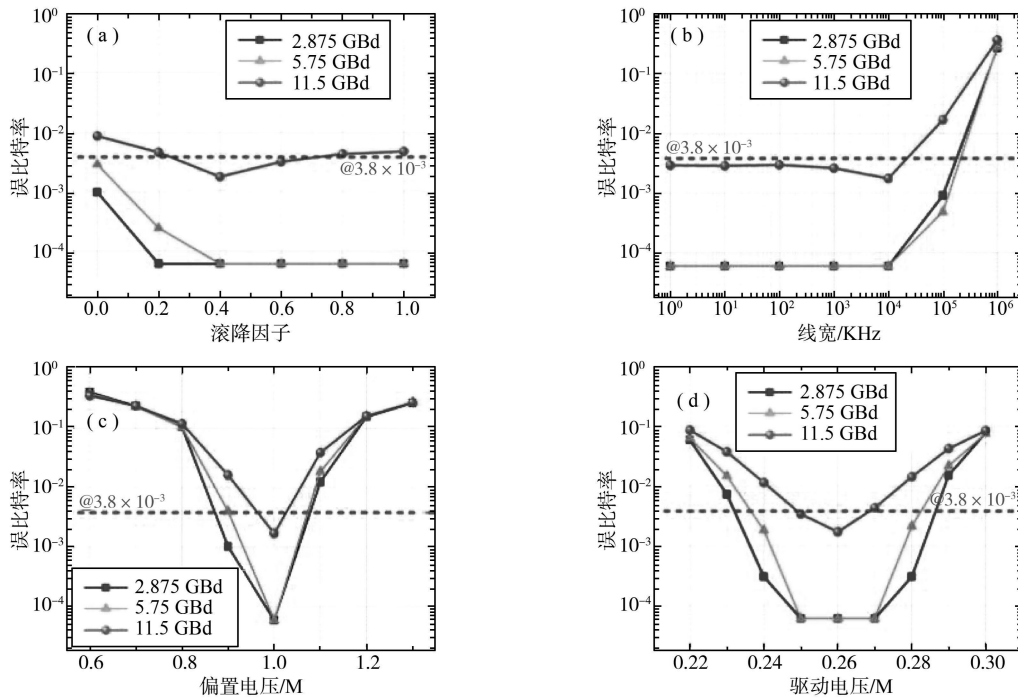


图 6 误比特率分别与(a)滚降因子(b)线宽(c)偏置电压(d)驱动电压的关系曲线

由图 6(a)还可以看出当波特率为 11.5 GBd 时,性能最佳的 α 约为 0.4,由于系统带宽受限,当 α 大于 0.4 时,系统的性能开始恶化。而对于 2.875 和 5.75 GBd 的低波特率情况,当滚降因子大于 0.4 时,系统的性能一直保持最佳状态。所以,我们选择滚降因子 $\alpha=0.4$ 。图 6(b)分别给出了三种波特率情况下 ECL-1 和 ECL-2 的激光器线宽和 BER 的关系,可以看出当激光器线宽达到 10^5 KHz 时,系统的 BER 性能开始变差,所以选择 10^4 KHz 作为最佳的激光器线宽。图 6(c)和(d)分别显示了三种波特率情况下 MZM 偏置电压、驱动电压和 BER 的关系。本仿真中 MZM 的半波电压 V_{π} 设置为 2 V,当偏置电压和驱动电压分别为 1 V 和 0.26 V 时,系统的 BER 性能是最佳的。当 MZM 的驱动电压保持在最佳状态不变,改变偏置电压的值,

或者保持 MZM 的最佳偏置电压不变,改变驱动电压的值,系统的性能都会急剧恶化。所以,当改变其中一个参数时,另一个参数也要随之改变,以使系统的性能最佳。

由于在发送端信号进行了脉冲成形,2 位的 DAC 不能实现产生 PAM-4 信号。由图 7(a)可以看出,3 位的 DAC 就可以使得 BER 保持在门限值 3.8×10^{-3} 以下,并且当 DAC 的位数继续增大时,系统的 BER 保持稳定。图 7(b)所示的 ADC 分辨率与 BER 的关系曲线与图 7(a)类似,当 ADC 位数大于 3 时,三种波特率情况下的 BER 都小于门限值 3.8×10^{-3} 。图 7(c)显示了接收光功率(ROP)和 BER 的关系曲线,ROP 指的是进入光耦合器 OC 之前的光功率,可以用来衡量接收机的灵敏度。可以看出,提高 ROP 是提升 BER 性能的有效方式。和波特率为 11.5 GBd 的情况相比,2.875 GBd 和 5.75 GBd 的系统分别获得了 6.5 dB 和 3.5 dB 的接收机灵敏度增益,并且它们的最佳 ROP 为 -32 dBm。随着波特率的增大,系统性能越来越差,此时需要增大 ROP 来提升系统的性能。图 7(d)显示了 BER 和输入光功率(IOP)的关系曲线,IOP 是指进入 PD 的光功率。在三种不同的波特率情况下,保持 ROP 为 -32 dBm 不变,相比波特率为 11.5 GBd 的情况,2.875 GBd 和 5.75 GBd 的系统分别得到 5 dB 和 3 dB 的功率增益。

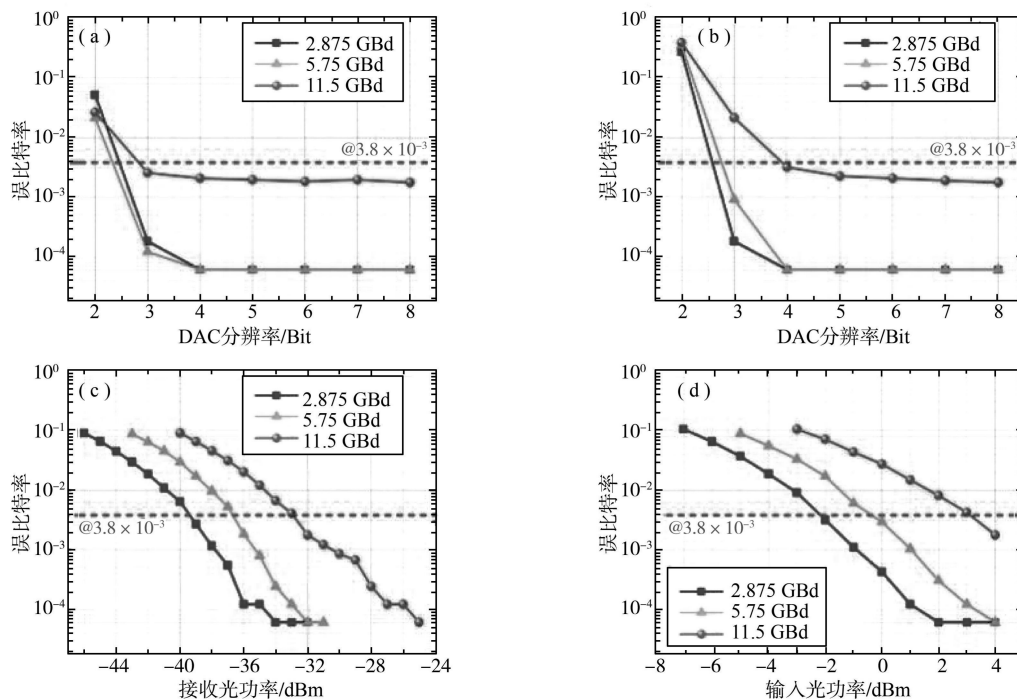


图 7 误比特率分别与(a)DAC 分辨率;(b) ADC 分辨率;(c) 接收光功率;(d) 输入光功率的关系曲线

3 结论

本文中我们基于强度调制和相位不敏感的外差相干探测,分别对 2.875、5.75、11.5 GBd 三种不同比特率的 100 GHz 的 PAM4 信号无线传输进行了仿真,全面比较了各个设备参数与 BER 性能的关系,包括滚降因子、激光器线宽、MZM 偏置电压和驱动电压、DAC 和 ADC 分辨率、ROP 以及 IOP。随着比特率的增加,误码性能随之下降。这些仿真对于光子辅助的太赫兹波段电光器件的设计具有重要的指导意义。

参 考 文 献

- [1] ZHANG J, YU J J, LI X Y, et al. 200 Gbit/s/ λ PDM-PAM-4 PON system based on intensity modulation and coherent detection[J]. Journal of Optical Communications and Networking, 2020,12(1): A1-A8.
- [2] LI X Y, YU J J, LI X Y, et al. Photonics-aided millimeter-wave technologies for extreme mobile broadband communications in 5G[J]. Journal of Lightwave Technology, 2020,38(2): 366-378.
- [3] 赵明明,余建军. 太赫兹通信系统的研究现状与应用展望[J]. 太赫兹科学与电子信息学报,2018,16(6):931-937.

-
- [4] LI X Y, YU J J, LI X Y, et al. Photonics-Aided Mm-Wave Communication for 5G[C].//Optical Fiber Communications Conference and Exhibition (OFC), San Diego, CA, USA, 2019.
- [5] YU J J. Photonics-assisted millimeter-wave wireless communication[J]. IEEE Journal of Quantum Electronics, 2017,53(6):1-17.
- [6] NAGATSUMA T. THz Communication Systems[C].//Optical Fiber Communication Conference (OFC), March 19-23, 2017, San Diego, CA, USA, 2017.
- [7] LI X Y, YU J J, WANG K H, et al. Photonics-aided 2×2 MIMO wireless terahertz-wave signal transmission system with optical polarization multiplexing[J]. Optics Express, 2017,25(26): 33236-33242.
- [8] ZHOU W, ZHAO L, ZHANG J, et al. W-band PAM-4 wireless delivery employing intensity modulation and coherent detection based on CMMA equalization[C].//2019 IEEE MTT-S International Microwave Conference on Hardware and Systems for 5G and Beyond (IMC-5G), Nairobi, Kenya, 2019.
- [9] ZHOU W, ZHAO L, ZHANG J, et al. 135 GHz D-Band 60 Gbps PAM-8 wireless transmission employing a joint DNN equalizer with BP and CMMA[J]. Journal of Lightwave Technology, 2020,38(14): 3592-3601.
- [10] ZHU Y. Comparative study of cost-effective coherent and direct detection schemes for 100 Gb/s/ λ PON[J]. Journal of Optical Communications and Networking, 2020,12(9): D36-D47.
- [11] ZHANG J, YU J J, SHAN J, et al. SOA pre-amplified 100 Gb/s/ λ PAM-4 TDM-PON downstream transmission using 10 Gbps O-band transmitters[J]. Journal of Lightwave Technology, 2020,38(2): 185-193.
- [12] ZHOU X, ZHONG K P, HUO J H, et al. 112 Gb/s transmission over 80 km SSMF using PDM-PAM4 and coherent detection without optical amplifier[J]. Optics express, 2016,24(15): 17359-17371.
- [13] ZHANG J W. Single-wavelength 100 Gb/s PAM-4 TDM-PON achieving over 32 dB power budget using simplified and phase insensitive coherent detection[C].//2018 European Conference on Optical Communication (ECOC), Roma, Italy: IEEE, 2018.
- [14] OERDER M, MEYR H. Digital filter and square timing recovery[J]. IEEE Transactions on Communications, 1988,36(5)605-612.
- [15] GODARD D N. Self-recovering equalization and carrier tracking in two-dimensional data communication systems[J]. IEEE transactions on communications, 1980, 28(11): 1867-1875.
- [16] ZHOU X, YU J J. Multi-level, multi-dimensional coding for high-speed and high-spectral-efficiency optical transmission[J]. Journal of Lightwave Technology, 2009, 27(16): 3641-3653.

寄生参数对并联 SiC MOSFET 电流不均衡的影响

张永刚^{1,2,3}, 宁平凡^{1,2,3}, 刘 婕^{1,3}, 王迪迪^{1,3}, 肖宁如³, 李玉强^{1,2,3}

(1.天津工业大学 电气工程与自动化学院,天津 300387;2.天津工业大学 电子与信息工程学院,天津 300387;
3.天津工业大学 大功率半导体照明应用系统教育部工程研究中心,天津 300387)

摘 要 SiC MOSFET 并联使用是提高系统功率密度的有效手段。在高频高压环境中并联使用的 SiC MOSFET,由于寄生电感,寄生电容等因素的差异,导致并联电流难以实现均衡。为分析导致电流不均衡现象的影响因素,本文采用 CREE 公司官网所提供的 spice 模型搭建了相关仿真测试电路。基于数据手册中所提供的器件参数,分别对寄生电容和寄生电感等参数进行差异化设置,利用 PSpice 软件进行仿真。分析了在负载电压为 600 V 时,不同寄生参数对动态和静态电流不均衡的影响程度。最后设计了一种基于阻抗平衡联合磁芯电感的方法对并联 SiC MOSFET 动静态电流不均衡进行抑制,有效抑制了并联 SiC MOSFET 电流不均衡现象的发生。

关键词 寄生电感;寄生电容;并联 SiC MOSFET;电流不均衡

中图分类号 TN32

文献标识码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



The Influence of Parasitic Parameters on Current Imbalance of Parallel SiC MOSFET

ZHANG Yonggang^{1,2,3}, NING Pingfan^{1,2,3}, LIU Jie^{1,3},
WANG Didi^{1,3}, XIAO Ningru³, LI Yuqiang^{1,2,3}

(1.School of Electrical Engineering and Automation, Tiangong University, Tianjin 300387, China; 2.School of Electronics and Information Engineering, Tiangong University, Tianjin 300387, China; 3.Engineering Research Center of Ministry of Education for High-power Semiconductor Lighting Application System, Tiangong University, Tianjin 300387, China)

Abstract The parallel connection of SiC MOSFET is an effective means to increase the power density of the system. For SiC MOSFET used in parallel in high-frequency and high voltage environments, the differences of parasitic inductance, parasitic capacitance and other factors make it difficult to realize the equalization of the parallel current. Therefore, in order to analyze the factors that lead to the current imbalance, this paper uses the spice model provided by CREE company official website to build the related simulation and test circuit. Based on the device parameters provided in the data sheet, the parasitic capacitance and parasitic inductance were differentially set, and simulation was conducted with PSpice software. The influence of

收稿日期:2020-11-01

基金项目:国家自然科学基金项目(11804249);天津市教委科研项目(2018ZD15,2018KJ210)资助

通讯作者:李玉强,男,满族,博士,讲师,研究方向:半导体材料和高压物理, E-mail:liyqiang@tiangong.edu.cn.

different parasitic parameters on the dynamic and static current imbalance at the load voltage of 600V is analyzed. Finally, a method based on impedance balance combined with core inductance is designed to suppress the dynamic and static current imbalance of parallel SiC MOSFET, which can effectively inhibit the current imbalance.

Key words parasitic inductance; parasitic capacitance; parallel SiC MOSFET; current imbalance

0 引言

随着电动汽车、新能源行业等新兴工业领域的发展,电力电子设备的应用领域也越来越广泛。作为功率开关器件的 MOSFET 和 IGBT 更引起研究人员的注意。传统的硅基器件在耐压、工作频率等方面都已经达到其物理极限,远不能满足日益提升的要求^[1],而作为宽禁带半导体代表的 SiC、GaAs 在高温、高压、高频环境下具有较高的热导率和较低损耗等优良的物理特性^[2,3]。因此, SiC MOSFET 在新能源汽车,大功率变流设备中逐步替代传统半导体器件^[4]。SiC MOSFET 制造,封装工艺相较于传统 MOSFET 并不成熟,晶圆尺寸和生长速度也远小于硅。在相同电压等级下,电流耐受程度越高,其制造、使用、后期维护的成本也越高。即使是相同型号的芯片,参数也会有一定的差异性,更大的电流和更高的开关速度下使得寄生参数在开关过程中对并联电流不均衡的影响更明显。如今,对于 SiC MOSFET 的研究主要集中于器件封装^[5],器件模型的建立^[6]以及大规模应用等重要领域^[7],而寄生参数对并联电流不均衡影响的研究相对较少。关于寄生参数研究的方法主要有:(1) 通过实验测量寄生参数的影响^[8],(2) 通过数学公式建立模型,进行相关的理论分析^[9],(3) 通过软件进行仿真,研究寄生参数对于开关和导通过程的影响^[10]。并联 SiC MOSFET 的电流不平衡主要分为动态和静态两个方面。动态电流不平衡是指在开关过程中,漏极电流由于寄生参数,驱动回路等因素所导致的差异。静态电流不平衡是指并联 SiC MOSFET 在完全导通的情况下,由于导通电阻和驱动电压等因素导致的漏极电流不均衡现象。在相同电压等级下采用更高电流等级的碳化硅模块将不存在电流不均衡的问题^[11],同时还能有效降低开关损耗,随着电流等级的提高,碳化硅芯片的制造技术不成熟,产能不足等原因导致的价格偏高,备货不充足等相关问题更严重,难以满足工业生产的需要。对并联芯片进行有效的均流措施可以有效缓解上述问题。因此对并联 SiC MOSFET 电流不均衡影响因素的研究就非常重要,为 SiC MOSFET 更广泛的使用提供理论支持。

本文分析影响并联 SiC MOSFET 电流不均衡的因素,通过仿真实验的方法验证理论分析的正确性。同时还给出了一种基于阻抗平衡联合磁芯电感的方法用以抑制并联电流不均衡,以提高并联 SiC MOSFET 系统的使工作效率。

1 寄生参数对并联 SiC MOSFET 电流不均衡的影响

本文选用 CREE 公司的 C2M008120D 型 SiC MOSFET 为研究对象,采用其官方网站所提供的 spice 模型,搭建相关仿真电路并进行了仿真实验。

图 1 是考虑寄生参数的并联 SiC MOSFET 的仿真测试原理图。图中 V_g 是栅极驱动信号源, R_g 是栅极驱动电阻,包括 SiC MOSFET 内部栅极驱动和外部驱动两部分, DUT1, 2 是两个并联使用的 SiC MOSFET 被测芯片模型。 $L_{g1,2}$ 分别是两个被测芯片的栅极寄生电感, $L_{d1,2}$ 是漏极寄生电感, $L_{s1,2}$ 是源极寄生电感。 $C_{gd1,2}$ 是栅漏极寄生电容, $C_{gs1,2}$ 是栅源极寄生电容, $C_{ds1,2}$ 漏源极寄生电容。 C_{bus} 是母线电容, V_{DD} 作为直流负载电压,设置为 600 V。由数据手册及 spice 模型的库文件得 C2M008120D 部分参数如表 1 所示。

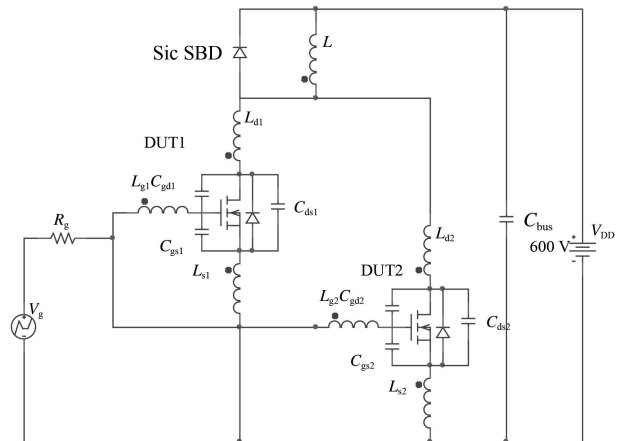


图 1 考虑寄生参数的并联 SiC MOSFET

表 1 基于数据手册的 C2M008120D 静态参数

物理属性	中文名称	典型数值	单位	测试条件
$V_{(BR)DSS}$	漏极击穿电压	1200	V	$V_{gs}=20\text{ V}$
$V_{GS(th)}$	阈值电压	2.2	V	$i_d=20\text{ A}$
R_{dson}	导通电阻	80/150	$m\Omega$	$T_J=25/150\text{ }^\circ\text{C}$
g_f	跨导	9.8/8.5	S	-
C_{iss}	输入电容	950	pF	
C_{oss}	输出电容	80	pF	$V_{gs}=0\text{ V}$
C_{rss}	反向传输电容	6.5	pF	$V_{ds}=1000\text{ V}$
L_s	栅极寄生电感	15	nH	$f=1\text{ MHz}$
L_d	漏极寄生电感	6	nH	
L_g	源极寄生电感	9	nH	

1.1 栅极寄生电感 L_g 对并联 SiC MOSFET 电流不均衡的影响

驱动回路中的栅极寄生电感 L_g , 来源于驱动引线长度和封装过程中引脚长度。栅极寄生电感 L_g 对输入电容 C_{iss} 的充放电速度和开关振荡势必有一定的影响。在仿真实验的过程中仅考虑栅极寄生电感 L_g 的差异, 保持栅极寄生电感 L_{g1} 为 1 nH 不变, 另一支路上栅极寄生电感 L_{g2} 分次设置为 10、20、30 nH, 用以模拟不同栅极寄生电感下, 对并联漏极电流 i_d 的影响程度, 其仿真结果如图 2 所示。

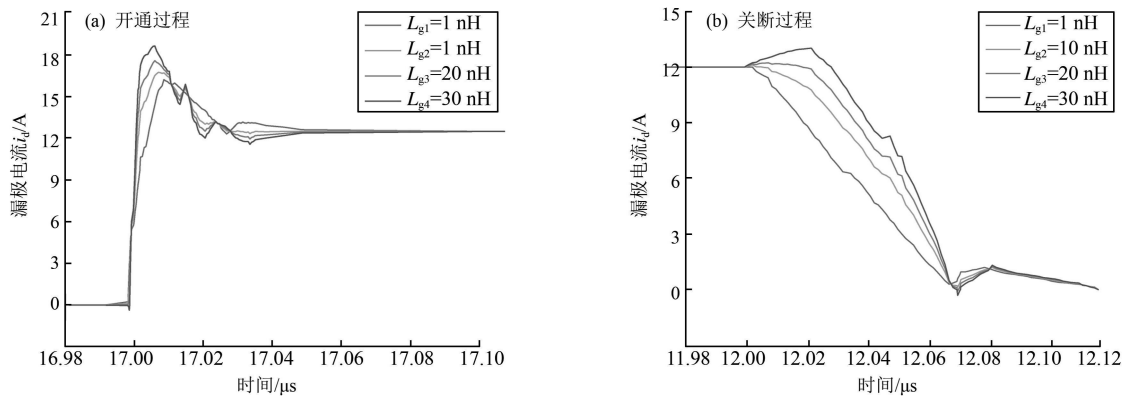


图 2 栅极寄生电感对并联电流不均衡的影响

在并联使用的开通过程中, 并联支路上的漏极电流分别为

$$i_{d1} = g_m (U_g - L_{g1} i_g - V_{th}), \quad (1)$$

$$i_{d2} = g_m (U_g - L_{g2} i_g - V_{th}), \quad (2)$$

g_m 表示器件的跨导, $i_{g1,2}$ 表示栅极驱动电流。在该过程中的电流不均衡度为

$$\lambda = \frac{i_{d1}}{i_{d2}} = \frac{g_m (U_g - L_{g1} i_g - V_{th})}{g_m (U_g - L_{g2} i_g - V_{th})}. \quad (3)$$

由公式(3)以及仿真结果可知, 栅极电感小的器件比栅极电感大的器件更早开通, 而栅极电感大的, 需要分担的电流也更多。栅极寄生电感 L_g 只有在差异较大的情况下才会对并联 SiC MOSFET 开关过程中的电流产生影响, 当两并联 SiC MOSFET 完全导通后, 栅极寄生电感 L_g 对静态电流均衡并无明显的影响。

1.2 漏极寄生电感 L_d 对并联 SiC MOSFET 电流不均衡的影响

漏极寄生电感源于器件封装过程和布线结构, 漏极寄生电感 L_d 与寄生二极管在导通后形成振荡回路, 引起电流振荡, 在关断过程中, 漏源极电容 C_{gs} 开始充电过程, 关断后与之形成振荡回路。在仿真实验的过程中仅考虑漏极寄生电感的差异, 保持栅极寄生电感 L_{d1} 为 6 nH 保持不变, 另一支路上漏极寄生电感分次设置为 4、8、10 nH, 用以模拟不同栅极寄生电感下, 对并联漏极电流 i_d 的影响程度, 开关过程的仿真结果如

图 3 所示,完全导通的仿真结果如图 4 所示。

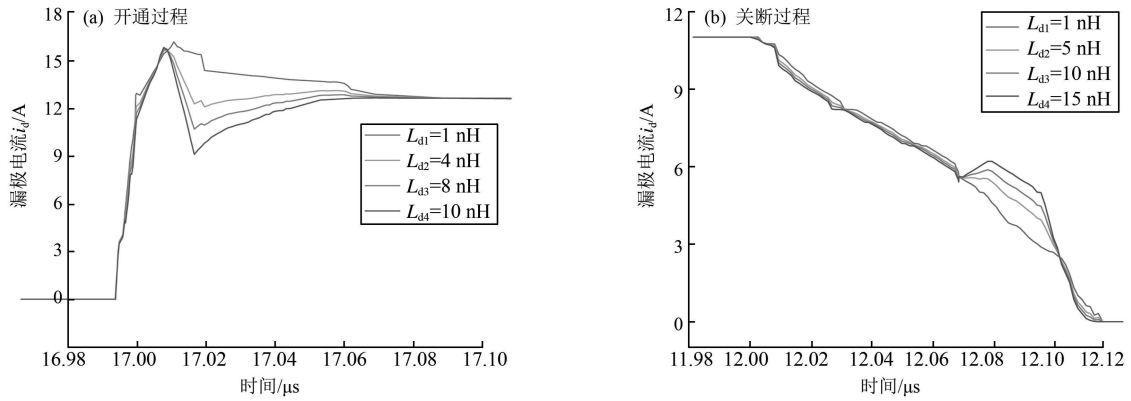


图 3 漏极寄生电感对并联电流不均衡的影响

由仿真结果可知,漏极寄生电感 L_d 对开关过程及导通后的电流不均衡均有较大的影响。漏极电感较大的支路,电流过冲较大,更容易引起电流振荡现象的发生,这也是导致器件损坏的重要原因之一。图 4 中,12 μs 时并联器件由完全导通进入关断状态,电流急剧下降。在完全导通后,由戴维南定理(Thevenin's theorem)得

$$L_{d1} \frac{d_{i1}}{d_t} + R_{d_{son1}} i_{d1} = L_{d2} \frac{d_{i2}}{d_t} + R_{d_{son2}} i_{d2} = U_{dc} - L \frac{d_{iL}}{d_t}, \quad (4)$$

式(4)中的 d_i/d_t 是电流变化率, $R_{d_{son}}$ 是导通电阻。 i_d 是漏极电流, U_{dc} 是母线电压,当导通电阻恒定时,此时的电流差异可以表示为

$$i_m = i_{d1} - i_{d2} = \frac{L_{d1} - L_{d2}}{2R_{d_{son}}} \frac{U_{DD}}{L}. \quad (5)$$

漏极寄生电感的差异直接决定了漏极电流在静态过程中的差异。在开关过程中,漏极寄生电感 L_d 和寄生的体二极管形成谐振回路,引起电流振荡,振荡频率为

$$f = \frac{1}{2\pi \sqrt{L_d C_p}}. \quad (6)$$

关断过程中,漏极寄生电容 L_d 完成对漏源极电容 C_{ds} 充电,并与之形成谐振回路,振荡频率为

$$f = \frac{1}{2\pi \sqrt{L_d C_{gs}}}. \quad (7)$$

漏极寄生电感 L_d 主要影响器件在开关过程中电流上升(下降)后的波形,当 L_d 较大的振荡频率小、阻尼系数小,因此,在开关过程中,较大 L_d 支路的电流过冲大同时振荡幅度也较大。

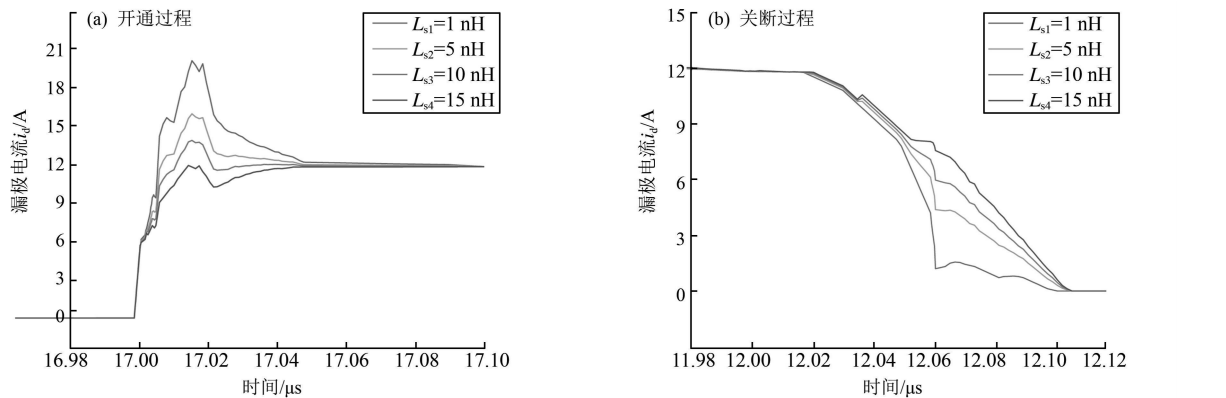


图 4 漏极电感对静态电流不均衡的影响



图 5 源极寄生电感对并联电流不均衡的影响

1.3 源极寄生电感 L_s 对并联 SiC MOSFET 电流不平衡的影响

源极寄生电感 L_s 也是影响并联 SiC MOSFET 电流不平衡的重要因素。在仿真实验的过程中仅考虑源极寄生电感 L_s 的差异,保持源极寄生电感 L_{s1} 为 1 nH 不变,另一支路上漏极寄生电感 L_{s2} 分次设置为 5、10、15 nH,用以模拟不同源极寄生电感下,对并联漏极电流 i_d 的影响程度,其仿真结果如图 5 所示。

源极寄生电感对栅源极电压具有负反馈作用,同时对静态电流几乎为无影响由于在到通知后,电流变化率几乎为零,因此就不会影响电流的变化,如公式(8)所示

$$V_{gs} = V_g - i_g R_g - L_s \frac{d_i}{d_t} \quad (8)$$

在导通过程中,当源极寄生电感较大时, SiC MOSFET 开通较慢,同时承担的电流较小,当并联器件的 L_s 差异增大时, L_s 较小的支路上电流过冲增大。关断过程与之类似。

1.4 栅源极寄生电容 C_{gs} 对并联 SiC MOSFET 电流不平衡的影响

作为电压控制型器件, SiC MOSFET 的开通关断实际上就是对栅极电容充放电的过程,由数据手册可知,器件的在输入电容 C_{iss} 由栅源极电容 C_{gs} 和栅漏极电容 C_{gd} 组成。在仿真实验的过程中仅考虑漏极寄生电感的差异,保持栅源极寄生电容 C_{gs1} 为 900 pF 不变,另一支路上栅源极寄生电容 C_{gs2} 分次设置为 930、960、1000 pF,用以模拟不同栅极寄生电容下,对并联漏极电流 i_d 的影响程度,其仿真结果如图 6 所示。

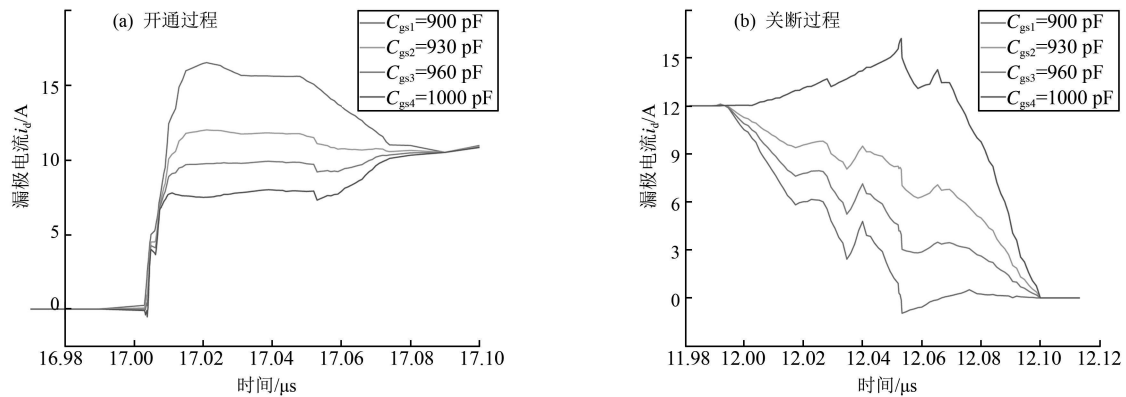


图 6 栅源极寄生电容对并联电流不平衡的影响

从图 6 可以看出,并联 SiC MOSFET 的漏极电流对于栅源极寄生电容非常敏感较小的支路上开关速度较快且漏极电流的波动也很小。在两器件完全导通后,漏极寄生电感 L_d 对静态电流均衡并无明显的影响。 C_{gs} 主要影响栅极电压的上升/下降快慢,在同样的条件下 C_{gs} 较小的器件栅压更早满足阈值,这就直接影响到器件的开关速度。减小栅源极电容与栅极驱动电阻可形成 RC 缓冲电路,可以降低器件的充放电速度,降低器件的开关速度,抑制振荡现象的发生。栅源极寄生电容越大,回路的时间常数越大,充放电时间越长,器件的开关速度越慢。同样,开关速度慢会增加器件损耗,降低器件可工作的开关频率。

SiC MOSFET 的开关过程对 C_{gs} 十分敏感,首先表现在栅极电压的上升/下降速度慢,从而导致了开关过程中电流的不平衡。由于 C_{gs2} 较大,该支路开关速度较慢, C_{gs2} 支路的数值越大,器件开通较慢,它的电流较小。在关断过程中, C_{gs2} 数值越大的支路器件关断更慢,则承受更大的电流。由数据手册可知, SiC MOSFET 的 C_{gd} , C_{ds} 数值较小,不匹配程度也相对小。因此对并联使用的 SiC MOSFET 开关过程中电流不平衡影响也较小,因此文中并未针对上述两参数对并联电流不平衡的抑制进行分析。

2 并联 SiC MOSFET 电流不平衡的抑制

并联 SiC MOSFET 电流均流方法可分为降额法^[12],阻抗平衡法^[13,14]栅极电阻补偿法^[15,16]和有源栅极控制法^[17,18]。本文给出了一种基于阻抗平衡联合磁芯电感的方法用以抑制并联 SiC MOSFET 电路不平衡的现象的发生。

如图 7 所示,是一种基于阻抗平衡和磁芯电感的并联 SiC MOSFET 电流不平衡抑制的电路原理图。其中 R_c 是串联接入并联支路的均流电阻, L_m 表示磁芯电感。在并联 SiC MOSFET 的回路中,

$$U_1 = i_{d1} (R_c + Rd_{son1}), \quad (9)$$

$$U_2 = i_{d2} (R_c + Rd_{son2}). \quad (10)$$

此时,漏极不均衡电流之比

$$\lambda = \frac{i_{d1}}{i_{d2}} = \frac{R_c + Rd_{son1}}{R_c + Rd_{son2}}. \quad (11)$$

将均流电阻 R_c 设置为 1Ω , 远大于数据手册中 $80 \text{ m}\Omega$ 的导通电阻。在导通状态下, 电流处于平衡状态且不会造成过大的损耗。并联 SiC MOSFET 支路中的电流流入匝数、结构完全相同的缠绕在磁芯上的线圈。当并联回路的寄生参数, 功率回路一致时, 漏极流过的电流不会有任何差异。两电流在磁芯中产生的磁通量的矢量和为零, 对流过的电流不会产生作用。相反的, 当电流不均衡, 磁芯电感就会产生相反的磁通相互抵消后的剩余磁通会在磁芯中产生感应电动势, 并作用到电流上升较快的支路上进而使电流趋于平衡状态。由安培环路定理可知

$$ni = \int NH dl = H 2\pi R, \quad (12)$$

式中的 H 表示磁场强度, R 表示磁芯电感的有效半径, n 表示线圈的匝数, i 表示流过线圈的电流大小。两个线圈匝数相同, 线圈回路中的励磁电感 L_m 对两并联支路中电流的不平衡可以起到抑制作用, 其感应电动势 U_f 为

$$U_f = L_m \frac{d\Delta i_d}{dt}. \quad (13)$$

磁感应强度

$$\Delta B = \mu_r \mu_0 (H_1 - H_2), \quad (14)$$

$$S = ah = \frac{1}{2} (R_{max} - R_{min}) h, \quad (15)$$

式中的 B 表示磁感应强度, μ_r 表示磁芯的相对磁导率, μ_0 为空气磁导率, S 为磁芯的横截面积, R_{max} , R_{min} 分别表示磁环内外径的大小。由公式(14)(15)可以得出

$$\Delta B = n\mu_r \mu_0 \frac{i_{d1} - i_{d2}}{2\pi R} = \frac{n\mu_r \mu_0}{2\pi R} \Delta i_d. \quad (16)$$

感应电动势 U_f

$$U_f = L_m \frac{d\Delta i_d}{dt} = \mu_r \mu_0 \frac{n^2 s d}{2\pi R} \frac{d\Delta i_d}{dt}. \quad (17)$$

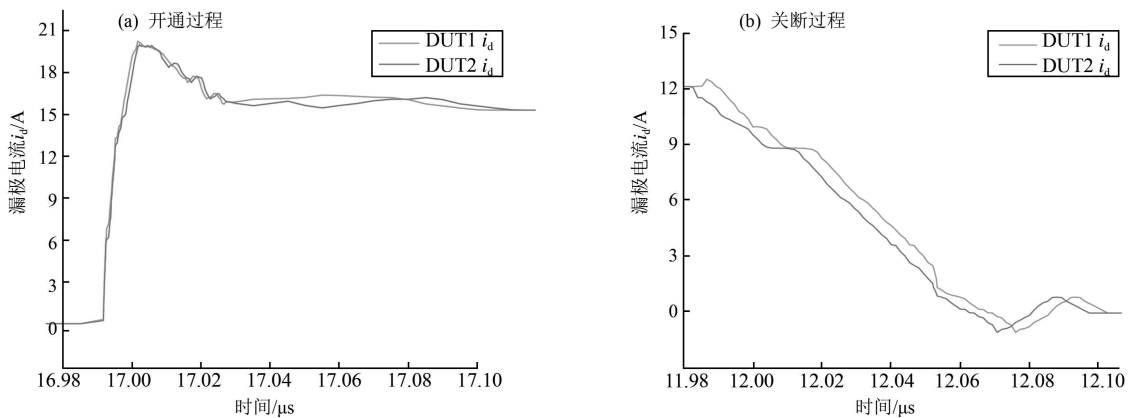


图 8 采取均流措施后开关过程中的漏极电流

磁芯电感抑制电流不平衡的本质在于作用在不平衡电流上的电感是线圈中的励磁电感大于作用在两支

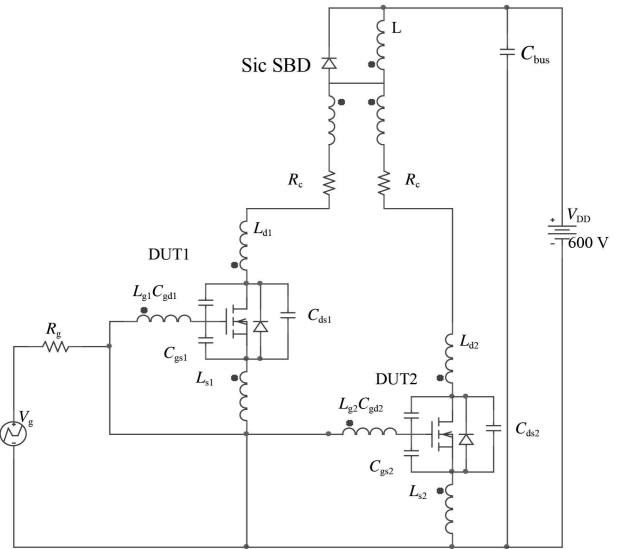


图 7 电路原理图

路电流上的电感。该均流方案适用于所有可能导致电流不平衡因素的抑制,下文将以栅极寄生电容不匹配导致的电流不平衡为例,进行仿真实验的验证。验证结果如图 8 所示。

如图 8 所示,针对栅极寄生电容 C_{gs} 的不匹配所产生的电流不平衡在采用一种基于阻抗平衡和磁芯电感的均流方法后,从图中可以看出相比于原来电流在开关过程中电流不平衡有较大程度的改善。

3 结语

本文针对可能导致并联 SiC MOSFET 电流不平衡的因素,基于 CREE 官网提供的 spice 模型进行了相关的仿真及理论分析。还给出了一种基于阻抗平衡联合磁芯电感的均流方法,该方法能有效抑制各种因素导致的动静态电流不平衡现象的发生。

(1) 并联使用的 SiC MOSFET 可以有效提高系统的功率密度。寄生参数不匹配会导致的并联电流不平衡,严重威胁回路的安全工作。源极寄生电感 L_s 和栅源极寄生电容 C_{gs} 对开关过程中电流不平衡有较大的影响而对导通之后的电流不平衡则影响较小可以忽略。漏极寄生电感 L_d 则主要影响静态电流不平衡而栅极寄生电感 L_g 只有在数值差异较大的情况下才会对动态电流不平衡产生影响。因此,在并联使用 SiC MOSFET 的过程中,芯片的寄生参数不匹配会严重影响到并联电流不平衡程度,进而威胁回路安全工作。

(2) 在并联 SiC MOSFET 工程中,不平衡电流流过均流电阻和磁芯电感,磁芯电感会产生较大的励磁电感,抑制并联过程中的不平衡电流,从而有效改善电流不平衡现象的发生。串联接入的均流电阻和磁芯电感对动静态电流不平衡有良好的抑制效果,能有效保护电路提高工作效率。

参 考 文 献

- [1] 盛况,任娜,徐弘毅.碳化硅功率器件技术综述与展望[J].中国电机工程学报,2020,40(6):1741-1753.
- [2] 李玉强,刘超,柴永灏,等.量子阱厚度和势垒掺杂对大功率 AlGaInP LED 发光效率衰减特性的影响 [J].聊城大学学报(自然科学版),2018,31(4):37-41.
- [3] 盛况,郭清,张军明,等.碳化硅电力电子器件在电力系统的应用展望[J].中国电机工程学报,2012,32(30):1-7.
- [4] 徐德鸿,徐文杰,何国锋,等.新能源对电力电子提出的新课题[J].电源学报,2014,12(6):4-9.
- [5] MITO Z, MAO Y, NGO K, et al. Package influence on the simulated performance of 1.2 kV SiC MOSFET modules[J]. Workshop on Wide-Bandgap Power Devices and Applications, 2015, 16: 306-311.
- [6] 徐国林,朱夏飞,刘先正,等.基于 PSpice 的碳化硅 MOSFET 的建模与仿真[J].智能电网,2015,3(6):507-511.
- [7] 赵斌.SiC 功率器件特性及其在 Buck 变换器中的应用研究 [D].南京:航空航天大学,2014.
- [8] 滕咏喆,高强,张乾,等.考虑器件工作温度影响的 SiC 功率 MOSFET 建模[J].中国电机工程学报,2020,40(3):932-942.
- [9] CHEN K, ZHAO Z, YUAN L, et al. The impact of nonlinear junction capacitance on switching transient and its modeling for SiC MOSFET [J]. Transactions on Electron Devices, 2015, 62(2): 333-338.
- [10] CHEN J F, LIN J N, AI T H. The techniques of the serial and paralleled IGBTs [J]. Conference of the IEEE Industrial Electronics Society, 2002, 2(2): 999-1004.
- [11] JAHHI S, ALATISE O, FISHER C, et al. An evaluation of silicon carbide unipolar technologies for electric vehicle drive-trains[J]. Journal of Emerging & Selected Topics in Power Electronics, 2014, 2(3): 517-528.
- [12] HAIDER S, LI G, WANG K. A dual control strategy for power sharing improvement in islanded mode of AC microgrid[J]. Protection and Control of Modern Power Systems, 2018, 3(2): 111-118.
- [13] 查申森,郑建勇,苏麟,等.大功率 IGBT 并联运行时均流问题研究[J].电力自动化设备,2005,25(7):32-34.
- [14] ABDI B, RANJBAR A H, MALEKIAN K. Problems associated with parallel performance of high current semiconductor switches and their remedy[J]. Automation and Motion, 2008, 4(3): 1379-1383.
- [15] 臧小惠,惠晶,沈锦飞.大容量逆变电源 IGBT 并联应用的仿真分析[J].计算机仿真,2006,23(2):197-199.
- [16] ZHOU Q, GAO F, JIANG T. A gate driver of SiC MOSFET with passive triggered auxiliary transistor in a phase-leg configuration[J]. Energy Conversion Congress & Exposition, 2015 62(8): 7023-7030.
- [17] BORTIS D, BIELA J, KOLAR J W. Active gate control for current balancing of parallel-connected IGBT modules in solid-state modulators [J]. Transactions on Plasma Science, 2008, 36(5): 2632-2637.
- [18] SASAKI M, NISHIO H, NG W T. Dynamic Gate Resistance Control for Current Balancing in Parallel Connected IGBTs[C]. // Applied Power Electronics Conference and Exposition (APEC), 2013.

自聚焦圆贝塞尔高斯涡旋光束在自由空间中的传播特性

江俊杰,邓冬梅

(华南师范大学 广东省微纳光子功能与器件重点实验室,广东 广州 510631)

摘要 根据近轴光场方程及分步傅里叶算法,数值模拟了圆贝塞尔高斯涡旋光束在自由空间的传播。与传统自聚焦光束相比,其聚焦距离更长,焦平面强度更高。通过缩放光斑的初始尺寸,光束的聚焦特性也会随之改变。由于焦点处存在中空区域并携带轨道角动量,其在粒子捕获有着应用前景。此外,还研究了涡旋形式对该光束的影响。

关键词 光学涡旋;贝塞尔光束;自聚焦光束

中图分类号 O436.1

文献标识码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Propagation Dynamics of Autofocusing Circular Bessel Gaussian Vortex Beams in Free Space

JIANG Junjie, DENG Dongmei

(Provincial Key Laboratory of Nanophotonic Functional Materials and Devices,
South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract Based on the split-step Fourier method and paraxial wave equation, we introduce a new class of Circular Bessel Gaussian Vortex Beams (CBGVs) with the autofocusing property and investigate their propagation dynamics in free space. By increasing the beam size, the focus properties of CBGVs will change. Propagation dynamics of CBGVs with an on-axis vortex and off-axis vortex is also investigated.

Key words optical vortices; Bessel beams; autofocusing

0 引言

2010年, Efremidis^[1]等人首次提出了具有激增自聚焦特性的径向对称波包。这类光束有一个特殊的性质,即在传播过程中,它们的最大强度几乎保持不变,而在焦点处突然以数量级激增。与克尔介质(Kerr Media)产生的自聚焦效应不同的是,这类光束的自聚焦是纯线性的,是光场结构本身的结果^[2]。随后, Efremidis^[3]和 Panagiotopoulos^[5]通过实验证实这种光束确实存在。激增自聚焦光束在烧灼点的形成^[3], 介电微粒子的光学捕获和操纵^[4,6,7]以及非线性强光子弹的产生^[5]有着独特的应用前景。然而,对于传统的自聚焦

收稿日期:2020-10-12

基金项目:国家自然科学基金项目(11775083,11374108);广东省攀登计划(pdjh2020a0149)资助

通讯作者:邓冬梅,女,汉族,博士,研究员,研究方向:光信息传输与处理;自加速光束及涡旋光束的传输及其应用, E-mail: dmdeng@263.net。

光束而言,即环艾里高斯光束,对于较长的传播距离时,其自聚焦能力由于焦平面强度相对较低而受到限制。

1987年,Durnin等人推导出亥姆霍兹方程的精确解,即贝塞尔模式,是非衍射光束族的重要成员^[8-10]。由于贝塞尔光束的准无衍射特性,它可以应用于不同的领域,如光学操控^[11]、自由空间光通信^[12,13]、显微镜成像^[14]等。

光学涡旋(Optical Vortices)是一种具有螺旋相位波前,带有轨道角动量(OAM),能够携带不同拓扑电荷数的光束。对于有 l 个拓扑荷的涡旋光束,绕光束传播方向(z 轴)一周,相位改变 $2l\pi$,光束横截面中心处振幅为0,在 z 轴上存在相位奇异。涡旋光束在光通信^[15-17]、光学捕获^[18]、光学显微镜^[19]等方面有广泛的应用。近年来,嵌入不同类型自动聚焦光束的涡旋光束得到了广泛的研究^[20-23]。

根据现有研究成果,提出一种可以在长距离内实现焦平面强度较高的自聚焦新型圆贝塞尔高斯涡旋光束(Circular Bessel Gaussian Vortex Beams,简称CBGVs),并系统的研究了它在自由空间的传播特性。

1 同轴涡旋的自聚焦圆贝塞尔高斯涡旋光束的传播特性

我们假定CBGVs在自由空间中传播,在傍轴光学系统中,波的复包络服从傍轴亥姆霍兹方程,即

$$\frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial y^2} + 2ik_0 \frac{\partial u}{\partial z} = 0, \quad (1)$$

其中 u 为光波的复振幅, $k_0 = \frac{2\pi}{\lambda}$ 为波数, λ 为波长。

在柱坐标系中,带有同轴涡旋的CBGVs初始光场表达式为

$$u(r, \varphi, z=0) = CJ_n \left(\frac{r_0 - r}{w_0} \right) \exp \left[-a \left(\frac{r_0 - r}{w_0} \right)^2 \right] \left(\frac{r}{w_0} \right)^m \exp(im\varphi), \quad (2)$$

其中 C 为控制初始输入功率的无量纲常数, J_n 为 n 阶第一类贝塞尔函数,当 $n=0$ 时, r_0 为主环的半径,当 $n>0$ 时, r_0 为两个主环的中点(如图1(a)所示), w_0 为长度参数, m 为拓扑荷数, a 为控制初始光束衰减的衰减系数, z 为光束传播距离。

由于CBGVs在自由空间的传播解析表达式难以求出,我们这里将采用分步傅里叶循环的方法^[24]来数值模拟其传播过程。若未作其他特殊说明,本文的部分参数选取如: $C=1$, $r_0=3$ mm, $w_0=20$ μ m, $a=0.001$, $n=1$, $\lambda=632.8$ nm。

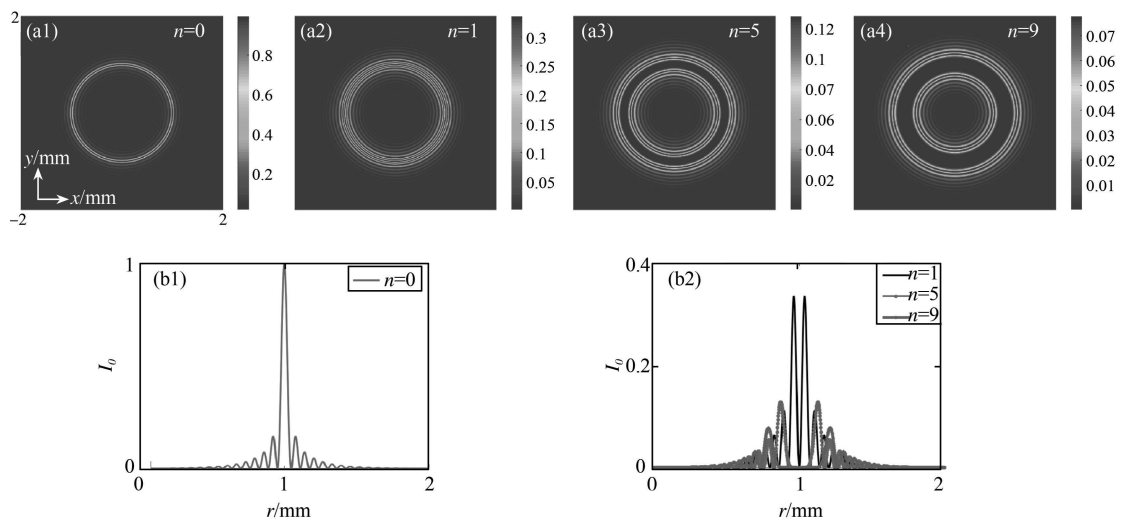


图1 (a) CBGVs的横截面光场分布;(b) CBGVs的初始强度 I_0 与 r 的关系

图1给出了部分CBGVs的横向截面图以及光场分布情况,其中 I_0 代表初始平面的光强,为了现象更加明显,这里我们取 $r_0=1$ mm, $m=0$ 。从图1我们可以看到,初始强度分布是关于 $r=r_0$ 对称的。从图1(a)我们可以看到,零阶CBGVs在 $r=r_0$ 处有一个主环,而高阶的CBGVs则有两个环且对称分布在 $r=$

r_0 的两侧。注意到在光束内部区域 ($r < r_0$), 随着 r 的增加, 其强度也不断增大, 并最终在里面那个环取得极值, 随后, 随着 r 的增加, 强度却不断下降并最终达到零。因此, 光束的内部区域在传播过程中会经历自动散焦而不是自动聚焦。然而, 在光束的外部区域 ($r > r_0$) 却有着刚好相反的行为。从图 1 我们可以看到, 随着阶数 n 的不断增大, 强度为 0 的区域也会不断变大。因此, 当 n 较低时, $r = r_0$ 处的空心区域较小, 外圈和内圈引起的聚焦变得很近, 这可能会增强自动聚焦特性。为了更好地展现 CBGVBs 的聚焦特性, 下文中的讨论我们都令 $n = 1$ 。

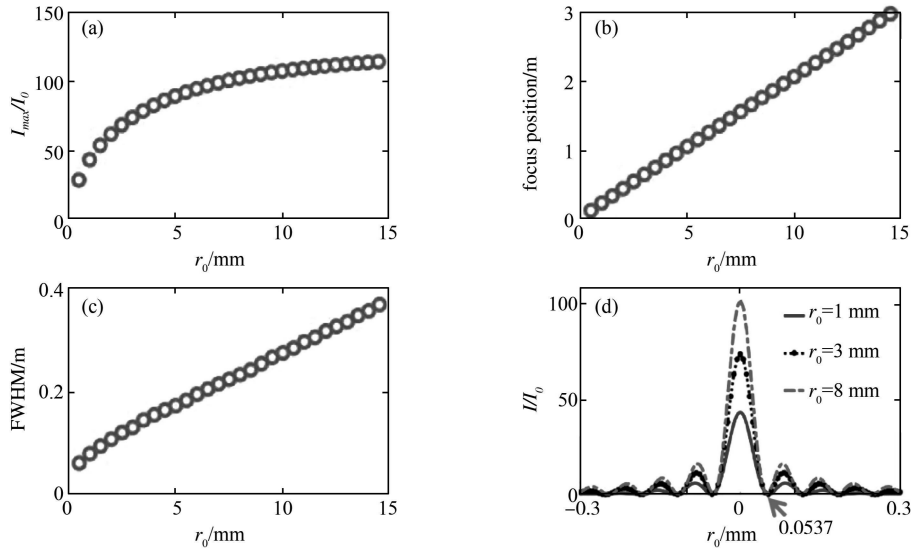


图 2 聚焦特性与 r_0 的关系 (a) I_{\max}/I_0 与 r_0 的关系; (b) 聚焦位置与 r_0 的关系; (c) 半高全宽与 r_0 的关系; (d) 不同 r_0 对应的焦平面横向分布

图 2 展示了当 $m = 0$ 时, 光束初始半径 r_0 对聚焦特性的影响。图 2(a) 的纵坐标 I_{\max}/I_0 为归一化强度 (任意位置的最大强度与初始输入强度的比值), 而 (c) 中的 FWHM 为半高全宽 (full width at half maximum)。从图 2(a) 我们可以看出随着 r_0 的增加, 归一化强度也随着光束功率的增加而增加。从图 2(b)(c) 中可以看出, CBGVBs 的焦距和半高全宽几乎随 r_0 的增加而线性增加。然而, 如图 2(d) 所示, 即使 r_0 发生改变, 焦平面内的光斑大小基本不变, 半径约为 $53.7 \mu\text{m}$, 因此, 当我们缩放光斑的初始尺寸 r_0 时, 光束的聚焦特性即聚焦强度, 焦距及半高全宽会同时发生改变。

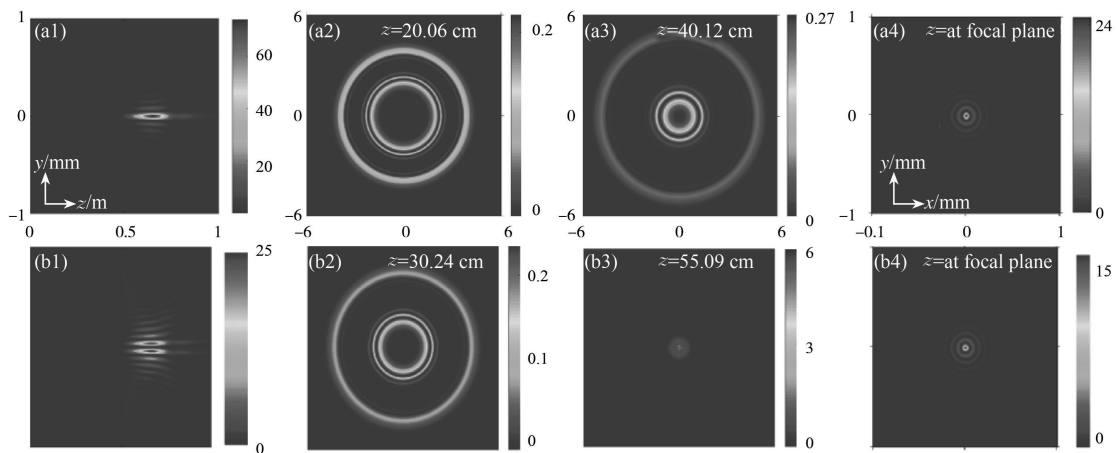


图 3 CBGVBs 的传播侧视图及部分截面图 (a) $m = 0$; (b) $m = 1$ 其中 (a)(b) 图的坐标上下对应

图 3 给出了 $m = 0$ 和 $m = 1$ 的传播侧视图 (z - y 图) 及部分截面图, 其中 colorbar 代表归一化强度 $I/I_{0\max}$ (任意位置处的强度与初始输入强度最大值的比值), 从图 3 的 (a1)、(b1) 可以看出 CBGVBs 沿 z 轴传播的过程中, 强度不断增加, 并在焦平面前激增自聚焦。同时, 图 3 的 (a4)、(b4) 以及图 2 的 (d) 表明光束在达到焦平面前, 光斑不断缩小, 即强度不断向光束中心聚焦。与传统的圆贝塞尔光束相比 ($m = 0$), 当 $m = 1$ 时,

CBGVs 沿 z 轴存在一个由同轴涡旋引起的中空通道。从图 4(b)我们可以看到,当 $m > 0$ 时,CBGVBs 的归一化强度比 $m = 0$ 时要小得多。并且当 m 增大时,光束的归一化强度变小,而光束中心的零强度区域变大。这一特殊性在粒子捕获这一应用中有着极其重要的作用。近年来,圆贝塞尔光束已被广泛应用于粒子的操纵和捕获^[10],与普通的光镊设置相比,因其突变聚焦特性而使用了放大率较低的物镜。但由于其在焦点处的强度分布不是中空的,传统的圆贝塞尔光束($m = 0$)不适合捕获折射率小于周围介质的微粒。并且传统贝塞尔光束并不携带轨道角动量,这在光扳手以及光镊的应用上是非常不利的。因此,焦平面为存在中空区域且携带轨道角动量的圆贝塞尔高斯涡旋光束有着更广泛的应用。此外,拓扑荷为 $m = 0, 1, 2$ 的 CBGVs 分别在 $z = 65.2, 65.6, 65.8$ cm 处聚焦。可以看到,当 m 上升时,聚焦位置也会稍稍后移。

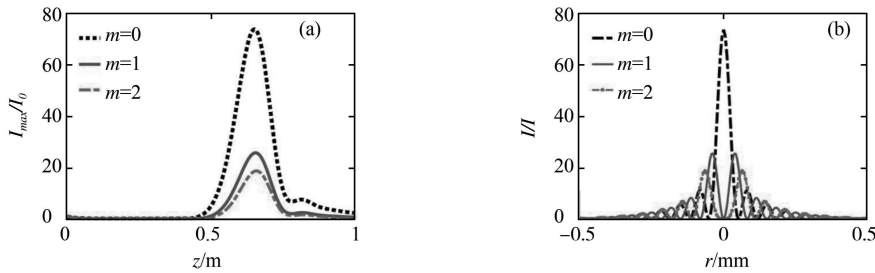


图 4 (a) CBGVs 传播过程中的归一化强度与 z 和 m 的关系图;(b) CBGVs 在焦平面处的归一化强度与 r 和 m 的关系图

2 对称双离轴涡旋的圆贝塞尔高斯光束的传输特性

近几十年来,如何产生高质量的涡旋光场成为人们研究的一个热点内容,这其中就包括无衍射光束^[25]。然而,在产生涡旋光束的过程中,较难保证涡旋轴与传播轴完全重合,也就是说产生的涡旋具有一定的离轴量。因此,研究离轴涡旋的圆贝塞尔高斯光束是十分有必要的,为了计算简便,我们假定两个涡旋沿 x 轴对称放置,则其光场表达式可写为

$$u(r, \varphi, z = 0) = \frac{C}{\tau w_0^2} J_n \left(\frac{r_0 - r}{\tau w_0} \right) \exp \left[-a \left(\frac{r_0 - r}{\tau w_0} \right)^2 \right] (r e^{i\varphi} + r_k)(r e^{\pm i\varphi} - r_k), \quad (3)$$

其中 \pm 代表涡旋方向,即拓扑荷为 $(+1, -1)$ 或 $(+1, +1)$,两个涡旋的初始距离为 $2r_k$ 。

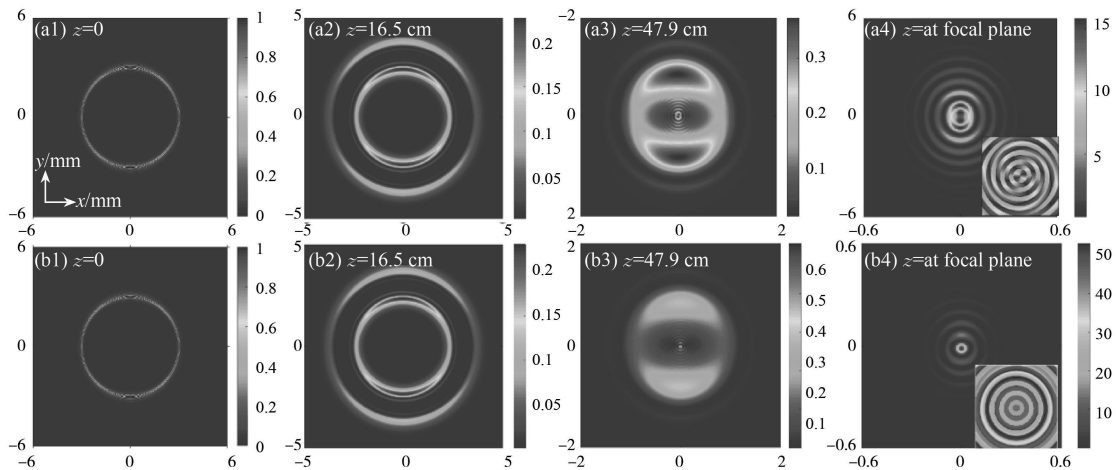


图 5 CBGVs 部分传播侧视图,其中(a4)(b4)分别为焦平面($z = 65.8, 65.9$ cm)的归一化强度和相位图,其中(a1)-(a4)的拓扑荷为 $(+1, +1)$, $r_k = 1.5$ mm,(b1)-(b4)的拓扑荷为 $(+1, -1)$, $r_k = 1.5$ mm

从图 5(a1)-(b4)中,我们可以发现拓扑荷为 $(+1, +1)$ 的两个光学涡旋叠加时,二者都有向中心收拢的趋势,并在焦平面处重叠但不完全重合(从相位图可以看出),同时,在光束的中心附近有两个中空洞,归一化强度较低。从相位图上可以看出,在光源附近存在两个相邻的奇点,即在传播过程中有两个相同的涡旋向光束中心偏移。然而,如果两个相反的涡旋加在 CBGVs 上,它们在传播过程中发生碰撞并湮灭。归一化强

度分布图(图 5(b4))和相位图与 $m = 0$ 时 CBGVBs 的情况相似,只是焦平面的主瓣略微向上移动。

接下来,我们将研究不同涡旋位置而产生的影响。我们分别将涡旋放置在初始光束中空区域($r_k = r_0$)以及区域外部($r_k > r_0$)。如图 6 所示,当 $r_k = r_0$ 时,其传播情况与 $r_k = 1.5$ mm 类似,但其沿 x 轴存在一条缝隙。焦平面内沿 y 轴存在两个主瓣,从其相位图我们可以看出,两个主瓣之间的相位差近似为 π ,相位沿 x 轴分布混乱。如图 6(b1)-(b4)所示,当两个相反的涡旋位于入射光束的两个主环外时,焦平面的主瓣向下位移,与图 5(b1)-(b4)中的情况相反。

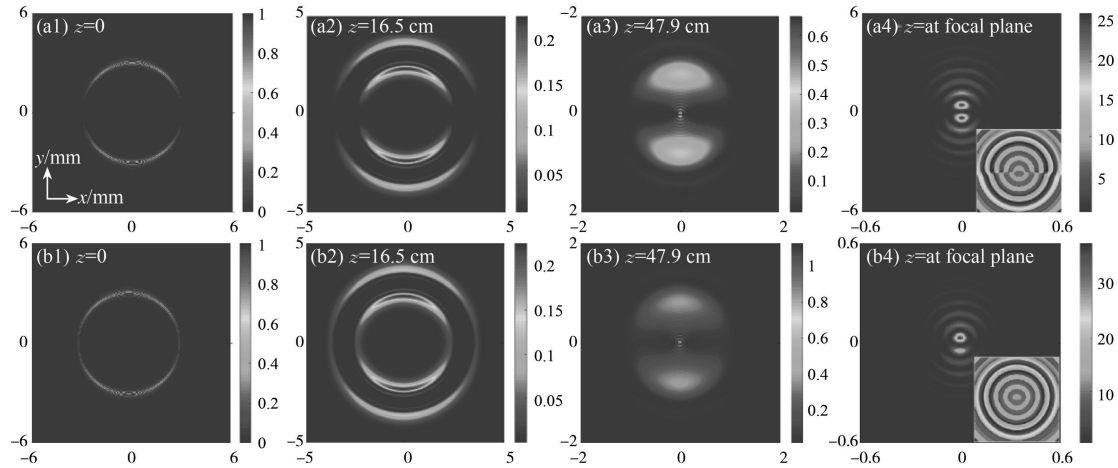


图 6 CBGVBs 部分传播侧视图,其中(a4)(b4)分别为焦平面($z = 65.7$ cm, $z = 65.2$ cm)的归一化强度和相位图,其中(a1)-(b4)的拓扑荷均为 $(+1, -1)$, (a1)-(a4)中 $r_k = 3$ mm, (b1)-(b4)中 $r_k = 4.5$ mm

4 结论

本文系统地研究了 CBGVBs 在自由空间的传播特性,我们发现可以通过改变输入光束的尺寸 r_0 来控制聚焦位置、聚焦强度和半高全宽。与传统的自聚焦光束相比,CBGVBs 可以在更长的距离和更小的衍射范围内自动对焦。同时,得益于光学涡旋的作用,我们发现 CBGVBs 在焦平面处有一个中空区域,这一特性在捕获折射率小于周围介质的微粒有着重要的应用前景。除此之外,我们还讨论了带有双对称离轴涡旋的 CBGVBs 的性质,通过改变 r_k 以及涡旋形式,涡旋会发生重叠,碰撞湮灭等等现象。

参 考 文 献

- [1] EFREMIDIS N K, CHRISTODOULIDES D N. Abruptly autofocusing waves[J]. Optics Letters, 2010, 35: 4045-4047.
- [2] CHREMMOS I, EFREMIDIS N K, CHRISTODOULIDES D N. Preengineered abruptly autofocusing beams[J]. Optics Letters, 2011, 36: 1890-1892.
- [3] PAPAZOGLU D G, EFREMIDIS N K, CHRISTODOULIDES D N, et al. Observation of abruptly autofocusing waves[J]. Optics Letters, 2011, 36: 1842-1844.
- [4] ZHANG P, PRAKASH J, ZHANG Z, et al. Trapping and guiding microparticles with morphing autofocusing airy beams[J]. Optics Letters, 2011, 36: 2883-2885.
- [5] PANAGIOTOPOULOS P, PAPAZOGLU D G, COUAIROUAND A, et al. Sharply autofocused ring-airy beams transforming into non-linear intense light bullets[J]. Nature Communication, 2013, 4: 2622-2627.
- [6] LU W, SUN X, CHEN H, et al. Abruptly autofocusing property and optical manipulation of circular airy beams[J]. Physical Review A, 2019, 99: 013817.
- [7] JIANG Y, HUANG K, LU X. Radiation force of abruptly autofocusing airy beams on a rayleigh particle[J]. Optics Express, 2013, 21: 24413-24421.
- [8] DURNIN J, MICELI J J, EBERLY J H. Diffraction-free beams[J]. Physical Review Letter, 1987 58: 1499-1501.
- [9] DURNIN J. Exact solutions for nondiffracting beams. I. the scalar theory[J]. Journal of the Optical Society of America A, 1987, 4: 651-654.
- [10] ARLT J, GARCES CHAVEZ V, SIBBETT W, et al. Optical micromanipulation using a bessel light beam[J]. Optics Communication, 2001,

197;239-245.

- [11] NELSON W, PALASTRO J P, DAVIS C C, et al. Propagation of bessel and airy beams through atmospheric turbulence[J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 2014, 31:603-609.
- [12] BIRCH P, ITUEN I, YOUNG R, et al. Long-distance bessel beam propagation through kolmogorov turbulence[J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 2015, 2:2066-2073.
- [13] PLANCHON T, GAO L, MILKIE D, et al. Rapid three-dimensional isotropic imaging of living cells using bessel beam plane illumination [J]. *Nature Methods*, 2011, 8:417-423.
- [14] NYE J F, BERRY M V. Dislocations in wave trains[J]. *Proceedings of the Royal Society -Mathematical Physics and Engineering Sciences*, 1974, 336:165-190.
- [15] YAN Y, XIE G, LAVERY M, et al. High-capacity millimetre-wave communications with orbital angular momentum multiplexing[J]. *Nature Communication*, 2014, 5:4876.
- [16] YAN X, GUO L, CHENG M, et al. Controlling abruptly autofocusing vortex beams to mitigate crosstalk and vortex splitting in free-space optical communication[J]. *Optics Express*, 2018, 26:12605-12619.
- [17] YAN X, GUO L, CHENG M, et al. Probability density of orbital angular momentum mode of autofocusing airy beam carrying power-exponent-phase vortex through weak anisotropic atmosphere turbulence[J]. *Optics Express*, 2017, 25:15286-15298.
- [18] GAHAGAN K T, SWARTZLANDER G A. Optical vortex trapping of Particles[J]. *Optics Letters*, 1996, 21:827-829.
- [19] YAN L, GREGG P, KARIMI E, et al. Q-plate enabled spectrally diverse orbital-angularmomentum conversion for stimulated emission depletion microscopy[J]. *Optica*, 2015, 2:900-903.
- [20] CHEN X, DENG D, WANG G, et al. Abruptly autofocused and rotated circular chirp pearcey gaussian vortex beams[J]. *Optics Letters*, 2019, 44:955-958.
- [21] YU W, ZHAO S, JIANG P, et al. Propagation dynamics of janus vortex waves[J]. *Optics Express*, 2019, 27:34484-34495.
- [22] SUN C, DENG D, YANG X, et al. Propagation dynamics of autofocusing circle pearcey gaussian vortex beams in a harmonic potential[J]. *Optics Express*, 2020, 28:325-333.
- [23] JIANG Y, HUANG K, LU X. Propagation dynamics of abruptly autofocusing airy beams with optical vortices[J]. *Optics Express*, 2012, 20:18579-18584.
- [24] POON T C, KIM T. *Engineering Optics With Matlab[M]*. World Scientific, 2006.
- [25] 高垣梅, 卢城臻. 含多阶涡旋的无衍射阵列光束的设计[J]. *聊城大学学报(自然科学版)*, 2019, 32(2):42-46.

关于水热合成 $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2 : \text{Yb}^{3+}, \text{Ho}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ 荧光粉的上转换白光研究

江 莉, 杨 骏

(西南大学 化学化工院, 重庆 400715)

摘 要 在无任何添加剂作用下仅通过简单水热法成功制备了 $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2 : \text{Ln}^{3+}$ ($\text{Ln} = \text{Yb}^{3+}, \text{Ho}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$) 荧光粉。在 980 nm 近红外激发下, 研究了荧光粉的上转换发光性质与能量传递机制, $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2 : \text{Yb}^{3+}/\text{Ho}^{3+}$ 的上转换发射光谱由绿色发射(539 nm)和红色发射(658 nm)组成, $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2 : \text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ 的上转换发射光谱主要为蓝色发射(475 nm)。当三掺 $\text{Yb}^{3+}/\text{Ho}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ 离子时, 成功制得较为理想的白色上转换荧光粉(0.3345, 0.3309), 与国际标准色度坐标值相接近(0.33, 0.33), 可能具有生物医学探针等潜在应用。

关键词 水热法; 上转换发光; 能量传递

中图分类号 TB321

文献标识码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Study on Up-conversion White Light of Hydrothermal Synthesis $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2 : \text{Yb}^{3+}, \text{Ho}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ Phosphors

JIANG Li, YANG Jun

(School of Chemistry and Chemistry Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2 : \text{Ln}^{3+}$ ($\text{Ln} = \text{Yb}, \text{Ho}, \text{Tm}$) phosphors were successfully prepared by simple hydrothermal method without any additives. The up-conversion luminescence properties and energy transfer mechanism of phosphor were studied under the excitation of 980 nm near-infrared. The up-conversion emission spectra of $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2 : \text{Yb}^{3+}/\text{Ho}^{3+}$ were composed of green emission (539 nm) and red emission (658 nm), and the up-conversion emission spectra of $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2 : \text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ were mainly blue emission (475 nm). When $\text{Yb}^{3+}/\text{Ho}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ ions doped, the relatively ideal up-conversion phosphors (0.3345, 0.3309) were successfully prepared, which were close to the international standard chrominance coordinate value (0.33, 0.33) and may have potential applications as biomedical probes.

Key words hydrothermal method; up-conversion luminescence; energy transfer

收稿日期: 2020-11-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(51302229)资助

通讯作者: 杨骏, 男, 汉族, 博士, 教授, 研究方向: 稀土发光材料, E-mail: jyang@swu.edu.cn.

0 引言

稀土(RE)离子由于其丰富的能级及发光光谱而一直备受青睐,研究者们发现以稀土离子掺杂的荧光材料不仅在光学测温领域^[1-3]显示了其优异性能,而且广泛应用在生物医学^[4]、生物纳米探针^[5]、玻璃大棚^[6]、LED^[7]等诸多领域。最近,稀土离子掺杂的白色上转换(UC)发光材料的研究赢得了大量关注^[7-9]。纵观众多稀土离子中,在Yb³⁺离子作为敏化剂时,Er³⁺离子和Ho³⁺离子作为发光中心,受激发后(980 nm)能同时产生红色和绿色上转换发光,而Tm³⁺离子在激发后又能发出强蓝色排放,根据三基色原理(红绿蓝按一定比例复合能得到白色)因此常把Yb³⁺/Er³⁺/Tm³⁺离子或Yb³⁺/Ho³⁺/Tm³⁺离子共同掺杂到同一基质中而实现白色的上转换发光。例如Zhao的课题组利用无表面活性剂的水热合成法制备了Sr₂ScF₇纳米晶体,并通过三掺Yb³⁺/Er³⁺/Tm³⁺离子首次得到了标准色度坐标为(0.320,0.330)的Sr₂ScF₇:Yb³⁺/Er³⁺/Tm³⁺白色上转换荧光粉^[7]。Jin等人采用热水法制得Ba(MoO₄)_{0.5}(WO₄)_{0.5}:Yb³⁺,Ho³⁺,Tm³⁺纳米荧光粉,并利用XRD和SEM分别研究了其物相结构与粒径的大小^[10]。众所周知,基质材料的物理结构和化学性质在稀土发光材料中扮演了举足轻重的角色,因此基质材料的选取显得尤为慎重。近些年,稀土发光材料蓬勃发展,已先后报道了氟化物^[11,12]、钒酸盐^[13]、磷酸盐^[14]、钨酸盐^[15]以及钼酸盐^[16]等稀土荧光材料。其中,含副族元素的双钼酸盐晶体材料拥有特殊的白钨矿结构而具有较好的物理稳定性和化学性质,并且声子能量比较低因此受到了许多关注。然而,AgY(MoO₄)₂:Yb³⁺/Ho³⁺和AgY(MoO₄)₂:Yb³⁺/Tm³⁺荧光粉的发光性质以及Yb³⁺/Ho³⁺/Tm³⁺掺杂的白色上转换发光材料却少有文献报道^[16,17]。合成荧光粉的方法多种多样,常见的有高温固相法^[18]、溶胶凝胶法^[19]、共沉淀法^[20]、水热法^[11]等,本文采用的简单的是水热合成方法。

本研究是在夏等人对AgY(MoO₄)₂:Yb³⁺/Er³⁺荧光粉的温敏性质的研究基础上进一步探究其上转换白光的性质。合成AgY(MoO₄)₂:Ln³⁺荧光粉依然是利用一步水热法,且分别研究了AgY(MoO₄)₂:Yb³⁺/Ho³⁺和AgY(MoO₄)₂:Yb³⁺/Tm³⁺上转换的发光情况,以及由Yb³⁺/Ho³⁺/Tm³⁺三掺调节上转换白色发射,探究了其上转换能量传递机制。

1 实验部分

1.1 实验过程

AgY(MoO₄)₂:Ln³⁺(Ln=Yb³⁺,Ho³⁺,Tm³⁺)荧光粉由简单水热法完成的,量35 mL去离子水于洗净并干燥的烧杯中,分别滴加1 mmol Y(NO₃)₃,1 mmol AgNO₃,少量的Yb(NO₃)₃,Ho(NO₃)₃和Tm(NO₃)₃充分搅拌后呈透明溶液。搅拌半小时后,计算出2 mmol(NH₄)₆Mo₇O₂₄的质量并准确称取,加到上述混合溶液中。在磁力搅拌下充分搅拌半个小时,将淡黄色液体转移至50 mL反应釜内胆中,并加蒸馏水至容器的80%,在200 °C的烘箱中恒温反应24 h。反应结束后完全冷却至室温,用去离子水以及无水乙醇反复清洗,然后离心,在60 °C恒温干燥箱中干燥一整晚得最终产品。

1.2 实验药品与试验仪器

1.2.1 实验试剂。Ln₂O₃(Ln=Y,Yb, Ho,Tm),源自赣州市广利高新技术材料有限公司纯度为99%,钼酸铵((NH₄)₆Mo₇O₂₄),产自重庆川东化工有限公司,规格为分析纯,AgNO₃规格为分析纯,购自成都科隆化工试剂厂,HNO₃(AR)和乙醇都买自重庆钛新化工有限公司。Y(NO₃)₃,Yb(NO₃)₃,Ho(NO₃)₃和Tm(NO₃)₃是由其对应的氧化物为原始原材料,一边搅拌一边加热溶解在过量的浓硝酸中,经高温溶解反应后蒸发掉多余的硝酸,最后冷却至室温再稀释就得相应浓度的硝酸盐。

1.2.2 试验设备。AgY(MoO₄)₂:Ln³⁺(Ln=Yb³⁺,Ho³⁺,Tm³⁺)荧光粉的物相结构由MSALXD₃仪器(产自北京普析通用仪器公司)检测,扫描范围为2θ:20°-70°。上转换发射光谱与白色上转换发射光谱均由Perkin-Elmer LS55 荧光光谱仪(型号:MDL-N-980-8)检测。

2 结果与讨论

2.1 物相

$\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2 : \text{Ln}^{3+}$ ($\text{Ln} = \text{Yb}^{3+}, \text{Ho}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$) 荧光粉的 XRD 衍射图如图 1 所示(图中仅给出一部分荧光粉的衍射图),其衍射峰与标准卡片(JCPDS 52-0012)一一对应,没有检测到任何杂质峰,说明合成的荧光粉均可归属到纯白钨矿 $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2$ 中,并且产品纯度与结晶度良好。值得注意的是, $\text{Yb}^{3+}, \text{Ho}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ 离子的掺杂没有引入任何小杂峰,说明掺杂非常成功。这与 $\text{Yb}^{3+}, \text{Ho}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ 离子与 Y^{3+} 离子所带电荷相等,且离子半径相差不大因此可以替代晶格位点上的 Y^{3+} 离子密切相关。

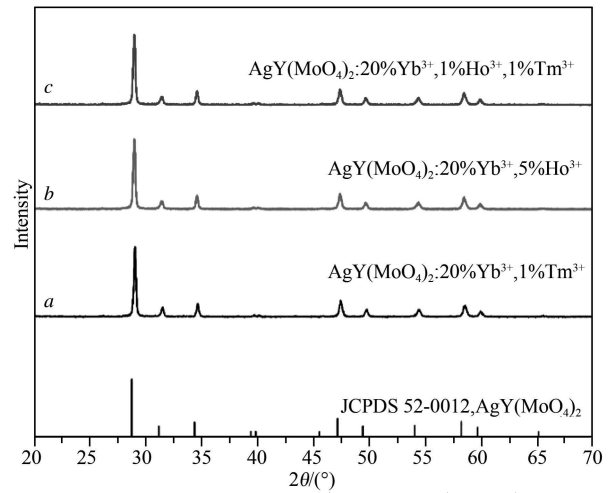


图 1 $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2 : \text{Ln}^{3+}$ ($\text{Ln} = \text{Yb}^{3+}, \text{Ho}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$) 荧光粉的 XRD 衍射图

2.2 $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2 : 20\% \text{Yb}^{3+}, x\% \text{Ho}^{3+}$ 的上转换发光性质

图 2(a) 呈现的是测试波段为 450-750 nm 的 $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2 : 20\% \text{Yb}^{3+}, x\% \text{Ho}^{3+}$ ($x = 0.5, 1, 3, 5, 7, 9$) 荧光粉的 UC 荧光强度(980 nm 激发)随 Ho^{3+} 离子掺杂量的变化, Yb^{3+} 离子的掺杂浓度没有进一步探究。

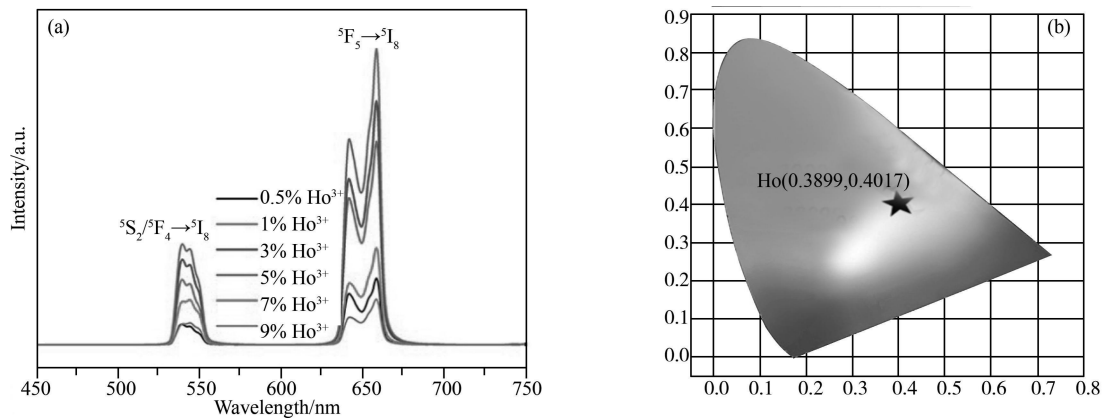


图 2 (a) $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2 : 20\% \text{Yb}^{3+}, x\% \text{Ho}^{3+}$ 荧光粉的发射光谱图; (b) $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2 : 20\% \text{Yb}^{3+}, 5\% \text{Ho}^{3+}$ 荧光粉在色度坐标的位置

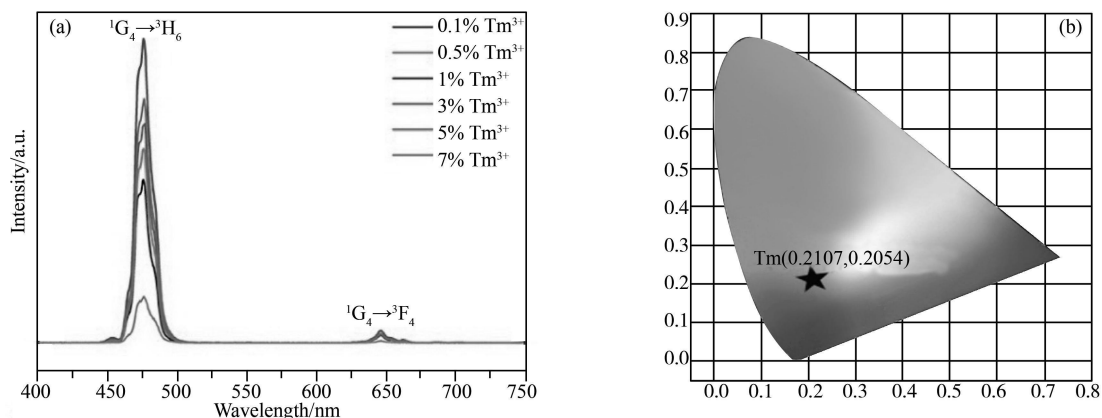


图 3 (a) $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2 : 20\% \text{Yb}^{3+}, x\% \text{Tm}^{3+}$ 荧光粉的发射光谱图; (b) $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2 : 20\% \text{Yb}^{3+}, 1\% \text{Tm}^{3+}$ 荧光粉在色度坐标的位置

由图可知, Ho^{3+} 离子掺杂量的改变对光谱峰的形状没有影响只影响其强度, 荧光强度与离子掺杂量的关系呈倒 U 型, 也就是先升后降的趋势, 当掺杂量为 $20\% \text{Yb}^{3+}, 5\% \text{Ho}^{3+}$ 时发光强度为最佳。光谱图由 539 nm 处的绿色发射($^5\text{S}_2, ^5\text{F}_4 \rightarrow ^5\text{I}_8$)和 658 nm 处的红色发射($^5\text{F}_5 \rightarrow ^5\text{I}_8$)构成。 $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2 : 20\% \text{Yb}^{3+}, 5\%$

Ho^{3+} 荧光粉发光整体呈黄色,其在色度坐标值为(0.3899,0.4017)(如图 2(b)所示)。

2.3 $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2:20\%\text{Yb}^{3+},x\%\text{Tm}^{3+}$ 的上转换发光性质

图 3(a)显示的是控制 Yb^{3+} 离子掺杂量为 20%时,仅改变 Tm^{3+} 离子的掺杂浓度的 UC 发射光谱图。由图可得,随着 Tm^{3+} 离子的掺杂量逐渐增加,荧光强度随之增强,直到掺杂量为 20% Yb^{3+} ,1% Tm^{3+} 时,荧光强度到达最高点,而后掺杂离子量继续增加荧光强度反而降低,也就是高浓度的发光离子导致了浓度猝灭^[7]。 Yb^{3+} , Tm^{3+} 的发射光谱主要由强蓝色发射(475 nm)和微弱的红色发射(649 nm)组成。 Tm^{3+} 的电子从 $^1\text{G}_4$ 基态能级填充至 $^3\text{H}_6$ 激发态能级产生强蓝色发射,而弱红色发射则应归因为由 Tm^{3+} 离子的 $^1\text{G}_4$ 能级辐射跃迁到 $^3\text{F}_4$ 能级。如图 3(b),样品整体发蓝光,根据色温原理计算出其在色度坐标图上位置为(0.2107,0.2054)。

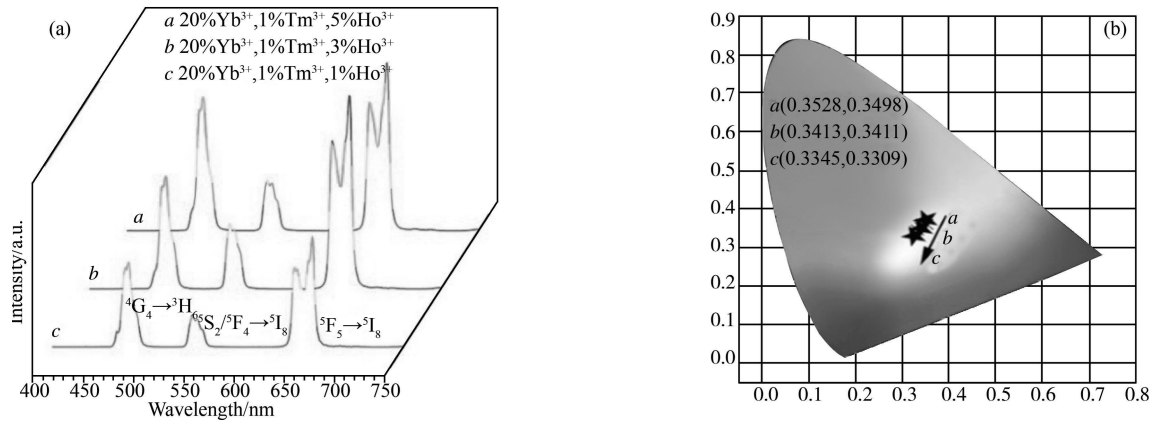


图 4 (a) $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2:20\%\text{Yb}^{3+},1\%\text{Tm}^{3+},x\%\text{Ho}^{3+}$ 荧光粉的发射光谱图; (b) $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2:20\%\text{Yb}^{3+},1\%\text{Tm}^{3+},x\%\text{Ho}^{3+}$ 荧光粉在色度坐标的位置

2.4 $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2:20\%\text{Yb}^{3+},1\%\text{Tm}^{3+},x\%\text{Ho}^{3+}$ 的白色上转换发光性质

基于以上分析,我们推测出在 $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2$ 荧光粉中通过三掺 Yb^{3+} , Tm^{3+} 和 Ho^{3+} 离子可以调节出白色上转换发射。为了证实上述猜测,我们合成了一系列 $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2:20\%\text{Yb}^{3+},1\%\text{Tm}^{3+},x\%\text{Ho}^{3+}$ 荧光粉(见图 4(a))。从图中我们可以直接观察到三掺的荧光光谱同时包含蓝色发射,绿色发射和红色发射,他们分别归因于 Tm^{3+} 离子的 $^1\text{G}_4 \rightarrow ^3\text{H}_6$, Ho^{3+} 离子的 $^5\text{S}_2, ^5\text{F}_4 \rightarrow ^5\text{I}_8$ 以及 $^5\text{F}_5 \rightarrow ^5\text{I}_8$ 辐射跃迁(由于 Tm^{3+} 离子的红色发射微弱,因此,本文不进行讨论其红光对白光发射带来的影响)。同时,如图 4(b)随着 Ho^{3+} 离子的掺杂量降低, $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2:20\%\text{Yb}^{3+},1\%\text{Tm}^{3+},x\%\text{Ho}^{3+}$ 荧光粉的色度坐标由黄白区(0.3528,0.3498)转变至白光区(0.3345,0.3309)。

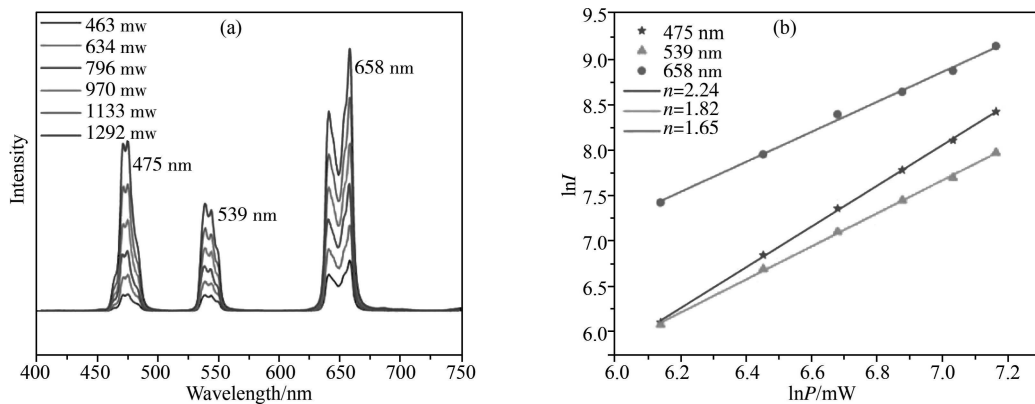


图 5 (a) 不同功率下的 $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2:20\%\text{Yb}^{3+},1\%\text{Tm}^{3+},1\%\text{Ho}^{3+}$ UC 光谱图; (b) 荧光强度(I_p)和泵浦功率(P_w)的函数关系线性拟合图

2.5 $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2:20\%\text{Yb}^{3+},1\%\text{Tm}^{3+},1\%\text{Ho}^{3+}$ 的 UC 能量传递机制

为了进一步探究其能量传递机理,监测了不同功率下的荧光强度(图 5(a))。据文献报道,荧光强度

(I_p)和泵浦功率(P_w)的函数关系描写为^[10]

$$I_p \propto P_w^n, \quad (1)$$

其中 n 是发光过程中所需的光子个数,其数值可以由非线性曲线拟合所得。如图 5(b)所示,拟合曲线的斜率即为 n 值,结果表明,在 475 nm 的蓝色发射的光子数为 2.24 属于双光子过程,539 nm 和 658 nm 处的绿色发射和红色发射的 n 值分别为 1.82 和 1.65 均属于双光子过程。

一般而言,UC 机制包含能量转移上转换(ETU)、激发态吸收(ESA)以及光子雪崩(PA)^[21]。在衡量 $\text{Yb}^{3+},\text{Tm}^{3+},\text{Ho}^{3+}$ 离子之间存在的吸收截面和掺杂量的显著性差异后, $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2:20\%\text{Yb}^{3+},1\%\text{Tm}^{3+},1\%\text{Ho}^{3+}$ 荧光粉的 UC 机制为能量转移上转换(ETU),其具体传递过程见图 6。 Yb^{3+} 离子在 980 nm 激发下,吸收光子后,由 $^5\text{F}_{7/2}$ 能级跃迁至 $^5\text{F}_{5/2}$ 能级 [$\text{Yb}^{3+}:^5\text{F}_{7/2} + 980 \text{ nm} \rightarrow \text{Yb}^{3+}:^5\text{F}_{5/2}$]。随后, Yb^{3+} 离子将光子传递给 Ho^{3+} 离子, Ho^{3+} 离子的电子从基态 $^5\text{I}_8$ 填充至激发态 $^5\text{I}_6$ [$\text{Ho}^{3+}:^5\text{I}_8 + \text{Yb}^{3+}:^5\text{F}_{7/2} \rightarrow \text{Ho}^{3+}:^5\text{I}_6 + \text{Yb}^{3+}:^5\text{F}_{5/2}$]。紧接着 $^5\text{I}_6$ 能级经非辐射弛豫回到 $^5\text{I}_7$ 能级,发生 $^5\text{I}_7 \rightarrow ^5\text{F}_5$ 的跃迁 [$\text{Ho}^{3+}:^5\text{I}_7 + \text{Yb}^{3+}:^5\text{F}_{7/2} \rightarrow \text{Ho}^{3+}:^5\text{F}_5 + \text{Yb}^{3+}:^5\text{F}_{5/2}$], $^5\text{F}_5$ 能级的辐射释放产生红光。此外, $^5\text{I}_6$ 能级在 Yb^{3+} 离子作用下跃迁至 $^5\text{S}_2,^5\text{F}_4$ 能级是绿光产生的原因 [$\text{Ho}^{3+}:^5\text{I}_6 + \text{Yb}^{3+}:^5\text{F}_{7/2} \rightarrow \text{Ho}^{3+}:^5\text{S}_2,^5\text{F}_4 + \text{Yb}^{3+}:^5\text{F}_{5/2}$]。至于 Tm^{3+} 离子,吸收 Yb^{3+} 离子传递的光子后,发生 $^3\text{H}_6 \rightarrow ^3\text{H}_5$ 的辐射跃迁 [$\text{Tm}^{3+}:^3\text{H}_6 + \text{Yb}^{3+}:^5\text{F}_{7/2} \rightarrow \text{Tm}^{3+}:^3\text{H}_5 + \text{Yb}^{3+}:^5\text{F}_{5/2}$], $^3\text{H}_5$ 能级的非辐射跃迁后, $^3\text{F}_4$ 能级跃迁至 $^3\text{F}_2$ 能级。然后,再次经过非辐射跃迁($^3\text{F}_2 \sim ^3\text{H}_4$),最后, Tm^{3+} 离子的 $^3\text{H}_4$ 能级跃迁至 $^1\text{G}_4$ 能级 [$\text{Tm}^{3+}:^3\text{H}_4 + \text{Yb}^{3+}:^5\text{F}_{7/2} \rightarrow \text{Tm}^{3+}:^1\text{G}_4 + \text{Yb}^{3+}:^5\text{F}_{5/2}$],然后辐射释放生成蓝光。

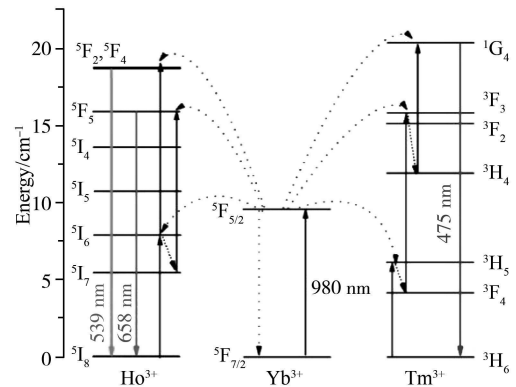


图 6 $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2:20\%\text{Yb}^{3+},1\%\text{Tm}^{3+},1\%\text{Ho}^{3+}$ 荧光粉 UC 能量传递过程

3 结论

通过简单水热法成功制备了 $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2:\text{Ln}^{3+}$ ($\text{Ln}=\text{Yb}^{3+},\text{Ho}^{3+},\text{Tm}^{3+}$) 荧光粉。考察了荧光粉的上转换发光性质与能量传递机制,在 980 nm 激发下, $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2:\text{Yb}^{3+}/\text{Ho}^{3+}$ 荧光粉的上转换发射光谱由绿色发射(539 nm)和红色发射(658 nm)组成, $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2:\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ 荧光粉的上转换发射光谱主要为蓝色发射(475 nm)。本文制得的 $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2:20\%\text{Yb}^{3+},1\%\text{Tm}^{3+},1\%\text{Ho}^{3+}$ 白色上转换荧光粉(0.3345,0.3309),与国际标准色度坐标值相接近(0.33,0.33),可能具有生物医学探针等潜在应用,其他应用还需后续深入研究。

参 考 文 献

- [1] 刘玉莲,毛旖旎,杨骏.关于 $[\text{CaY}]\text{F}_2:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ 荧光粉的水热合成、上转换发光性质及温度传感能力的探究[J].聊城大学学报(自然科学版),2020,33(4):39-44.
- [2] 夏文鹏,江莉,胡珊珊.镧系离子掺杂的 $\text{AgY}(\text{MoO}_4)_2$ 上转换荧光粉的形貌调控及其温敏性研究[J].聊城大学学报(自然科学版),2020,33(5):60-65.
- [3] 明成国,陈慧萱,裴煜婷. $(\text{Er}_{0.01}\text{Yb}_{0.99})(\text{W}_{x/2}\text{Al}_{1-x})_8\text{O}_{12}$ 纳米粉的制备与荧光特性研究[J].聊城大学学报(自然科学版),2020,33(6):82-87.
- [4] HUANG Y, SKRIPKA A, LABRADOR-PÁEZ L, et al. Upconverting nanocomposites with combined photothermal and photodynamic effects. *Nanoscale*, 2018, 10 (2): 791-799.
- [5] YUAN N, LIU D Y, YU X C, et al. A biological nano-thermometer based on ratiometric luminescent $\text{Er}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$ -codoped $\text{NaGd}(\text{WO}_4)_2$ nanocrystals. *Materials Letters*, 2018, 218: 337-340.

- [6] 明成国,裴嫚亭,陈慧萱.应用于玻璃温室大棚的 Eu/Mn/Sm 三掺磷酸盐玻璃陶瓷的荧光性能研究[J].聊城大学学报(自然科学版), 2020, 33(1): 53-56.
- [7] ZHAO B, SHEN D, YANG J, et al. Lanthanide-doped Sr_2ScF_7 nanocrystals: controllable hydrothermal synthesis, the growth mechanism and tunable up/down conversion luminescence properties[J]. *Journal of Materials Chemistry C*, 2017, 5 (13): 3264-3275.
- [8] SAMANTA B, DEY A K, BHAUMIK P, et al. Controllable white light generation from novel $\text{BaWO}_4: \text{Yb}^{3+}/\text{Ho}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ nanophosphor by modulating sensitizer ion concentration[J]. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 2018, 30 (2): 1068-1075.
- [9] CHO K, CHOI J, KIM K M, et al. Upconversion luminescence of $\text{Ho}^{3+}/\text{Tm}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$ tri-doped $\text{NaLa}(\text{MoO}_4)_2$ phosphors[J]. *Ceramics International*, 2015, 41: S668-S674.
- [10] JIN J, YANG K, SU J, et al. White up-conversion emission in $\text{Ba}(\text{MoO}_4)_{0.5}(\text{WO}_4)_{0.5}: \text{Yb}^{3+}, \text{Ho}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ nano-phosphor[J]. *Journal of Luminescence*, 2015, 159: 178-182.
- [11] 毛旖旎,杨骏.水热合成 $\text{Ba}_3\text{Sc}_2\text{F}_{12}: \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ 荧光粉的形貌及其上转换发光性能的探究[J].聊城大学学报(自然科学版), 2020, 33(2): 68-72.
- [12] 毛旖旎,胡珊珊.基于 $\text{Tb}^{3+} \rightarrow \text{Eu}^{3+}$ 能量传递的荧光粉[J].聊城大学学报(自然科学版), 2020, 33(3): 51-56.
- [13] GETZ M N, NILSEN O, HANSEN P-A. Sensors for optical thermometry based on luminescence from layered $\text{YVO}_4: \text{Ln}^{3+}$ ($\text{Ln} = \text{Nd}, \text{Sm}, \text{Eu}, \text{Dy}, \text{Ho}, \text{Er}, \text{Tm}, \text{Yb}$) thin films made by atomic layer deposition[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9 (1): 1-9.
- [14] 赵丹,赵丹丹,薛亚丽.一种新型蓝色发光材料 $\text{Na}_{13}\text{Sr}_2\text{Ta}_2(\text{PO}_4)_9: \text{Tm}^{3+}$ 的合成及性能研究[J].聊城大学学报(自然科学版), 2020, 33(5): 66-73.
- [15] LIN M, XIE L, WANG Z, et al. Facile synthesis of mono-disperse sub-20 nm $\text{NaY}(\text{WO}_4)_2: \text{Er}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$ upconversion nanoparticles: a new choice for nanothermometry[J]. *Journal of Materials Chemistry C*, 2019, 7 (10): 2971-2977.
- [16] LI T, GUO C, ZHOU S, et al. Highly Sensitive Optical Thermometry of $\text{Yb}^{3+}-\text{Er}^{3+}$ Codoped $\text{AgLa}(\text{MoO}_4)_2$ Green Upconversion Phosphor [J]. *Journal of the American Ceramic Society*, 2015, 98 (9): 2812-2816.
- [17] XIA W, ZHANG Y, HU S, et al. Self-assembled hierarchical architecture of tetragonal $\text{AgLa}(\text{MoO}_4)_2$ crystals: hydrothermal synthesis, morphology evolution and luminescence properties[J]. *CrystEngComm*, 2018, 20 (13): 1832-1843.
- [18] ZHANG L, DONG L, SHAO B, et al. Novel NIR $\text{LaGaO}_3: \text{Cr}^{3+}, \text{Ln}^{3+}$ ($\text{Ln} = \text{Yb}, \text{Nd}, \text{Er}$) phosphors via energy transfer for C-Si-based solar cells[J]. *Dalton Trans*, 2019, 48 (30): 11460-11468.
- [19] 明成国,陈慧萱,裴嫚亭.应用于光学温度传感器的 $\text{Er}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$ 共掺的 YAG 晶体的光热性能研究[J].聊城大学学报(自然科学版), 2020, 33(2): 73-77.
- [20] LIU C, GAO Z, ZENG J, et al. Magnetic/Upconversion Fluorescent $\text{NaGdF}_4: \text{Yb}, \text{Er}$ Nanoparticle-Based Dual-Modal Molecular Probes for Imaging Tiny Tumors in Vivo[J]. *Acs Nano*, 2013, 7(8): 7227-7240.
- [21] DONG H, SUN L D, YAN C H. Energy transfer in lanthanide upconversion studies for extended optical applications[J]. *Chem Soc Rev*, 2015, 44 (6): 1608-34.

磷掺杂类石墨相氮化碳的制备及其在甲基汞检测中的应用

孙晓彤¹, 刘瑶¹, 戴正亮², 王贝², 黄剑豪², 陈星¹

(1. 合肥工业大学 资源与环境工程学院, 安徽 合肥 230002; 2. 安庆市长虹化工有限公司, 安徽 安庆 246002)

摘要 甲基汞在对生物危害极大, 因此迫切需要一种快速高灵敏的检测方法。本文通过将磷掺杂到类石墨相氮化碳($g-C_3N_4$)中, 减小了其禁带宽度, 提高了其催化活性。采用磷掺杂类石墨相氮化碳(PCN)修饰金电极构建了电化学传感器用于甲基汞(CH_3Hg^+)的测定。在最佳实验条件下, CH_3Hg^+ 展示出良好的差分脉冲伏安响应信号, 在 $0-25 \mu g \cdot L^{-1}$ 的浓度范围内, 响应峰值电流具有良好的线性关系, 计算得到其灵敏度为 $0.42 \mu A/(\mu g \cdot L^{-1})$ 和最低检测限为 $0.182 \mu g \cdot L^{-1}$ ($S/N=3$)。此外, 通过添加 $SnCl_2$, 消除了无机汞在甲基汞检测中的影响。PCN 敏感界面对 CH_3Hg^+ 的检测在 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Bi^{3+} 和 As^{3+} 阳离子存在下具有良好抗干扰能力, 对传感器稳定性与重现性评估也取得良好效果, 实际水样中 CH_3Hg^+ 的检测达到了 94.7%-104.4% 的回收率。结果表明, PCN 修饰电极对实际水环境中 CH_3Hg^+ 的测定具有很大的应用潜力。

关键词 磷掺杂类石墨相氮化碳; 电化学分析检测; 带隙调控; 甲基汞

中图分类号 X52

文献标识码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Preparation of Phosphorus-Doped Graphite Carbon Nitride and Its Application in Methylmercury Detection

SUN Xiaotong¹, LIU Yao¹, DAI Zhengliang², WANG Bei²,
HUANG Jianhao², CHEN Xing¹

(1. School of Resource and Environmental Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China;
2. Anqing Changhong Chemical Co., Ltd., Anqing 246002, China)

Abstract Methylmercury is extremely harmful to organisms in the environment, so there is an urgent need for a rapid and efficient detection method. By doping phosphorus into graphite carbon nitride ($g-C_3N_4$), the band gap was reduced and the catalytic activity was improved. An electrochemical sensor for the determination of methylmercury (CH_3Hg^+) was constructed by using phosphorus doped graphite carbon nitride (PCN) modified gold electrode. Under the optimized experimental conditions, CH_3Hg^+ exhibits a sensitive differential pulse voltammetry response signal. In the concentration range of $0-25 \mu g \cdot L^{-1}$, the response peak current has a good linear relationship, the sensitivity is $0.42 \mu A/(\mu g \cdot L^{-1})$ and the limit of detection is $0.182 \mu g \cdot L^{-1}$ ($S/N=3$). In addition, the influence of inorganic mercury in CH_3Hg^+ detection

收稿日期: 2021-03-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(21777164); 安徽省科技重大专项项目(202003a07020004)资助

通讯作者: 陈星, 男, 汉, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 水污染控制技术, E-mail: xingchen@hfut.edu.cn.

was eliminated by adding SnCl_2 . PCN sensing interface shows that the detection of CH_3Hg^+ by heavy metal ions has good anti-interference ability in the presence of Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Bi^{3+} and As^{3+} . The evaluation of the stability and reproducibility of the sensor also achieved good results, and the detection rate of CH_3Hg^+ in actual water samples reached 94.7%-104.4%. The results show that PCN modified electrode has great potential for the determination of CH_3Hg^+ in actual water environment.

Key words P doped graphitic carbon nitride; electrochemical analysis and detection; band gap regulation; methyl mercury

水体汞污染来源多为汞的开采冶炼、氯碱、化工等工业企业排出的废水及含汞农药的使用。汞在水环境中主要以单质汞,无机汞,和有机汞的形态存在。水中胶体颗粒、悬浮物、泥土颗粒、浮游生物等都能吸附汞,而后通过重力作用沉降进入底泥,在微生物的作用下可转变为有机汞。有机汞的毒性远大于单质汞和无机汞,其中甲基汞形态更加危险^[2,3]。甲基汞是一种很强的神经毒素,由于其小分子量且具有强脂溶性,很容易穿过血脑屏障和生物膜,会给人类健康造成一定的危害^[4]。因此,迫切需要发展一种快速、灵敏的分析方法用于检测水环境中的甲基汞。

目前,甲基汞的分析主要是元素分析仪器(如原子发射光谱^[5]、原子荧光光谱^[6]和电感耦合等离子体质谱^[7])与高效液相色谱的结合使用。这些分析方法具有操作复杂,仪器昂贵,耗时等缺点。因此,电化学分析技术以其高的灵敏度和选择性、成本低、易操作等优点而得到了广泛关注。徐等采用金纳米颗粒/石墨烯复合材料(AuNPs-RGO)修饰玻碳电极,通过差分脉冲伏安法(DPSV)对鱼中的 CH_3Hg^+ 进行了分析。 CH_3Hg^+ 浓度在 $3\text{-}24 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内线性关系良好,最低检测限为 $0.12 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[8]。Afonso等在酸性介质中,采用快速扫描伏安法探究了 CH_3Hg^+ 在碳纤维电极上的还原机理,并阐明甲基汞的伏安曲线与扫描速率的关系^[9]。Abollino等利用盐酸作为电解质,在方波模式下测量甲基汞的信号,其最低检测限为 $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[10]。

众所周知,电化学传感器件的性能主要取决于电极材料。类石墨相氮化碳(Graphitic carbon nitride, $\text{g-C}_3\text{N}_4$)是一种具有独特能带结构、优异稳定性和良好生物相容性的纳米材料,可为生物小分子的电化学检测提供灵敏的传感界面^[11]。同时, $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 的层状结构可以进行灵活的修饰,进一步克服了其易团聚和导电性差的缺陷,一般可以通过元素掺杂或者表面修饰等方法。Wu通过水热反应制备了掺磷 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 量子点,研究发现在P注入 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 晶格的过程中,其带隙明显减小^[12]。Hu等人制备了磷掺杂 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ (PCN),并涂覆在 Al_2O_3 基底上制备了光催化膜反应器。在可见光照射下,10% PCN对亚甲基蓝的降解活性最高。这是因为磷的加入取代了C位并填补了C空位,在保留结构特征的同时修复了结构缺陷,从而减少了电荷重组,提高了导电率^[13]。Zhou等以六氯环三磷腈为磷源,采用热聚合法成功地合成了磷掺杂的 $\text{g-C}_3\text{N}_4$,在光催化制氢方面表现出优异的光催化性能。磷原子的引入起到至关重要的作用,共改变了 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 的电子结构性质并抑制光生电荷的复合载体,从而提高其光催化性能^[14]。综上,在 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 结构中引入P原子,进一步利用其催化作用,有望提升甲基汞的电化学分析性能。 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 是一种3D层叠材料,经过剥离和HCl质子化后,变为超薄纳米片,为吸附 CH_3Hg^+ 提供更多的活性位点^[15],质子化还可以调节带隙,提高 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 的催化作用和离子电导率^[16],从而可以进一步提高 CH_3Hg^+ 的灵敏度。

本文以脲素为前驱体,磷酸二氢铵为磷源,通过高温热聚合法制备磷掺杂 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 。其中,磷元素的掺入改变了 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 的电子性质和带隙宽度。进一步通过盐酸酸化处理得到质子化的磷掺杂 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ (PCN),改性后PCN表现出良好的分散性和大的表面积,其有利于电荷的转移与分离。采用PCN构建电化学传感界面用于 CH_3Hg^+ 的检测,同时考察了不同P掺入量对 CH_3Hg^+ 检测的影响。此外,还探究了该电化学敏感界面的抗干扰性能和在实际水环境中 CH_3Hg^+ 分析的应用。结果表明,PCN修饰电极具有很高的灵敏度、可靠性和稳定性,在实际水环境检测方面具有巨大的应用潜力。

1 实验部分

1.1 主要试剂

脲素($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$)、磷酸二氢铵($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)和氯化甲基汞(CH_3HgCl)均为分析纯,购自上海国药试剂有限公司,无需进一步纯化即可用于本研究。通过混合 0.1 M 乙酸和 0.1 M 乙酸钠溶液制备 0.1 M 乙酸-乙酸钠缓冲溶液,均为分析纯,购自天津市大茂化学试剂厂。通过稀释重金属离子的标准溶液来制备不同浓度的重金属离子溶液。其他试剂均为分析纯,购买自于中国国药集团化学试剂有限公司。

1.2 主要仪器

所有电化学实验都在 CHI760E 电化学工作站(中国上海化学仪器公司)上进行,使用配备有金电极、铂丝电极和氯化银电极的三电极系统。表征仪器有:场发射扫描电子显微镜(SEM,美国 FEI 公司)、场发射透射电子显微镜(TEM,日本 Hitachi 公司)、傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR,美国 Thermo Nicolet 公司)、X 射线光电子能谱仪(XPS,美国 Thermo 公司)、X 射线衍射仪(XRD,日本里加公司)、紫外-可见光谱仪(UV-vis,美国 Agilent 公司)。

1.3 磷掺杂 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 纳米材料的制备

磷掺杂 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 通过高温热聚合方法制备^[17]。首先,取 20 g 脲素置于氧化铝(Al_2O_3)陶瓷坩埚中,放入马弗炉 550 °C 加热 2 h,以 10 °C 每分钟的速度升温,反应结束后,将坩埚冷却至室温,将制备好的 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 命名为 CN。然后,将一定量的脲素(19、18、17 g)和磷酸二氢铵(1、2、3 g)溶于 50 mL 水中,并在 60 °C 水浴中搅拌 1 h,之后将混合溶液在 60 °C 的烘箱中干燥 12 h,然后将干燥后的复合物转移到 Al_2O_3 陶瓷坩埚中,并在马弗炉 550 °C 加热 2 h,以 10 °C 每分钟的速度升温,反应结束后,将坩埚冷却至室温^[17]。将材料进行剥离并用浓盐酸(37%)质子化处理。将 2 g 复合材料放入 20 mL 去离子水中,超声处理 16 h,超声频率为 90 Hz,每 20 min 换水一次,保持水温在 25 °C 以下。然后在 10000 r/min 下离心 5 min,然后在 60 °C 下干燥 12 h,得到剥离的复合材料。将剥离的材料放入 HCl(37%)中,在室温下搅拌 3 h,得到不透明的分散体。用去离子水洗涤三次,在 60 °C 烘箱中干燥 12 h,得到 HCl 质子化后的复合材料。根据前驱体(磷酸二氢铵和脲素混合物)中磷酸二氢铵所占的质量百分比(5%、10%、15%),制备出含不同磷掺杂量的 $\text{g-C}_3\text{N}_4$,并将其命名为 PCN_x ,分别为 PCN_5 、 PCN_{10} 、 PCN_{15} 。

1.4 磷掺杂 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 修饰金电极的制备

金电极的预处理:首先要对金电极的表面进行抛光处理,具体操作为用 1.0、0.3、0.05 μm 的氧化铝粉末对金电极的表面进行打磨,直至表面光滑呈现镜面为止,然后依次使用无水乙醇和去离子水超声 2 min,电极在常温下晾干备用。在电极使用之前,将电极在 0.5 mol/L 硫酸中活化。

在金电极表面修饰 PCN_x 纳米材料采用滴涂法,即取 2 mg 的 PCN_x 纳米材料置于试管中,加入 4 mL 的去离子水,制得 0.5 g/L 的 PCN_x 悬浮液,再用微量移液枪吸取 5 μL 的悬浮液于预处理后的金电极表面。修饰过后的电极在自然环境中放置待干。

1.5 电化学分析实验

采用差分脉冲伏安法(DPV)对缓冲溶液中甲基汞离子进行电化学检测,缓冲溶液中的甲基汞离子在富集电压为 -0.9 V,富集时间为 800 s 的条件下沉积在修饰金电极的表面,离子还原为零价。然后在 DPV 下,电化学窗口 0-1 V 内出现电化学响应峰,共峰电流随着离子的浓度的增加而增加。随后,在电极表面施加 +1.2 V,时间 150 s 用来去除电极表面被还原的金属,以便于接下来的实验。根据汞离子的电化学响应电流峰值与浓度之间的关系,利用相关软件进行拟合,对甲基汞离子进行定量分析。

2 结果与讨论

2.1 磷掺杂 $\text{g-C}_3\text{N}_4$ 的扫描电子显微镜(SEM)表征

图 1 是 CN 和 PCN_{10} 的扫描电镜图(SEM)、透射电镜图(TEM)和能量色散 X 射线光谱(EDS),从图 1(a),(b)中可以观察到 CN 和 PCN_{10} 纳米片的聚集体。在形态上,CN 和 PCN_{10} 的结构非常相似,说明磷掺杂并没有改变其形貌^[18],观察其孔隙,发现 CN 的团聚现象得到抑制, PCN_{10} 纳米片更薄。图 1(c)中显示 PCN_{10} 纳米片由薄纳米片构成,具有层状结构和孔道,孔结构可以促进传质,为催化反应提供更多的活性位

点。为了确定这些样品的氧化态和化学键,还进行了EDS分析以确认组成,并清楚地揭示了碳、氮和磷的存在。从图1(d-g)可以看出,C和N是 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 的两种组成元素,均匀分布在PCN10样品中,掺杂元素P和O也均匀分布。

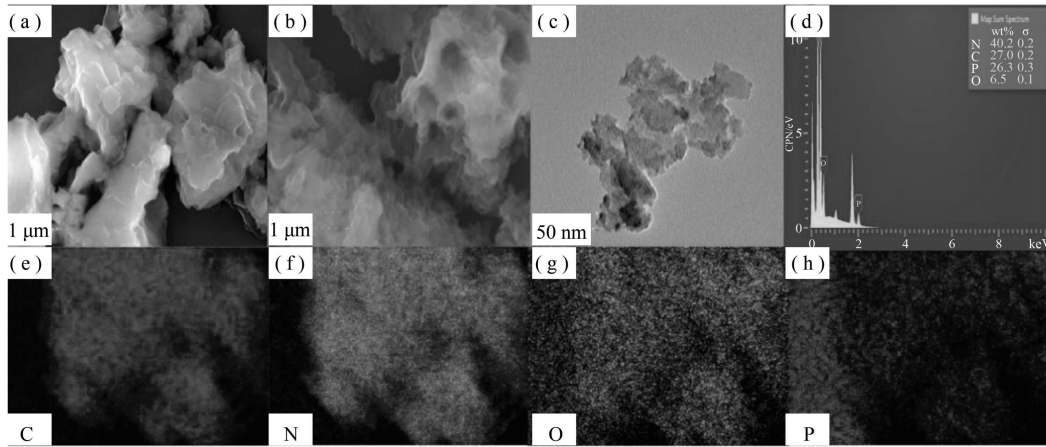


图1 (a)CN; (b)PCN10 的扫描电镜图(SEM); (c)PCN10 的透射电镜图(TEM)和(d)-(g)PCN10 的能谱图

2.2 磷掺杂 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 的X射线光电子能谱(XPS)表征

通过X射线光电子能谱(XPS)来研究样品内元素的化学状态,分析结果如图2所示。从图2(a)可以看出,所有样品都由C、N和O这三种元素所组成,在全谱中均可观察到P的特征峰,说明P成功掺杂进 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 中,PCN5、PCN10及PCN15中磷元素的占比分别为8.6%、12.09%和14.06%。图2(b)中的C1s光谱在结合能为284.8、286.3、288.1 eV时显示出三个特征峰。284.8 eV的特征峰归因于无定形碳原子,286.3 eV的峰对应 C-NH_2 ,288.1 eV的特征峰是 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 晶格中的三氨基 $\text{C}(\text{N})_3$ ^[20]。图2(c)中的N1s位于特征能区399.1 eV的特征峰,可归因于三嗪环的杂化氮原子($\text{C}=\text{N}-\text{C}$),402.1 eV处的弱峰与带有氢原子和叔氮的氨基($\text{C}-\text{N}-\text{H}$)有关,存在于 $\text{N}(\text{C})_3$ 基团的特征峰中。本实验中最重要的是,如图2(d)所示,在PCN10样品中可以观察到位于134 eV处的特征峰,归因于掺杂过程中形成的P-N键^[13],表明P取代C位点与相邻位点的 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 骨架的庚嗪环内的N形成共价键。元素分析如:C 26.12%、N 51.68%、O 8.14%、P 14.06%。

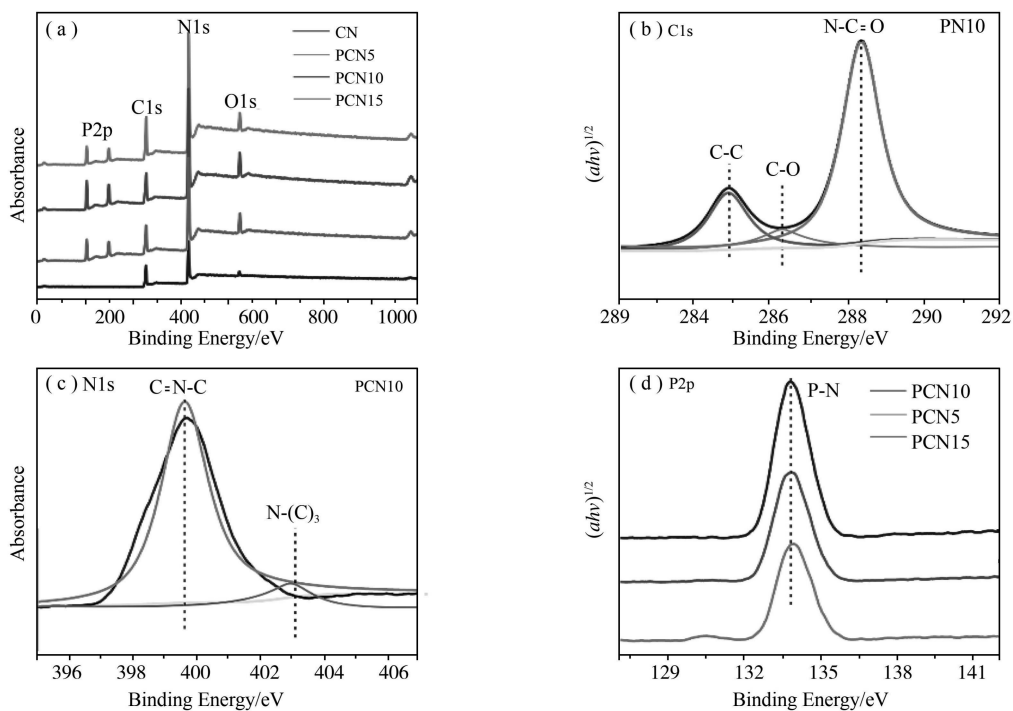


图2 (a) CN、PCN5、PCN10 和 PCN15; (b)、(c) PCN10 复合材料的C1s、N1s 和(d) CN、PCN5、PCN10 和 PCN15 的P2p 的XPS 光谱

2.3 磷掺杂 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 的 X 射线衍射(XRD)表征

本实验中 CN、PCN5、PCN10 和 PCN15 的 XRD 图谱如图 3(a)所示,在 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 的 XRD 图谱中可以观察到在 13.1° 和 27.1° 附近有两个基本衍射峰。 13.1° 处的衍射峰是三嗪环单元的平面封装结构,对应于 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 的(100)晶面。 27.1° 附近的强衍射峰对应于 CN 的芳香单元的层间堆积,对应于 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 的(002)晶面^[14]。由图中看出 PCN_x (0.323 nm)的晶面间距较短。这可能是由于脲素中额外的残余氧促进了缩合过程,使 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 的晶体结构更加稳定。这两个峰值不会随时间而移动或改变,增加磷含量,揭示了 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 的晶体结构在磷掺杂后得到很好的保留。

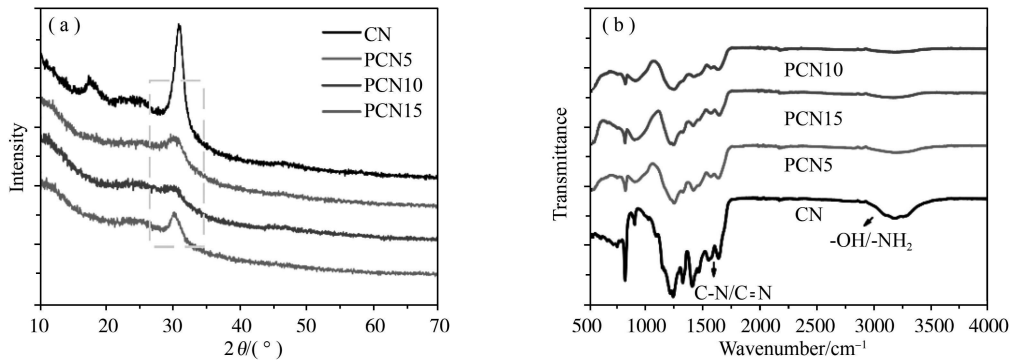


图 3 CN、PCN5、PCN10 和 PCN15 的(a)XRD 图谱和(b) FTIR 图谱

2.4 磷掺杂 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 的傅里叶变换红外光谱(FTIR)表征

使用傅里叶变换红外光谱(图 3(b))研究了 PCN_x 样品的模式。在 $1200\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ 范围内的峰值代表碳氮杂环体系的伸缩振动,以及在 804 cm^{-1} 处的峰代表着可以分配给七嗪环的伸缩振动。 $3000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ 附近的宽带可归因于分别来自表面吸附的 H_2O 和未凝聚胺基的羟基和氨基振动。 PCN_x 样品显示出石墨 sp^2 键的三- s -三嗪环。随着过量的磷掺杂进 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 中(PCN15),FTIR 的强度略有下降,表明 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 的结构被破坏,这可能导致磷掺杂的 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 的光催化活性降低。

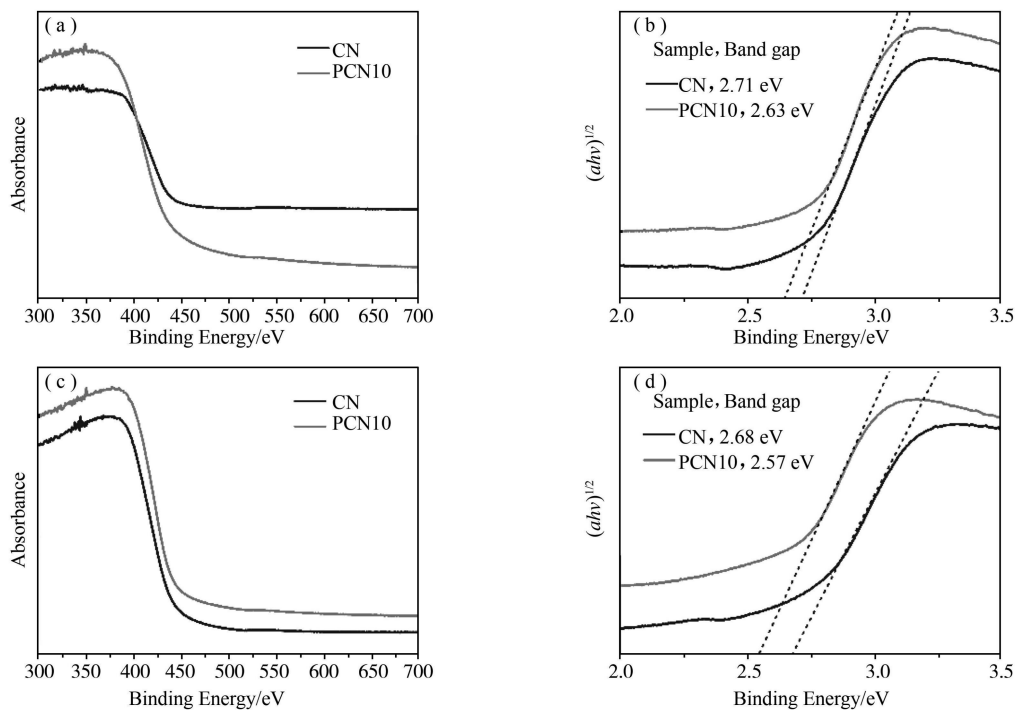


图 4 与甲基汞吸附前所有样品的(a)紫外可见漫反射光谱以及(b) $(\alpha h\nu)^{1/2}$ 与光子能量关系图,与甲基汞吸附后所有样品的(c)紫外可见漫反射光谱以及(d) $(\alpha h\nu)^{1/2}$ 与光子能量关系图

2.5 磷掺杂 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 的紫外可见漫反射光谱(UV-Vis)表征

图 4(a)为所有样品的紫外可见漫反射光谱,与 CN 的能带边缘相比,PCN10 具有红移,这可能是由于 P

的掺杂导致捕获更多的光能以产生更多的光致电子空穴电荷^[22]。磷原子在 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 基体中的引入对与其密切相关的能带结构和电子性质有显著影响,这与半导体的光吸收有关。如图 4(b)-(d)所示,根据 Kubelka-Munk 公式,吸附 CH_3Hg^+ 前的 CN 和 PCN10 的带隙宽度分别计算为 2.71、2.63 eV,吸附后的带隙宽度为 2.68、2.57 eV,显示出 PCN10 的带隙要比 CN 窄,吸附 CH_3Hg^+ 后 CN、PCN10 的带隙比吸附前窄。可以得出 PCN10 的带隙较窄,说明 P 掺杂确实可以调节带隙,提高电导率。磷掺杂的 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 吸附 CH_3Hg^+ 后也可以更好的调节带隙,提高电导率。

2.6 不同修饰电极材料检测 CH_3Hg^+ 的比较

图 5 中显示了不同比例的磷掺杂 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 修饰电极对 $15 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \text{CH}_3\text{Hg}^+$ 的电化学检测性能。在沉积过程中,当 CH_3Hg^+ 在金电极表面还原为单质汞时,可能会发生剥离过程。 CH_3Hg^+ 还原在裸金电极、CN 和 PCN_x 修饰电极上产生的溶出电流几乎相似。因此,为了确定掺磷 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 的最佳比例,采用 PCN5、PCN10 和 PCN15 复合材料对金电极进行改性。 CH_3Hg^+ 的最大峰值电流是用 PCN10 修饰的金电极获得的。说明磷掺杂 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 与裸金电极相比具有优异的检测性能,这可归因于掺杂磷复合材料的优越性。因此在本电化学实验中,我们使用 PCN10 材料修饰金电极构建敏感界面从而进行后面所有的研究。

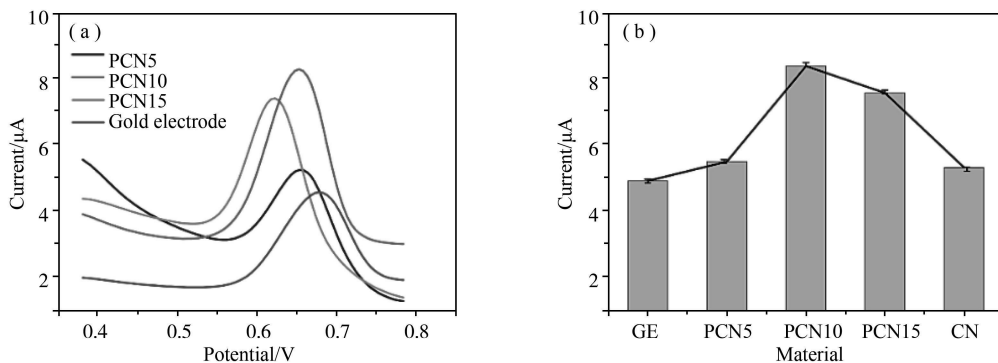


图 5 裸金电极和不同比例掺磷 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 复合样品(CN、PCN5、PCN10 和 PCN15)修饰电极在 $0.1 \text{ M HAc-NaAc}(\text{pH}=5.0)$ 中对标定 $15 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \text{CH}_3\text{Hg}^+$ 的(a)微分脉冲伏安响应图和(b)所有样品的柱状图比较

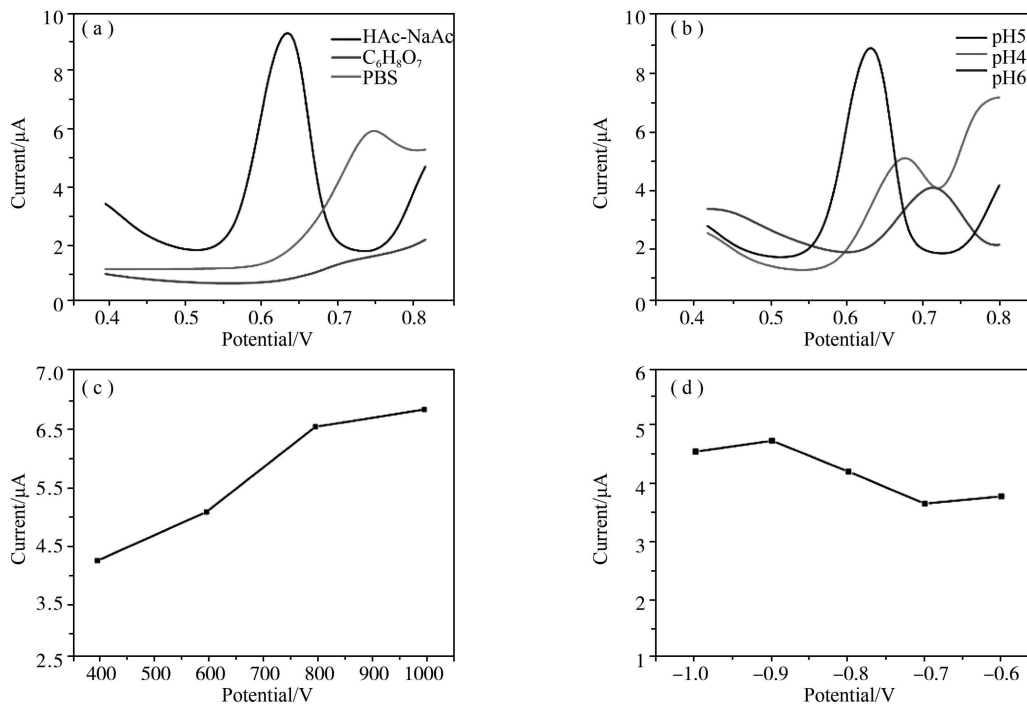


图 6 PCN10 修饰电极检测 $15 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \text{CH}_3\text{Hg}^+$ 优化实验(a)缓冲溶液;(b)pH 值;(c)预浓缩时间;(d)富集电压

2.7 电化学实验条件的优化

为了使得 PCN10 修饰电极传感器检测 CH_3Hg^+ 获得最佳的电化学检测结果,对本实验中主要影响因

子如电解质类型、pH、预浓缩时间和富集电位进行条件优化。所有优化都是在 CH_3Hg^+ 浓度为 $15 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时进行。图 6(a)所示,缓冲溶液分别是 $\text{pH}=5$ 的柠檬酸-柠檬酸钠溶液、磷酸氢二钠-磷酸二氢钾(PBS)溶液、乙酸-乙酸钠溶液(HAc-NaAc), CH_3Hg^+ 还原在 HAc-NaAc 中的响应电流最高,所以选择 HAc-NaAc 做为缓冲溶液。图 6(b)所示,使用 $\text{pH}=4, 5, 6$ 的 0.1M HAc-NaAc 溶液,结果显示 $\text{pH}=5$ 时响应电流最高,故缓冲溶液选择 $\text{pH}=5$ 的 HAc-NaAc 溶液。图 6(c)显示 CH_3Hg^+ 的响应电流值随着时间的增加而快速提升,当时间超过 800 s 后,溶出电流峰值开始增加的较为缓慢。考虑到节约实验所用的时间,选取 800 s 作为实验优化时间。如图 6(d)所示,富集电压选择了一 $1.0, -0.9, -0.8, -0.7, -0.6\text{ V}$ 共 5 个电压进行电化学检测,可以看出富集电压在一 0.9 V 时达到最高,所以选择一 0.9 V 的富集电压。因此在本实验中,电解质采用 HAc-NaAc 缓冲液, pH 值为 5,富集电压为一 0.9 V ,富集时间为 800 s 。

2.8 电化学分析检测 CH_3Hg^+

电极表面甲基化汞化合物的还原分两步进行。在恒电位下, CH_3Hg^+ 的电还原首先产生甲基汞自由基 ($\text{CH}_3\text{Hg} \cdot$)。 $\text{CH}_3\text{Hg} \cdot$ 要么被还原为 Hg^0 (处于负电位), 要么被歧化为 $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ 。在短时间内,不同有机汞化合物的二聚速率取决于 R-Hg 的氧化还原和络合反应^[25]。根据电化学氧化还原机理,在 $\text{CH}_3\text{Hg} \cdot$ 之后, Hg^0 沉积及溶出过程继续进行。

在最优的实验条件下,用 PCN10 纳米材料修饰金电极采用 DPV 对标定的 CH_3Hg^+ 进行电化学检测分析,浓度范围为 $0-25 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,裸金电极用作对照。图 7 中显示出电化学伏安溶出峰电流与 CH_3Hg^+ 浓度之间的关系曲线。如图 7.a 所示为裸金电极线性回归模型,其线性方程为 $I_p (\mu\text{A}) = 0.231C (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}) + 0.107$ ($n=9, R^2=0.998$)。图 7(b)显示, $I_p (\mu\text{A}) = 0.337C (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}) - 0.099$ ($n=9, R^2=0.993$),说明与裸金电极相比,未质子化的 PCN10 修饰的金电极对 CH_3Hg^+ 检测的灵敏度明显提升。通过对材料进行盐酸质子化处理,以获得更好的灵敏度,如图 7(c)所示,峰值电流与 CH_3Hg^+ 之间的线性关系 $I_p (\mu\text{A}) = 0.42C (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}) + 0.066$ ($n=9, R^2=0.986$),灵敏度达到 $0.42 \mu\text{A}/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$,检测限为 $0.182 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。表 1 列出了之前通过不同电化学方法和材料检测 CH_3Hg^+ 。可见,PCN10 修饰金电极具有较高的灵敏度和较低的检测限。

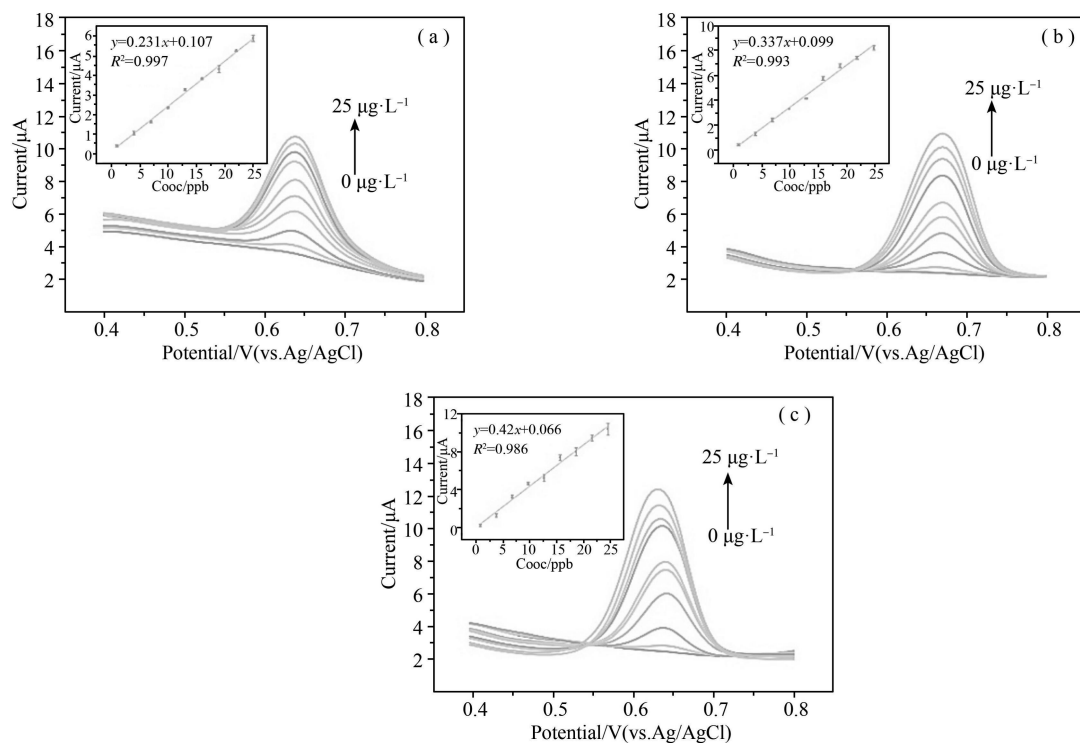


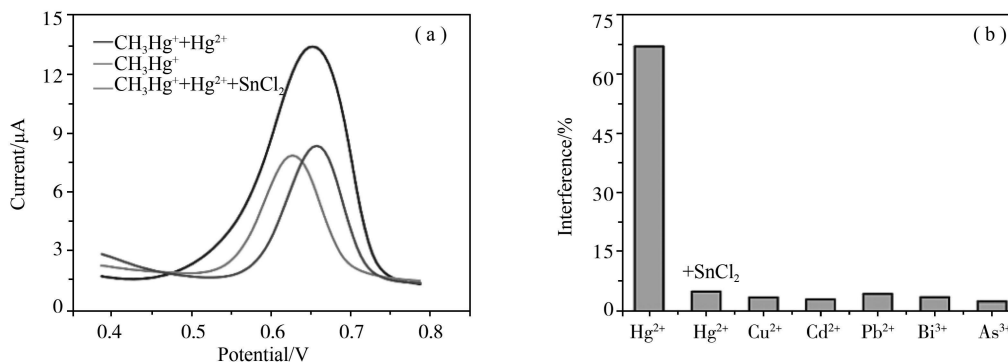
图7 在最优的实验条件下(a)裸金电极;(b)未质子化的PCN10纳米材料改性电极对 CH_3Hg^+ 微分脉冲伏安法(DPV)和(c)HCl质子化后的PCN10纳米材料改性电极对 CH_3Hg^+ 微分脉冲伏安法(DPV)

表 1 不同材料修饰不同电极对 CH_3Hg^+ 的分析性能比较

电极	检测方法	检测范围/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	灵敏度/ $(\mu\text{A} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{L}^{-1})$	LOD/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	参考文献
Goldfilm/GCE	DPV	2.18-108	0.20	0.46	[26]
SH-SAMMS/carbon paste electrode	SWASV	10-1500	-	3	[27]
Pt/Microelectrode	CV	$(1-54) \times 10^3$	0.0012	0.56	[28]
AuNPs/mpg- C_3N_4	DPV	1-25	0.285	0.103	[24]
PCN10/Gold electrode	DPV	1-25	0.42	0.182	本文

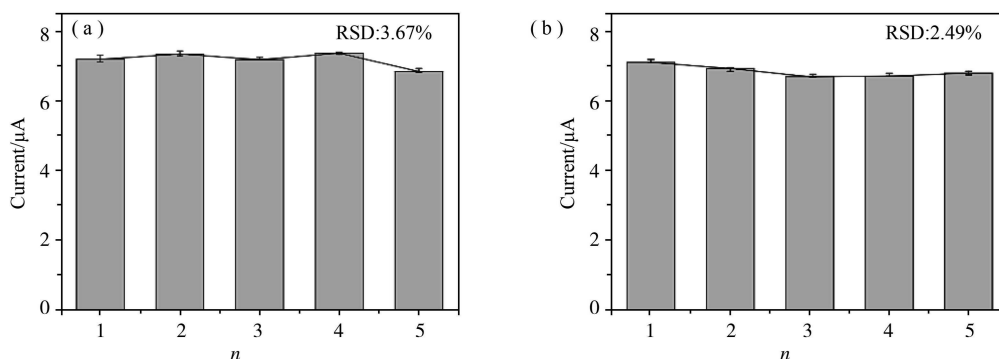
2.9 其他阳离子的干扰实验

如图 8 所示, Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Bi^{3+} 和 As^{3+} 等阳离子对 CH_3Hg^+ 的干扰情况。根据 CH_3Hg^+ 的电化学还原机理, 无机 Hg^{2+} 对 CH_3Hg^+ 的测定有显著的影响, 这是由于存在重叠的响应电位。图 8(a) 显示在 0.1 M pH=5 的 HAc-NaAc 溶液中添加 $15 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \text{CH}_3\text{Hg}^+$, 加入 SnCl_2 选择性还原 Hg^{2+} , SnCl_2 只还原 Hg^{2+} , 不影响 CH_3Hg^+ , 因此可以消除 Hg^{2+} 对检测 CH_3Hg^+ 的影响。实验中先在缓冲溶液中加入 $15 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CH_3Hg^+ 离子, 然后按 $15 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5 倍、10 倍、15 倍、20 倍、25 倍的比例分别加入待检测的干扰阳离子, 在添加了其他重金属离子后, 仍能灵敏地检测到 CH_3Hg^+ , 峰值电流保持稳定。如图 8(b) 所示, Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Bi^{3+} 和 As^{3+} 等阳离子不会使 CH_3Hg^+ 的峰值电流变化超过 5%^[29]。因此, 天然水样中常见的金属离子不会显著干扰该材料修饰电极检测 CH_3Hg^+ 。

图 8 不同金属离子对 $15 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \text{CH}_3\text{Hg}^+$ 的峰值电流的影响

2.10 稳定性与重现性

PCN10 修饰金电极作为一种电化学传感器, 稳定性和重现性对于其性能来说十分重要。所以在本研究实验在最优条件下考察了 PCN10 修饰金电极传感器的稳定性和重现性。使用 PCN10 材料修饰 5 个金电极 (编号为 1-5) 对 CH_3Hg^+ ($15 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 进行电化学检测, 电化学响应如图 9(a) 所示, 其 RSD 计算为 3.67%, 低于 5%。另一方面, 用 PCN10 修饰电极对 CH_3Hg^+ ($15 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 进行循环 5 D 的重现性电化学检测, 如图 9(b) 所示, 在重复测量期间, CH_3Hg^+ 电化学剥离电流峰值并没有发生明显的波动, 相对标准差 (RSD) 计算为 2.49%。综上所述, 该 PCN10 修饰电极传感器界面具有良好的稳定性和重现性能, 这为实际水样中甲基汞离子的电化学分析检测提供了可靠性支撑。

图 9 PCN10 纳米材料修饰电极对 CH_3Hg^+ 的电化学检测(a)稳定性和(b)重现性研究

2.11 实际水样检测

用磷掺杂 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 电化学传感器检测了安徽省合肥市合肥工业大学斛兵塘和安徽省合肥市南淝河实际水样中 CH_3Hg^+ 的测定分析。电化学检测前,样品以 1:19 的比例混合在 0.1 M HAc-NaAc 缓冲液 (pH=5) 中,取混合溶液 10 mL 进行 CH_3Hg^+ 的电化学检测,两个水样中均未检测到 CH_3Hg^+ 污染。如表 2 所示,向水样中分别添加 CH_3Hg^+ 溶液 10 和 15 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, CH_3Hg^+ 的加标回收率在 94.7%-104.4% 之间。数据表明,新方法不受天然水样中基质成分的影响。新的 CH_3Hg^+ 检测方法可以有效地用于环境样品的甲基汞监测^[30]。

表 2 实际水样中甲基汞离子的检测分析结果

样品	添加量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	回收量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	回收率/%
斛兵塘	10	9.53	95.3
	15	15.41	102.7
南淝河	10	9.47	94.7
	15	15.66	104.4

3 结论

综上,采用类石墨相氮化碳($g\text{-C}_3\text{N}_4$)作为原材料,通过简单的化学合成方法制备出不同掺磷比例的 $g\text{-C}_3\text{N}_4$,并将其作为电化学电极修饰材料。比较了不同掺磷比例的 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 纳米结构材料修饰金电极对 CH_3Hg^+ 的电化学检测性能。针对 PCN10 修饰电极体系进行相关实验条件的优化,该电极对重金属 CH_3Hg^+ 具有较高的灵敏度和低的检测限,分别为 0.42 $\mu\text{A}/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$,检测限为 0.182 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。采用 PCN10 修饰电极传感器对 CH_3Hg^+ 的检测进行一系列的抗干扰实验,发现在金属离子干扰下,该电极体系对 CH_3Hg^+ 检测的灵敏度具有一定程度上的降低,但是相对偏差都稳定在 5% 以内,可以说明其他重金属离子对该材料检测甲基汞无明显影响。该传感器具有良好的稳定性与重现性,有望在实际水样分析中进行应用。

参 考 文 献

- [1] DU H, GUO P, WANG T, et al. Significant bioaccumulation and biotransformation of methyl mercury by organisms in rice paddy ecosystems; A potential health risk to humans[J]. Environmental Pollution, 2021, 273: 116-121.
- [2] HAMMERSCHMIDT C R, GUSTIN M S, BENNETT J. Mercury biogeochemical cycling and processes; implications for human and ecosystem health[J]. Science of the Total Environment, 2014, 496: 635-635.
- [3] GRANDJEAN P. Methylmercury toxicity and functional programming[J]. Reproductive Toxicology, 2007, 23(3): 414-420.
- [4] XIAO-WEN L S-Y H G-Z D. 食品中汞与甲基汞污染状况与检测技术研究进展[J]. 2019, Food and Fermentation Industries, 2018, 44(12): 295-301.
- [5] IOANNIDOU M D, ZACHARIADIS G A, ANTHEMIDIS A N, et al. Direct determination of toxic trace metals in honey and sugars using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry[J]. Talanta, 2005, 65(1): 92-97.
- [6] WU L, LONG Z, LIU L W, et al. Microwave-enhanced cold vapor generation for speciation analysis of mercury by atomic fluorescence spectrometry[J]. Talanta, 2012, 94: 146-151.
- [7] FANG Y, PAN Y S, LI P, et al. Simultaneous determination of arsenic and mercury species in rice by ion-pairing reversed phase chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2016, 213: 609-615.
- [8] XU Y, ZHANG W, SHI J, et al. Electrodeposition of gold nanoparticles and reduced graphene oxide on an electrode for fast and sensitive determination of methylmercury in fish[J]. Food Chem, 2017, 237: 423-430.
- [9] AFONSO F, RIBEIRO F, PROENCA L, et al. Voltammetric studies on the electrochemical reduction of methylmercury in HCl aqueous medium at a carbon microelectrode[J]. Electroanalysis, 2005, 17(2): 127-133.
- [10] ABOLLINO O, GIACOMINO A, MALANDRINO M, et al. Voltammetric determination of methylmercury and inorganic mercury with an home made gold nanoparticle electrode[J]. Journal of Applied Electrochemistry, 2009, 39(11): 2209-2216.
- [11] THOMAS A, FISCHER A, GOETTMANN F, et al. Graphitic carbon nitride materials: variation of structure and morphology and their use as metal-free catalysts[J]. Journal of Materials Chemistry, 2008, 18(41): 4893-4908.
- [12] WU J, YANG S, LI J, et al. Electron injection of phosphorus doped $g\text{-C}_3\text{N}_4$ quantum dots; controllable photoluminescence emission wavelength in the whole visible light range with high quantum yield[J]. Advanced Optical Materials, 2016, 4(12): 2095-2101.

- [13] HU C, WANG M S, CHEN C H, et al. Phosphorus-doped g-C₃N₄ integrated photocatalytic membrane reactor for wastewater treatment [J]. *Journal of Membrane Science*, 2019, 580: 1-11.
- [14] ZHOU Y, ZHANG L, LIU J, et al. Brand new P-doped g-C₃N₄: enhanced photocatalytic activity for H₂ evolution and Rhodamine B degradation under visible light[J]. *Journal of Materials Chemistry A*, 2015, 3(7): 3862-3867.
- [15] LIU Y, WEN G L, CHEN X, et al. Construction of electrochemical sensing interface towards Cd(II) based on activated g-C₃N₄ nanosheets; considering the effects of exfoliation and protonation treatment[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2020, 412(2): 343-353.
- [16] WANG X, MAEDA K, THOMAS A, et al. A metal-free polymeric photocatalyst for hydrogen production from water under visible light [J]. *Nat Mater*, 2009, 8(1): 76-80.
- [17] SHE P, LI J, BAO H, et al. Green synthesis of Ag nanoparticles decorated phosphorus doped g-C₃N₄ with enhanced visible-light-driven bactericidal activity[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2019, 384: 112-117.
- [18] CHEN P, CHEN L, GE S, et al. Microwave heating preparation of phosphorus doped g-C₃N₄ and its enhanced performance for photocatalytic H₂ evolution in the help of Ag₃PO₄ nanoparticles[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2020, 45(28): 14354-14367.
- [19] CHEN L, ZHU D Y, LI J T, et al. Sulfur and potassium co-doped graphitic carbon nitride for highly enhanced photocatalytic hydrogen evolution[J]. *Applied Catalysis B-Environmental*, 2020, 273: 119-123.
- [20] DONG F, ZHAO Z W, XIONG T, et al. In situ construction of g-C₃N₄/g-C₃N₄ metal-free heterojunction for enhanced visible-light photocatalysis[J]. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2013, 5(21): 11392-11401.
- [21] DUAN S F, TAO C L, GENG Y Y, et al. Phosphorus-doped isotype g-C₃N₄/g-C₃N₄: an efficient charge transfer system for photoelectrochemical water oxidation[J]. *ChemCatChem*, 2019, 11(2): 729-736.
- [22] ZHANG W, ZHANG J, DONG F, et al. Facile synthesis of in situ phosphorus-doped CN with enhanced visible light photocatalytic property for NO purification[J]. *RSC Advances*, 2016, 6(91): 88085-88089.
- [23] MOUSSA A. Textile color formulation using linear programming based on Kubelka-Munk and Duncan theories[J]. *Color Research and Application*, 2021, 756: 87-91.
- [24] CHEN X, LIU Y, KE X X, et al. A green method to synthesize AuNPs/mp g-C₃N₄ nanocomposites for constructing anti-interference electrochemical sensing interface toward methylmercury[J]. *Journal of Alloys and Compounds*, 2021, 853: 157-163.
- [25] KURMAZ V A, GULTYAI V P. Electrode reactions and electroanalysis of organomercury compounds[J]. *Russian Chemical Reviews*, 2010, 79(4): 307-350.
- [26] KOROLCZUK M, RUTYNA I. New methodology for anodic stripping voltammetric determination of methylmercury[J]. *Electrochemistry Communications*, 2008, 10(7): 1024-1026.
- [27] YANTASEE W, LIN Y, ZEMANIAN T S, et al. Voltammetric detection of lead(II) and mercury(II) using a carbon paste electrode modified with thiol self-assembled monolayer on mesoporous silica (SAMMS)[J]. *Analyst*, 2003, 128(5): 467-72.
- [28] Selective determination of methylmercury by flow-injection fast-scan voltammetry[J]. *Electroanalysis*, 1998, 10: 926.
- [29] DEVNANI H, RAJAWAT D S, SATSANGEE S P. Black rice modified carbon paste electrode for the voltammetric determination of Pb(II), Cd(II), Cu(II) and Zn(II)[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section a-Physical Sciences*, 2014, 84(3): 361-370.
- [30] MARDEGAN A, SCOPECE P, LAMBERTI F, et al. Electroanalysis of trace inorganic arsenic with gold nanoelectrode ensembles[J]. *Electroanalysis*, 2012, 24(4): 798-806.

液氮剥离超薄类石墨相氮化碳的制备及表征

廖国东, 邓文明, 孙艳娟, 邹菁, 江吉周

(武汉工程大学 化学与环境工程学院 & 环境生态与生物工程学院, 湖北 武汉 430205)

摘要 以不同富氮碳源作为前驱体制备块体氮化碳($g-C_3N_4$, CN), 液氮为剥离溶剂, 采用高温-快速气化联合的方法对块体 CN 进行剥离, 制备了超薄 CN 纳米片, 并成功应用于光催化污染物的降解和构建环境激素电化学传感器。经过一系列优化得到制备条件最优的富氮碳源和氮化碳的剥离量, 结果显示: 不同富氮碳源制备的 CN 剥离后的比表面积均大大增加, 以三聚氰胺为富氮碳源制备的 CN 片层平均厚度最薄, 为 1.5 nm。剥离量为 1.0 g 时剥离效果更佳均匀, 比表面积相对较大。与块体 CN 相比, 剥离后的超薄 CN 比表面积增加了 8~12 倍, 平均片层厚度小于 2.8 nm, 其原子层数可调, 且阻抗均大幅减小。光催化降解罗丹明 B (RhB) 速率常数较块体 CN 增加了 58 倍以上, 且对环境雌激素四溴双酚 A (TBPPA) 有较高的电催化活性。为大规模制备原子层数可调的超薄 CN 纳米片的工业化应用提供了新的思路。

关键词 超薄氮化碳; 液氮; 剥离; 光催化; TBPPA

中图分类号 O614.81

文献标识码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Preparation and Electrochemical Application of Ultra-thin Carbon Nitride

LIAO Guodong, DENG Wenming, SUN Yanjuan, ZOU Jing, JIANG Jizhou

(School of Chemistry and Environmental Engineering & School of Environmental Ecology and Biological Engineering, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430205, China.)

Abstract Bulk carbon nitride ($g-C_3N_4$, CN) prepared by using different nitrogen-rich carbon sources as precursors, using liquid nitrogen as the stripping solvent, using high temperature-rapid gasification combined method to strip the bulk CN to prepare the ultra-thin CN nanosheets were successfully applied to the degradation of photocatalytic pollutants and the construction of environmental hormone electrochemical sensors. After a series of optimizations, the nitrogen-rich carbon source and carbon nitride stripping amount with the best preparation conditions were obtained, and the results showed that the specific surface area of CN prepared from different nitrogen-rich carbon sources was greatly increased after stripping, and

收稿日期: 2021-01-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(62004143); 中央引导地方科技发展专项资金项目(2020ZYD033); 武汉工程大学第十一届研究生教育创新基金(CX2019194)资助

通讯作者: 江吉周, 男, 汉, 博士, 特聘教授, 硕士生导师, 研究方向: 新型二维材料的制备及其光电应用, E-mail: 027wit@163.com; 邹菁, 女, 汉, 博士, 二级教授, 博士生导师, 研究方向: 功能性微纳米材料的制备及其光电催化, E-mail: jingzou@wit.edu.cn.

CN prepared with melamine as the nitrogen-rich carbon source the average thickness of CN lamella is the thinnest, 1.5 nm. When the peeling amount is 1.0 g, the peeling effect is better and uniform, and the specific surface area is relatively large. Compared with the bulk CN, the specific surface area of the stripped ultra-thin CN increased by 8-12 times, the average sheet thickness was less than 2.8 nm, the number of atomic layers was adjustable, and the impedance was greatly reduced. The rate constant of photocatalytic degradation of RhB is 58 times higher than that of bulk CN, and it has obvious electrocatalytic activity for the environmental estrogen tetrabromobisphenol A (TBPPA). This article provides a new idea for the industrial application of large-scale preparation of ultra-thin CN nanosheets with adjustable atomic layers.

Key words ultra-thin carbon nitride; liquid nitrogen; stripping; photocatalysis; TBPPA

自 2004 年以来,机械法剥离石墨烯逐渐出现在人们的视野^[1]。超薄二维纳米材料由其独特的物理化学、光电催化等性能,在材料科学、凝聚态物理、化学和纳米科技等领域快速发展^[2]。在二维纳米结构的诸多材料中,单层结构的碳材料例如石墨烯由于其在微观结构中的各向异性所展示出的表面效应和量子限域效应使得表现出的性质和体相材料截然不同^[3-5]。随着石墨烯的深入研究,越来越多的科研人员开始重视类石墨相二维层状晶体结构特征的无机化合物,截至目前为止,越来越多的二维纳米片材料被科学家们发现,诸如:石墨烯及其相关衍生物^[6]、过渡金属氧化物^[7]、过渡金属二硫化物^[8]、氮化物和碳氮化物^[9]、黑磷纳米片^[10]等。与体相材料对比而言,二维纳米片的能带结构的特征收其厚度的调节而改变,这进一步拓展了二维纳米片材料在光电领域的应用^[11]。

类石墨相氮化碳($g\text{-C}_3\text{N}_4$, CN)是一种类似石墨烯的二维平面结构,非金属的独特半导体聚合材料^[12],由于其大的比表面积,合适的禁带宽度($E_g=2.7\text{ eV}$)和导带价带位置(-1.2 eV 和 $+1.4\text{ eV}$ vs NHE),出色的热稳定性和化学稳定性,易于生产和环境友好性^[13-15]。2009 年, Wang 等首次将这种新型的非金属组分的半导体材料用于光解水,极大激发了人们对 CN 及其复合催化材料在光催化^[16]、光电转化^[17]、发光材料^[18]、电化学传感^[19]等领域积极探索。然而,通过常规方法未经进一步处理而制备的 CN 具有低的比表面积和不规则的形态会减弱材料中的电子转移并在很大程度上限制其光催化性能,同时导电性、水溶性较差,因此也不利于电化学方面的应用^[20]。针对块状 CN 的这些缺点,研究人员进行了大量的改性研究, CN 的主要改性方法是:金属和非金属掺杂^[21,22],缺陷控制^[23],异质结构^[24],结构调整^[25]和助催化剂负载^[26]。其中,制备新型纳米结构是一种有效的方法。理论研究表明, CN 纳米片具有优异的电学和光学性能,其层状结构与石墨烯类似,受层间范德华力的影响,在二维平面内有强的 C-N 共价键生成。所以为了改善 CN 的表面光电结构,加大比表面积和提升光电催化效率,将 CN 剥离至单原子层数是十分必要的^[27]。目前, CN 剥离常用方法包括超声辅助液相剥离法^[28]、热剥离方法^[29]、酸或碱溶液剥离法^[30,31]以及机械球磨^[32]等方法。例如 Niu 等^[33]以双氰胺为前驱物,将其加热到 $550\text{ }^\circ\text{C}$,并保持 4 h 以制备 CN 块状材料。然后将大块 CN 在空气中煅烧 2 h,然后冷却可以获得厚度为 2 nm 的 CN 纳米片。当在空气中加热时,块状 CN 材料层之间的分子力减弱甚至消失,因此, CN 原子层逐渐从块状 CN 中脱离而变薄,从而获得了纳米片。Zhao 等^[34]利用经典热聚合法制备块体 CN,在 $550\text{ }^\circ\text{C}$ 下加热 3 h 形成 CN 纳米片(NS),再用异丙醇为溶剂超声剥落 8 h 得到厚度为 0.5 nm 的原子单层 CN(SL CN)。通过灭活大肠杆菌来研究光催化消毒的性能。在可见光照射下, $2\times 10^7\text{ cfu ml}^{-1}$ 大肠杆菌可在 4 h 内被 SL CN 完全杀死,而大肠杆菌仅约 3 log 和 5 log。Fang 等^[35]通过使用无水乙二胺(AED)作为辅助试剂来剥离获得的 2D CNNS 的厚度可以达到约 3-4 nm。与 BCN 相比, 2D CNNS 的表面积从 4.7 至 $31.1\text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ 可提高约 7 倍。其光催化氢(H_2)释放速率从 $4.8\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$ 增加到 $35.3\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$ 。阎鑫^[36]等采用球磨后超声的方法得到单原子层的 CN 二维纳米片。将其用于光催化降解有机染料罗丹明 B,结果显示:块体 CN 催化降解 RhB 的效率为 47%,而球磨后超声所得到的 CN 二维纳米片光催化降解 RhB 的效率为块体 CN 的两倍。

针对以上方法具有价格昂贵,操作复杂,反应时间长的缺点,在本文中,采用高温-快速气化联合的方法对块体 CN(BCN)进行剥离,制备了超薄 CN(UCN)纳米片,并成功应用于光催化污染物的降解和环境激素电化学传感器的构建。对微观结构和光电催化性能进行了全面表征,构建了一种流程简单,绿色环保,原料便宜易得,有望应用于工业化大规模制备超薄 CN 的方法。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

三聚氰胺(Melamine, Ma); 二氰二胺(Dicyandiamide, DCDA); 硫脲(Thiourea, TU)(国药集团化学试剂有限公司); 四溴双酚 A(Tetrabromobisphenol A, TBPPA); 液氮; $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ 超纯水。

XRD(X-Ray Diffractometer, AXS D8 Advance, Bruker, 德国); TEM(Transmission Electron Microscopy, JSM-2100 型, 日本电子); Raman(Laser Confocal Micro Raman Spectrometer, DXR, 美国); UV-Vis-NIR(Ultraviolet Visible Near Infrared Spectrophotometer, DSR, Cary 5000, 美国); 电化学工作站(Electrochemical workstation, CHI660C 型, 上海辰华); 荧光光谱仪(Fluorescence Spectrometer, FS, Jasco FP-6200, 日本); X 射线光电子能谱(X-ray Photoelectron Spectroscopy, XPS, MULTILAB2000, 美国); 比表面积测试仪(Brunauer-Emmett-Teller, BET, ASAP 2020, Micromeritics, 美国); 原子力显微镜(Atomic Force Microscope, AFM, 美国); 光化学反应仪(Photochemical reaction instrument, BL-GHX-V, 中国)。

1.2 BCN 的制备

称取适量的 Ma, DCDA, TU 于坩埚中, 升温速率为 $5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, 分别在 $550 \text{ }^\circ\text{C}$ 保温 $4 \text{ h}^{[37]}$, $550 \text{ }^\circ\text{C}$ 保温 $4 \text{ h}^{[38]}$, $500 \text{ }^\circ\text{C}$ 保温 $2 \text{ h}^{[39]}$, 自然冷却至室温, 得到样品为 BCN 分别记为 BCN-Ma, BCN-DCDA, BCN-TU)。

1.3 UCN 的制备

称取适量 BCN 于坩埚中, 置于 580 或 $550 \text{ }^\circ\text{C}$ 的马弗炉中, 保温 20 min 取出, 立即浸入液氮的容器中, 待液氮完全挥发后取出 UCN, 重新放于马弗炉中。反复进行以上步骤 10 次得到的 UCN 记为 UCN_{550-10} , 反复进行 5 次时 UCN_{580-5} 。取适量上述 UCN 分别在 $550 \text{ }^\circ\text{C}$ 或 $580 \text{ }^\circ\text{C}$ 下的马弗炉中分别保温一次, 自然降至室温后得到的 UCN 分别记为 $\text{UCN}_{550-10+1}$, $\text{UCN}_{580-5+1}$ 。

1.4 光催化降解

称取适量 UCN 配成浓度为 0.5 mg/mL , 加入到盛有 50 mL , 10 ppm RhB 溶液的石英反应器中, 置于光化学反应仪中, 300 W 氙灯照射一段时间, 离心, 取上清液测吸光度 A 。

1.5 电化学测试

将磨好的玻碳电极用硫酸清洗活化, 再滴涂 $5 \text{ }\mu\text{L}$ 的 UCN 的修饰液, 光照至干。加入 1 mL 的 10^{-5} mol/L 的 TBPPA 于 4 mL 的 $\text{pH}=5.8$ 的磷酸缓冲溶液中, 使用电化学工作站, 采用铂丝 Pt 为对电极, 银-氯化银电极(Ag/AgCl)为参比电极, 玻碳电极为工作电极的三电极体系进行循环伏安测试。

2 结果与讨论

2.1 UCN 结构表征

对所获得的 UCN 的形貌进行 TEM 表征如图 1 所示。如图 1(a, b)说明 UCN_{550-10} 和 UCN_{580-5} 均为薄的大片状, UCN_{580-5} 边缘卷曲, 可能片层更薄。如图 1(c, d)是经过再一次热剥得到的 $\text{UCN}_{550-10+1}$, $\text{UCN}_{580-5+1}$ 均为小薄碎片。为了比较剥离所得样品 UCN 的厚度, 对 UCN 进一步进行了 AFM 表征, 结果表明: UCN_{550-10} 和 UCN_{580-5} 均为为大片状, 其平均厚度分别为 2.8 和 1.5 nm , 原子层则分别约为 8 层和 4 层, UCN_{580-5} 片更薄, 与 TEM 结果吻合。在 550 和 $580 \text{ }^\circ\text{C}$ 再进一步热剥一次, 则 $\text{UCN}_{550-10+1}$ 和 $\text{UCN}_{580-5+1}$ 其平均厚度分别约为 1.0 和 0.68 nm , 原子层则分别约为 2 层和 1 层, 说明高温剥离效果优于低温, 且剥离次数少, 但产量相对少些。

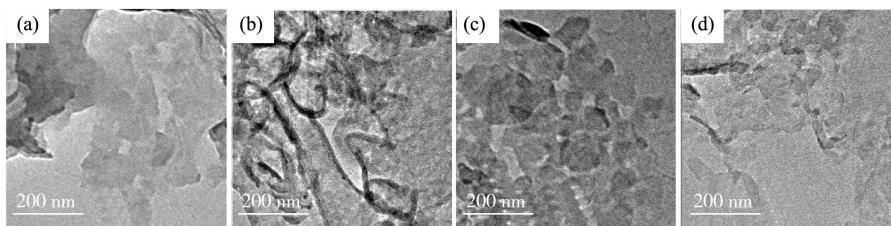


图 1 样品的 TEM 图 (a) UCN_{550-10} ; (b) UCN_{580-5} ; (c) $\text{UCN}_{550-10+1}$; (d) $\text{UCN}_{580-5+1}$

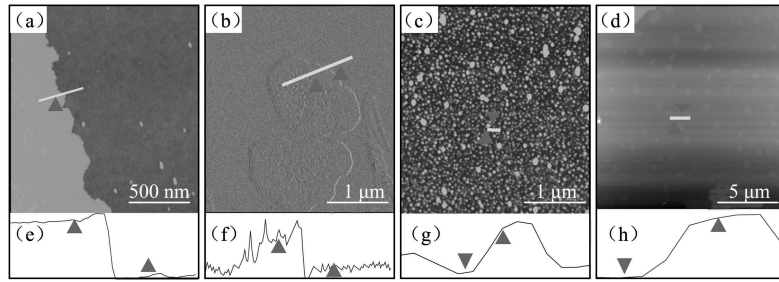


图2 样品的 AFM 图 (a) UCN_{550-10} ; (b) $UCN_{550-10+1}$; (c) UCN_{580-5} ; (d) $UCN_{580-5+1}$; (e) (f) (g) 和 (h) 所选区域的厚度分布图

为了研究 UCN 的晶相结构进行了 XRD 表征,从图 3 可以看出,UCN 的特征 XRD 衍射峰都没消失,依然保持着 CN 石墨相三嗪环结构,但 BCN 石墨层堆叠的 27.3° 处的衍射峰剥离后均向大角度发生了偏移,而且越薄偏移越大。

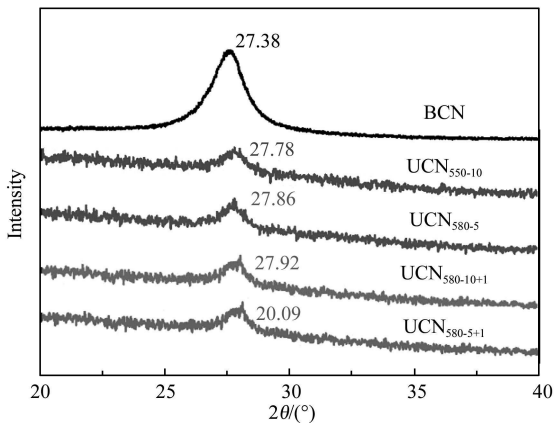


图3 样品的 XRD 图

表 1 UCN 比表面积及孔容

Sample	Pore volume / ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	Surface Area / ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)
BCN	0.096	16.26
UCN_{550-10}	0.580	139.59
$UCN_{550-10+1}$	0.724	186.50
UCN_{580-5}	0.513	120.35
$UCN_{580-5+1}$	0.521	129.39

从表 1 来看,通过液氮加热剥离可有效的提高比表面积, $UCN_{550-10+1}$ 比表面积可高达 $186.50 \text{ m}^2/\text{g}$,较 BCN 增加了 11.5 倍,而 $UCN_{580-5+1}$ 虽然为单层 CN,但比表面积比 $UCN_{550-10+1}$ 低,但较 BCN 也增加了 8 倍,其可能原因是在低温下剥离次数多,反复气化-冷却有利于表面产生的更多孔的缘故。

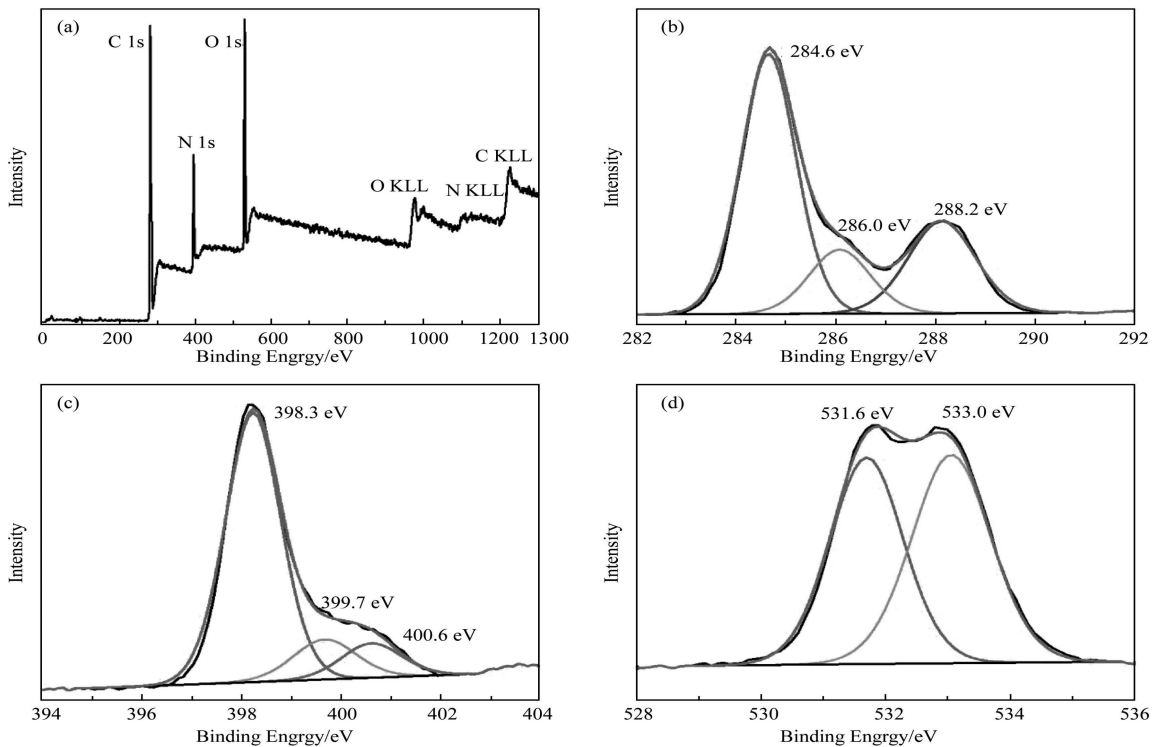


图4 $UCN_{550-10+1}$ 样品的 XPS 谱图 (a) 全谱; (b) C1s; (c) N1s; (d) O1s

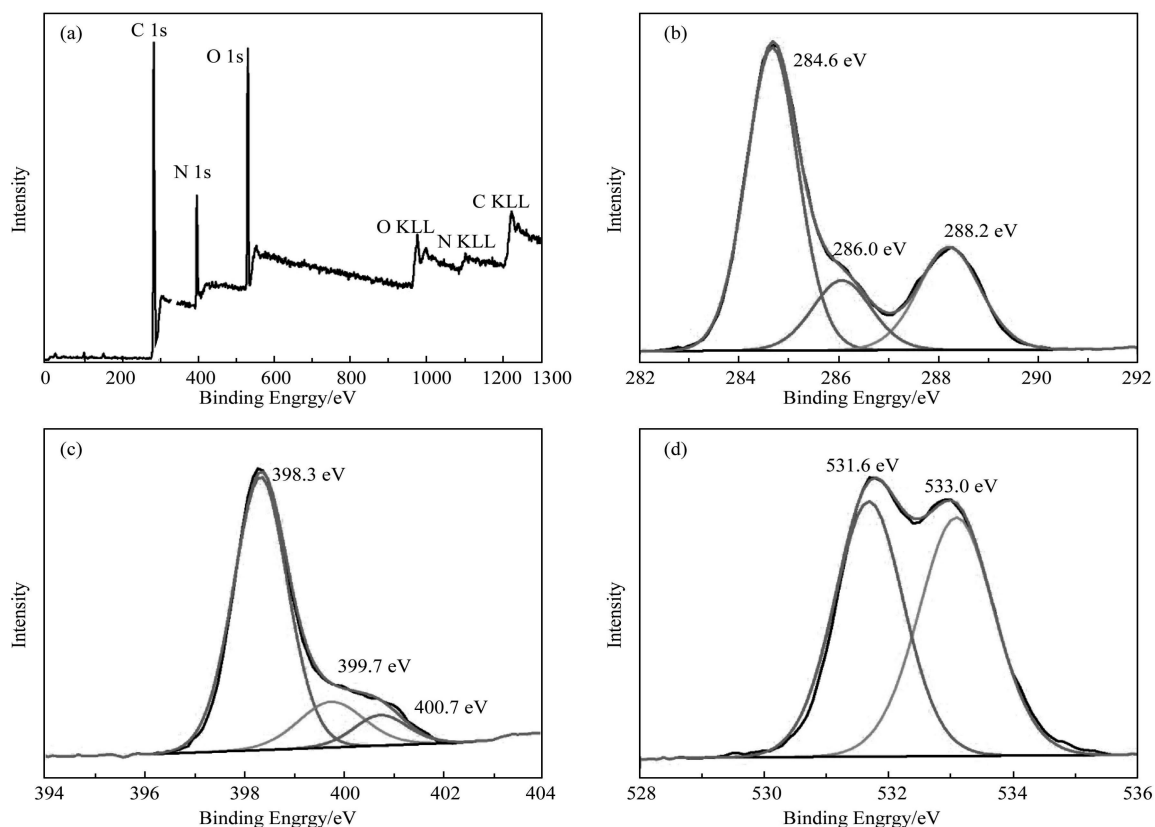


图 5 UCN₅₈₀₋₅₊₁ 样品的 XPS 谱图 (a)全谱; (b)C1s; (c)N1s; (d)O1s

表 2 样品的 XPS 分峰拟合结果

Sample	Element	Assignment	Position /eV	Area	Concentrate/%
BCN ₅₈₀	C1s	C-N	284.6	24905.6	40.7
		C=N	286.1	40789.9	
	N1s	N(sp ²)	398.3	64613.6	59.3
		N(sp ³)	399.6	24954.3	
UCN ₅₈₀₋₅₊₁	C1s	C-N	284.6	53039.0	51.0
		C=N	286.1	13788.8	
	N1s	O-C-O	288.2	21306.0	14.7
		N(sp ²)	398.3	19391.8	
		N(sp ³)	399.7	3916.5	
	O1s	NH _x	400.7	2138.9	34.3
C=O		531.6	29335.8		
UCN ₅₅₀₋₁₀₊₁	C1s	O-H	533.0	29943.8	50.6
		C-N	284.6	44528.8	
	N1s	C=N	286.1	12241.0	15.6
		O-C-O	288.1	19401.6	
		N(sp ²)	398.3	18000.1	
	O1s	N(sp ³)	399.7	3033.2	33.8
NH _x		400.6	2499.3		
		C=O	531.6	24275.1	
		O-H	533.0	26502.0	

对 UCN 的元素和价键进行了 XPS 分析,图 4 和图 5 分别为 $\text{UCN}_{550-10+1}$ 和 $\text{UCN}_{580-5+1}$ 的 XPS 谱图,其分析结果见表 2。通过对比发现,剥离后的 UCN 含 O 含量明显增加, $\text{UCN}_{550-10+1}$ 和 $\text{UCN}_{580-5+1}$ 分别增加了 33.8% 和 34.3%,这是因为 UCN 的比表面积明显增大,吸附能力增强,空气中大量的 H_2O , CO_2 被吸附,同时 C 有部分被氧化,形成 C-N, O-C=O, 所以 O 含量明显增加了;另外, N 含量确明显减少, $\text{UCN}_{550-10+1}$ 和 $\text{UCN}_{580-5+1}$ 分别较 BCN 减少了 43.73% 和 44.6%,说明剥离后 UCN 产生了 N 缺位,氮缺位的形成,有利于光生 e-h 对的分离,从而提高了 UCN 的光催化活性。

2.2 影响 UCN 制备的因素

2.2.1 前驱体。前驱体在形成 CN 过程中受到很多方面的影响,反应条件和前驱体的类型对形成 CN 过程中的理化性质有较大的影响。例如,不同温度加热的 Ma 形成的 CN 其 E_g 值不同。此外,舒庆等^[40]证明了 UCN 的微观构造以及吸附性能差异归结于前驱体的类型不同。前驱体的来源不同,合成的 UCN 结构也有一定的差异。因为剥离效果高温优于低温,所以讨论影响因素时均在 580 °C 下进行。

不同前驱体制备的 XRD 如图 6 所示,石墨层有序叠加的 27.3° 衍射峰,发现剥离后 UCN 该衍射峰均向大角度偏移了,并且强度减弱,高温 580 °C 下制备的 UCN 强度更弱,这是因为片层更薄的缘故。

为了探究不同前驱体制备的 UCN 的孔体积及其比表面积的关系,进行了等温氮气吸附脱附测试。如表 3 所述,发现不同前驱体制备的 UCN 的比表面积均大幅增加。 UCN_{580-5} -DCDA 的比表面积略小于 UCN_{580-5} -Ma 和 UCN_{580-5} -TU, UCN_{580-5} -Ma 的孔容最大, UCN_{580-5} -DCDA 的孔容最小,孔容越大则吸附能力越强。

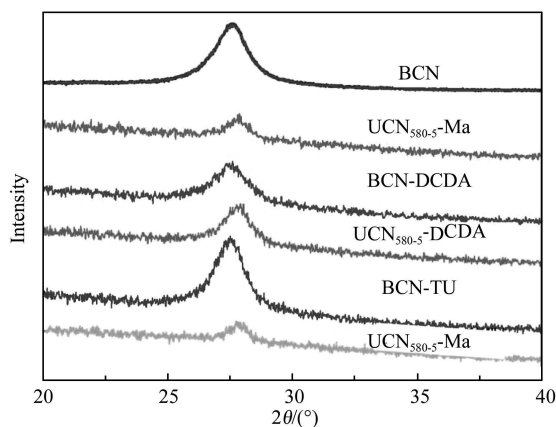


图 6 不同前驱体制备的 UCN 的 XRD 图

表 3 由几种不同前驱体制备的 UCN 的比表面积和总孔容

Sample	Surface area $/(\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1})$	Pore volume $/(\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1})$
UCN_{580-5} -TU	122.86	0.455
UCN_{580-5} -DCDA	111.16	0.380
UCN_{580-5} -Ma	120.35	0.521

如图 7 所示,采用 AFM 表征 UCN 的厚度, UCN_{580-5} -DCDA, UCN_{580-5} -TU 和 UCN_{580-5} -Ma 片层平均厚度分别为 4.3, 4.2, 1.5 nm, 和 UCN_{580-5} -DCDA 和 UCN_{580-5} -TU 为大片状相比, UCN_{580-5} -Ma 为细小的颗粒碎片且最薄, UCN_{580-5} -Ma 约为 2 层, UCN_{580-5} -DCDA 和 UCN_{580-5} -TU 约为 6 层。这是因为以不同前驱体结构不同得到的 UCN 形貌也不同,作为拥有六元环的平面结构的 Ma,经热缩聚脱去氨基后形成具有六元环结构的母体,在交联过程中易形成平面结构,更容易剥离成较薄的超薄片。

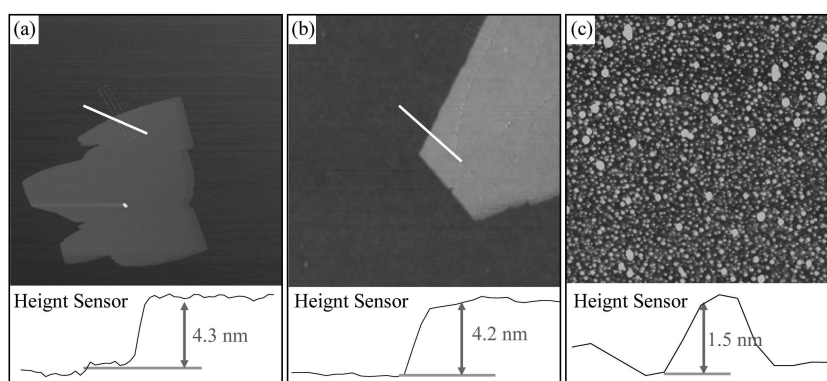


图 7 不同前驱体制备的 UCN 的 AFM 图 (a) UCN_{580-5} -DCDA; (b) UCN_{580-5} -TU; (c) UCN_{580-5} -Ma

2.2.2 剥离量。在 580 °C 条件下分别选择 0.5,1.0,1.5 g BCN 进行剥离,得到的 UCN 分别记为 UCN-0.5, UCN-1.0,UCN-1.5,其 AFM 的结果(见图 8)分别为,2.2,1.5,10.1 nm。由图可知,在高温条件下,剥离化程度由边缘向中心递减,边缘分解较快,中心部分未完全剥离而引起非均匀剥离,因此剥离程度受剥离量的影响而改变。CN-1.5 片层平均厚度为 10.1 nm,可能是由于用量太大,导致受热不均匀片层之间范德华力未能断开,因此剥离效果不明显。因此选择 1.0 g 剥离量进行后续研究。

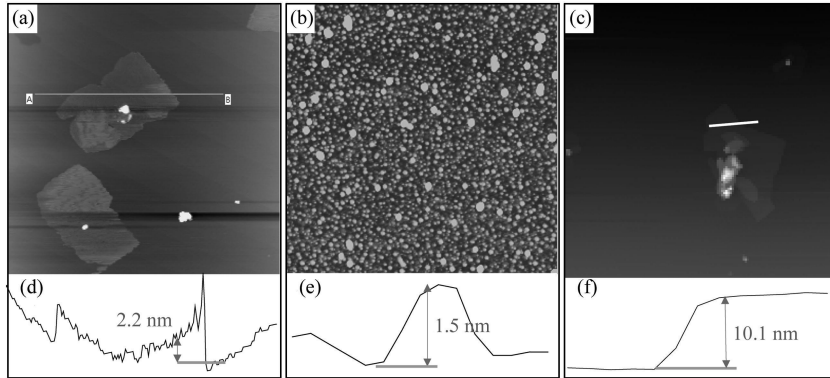


图 8 UCN 的 AFM 图谱 (a) UCN-0.5; (b) UCN-1.0; (c) UCN-1.5; (d)-(f) 为对应区域的厚度分布图

2.3 光电化学性质及应用

2.3.1 DSR、FS、光电流和阻抗分析。图 9 为 UCN 的 DSR 和 EIS,剥离后 UCN 片变薄,由于量子限制效应,带隙 E_g 均较 BCN 增大,其中 $UCN_{580-5+1}$ 的 E_g 值为 2.96 eV 最大, E_g 越大则光激发产生的光生电子还原能力和空穴氧化能力可能越强。利用交流阻抗测试表征材料在界面传输电子的阻力,如图 9(b) 所示, $UCN_{580-5+1}$ 和 $UCN_{550-10+1}$ 能奎斯特圆弧相差不大,均较 BCN 的阻抗明显减小,且为最小,说明片层越薄则传输电子阻力越低。

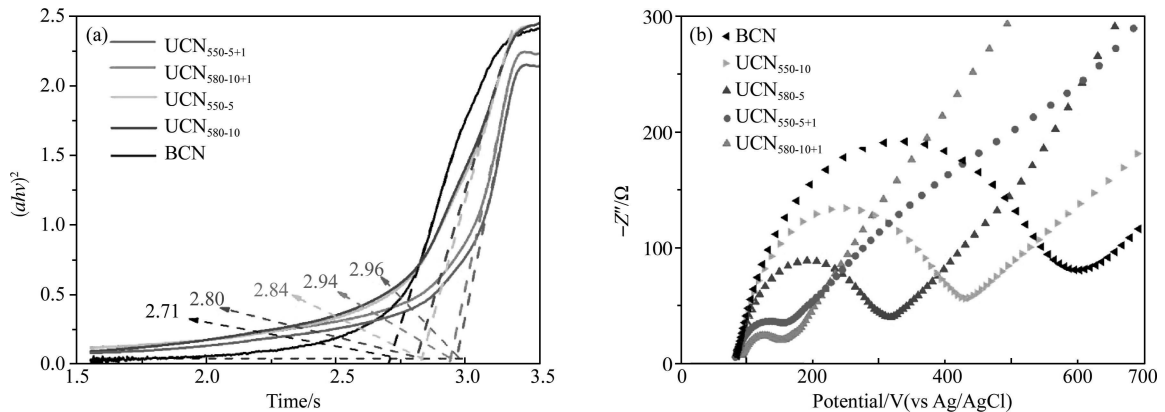


图 9 UCN 样品 (a) DSR spectra; (b) EIS(0.1 mol · L⁻¹ KCl 和 5.0 × 10⁻⁶ mol · L⁻¹ [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 溶液, 开路电压条件,测试频率为 10⁵ · 10⁻² Hz)

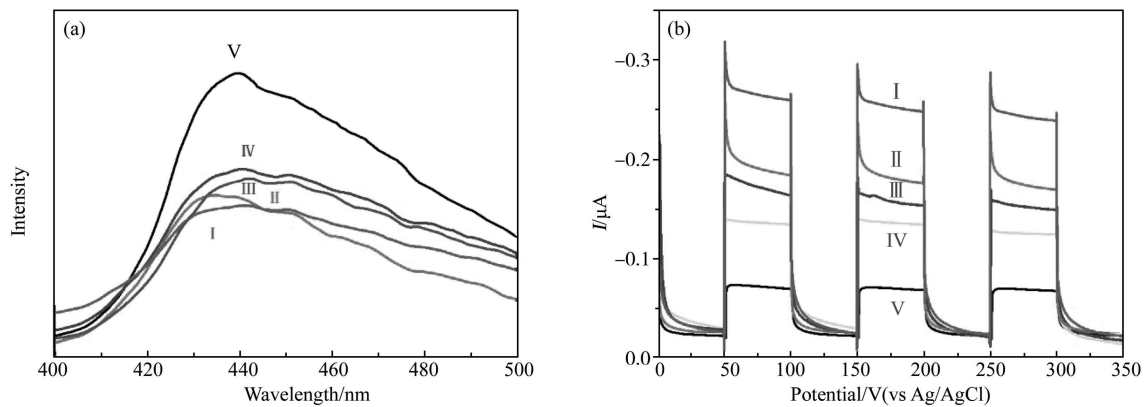


图 10 UCN 样品 (a) FS 光谱; (b) 瞬时光电流(荧光激发波长为 270 nm, I、II、III、IV、V 分别为 $UCN_{580-5+1}$ 、 $UCN_{550-10+1}$ 、 UCN_{580-5} 、 UCN_{550-10} 和 BCN)

光生电子空穴分离效率可以用 FS 和瞬时光电流来衡量。图 10 中 FS 强弱顺序与其瞬时光电流大小趋势走向相反。UCN₅₈₀₋₅₊₁ 光电流强度相比 UCN₅₅₀₋₁₀₊₁、UCN₅₈₀₋₅、UCN₅₅₀₋₁₀ 和 BCN 来说最高,而荧光强度最低,表明 UCN₅₈₀₋₅₊₁ 的光生电子空穴复合率最低。片层厚度越厚,光生电子传输到表面的时间越长。因此片层越薄,越有利于降低光生电子空穴的复合率,光生电子、空穴得到有效的分离,发生在片层厚度小于德布罗意波长时,则会表现出量子限制效应。瞬时光电流循环测试 3 次后依旧保持稳定,说明催化剂稳定性高。

2.3.2 UCN 在光电催化方面的应用。不同的 UCN 可见光催化降解 RhB 的结果见图 11(a),由图可见,光催化降解 RhB 进行 15 min 时,UCN₅₈₀₋₅₊₁、UCN₅₈₀₋₅、UCN₅₅₀₋₁₀、UCN₅₅₀₋₁₀₊₁ 降解率分别为 93.5%、90.3%、78.0%和 91.7%,由低到高增加,其中有三种催化剂的降解率已达 90% 以上,相比于 BCN 的速率常数 0.00238 min⁻¹,其降解速率常数分别为 0.235、0.171、0.137、0.185 min⁻¹和,分别增加了 98、72、58 和 77 倍。

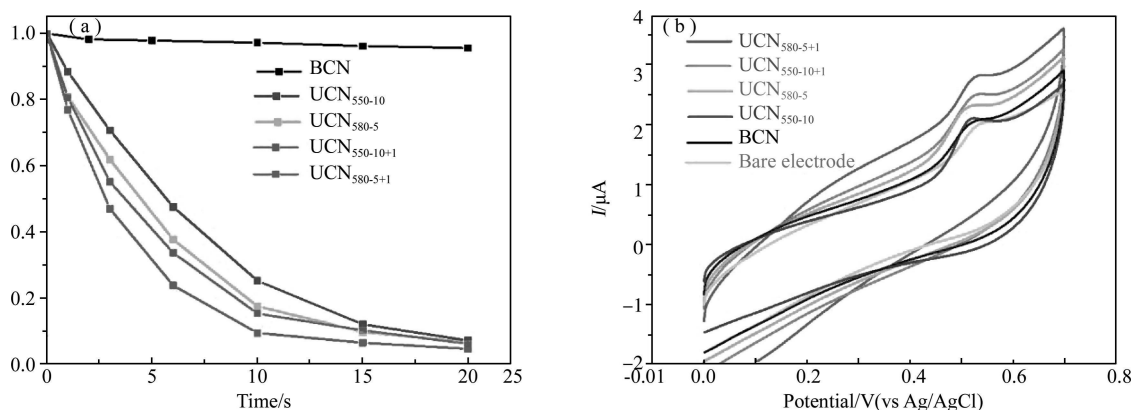


图 11 UCN 样品 (a)RhB 降解速率曲线; (b) TBBPA 的循环伏安响应图

UCN 对 TBPPA 电催化循环伏安响应结果见图 11(b), TBPPA 在 UCN₅₅₀₋₁₀, UCN₅₈₀₋₅, UCN₅₅₀₋₁₀₊₁, UCN₅₈₀₋₅₊₁ 修饰电极上的响应分别是 BCN 的 1.06、1.1、1.2 和 1.4 倍。说明 UCN 的电催化活性明显提高,这与 FS、EIS、瞬时光电流、比表面积等测试结果吻合。

3 结论

本文当中采用价格低廉、无毒无害的液氮作为剥离试剂来替代有机试剂超声剥离, CN 通过高温-快速气化联合的方法进行剥离,采用新方法制备的 CN 超薄片厚度仅为 0.68 nm,其比表面积高达 186 m²/g,同时层间距变小,提高了光生电子空穴分离效率,减弱了光生电子传输阻力。与此同时新方法制备的 CN 超薄片带隙宽度提升至 2.96 eV,在降解有机污染物 RhB 的实验中,其降解速率提升了近 100 倍。新合成的方法具有合成便捷,成本低,环保和适合工业大规模制备,该方法克服了现有 CN 超薄片制备方法的诸多缺点,找到了一条低成本制备单层 CN 的路线。

参 考 文 献

- [1] KNIEKE C, BERGER A, VOIGT M, et al. Scalable production of graphene sheets by mechanical delamination [J]. Carbon, 2010, 48 (11): 3196-3204.
- [2] GUPTA A, SAKTHIVEL T, SEAL S. Recent development in 2D materials beyond graphene [J]. Progress in Materials Science, 2015, 73: 44-126.
- [3] 胡耀娟, 金娟, 张卉, 等. 石墨烯的制备、功能化及在化学中的应用 [J]. 物理化学学报, 2010, 26(8): 2073-2086.
- [4] FERRARI A C, MEYER J C, SCARDACI V, et al. Raman spectrum of graphene and graphene layers [J]. Physical Review Letters,

2006, 97(18): 187401.

- [5] SCHWIERZ F. Graphene transistors [J]. *Nature Nanotechnology*, 2010, 5(7): 487-496.
- [6] LI D, KANER R B. Graphene-based materials [J]. *Science*, 2008, 320(5880): 1170-1171.
- [7] SUN Z, LIAO T, DOU Y, et al. Generalized self-assembly of scalable two-dimensional transition metal oxide nanosheets [J]. *Nature Communications*, 2014, 5(1): 1-9.
- [8] WU J, LIU M, CHATTERJEE K, et al. Exfoliated 2D transition metal disulfides for enhanced electrocatalysis of oxygen evolution reaction in acidic medium [J]. *Advanced Materials Interfaces*, 2016, 3(9): 1500669.
- [9] VENKATESHALU S, GRACE A N. MXenes-A new class of 2D layered materials: Synthesis, properties, applications as supercapacitor electrode and beyond [J]. *Applied Materials Today*, 2020, 18: 100509.
- [10] TAO W, ZHU X, YU X, et al. Black phosphorus nanosheets as a robust delivery platform for cancer theranostics [J]. *Advanced Materials*, 2017, 29(1): 1603276.
- [11] MANNIX A J, KIRALY B, HERSAM M C, et al. Synthesis and chemistry of elemental 2D materials [J]. *Nature Reviews Chemistry*, 2017, 1(2): 1-14.
- [12] WANG L Y, WANG K H, HE T T, et al. Graphitic carbon nitride-based photocatalytic materials: preparation strategy and application [J]. *Applied Surface Science*, 2020, 8(43): 16048-16085.
- [13] 张宇航, 孙艳娟, 徐瑾, 等. 超薄类石墨相氮化碳纳米片剥离技术的研究进展 [J]. *武汉工程大学学报*, 2017, 39(3): 223-230.
- [14] WEN J, XIE J, CHEN X, et al. A review on CN-based photocatalysts [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2017, 391: 72-123.
- [15] 彭小明, 罗文栋, 胡锋平, 等. 石墨类氮化碳改性方法的研究进展 [J]. *水处理技术*, 2019, 45(12): 1-6.
- [16] XIONG T, CEN W, ZHANG Y, et al. Bridging the CN interlayers for enhanced photocatalysis [J]. *ACS Catalysis*, 2016, 6(4): 2462-2472.
- [17] XU J, WANG G, FAN J, et al. CN modified TiO₂ nanosheets with enhanced photoelectric conversion efficiency in dye-sensitized solar cells [J]. *Journal of Power Sources*, 2015, 274: 77-84.
- [18] YADAV R M, KUMAR R, ALIYAN A, et al. Facile synthesis of highly fluorescent free-standing films comprising of graphitic carbon nitride (CN) nanolayers [J]. *New Journal of Chemistry*, 2020, 44: 2644-2651.
- [19] ZHOU X, ZOU J, ZHANG S, et al. Preparation and application of CN-ZnS-DNA nanocomposite with enhanced electrocatalytic activity [J]. *Chinese Journal of Catalysis*, 2017, 38(2): 287-295.
- [20] KANG S F, HE M F, CHEN M Y, et al. Ultrafast plasma immersion strategy for rational modulation of oxygen-containing and amino groups in graphitic carbon nitride [J]. *Carbon*, 2020, 159: 51-64.
- [21] GE F Y, XU Y G, ZHOU Y H, et al. Surface amorphous carbon doping of carbon nitride for efficient acceleration of electron transfer to boost photocatalytic activities [J]. *Applied Surface Science*, 2020, 507(30): 145145.
- [22] 尤欢, 张同, 韩长存. AuPd/CN 复合光催化剂可控制备及其光催化分解水产氢性能研究 [J]. *聊城大学学报(自然科学版)*, 2018, 31(3): 1-6.
- [23] GUO S, TANG Y, XIE Y, et al. P-doped tubular CN with surface carbon defects: universal synthesis and enhanced visible-light photocatalytic hydrogen production [J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2017, 218: 664-671.
- [24] CHU K, LIU Y, LI Y, et al. 2D/2D interface engineering of MoS₂/C₃N₄ heterostructure for promoted electrocatalytic nitrogen fixation [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(6): 7081-7090.
- [25] LIU C, HUANG H, CUI W, et al. Band structure engineering and efficient charge transport in oxygen substituted CN for superior photocatalytic hydrogen evolution [J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2018, 230: 115-124.
- [26] LIU M, XIA P, ZHANG L, et al. Enhanced photocatalytic H₂-production activity of CN nanosheets via optimal photodeposition of Pt as cocatalyst [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2018, 6(8): 10472-10480.
- [27] CUI J, QI D, WANG X. Research on the techniques of ultrasound-assisted liquid-phase peeling, thermal oxidation peeling and acid-based chemical peeling for ultra-thin graphite carbon nitride nanosheets [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2018, 48: 181-187.

- [28] ZHAO H X, YU H T, QUAN X, et al. Atomic single layer graphitic-C₃N₄: fabrication and its high photocatalytic performance under visible light irradiation [J]. RSC Advances, 2014, 4(2): 624-628.
- [29] WU C Z, LU X L, XU K, et al. Facile one step method realizing scalable production of CN nanosheets and study of their photocatalytic H₂ evolution activity [J]. Journal of Materials Chemistry A, 2014, 2(44): 18924-18928.
- [30] ZHANG X D, WANG H X, WANG H, et al. Single-layered graphitic-C₃N₄ quantum dots for two-photon fluorescence imaging of cellular nucleus [J]. Advanced Materials, 2014, 26(26): 4438-4443.
- [31] XU Y G, XIE M, HUANG S Q, et al. High yield synthesis of nano-size CN derivatives by a dissolve-regrowth method with enhanced photocatalytic ability [J]. RSC Advances, 2015, 5(33): 26281-26290.
- [32] KIM J S, OH J W, WOO S I. Investigation for the effects of ball milling process on the physical characteristics, the behaviors of carriers and the photocatalytic activity of sulfur doped g-C₃N₄ [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2017, 42(8): 5485-5495.
- [33] NIU P, ZHANG L, LIU G, et al. Graphene-like carbon nitride nanosheets for improved photocatalytic activities [J]. Advanced Functional Materials, 2012, 22(22): 4763-4770.
- [34] ZHAO H, YU H, QUAN X, et al. Fabrication of atomic single layer graphitic-C₃N₄ and its high performance of photocatalytic disinfection under visible light irradiation [J]. Applied Catalysis B: Environmental, 2014, 152: 46-50.
- [35] FANG L J, LI Y H, LIU P F, et al. Facile fabrication of large-aspect-ratio CN nanosheets for enhanced photocatalytic hydrogen evolution [J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2017, 5(3): 2039-2043.
- [36] 阎鑫, 惠小艳, 闫从祥, 等. 类石墨相氮化碳二维纳米片的制备及可见光催化性能研究 [J]. 材料导报, 2017, 31(9): 77-80.
- [37] YAN S C, LI Z S, ZOU Z G. Photodegradation performance of CN fabricated by directly heating melamine [J]. Langmuir, 2009, 25(17): 10397-10401.
- [38] WANG X, MAEDA K, THOMAS A, et al. A metal-free polymeric photocatalyst for hydrogen production from water under visible light [J]. Nature Materials, 2009, 8: 76-80.
- [39] ZHANG G, ZHANG J, ZHANG M, et al. Polycondensation of thiourea into carbon nitride semiconductors as visible light photocatalysts [J]. Journal of Materials Chemistry, 2012, 22(16): 8083-8091.
- [40] 叶仕雄, 舒庆. 硝酸活化三聚氰胺前驱体对 CN 结构和可见光催化性能的影响 [J]. 无机化学学报, 2020, 36(1): 1-10.

芳基亚磺酸钠作为含硫砌块合成吡咯并[1,2-*a*]吲哚

李梦婷,王 丹,宁志涛,王璐瑶,杜正银

(西北师范大学 化学化工学院,甘肃 兰州 730070)

摘 要 使用芳基亚磺酸钠作为含硫结构单元,基于串联自由基磺酰化/环化/异构化反应,在 I₂ 促进下空气中与 *N*-炔丙基吲哚反应合成了一系列 2-磺酰化 9*H*-吡咯并[1,2-*a*]吲哚衍生物。该方法可经一步反应同时构建一个 C-C 键和一个 C-S 键,而且所用原料容易获得,反应条件较温和,底物适用性广泛。

关键词 *N*-炔丙基吲哚;芳基亚磺酸钠;磺酰化/环化/异构化反应;9*H*-吡咯并[1,2-*a*]吲哚

中图分类号 O625

文献标识码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Synthesis of Pyrrolo[1,2-*a*]indoles with Sodium Arylsulfonates as Sulfur-containing Building Blocks

LI Mengting, WANG Dan, NING Zhitao, WANG Luyao, DU Zhengyin

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

Abstract Synthesis of 2-sulfonylated 9*H*-pyrrolo[1,2-*a*]indole derivatives by tandem radical sulfonylation/cyclization/isomerization is described, which use sodium arylsulfonates as sulfur-containing building block to react with *N*-propargylindoles in the presence of I₂ under air atmosphere. The protocol has the advantages of readily available starting materials, mild reaction conditions, wide substrate scope and the ability to construct C-C bonds and C-S bonds simultaneously.

Key words *N*-propargylated indoles; Sodium benzenesulfinate; Sulfonylation/ cyclization/ isomerization reaction; Pyrrolo[1,2-*a*]indoles.

0 引言

吡咯并[1,2-*a*]吲哚是天然产物^[1,2],抗癌药^[3]和抗肿瘤药^[4]中常见的结构片段。在图1中列举了一些含有吡咯并[1,2-*a*]吲哚骨架的生物活性分子,例如 lisatisine A 具有抗病毒的作用,Flinderole C 作为一种抗疟药,Mitomycin C (MC)具有抗癌功效,化合物D具有抗肿瘤功效等。由于含有吡咯并[1,2-*a*]吲哚结构片段的化合物具有很好的药用价值,因此近年来吡咯并[1,2-*a*]吲哚衍生物的合成引起了化学家们的极大兴趣。

收稿日期:2021-02-03

基金项目:国家自然科学基金项目(21262028, 21762039)资助

通讯作者:杜正银,男,汉族,博士,教授,博士生导师,研究方向:有机合成方法学,E-mail:clinton_du@126.com。

据已有文献报道,通过 *N*-炔丙基吡啶的串联自由基环化/异构化反应能够合成了一系列吡咯并[1,2-*a*]吡啶衍生物,而自由基串联环化反应作为高效的构建杂环化合物的重要策略被广泛应用^[5]。在图 2 中可以看到,合成的化合物具有四种可能的结构 **F**、**G**、**H** 和 **I**,这主要取决于合成化合物的反应条件。唐果课题组^[6]和朱成建课题组^[7]以二苯基磷氧化物为自由基试剂,使用 *N*-炔丙基吡啶和二苯基磷氧化物在不同的反应条件下,利用过渡金属催化合成了 2-磷酰基-9*H*-吡咯并[1,2-*a*]吡啶 **F**。前不久,Reddy 课题组报道了 *N*-炔丙基吡啶与以碳为中心的酰基自由基试剂反应,合成了单酰基和双酰基吡咯并[1,2-*a*]吡啶 **F**^[8]。这些转化足以证明 *N*-炔丙基吡啶可作为良好的自由基受体。

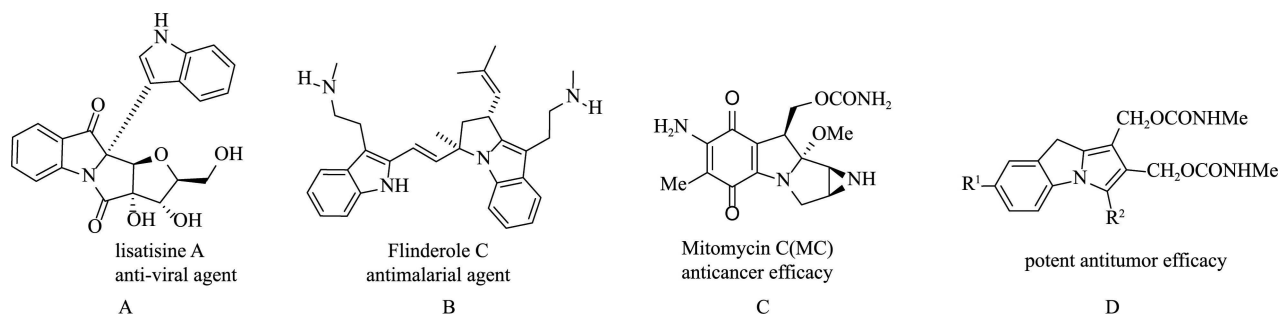


图 1 具有生物活性的吡咯并[1,2-*a*]吡啶衍生物

在自然界中普遍存在许多含硫的有机化合物^[9]。在有机分子中引入含硫基团可以大大增强其生物活性^[10]。目前已经有研究小组引入了含硫基团以促进 *N*-炔丙基吡啶的串联自由基环化/异构化反应。张鹏波课题组报告了 *N*-炔丙基吡啶与磺酰氯在光催化剂 *fac*-Ir(bpy)₃ 的催化下,以 CH₂Cl₂ 为溶剂,加入 2.0 当量 Na₂CO₃ 反应 12 h,可以有效的合成 2-磺酰化 9*H*-吡咯并[1,2-*a*]吡啶衍生物 **F**^[11]。此外芳基磺酰肼也可作为含硫基团与 *N*-炔丙基吡啶反应,以获得不同的吡咯并[1,2-*a*]吡啶衍生物。唐果课题组已经报道使用 NaI 为催化剂和 TBHP 氧化条件下可生成 2-磺酰化 9*H*-吡咯并[1,2-*a*]吡啶衍生物 **F**^[12],而成江课题组使用 CuSO₄ 和 K₂S₂O₈ 时反应生成了 2-硫代 3*H*-吡咯并[1,2-*a*]吡啶衍生物 **G**^[13]。同样梁永民课题组分别使用 CuCl₂-TBHP 和 Cu(NO₃)₂-TBHP 反应体系制备了 2-磺酰化 9*H*-吡咯并[1,2-*a*]吡啶-9-酮 **H**^[14] 和 2-磺酰化 3*H*-吡咯并[1,2-*a*]吡啶-3-酮 **I**^[15]。2019 年,王磊课题组开发了一种使用芳基亚磺酸作为磺酰化试剂合成 2-磺酰化 9*H*-吡咯并[1,2-*a*]吡啶 **F** 的方法^[16]。但是,该反应必须在 N₂ 气氛中进行,并且需要 2.0 当量的 AgOAc 作为氧化剂。DABCO·(SO₂)₂^[17] 和 K₂S₂O₅^[18] 作为二氧化硫的方便来源,与四氟硼酸芳基重氮盐、*N*-炔丙基吡啶三组分反应原位形成芳基磺酰基来制备 2-磺酰化 9*H*-吡咯并[1,2-*a*]吡啶 **F**。近年来,使用苯亚磺酸钠作为新型的含硫结构单元构建 S-C 键已成为研究的热点^[19-21]。因苯亚磺酸钠在空气中稳定,价格便宜且易于获得,因此引起了化学家广泛的重视。于是可以利用磺酰化试剂芳基亚磺酸钠在无过渡金属 I₂ 促进的温和反应条件下与 *N*-炔丙基吡啶发生串联自由基环化反应,以实现 9*H*-吡咯并[1,2-*a*]吡啶衍生物的合成。

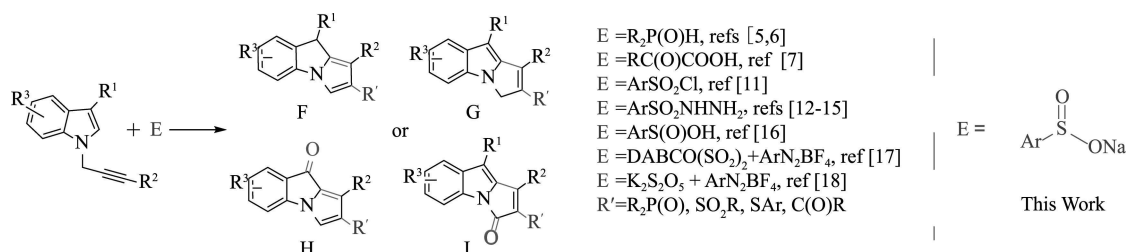


图 2 *N*-炔丙基吡啶的串联自由基环化/异构化反应

1 实验部分

1.1 试剂与表征

实验中所用的石油醚和乙酸乙酯为工业品,使用前需进行蒸馏纯化,其他所有试剂均为市售分析纯。核磁共振氢谱(¹H NMR): 400 MHz 核磁共振仪或 600 MHz 核磁共振仪。核磁共振碳谱(¹³C NMR): 150 MHz 核磁共振仪。CDCl₃ 为溶剂,TMS 作为内标。化学位移(δ)以 ppm 给出,偶合常数(*J*)以赫兹(Hz)给

出。熔点是在 X-4 型显微熔点测定仪上测定,熔点未校正。ZAB-HS 双聚焦高分辨质谱仪测定高分辨质谱。

1.2 实验步骤

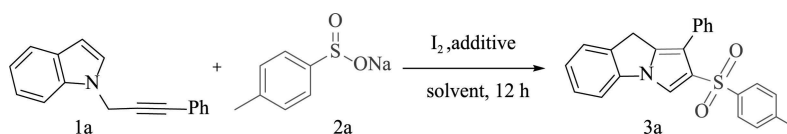
向 20 mL 反应管中依次加入 **1** (0.15 mmol), **2** (0.45 mmol), I₂ (0.15 mmol) 和六氟异丙醇 (2 mL)。旋紧反应管盖子,将反应混合物在油浴中于 120 °C 搅拌 12 h。反应液减压蒸馏去除溶剂后,通过硅胶柱层析分离反应体系,石油醚和乙酸乙酯作为洗脱剂,得到所需产物。产物大多数为已知化合物,有一种新的化合物,得到的目标产物经核磁 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 进行表征,与文献表征结果一致,具有代表性的化合物的表征数据如下: 2-((4-(Tert-butyl)phenyl)sulfonyl)-1-phenyl-9H-pyrrolo[1,2-*a*]indole. Pale yellow solid; mp 101-102 °C. ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 7.93 (s, 1H), 7.49 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.39-7.29 (m, 8H), 7.27-7.25 (m, 2H), 7.20-7.18 (m, 1H), 3.82 (s, 2H), 1.24 (s, 9H); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz): δ 156.0, 139.6, 139.5, 135.2, 134.0, 132.5, 129.8, 128.0, 127.9, 127.2, 127.2, 127.0, 126.1, 125.4, 125.2, 117.5, 115.3, 110.8, 34.9, 31.0, 29.1. ESI-HRMS: [M+Na]⁺ C₂₇H₂₅O₂NNaS, calcd, 450.1498; found, 450.1493.

2 实验结果与讨论

2.1 实验条件探究与优化

在此使用 1-(3-苯基丙-2-炔-1-基)-1*H*-吲哚和 4-甲基苯亚磺酸钠作为模板反应,对反应中底物的物料比、I₂ 的用量、碱、氧化剂、溶剂和温度进行了筛选,结果如表 1 所示。最初,我们选用 1-(3-苯基丙-2-炔-1-基)-1*H*-吲哚 (**1a**, 1.0 equiv) 和 4-甲基苯亚磺酸钠 (**2a**, 3.0 equiv) 进行反应。当加入 1.0 当量 I₂ 作为催化剂,乙醇作为溶剂时,在 80 °C 氩气气氛下反应进行 12 h 后,得到了所需产物 2-甲基苯基-9*H*-吡咯并[1,2-*a*]吲哚 **3a**,产率为 48% (entry 1)。为了提高产物产率,我们试图增加 **2a** 和 I₂ 的量。实验结果表明使用 2.0 当量的 I₂ 会导致 **3a** 收率降低至 15%,探究其原因是由于形成了复杂的反应混合物 (entry 2)。当增加 **2a** 为 4.0 当量

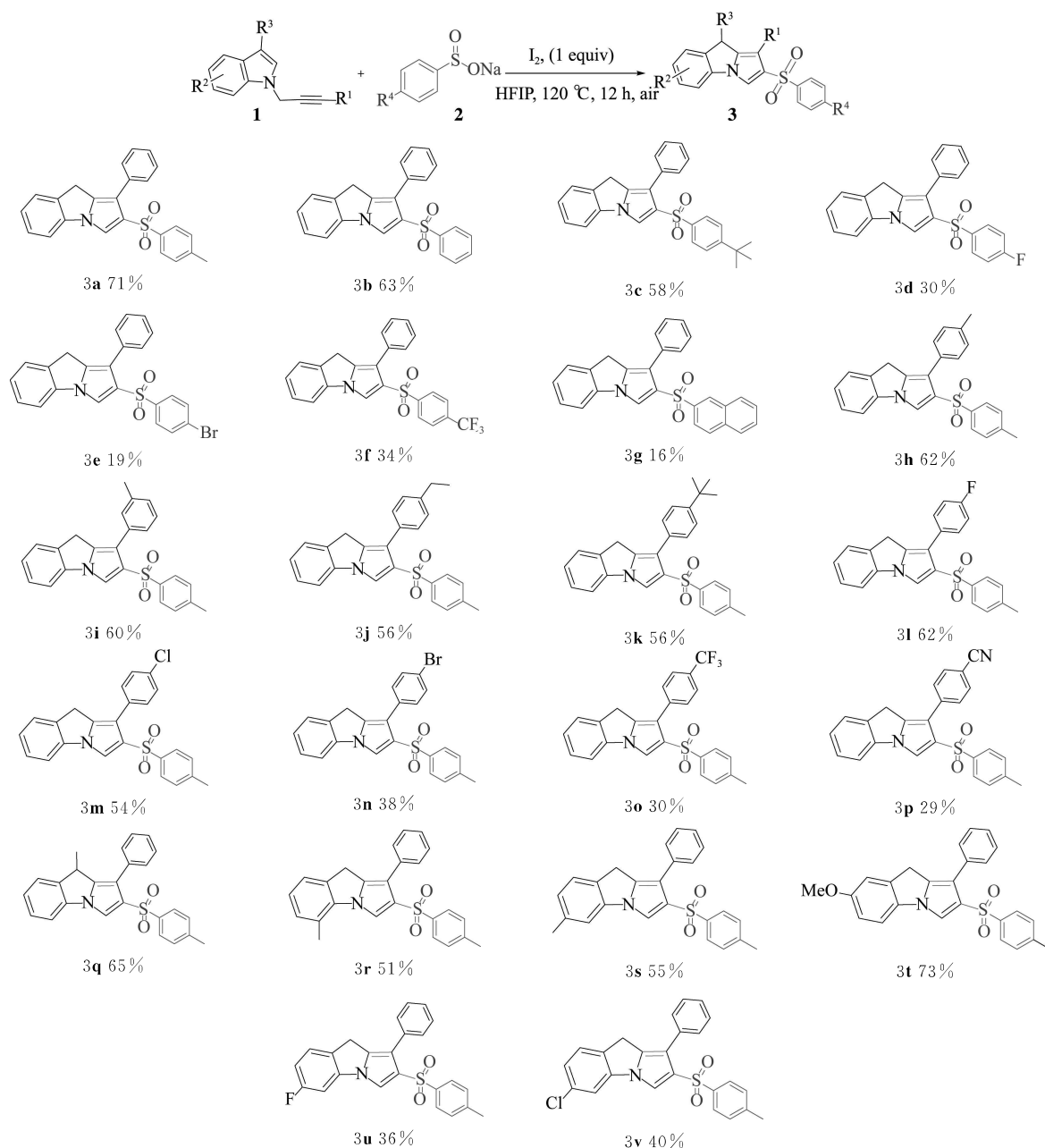
表 1 优化反应条件^a



Entry	Mole ratio of 1a : 2a	I ₂ (equiv)	Solvent	T/°C	Yield/%
1	1.0/3.0	1.0	EtOH	80	48
2	1.0/3.0	2.0	EtOH	80	15
3	1.0/4.0	1.0	EtOH	80	46
4	1.0/3.0	-	EtOH	80	0
5 ^b	1.0/3.0	1.0	EtOH	80	53
6 ^c	1.0/3.0	1.0	EtOH	80	5
7 ^d	1.0/3.0	1.0	EtOH	80	12
8 ^e	1.0/3.0	1.0	EtOH	80	23
9	1.0/3.0	1.0	THF	80	0
10	1.0/3.0	1.0	1,4-dioxane	80	0
11	1.0/3.0	1.0	DMSO	80	60
12	1.0/3.0	1.0	MeNO ₂	80	32
13	1.0/3.0	1.0	DCE	80	39
14	1.0/3.0	1.0	toluene	80	23
15	1.0/3.0	1.0	HFIP	80	66
16 ^f	1.0/3.0	1.0	HFIP	reflux	trace
17	1.0/3.0	1.0	HFIP	120	70
18 ^f	1.0/3.0	1.0	HFIP	120	71

注: a: Reaction conditions: **1a** (0.15 mmol), **2a** (3.0 equiv), I₂ (1.0 equiv based on **1a** except otherwise indicated), solvent (2 mL) in Ar atmosphere at indicated temperature for 12 h in a sealed pressure tube. Yield is isolated yield; b: 15 h; c: 2.0 equiv of Na₂CO₃ was added; d: 2.0 equiv of Cs₂CO₃ was added; e: 1.0 equiv of TBHP was added additionally; f: Under air atmosphere.

时生成**3a**的产率为46%,产率并没有明显的变化(entry 3)。在没有添加 I_2 作为催化剂的情况下,反应没有发生,由此可见, I_2 的存在对该反应至关重要(entry 4)。当反应时间从12 h延长至15 h时,产物产率增加至53%(entry 5)。接下来我们研究了碱和氧化剂对产物产率的影响。结果表明,加入 Na_2CO_3 和 Cs_2CO_3 导致反应体系比较复杂,获得**3a**的收率分别为5%和12%(entries 6 and 7)。在反应中同时加入1.0当量的叔丁基过氧化氢(TBHP)和1.0当量的 I_2 时获得了23%的收率(entry 8)。随后我们对不同溶剂(如乙醇、四氢呋喃、1,4-二恶烷、二甲基亚砜、硝基甲烷、1,2-二氯乙烷、甲苯和六氟异丙醇(HFIP))进行了筛选(entries 1, 9-15)。发现六氟异丙醇对该反应最有利,以66%的产率获得了**3a**。之后我们就以六氟异丙醇为反应溶剂,进一步探究了反应温度,发现在59 °C的回流条件下获得了痕量的目标产物,而当在密封的反应管中120 °C氩气气氛下进行反应时,获得了**3a**的产率为70%(entries 16 and 17)。该反应也能够在空气气氛于120 °C条件下进行,得到71%的**3a**(entry 18)。根据上述实验结果,我们选择的最优条件是在1.0当量 I_2 促进下,*N*-炔丙基吡啶与芳基亚磺酸钠物料比为1:3,六氟异丙醇为溶剂,120 °C反应12 h,得到9*H*-吡咯并[1,2-*a*]吡啶产率最高。



注:a: Reaction conditions: **1** (0.15 mmol), **2** (3.0 equiv), I_2 (1.0 equiv), HFIP (2 mL) in air at 120 °C for 12 h in a sealed pressure tube.

图3 *N*-丙炔基吡啶和芳基亚磺酸钠的底物拓展*

2.2 实验底物适用范围的拓展

通过上述我们得到的最佳反应条件,我们对底物的适用范围进行研究。结果如图3所示。用各种芳基亚磺酸钠2与1-(3-苯基丙-2-炔-1-基)-1*H*-吡啶1a化合物进行底物的拓展。发现给电子基芳基亚磺酸钠和4-叔丁基苯亚磺酸钠在该反应中均能顺利进行,得到相应的产物3a,3b和3c,产率分别为71%,63%和58%。各种含有吸电子基团的芳基亚磺酸钠,例如4-F,4-Br和4-CF₃,也可以19%-34%的产率转化为相应的2-磺酰化9*H*-吡咯并[1,2-a]吡啶(3d-f)。2-萘基亚磺酸钠在该磺酰化/环化反应中也是能够进行的,尽管得到目标产物3g收率较低为16%。其次,还研究了连接在底物1碳碳三键上不同取代基R¹对反应的影响。当R¹是给电子基团4-甲基,3-甲基,4-乙基和4-叔丁基时,底物1与2a的反应能够顺利进行得到相应的产物3h-k,产率约为60%。在此条件下,芳环上的卤素原子氟,氯和溴也具有良好的官能团耐受性,以38%-62%的产率得到了预期的产物3l-n。此外,4-CF₃和4-CN作为强吸电子基团可能因为电子效应导致反应性不太好,分别以30%和29%的产率得到相应的产物3o和3p。最后,我们研究了吡啶骨架中苯环上不同位置的各种取代基。令我们高兴的是,在吡啶环上包含3-甲基,7-甲基,6-甲基和5-甲氧基的底物表现良好,以51%-73%的收率获得了目标产物3q-3t。卤素原子(例如6-F和6-Cl)取代的吡啶也能顺利进行该反应,并以中等收率得到所需的产物3u-3v。由此看出,取代基的电子效应对产物的产率具有明显的影响。

2.3 反应机理探讨

为了验证碘促进的*N*-炔丙基吡啶与芳基亚磺酸钠的串联自由基环化反应的机理,在标准反应条件下我们进行了一些加入自由基捕获剂的对照实验(图4)。结果表明,当4.0当量的2,2,6,6-四甲基哌啶氮氧化物(TEMPO)被添加时,没有发现任何目标产物,说明该反应被完全抑制。当添加4.0当量的2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)和1,1-二苯基乙烯时,反应被部分抑制,分别仅获得33%和42%的3a。值得注意的是,

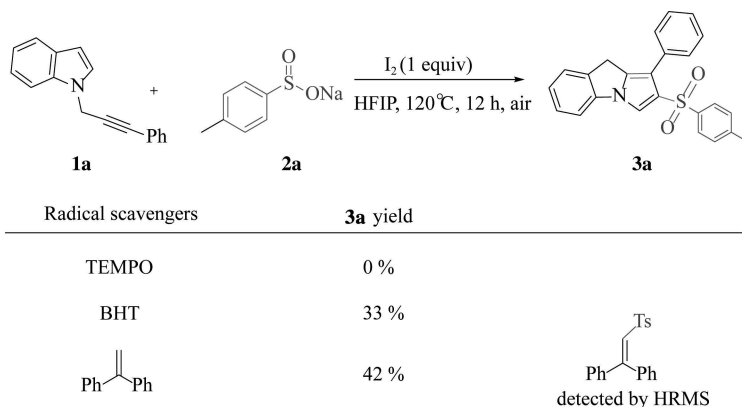


图4 对照实验

当添加1,1-二苯基乙烯时,通过ESI-HRMS分析检测到了1,2-二苯基-2-甲苯基乙烯的捕获产物([M+H]⁺C₂₁H₁₉O₂S,计算值为335.11003,检测值为335.11001)。这些结果表明该转化可能涉及串联自由基过程,并且在反应过程中形成了磺酰基自由基(图4)。

由已报道文献[7]和上述对照实验结果可知,该反应可能为自由基反应(图5)。首先,当对甲基苯亚磺酸钠被I₂氧化时,就会形成对甲基苯磺酰基自由基。然后对甲基苯磺酰基自由基进攻1a的碳碳三键,形成了自由基中间体I。中间体I经过自身分子内环化形成自由基中间体II。然后,自由基中间体II被I₂氧化,发生电子转移形成阳离子中间体III。最后,阳离子中间体III去质子化生成中间体化合物IV,中间体化合物IV将进一步异构化为所需产物3a。

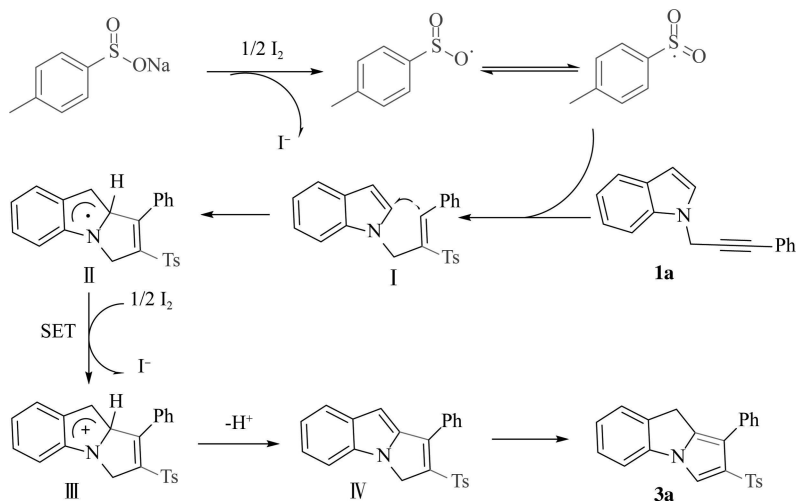


图5 可能的反应机理

3 结论

总之,我们已经开发了一种由*N*-炔丙基吡啶和芳基亚磺酸钠为反应底物,通过串联自由基磺酰化/环

化/异构化反应的方法来合成 2-磺酰化 9*H*-吡咯并[1,2-*a*]吲哚。我们在温和的反应条件下以中等至良好的产率获得了所需的产物。简单的操作,良好的官能团耐受性和容易获得的原料使该方案成为获得 9*H*-吡咯并[1,2-*a*]吲哚的有效合成方法。

参 考 文 献

- [1] LIU J F, JIANG Z Y, WANG R R, et al. A novel alkaloid with an unprecedented skeleton from leaves of *Isatis indigotica*[J]. *Organic Letters*, 2007, 9(21): 4127-4129.
- [2] FERNANDEZ L S, BUCHANAN M S, CARROLL A R, et al. Antimalarial bis-indole alkaloids from *flindersia* species[J]. *Organic Letters*, 2009, 11(2): 329-332.
- [3] TOMASZ M, PALOM Y. The mitomycin bioreductive antitumor agents; Cross-linking and alkylation of DNA as the molecular basis of their activity[J]. *Pharmacology Therapeutics*, 1997, 76(1-3): 73-87.
- [4] KAKADIYA R, DONG H J, LEE P C, et al. Potent antitumor bifunctional DNA alkylating agents, synthesis and biological activities of 3*a*-aza-cyclopenta[*a*]indenes[J]. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 2009, 17(15): 5614-5626.
- [5] 高凡, 吕琪妍, 於兵. 2-甲基芳炔化合物的自由基串联环化反应[J]. *聊城大学学报(自然科学版)*, 2020, 33(6): 66-75.
- [6] CHEN S, ZHANG P B, SHU W Y, et al. Cascade phosphinoylation /cyclization/isomerization process for the synthesis of 2-Phosphinoyl-9*H*-pyrrolo[1,2-*a*]indoles[J]. *Organic Letters*, 2016, 18(21): 5712-5715.
- [7] ZHANG H L, LI W P, ZHU C J. Copper-catalyzed cascade phosphorylation initiated radical cyclization; access to 2-phosphorylated pyrrolo[1,2-*a*]indole[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2017, 82(4): 2199-2204.
- [8] REDDY C R, KAJARE R C, PUNNA N. Silver-catalyzed acylative annulation of *N*-propargylated indoles with α -keto acids; access to acylated pyrrolo[1,2-*a*]indoles[J]. *Chemical Communications*, 2020, 56(23): 3445-3448.
- [9] 黄国保, 李秀英, 罗金荣, 等. 亚磺酸钠参与合成含硫化合物研究进展[J]. *有机化学*, 2019, 39(3): 617-624.
- [10] 李志朋, 李英俊, 李兴, 等. 芳基亚磺酸钠自偶联的研究进展[J]. *化学世界*, 2014, 55(5): 315-320.
- [11] ZHANG P B, SHI S S, GAO X, et al. Photoredox-catalyzed cascade annulation of *N*-propargylindoles with sulfonyl chlorides; access to 2-sulfonated 9*H*-pyrrolo[1,2-*a*]indoles[J]. *Organic Biomolecular Chemistry*, 2019, 17(11): 2873-2876.
- [12] ZHANG P B, GAO Y Z, CHEN S, et al. Direct synthesis of 2-sulfonated 9*H*-pyrrolo[1,2-*a*]indoles via NaI-catalyzed cascade radical addition/cyclization/isomerization[J]. *Organic Chemistry Frontiers*, 2017, 4(7): 1350-1353.
- [13] ZHU J W, SUN S, XIA M F, et al. Copper-catalyzed radical 1,2-cyclization of indoles with arylsulfonyl hydrazides; access to 2-thiolated 3*H*-pyrrolo[1,2-*a*]indoles[J]. *Organic Chemistry Frontiers*, 2017, 4(11): 2153-2155.
- [14] ZHU X Y, LI M, HAN Y P, et al. Copper-catalyzed oxidative cyclization of alkynes with sulfonylhydrazides leading to 2-sulfonated 9*H*-pyrrolo[1,2-*a*]indol-9-ones[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2017, 82(16): 8761-8768.
- [15] ZHU X Y, HAN Y P, LI M, et al. Copper-catalyzed radical sulfonylation of *N*-propargylindoles with concomitant 1,2-aryl migration[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2018, 360(18): 3460-3465.
- [16] XIE X Y, LI P H, WANG L. Synthesis of 2-sulfonated-9*H*-pyrrolo[1,2-*a*]indoles via a Ag-promoted cascade sulfonation and cyclization[J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 2019, 2019(1): 221-227.
- [17] CHEN H J, LIU M L, QIU G S, et al. A three-component reaction of aryldiazonium tetrafluoroborates, sulfur dioxide, and 1-(prop-2-yn-1-yl)indoles under catalyst-free conditions[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2019, 361(1): 146-150.
- [18] LIU Y, WANG Q L, CHEN Z, et al. Visible-light-induced cascade sulfonylation/cyclization of *N*-propargylindoles with aryldiazonium tetrafluoroborates via the insertion of sulfur dioxide[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2019, 17(47): 10020-10029.
- [19] ANSARI M Y, KUMAR N, KUMAR A. Regioselective intermolecular sulfur-oxygen difunctionalization (Phenoxy-sulfonylation) of alkynes; one-pot construction of (*Z*)- β -phenoxy vinylsulfones[J]. *Organic Letters*, 2019, 21(11): 3931-3936.
- [20] ZHU C, YUE H F, MAITY B, et al. A multicomponent synthesis of stereodefined olefins via nickel catalysis and single electron/triplet energy transfer[J]. *Nature Catalysis*, 2019(2): 678-687.
- [21] LIU Z H, YANG L, ZHANG K N, et al. Copper-catalyzed disulfonation of terminal alkynes with sodium arylsulfinate[J]. *Organic Letters*, 2020, 22(5): 2081-2086.

小分子探针 2-叠氮乙酰氨基-1,3,4,6- 四乙酰基葡萄糖的合成

王淳滨^{1,2}, 楚 俏^{1,2}, 刘 康^{1,2}, 郝梦林^{1,2}, 张茹梦³, 马 静³, 王佳佳¹

(1.河南大学 第一附属医院, 抗体药物开发技术国家与地方联合工程实验室 河南, 开封, 475001;

2.河南大学 临床学院 河南, 开封, 475001; 3.河南大学 药学院, 河南, 开封, 475001)

摘 要 实验以氨基葡萄糖盐酸盐为起始原料, 经过一系列反应(共5步)得到目标产物6, 其可作为非天然小分子探针代谢标记 O-GlcNAc 糖基化蛋白。在步骤3的丙酮、浓盐酸、50 °C 条件下分离得到一种具有荧光性能的中间体7, 并通过核磁、质谱等检测方法确定其结构, 同时探讨了其生成机理。

关键词 分子探针; O-GlcNAc; 糖基化; 代谢标记

中图分类号 Q532

文献标识码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Total Synthesis of 1,3,4,6-tetra-acetyl-2- deoxy-2-azide-Glucosamine

WANG Chunbin^{1,2}, CHU Qiao^{1,2}, LIU Kang^{1,2}, HAO Menglin^{1,2},
ZHANG Rumeng³, MA Jing³, WANG Jiajia¹

(1.The First Affiliated Hospital, National Laboratory for Antibody Drug Engineering, Henan University,

Kaifeng 475004, China; 2.School of Clinical Medicine, Henan University, Kaifeng 475004, China;

3.School of Pharmacy, Henan University, Kaifeng 475004, China)

Abstract In this paper, we used the commercially available Glucosamine hydrochloride as starting material, totally five steps, to synthesize target product 6, which can be used as unnatural small molecular probe for metabolically labeling O-GlcNAc modified proteins in mammal cells. In the condition of acetone, concentrated HCl at 50 °C in step 3, we discovered an interesting byproduct 7 with strong fluorescence, the structure of which was further confirmed with NMR and MS, and the plausible mechanism was also explored.

Key words molecular probe; O-GlcNAcylation; glycosylation; metabolic labeling

0 引言

在真核生物中, 翻译产生的蛋白质通常需要被进一步加工修饰, 以满足其结构、活性、功能的需求。据报道, 蛋白质翻译后修饰包括糖基化、乙酰化、磷酸化、甲基化等^[1-5]。其中蛋白质的糖基化修饰在维持细胞正常生理功能以及参与病理变化过程中起着至关重要的作用^[6]。蛋白质的糖基化修饰是将低聚糖与蛋白质上

收稿日期: 2020-11-07

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(21907022); 河南省高等学校重点科研项目计划(20A350001); 河南大学本科教育教学改革研究与实践项目(HDXJG2019-54); 河南省大学生创新创业训练计划项目(S202010475085)资助

通讯作者: 王佳佳, 男, 汉族, 博士, 讲师, 研究方向: 糖化学生物学, E-mail: jwang77@vip.henu.edu.cn.

特殊的氨基酸以共价结合的方式组合到一起,包括 N-连接的糖蛋白,O-连接的糖蛋白等。其中 O 连接的 N-乙酰葡萄糖胺(O-linked β -N-acetyl glucosamine,O-GlcNAc)糖基化是一类特殊的 O-糖基化修饰^[7-10],主要发生在苏氨酸和丝氨酸残基。O-GlcNAc 糖基化在肿瘤^[11,12]、糖尿病^[13,14]等慢性疾病发生时,常常伴随着 O-GlcNAc 糖基化异常激活或沉默,故探究不同疾病中 O-GlcNAc 糖基化水平的变化对进一步明确发病机制具有重要意义。此外,O-GlcNAc 糖基化与磷酸化修饰相似,可在环境因素的刺激下通过酶的调节作用进行糖基化与去糖基化,从而调控复杂的生命活动^[15-17],但与磷酸化修饰不同的是,参与调节糖基化与去糖基化的酶只有 O-GlcNAc 转移酶(O-GlcNAc transferase,OGT)和 O-GlcNAc 水解酶(O-GlcNAcase,OGA)^[18]。氨基己糖生物合成途径可以将葡萄糖转化为 UDP-N-乙酰葡萄糖(UDP-N-acetylglucosamine,UDP-GlcNAc),从而被 OGT 识别并与目的蛋白连接,研究发现经叠氮或者炔基官能团修饰的非天然糖可以经由相应的补救途径转变为 UDP 形式的糖,进而被 OGT 识别并利用^[19-24],随后利用叠氮-炔基环加成反应可以对 O-GlcNAc 糖基化的蛋白定位或者对靶蛋白富集,为 O-GlcNAc 糖基化异常相关疾病的研究提供新的途径。目前已报道多种叠氮或者炔基修饰的非天然小分子探针用于研究 O-GlcNAc 糖基化蛋白种类和位点鉴定(图 1)^[19,21,24]。其中 2-脱氧-N-叠氮乙酰氨基全乙酰化葡萄糖 $Ac_4GlcNAz$ 和相应的半乳糖构型 $Ac_4GalNAz$ 是两种经典探针,其合成方法一般是以氨基葡萄糖或者氨基半乳糖为起始原料,在甲醇、金属钠条件下与氯乙酸酐反应生成 2-脱氧-N-氯乙酰基取代的裸糖中间体,通过叠氮化和全乙酰化得到目标产物。虽然该方法步骤简短,但是反应中所需的金属钠存在一定的安全隐患^[19]。此外,某些课题组将葡萄糖氨基盐酸盐与叠氮乙酸直接偶连,再进行全乙酰化,该方法中所需的叠氮乙酸价格较高^[25]。因此,开发安全、高效、经济的方法用于合成该类探针,对推动 O-GlcNAc 相关领域的科学研究具有重要的意义。

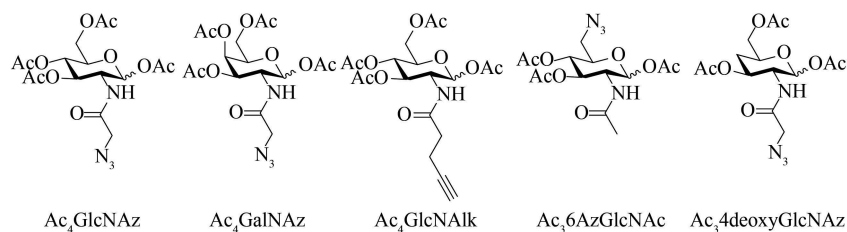


图 1 已报道的 O-GlcNAc 糖基化小分子探针

本文以氨基葡萄糖盐酸盐为起始原料,经过一系列反应得到小分子探针6,总收率 44%,经 Western blot 检测发现6 具有高效的糖基化标记效率,为后续 O-GlcNAc 糖基化等相关研究提供基础。此外,在步骤 3 中化合物4 在丙酮、浓盐酸、50 °C 的条件下得到中间体7,该中间体在 365 nm 下具有很强的吸收,本文通过核磁质谱等方法进一步确定其结构,结果表明中间体7 是一种与查耳酮以及姜黄素结构类似的化合物,在抗癌和抗氧化活性方面具有重要的生物学意义^[26-28]。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

葡萄糖氨基盐酸盐购买自北京凯森莱科技有限公司;茴香醛,氯乙酰氯购买于百灵威试剂有限公司;核磁检测采用 Bruker 300 M 和 400 M 核磁共振,LC-MS 分析仪器采用 Waters 3100。

1.2 实验方法

1.2.1 化合物3 的合成。将化合物1(10 g,46 mmol)溶解在 10.2 mL 的 5 mol/L 氢氧化钠溶液中,在冰浴条件下搅拌,随后加入茴香醛(5.64 mL,46 mmol,1 eq),待反应凝成固体在 4 °C 保存过夜。次日将混合物用水,乙醇,石油醚:乙酸乙酯 10:1 冲洗抽滤,干燥,得到化合物 12.6 g 2,产率 88%,不需纯化,直接用于下一步合成;取部分化合物2(3.97 g,13.8 mmol)溶解在 20 mL 的吡啶溶液中,在冰浴条件下搅拌,随后逐滴加入乙酸酐(7.84 mL,83 mmol,6 eq),在冰浴条件下逐渐恢复室温,搅拌过夜。次日用二氯甲烷与稀盐酸萃取,干燥,得到化合物3(5.8 g),产率 91%。¹H NMR (400 MHz,CDCl₃) δ 8.21 (s,1H),7.67 (d, J = 8.4 Hz,1H),6.92 (d, J = 8.4 Hz,1H),5.94 (d, J = 8.0 Hz,1H),5.46 (d, J = 3.2 Hz,1H),5.26 (dd, J = 10.4,3.0 Hz,1H),4.27-4.07 (m,3H),3.84 (s,3H),3.68-3.53 (m,1H),2.17 (s,3H),2.06 (s,3H),2.03 (s,3H),1.89 (s,3H); ¹³C NMR (100 MHz,CDCl₃) δ 170.40,170.09,169.63,168.69,164.47,162.32,130.27,114.07,

93.52, 71.78, 71.56, 68.76, 65.98, 61.33, 55.42, 20.77, 20.68, 20.51. HRMS (ESI): m/z $[M+NH_4]^+$ calculated for $C_{22}H_{27}NO_{10}$: 465.1635, found: 465.1637.

1.2.2 化合物4和7的合成。将化合物3(5 g, 10.7 mmol)溶解在适量的丙酮中,放上冷凝管,升高温度至 50 °C,搅拌 10 min,迅速加入 2.5 mL 浓盐酸,立即生成大量固体,待其冷却至室温,加入适量的乙醚,出现颗粒状悬浮,用纸盖住烧杯口,放入冰水等待 2-3 h。加入石油醚:乙酸乙酯 10:1 冲洗抽滤,干燥,得到化合物4(3.5 g),产率 85%,直接用于下一步的合成;中间体7的核磁数据: 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.72 (d, J = 15.6 Hz, 2H), 7.62 (d, J = 8.7 Hz, 4H), 7.03-6.96 (m, 6H), 3.89 (s, 6H); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 188.90, 161.59, 142.71, 130.11, 127.68, 123.54, 114.45, 55.44.

1.2.3 化合物5的合成。将化合物4(3 g, 7.8 mmol)在真空条件下溶解在 20 mL 二氯甲烷中,插上气球,随后加入 5 mL 吡啶,将反应处于冰浴条件下,持续搅拌,随后逐滴加入氯乙酰氯(1.22 mL, 15 mmol, 2 eq),过夜,加入适量的甲醇淬灭反应,搅拌 10 min,浓缩后用稀盐酸与二氯甲烷萃取,干燥,得到化合物5(3.3 g),产率 89%。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.42 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.19 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 5.31-5.17 (m, 2H), 4.46-4.40 (m, 1H), 4.25 (dd, J = 12.4, 4.0 Hz, 1H), 4.07-3.90 (m, 2H), 3.92 (s, 2H), 2.19 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.03 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 170.47, 170.16, 169.37, 166.73, 92.46, 71.85, 69.85, 66.37, 61.28, 50.36, 42.44, 20.89, 20.69, 20.62. HRMS (ESI): m/z $[M+NH_4]^+$ calculated for $C_{16}H_{22}ClNO_{10}$: 423.0932, found: 423.0935.

1.2.4 化合物6的合成。将化合物5(1.8 g, 4.2 mmol)与 NaN_3 (0.54 g, 8 mmol, 2 eq)混合,加入 10 mL DMF 溶解,搅拌,升温至 70 °C,反应过夜。次日,旋蒸将 DMF 旋出,经硅胶层析柱分离纯化(石油醚:乙酸乙酯=3:1),得到 1.3 g 目标化合物6,产率 72%。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.42 (d, J = 8.8 Hz), 6.19 (d, J = 3.6 Hz), 5.31-5.17 (m, 2H), 4.46-4.40 (m, 1H), 4.25 (dd, J = 12.4, 4.0 Hz, 1H), 4.07-3.90 (m, 2H), 3.92 (s, 2H), 2.19 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.03 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 171.51, 170.64, 169.13, 168.65, 166.87, 90.26, 70.34, 69.81, 67.43, 61.49, 52.43, 51.24, 20.66. HRMS (ESI): m/z $[M+NH_4]^+$ calculated for $C_{16}H_{22}N_4O_{10}$: 448.1680, found: 448.1677.

1.2.5 细胞的培养和代谢标记。将 HEK293T 细胞培养在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,在温度为 37 °C 和 5.0% 二氧化碳的培养箱中。待细胞长至 80%-85% 密度,向细胞中加入终浓度为 200 μ mol/L $Ac_4GlcNAz$ 或相应体积的 DMSO 作为对照,于培养箱中继续培养 24 h。

1.2.6 Western blot 检测探针6标记效率。将细胞转移至 1.5 mL 离心管,500 r/min 离心 5 min,去除培养基后,用无菌 PBS 清洗两遍;在每个小皿中加入 200 μ L 细胞裂解液(1 \times lysis buffer、PMSF, 25 倍蛋白酶抑制剂、10 倍磷酸酶抑制剂),于 4 °C 层析柜中,裂解 30 min;裂解结束后,12000 r/min、4 °C 离心 10 min;离心结束后,将含有蛋白的上清液取出到新的 EP 管中并进行 BCA 蛋白定量;取 200 μ g 体积蛋白,另取一支 1.5 mL 离心管依次加入 170 μ L 裂解液,0.2 μ L 100 mmol/L $CuSO_4$ (终浓度 100 μ mol/L), 0.4 μ L 100 mmol/L THPTA ($CuSO_4$:THPTA=1:2, 摩尔数比), 0.2 μ L 100 mmol/L Biotin-PEG-Alkyne (终浓度 100 μ mol/L), 室温反应 2 h,在蛋白样品中加入 1 mL 冰甲醇,于 -80 °C 静止 2 h,取出后于 10000 g, 4 °C 离心 10 min;加入 500 μ L 冰甲醇,吹洗蛋白,再次离心,弃掉上清液,蛋白于室温晾干 15 min;每管加入 80 μ L 4% SDS buffer (4% SDS, 150 mmol/L, 50 mmol/L TEA pH7.4),另加 20 μ L 5 \times loading buffer,煮沸 10 min;配胶,每孔上样 30 μ L 蛋白,进行电泳分析;电泳结束后,以 280 mA、180 min 进行转膜(NC膜, GE公司);将转好的膜在 TBST 配置的 5% 脱脂牛奶中在室温下进行封闭;孵育 HRP-Streptavidin (1:10000 稀释), 1 h 后, PBST 清洗 3 \times 10 min;)对清洗过后的膜加入化学发光液爆片分析。

2 结果与讨论

本课题以商品化的葡萄糖糖氨基盐酸盐为起始原料,在 5 M 氢氧化钠作用下与对甲氧基苯甲醛作用生成亚胺结构,对葡萄糖的二位氨基进行临时保护;随后在吡啶和醋酸酐的作用下进行全乙酰化保护得到中间体 3;接着在滴加少量浓盐酸的热丙酮溶液中脱除二位保护基,静置冷却至室温,加入乙醚混匀并抽滤,得到关键中间体4;最后在吡啶溶液中与氯乙酰氯反应在二位引入氯乙酰基,并发生叠氮化,最终顺利得到目标产物 2-叠氮乙酰氨基-1,3,4,6-四乙酰基葡萄糖6(图 2),并通过核磁、验证其结构确实为理想产物。我们将

200 $\mu\text{mol/L}$ 探针6 与 Hek293T 细胞孵育 24 h, 设置空白对照组, 收集细胞并裂解提取蛋白, 通过与 Biotin-PEG₄-Alkyne 发生 click 反应, 最终经由 western blot 检测发现我们合成的探针6 与对照组相比具有很高的标记效率(图 3), 与之前报道的文献一致^[19]。

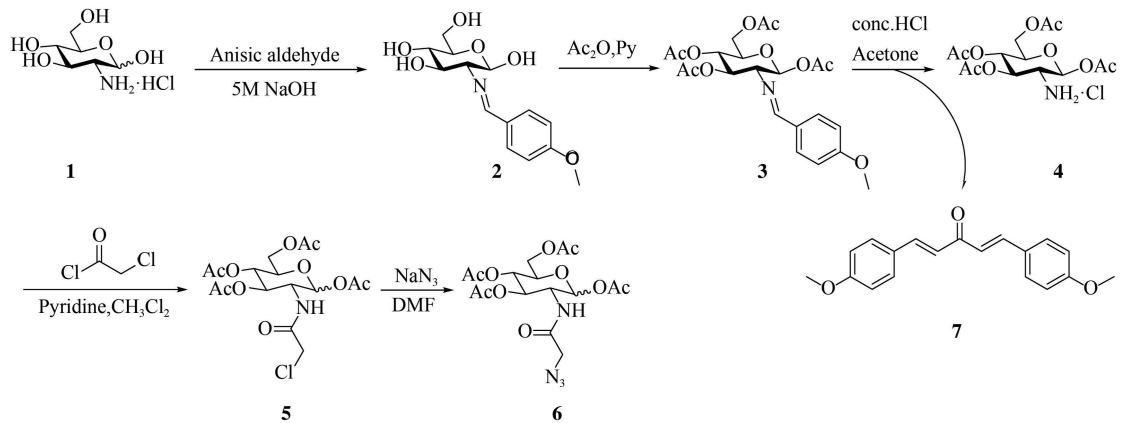


图 2 糖代谢分子探针6 的合成路线

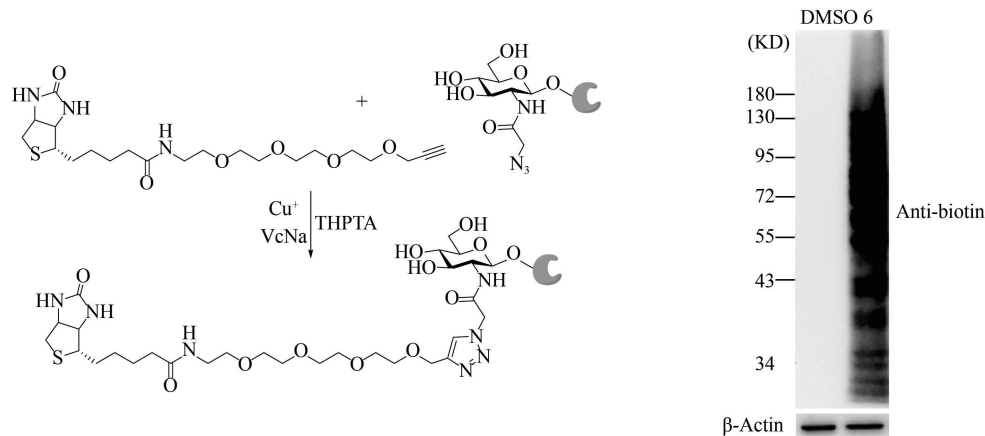


图 3 化合物6 在 293T 细胞进行糖基化标记的机制和结果

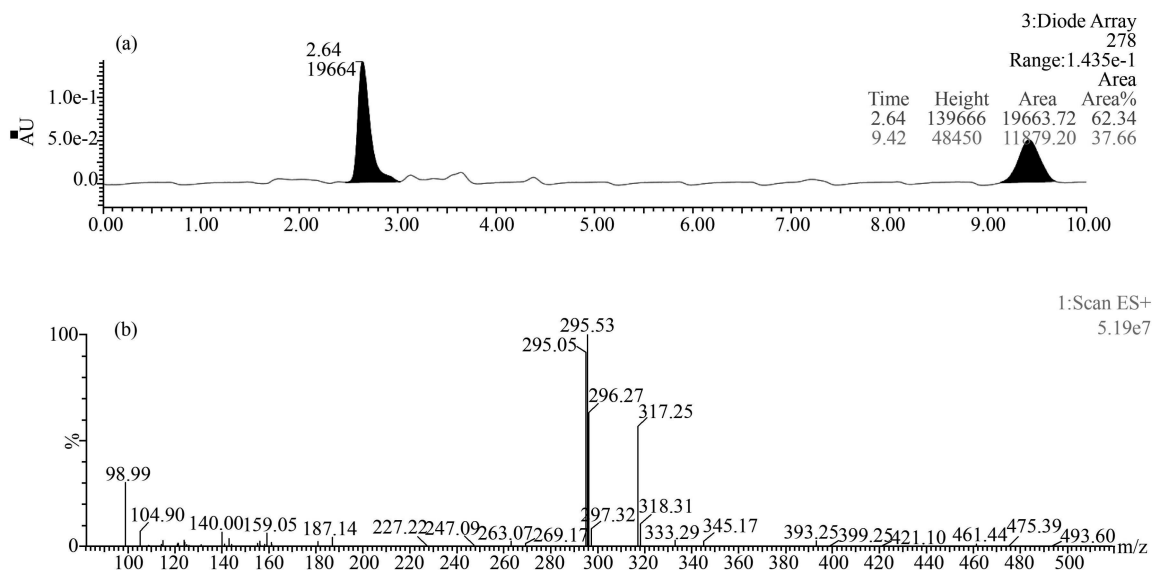


图 4 通过 LC-MS 分析化合物7 的结构

此外, 在合成目标化合物6 的过程中, 我们发现步骤3 即浓盐酸和 50 $^{\circ}\text{C}$ 丙酮的条件下, 生成了一种在 365 nm 紫外灯照射下具有强烈吸收, 且极性偏小的副产物, 具备一般荧光探针的特性。为探究其具体结构, 首先我们将反应液混合物进行液质联用分析, 结果如图 4 所示, 液相中保留时间为 2.64 与 9.42 min 位置呈现两组峰(图 4(a)), 根据化合物的极性分析, 保留时间 9.42 min 为我们重点研究的荧光化合物, 其对应的质

谱图发现对应的分子离子峰的分子量为 295.5 m/z (图 4(b)),与理论计算值 295.3 相符;为进一步确定中间产物 7 的结构,我们将其经柱层析纯化,通过核磁氢谱和质谱确定其结构如图 2 所示,为一种具有对称结构的 α,β 不饱和酮,是一种与查耳酮以及姜黄素结构类似的化合物。

根据中间体 7 的结构,本文推测了其生成的可能机理(图 5)。首先,在酸性条件下丙酮的羰基氧被质子化,通过异构共振形成具有亲核性能的碳负离子中间体 d;其次,从糖环上脱下来的保护基对甲氧基苯甲醛在酸性条件下被质子化,与 d 发生亲核加成生成 β -羟基酮 f,中间体 f 在加热条件下失去一分子水,生成 α,β -不饱和醛 h;随后, h 再次或者同时发生类似的过程即可得到中间体 7。

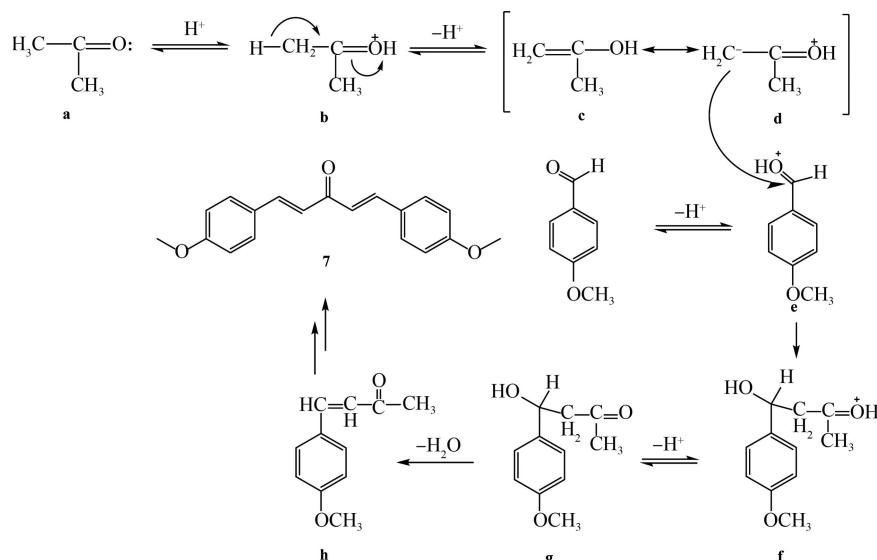


图 5 中间体 7 生成的可能机理

为进一步分析中间体 7 的荧光性能,我们首先对中间体 7 进行了全波长扫描,结果发现其最大吸收波长为 362 nm(图 6(a)),与姜黄素的吸收波长为 425 nm 相比较短,其原因是 7 结构中苯环上的甲氧基的供电效应不如羟基高,致使吸收波长的差异。随后,我们配制了化合物 7 的系列浓度梯度,并在 362 nm 下检测吸收与浓度的依赖性(图 6(b)),结果表明,在固定波长下,中间体 7 展现了良好的浓度依赖性。

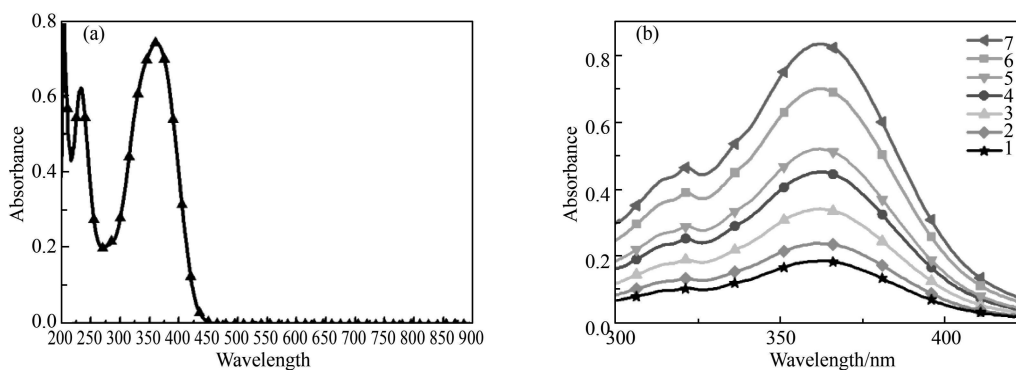


图 6 中间体 7 的全波长扫描及浓度与波长的关系

3 结论

本文以氨基葡萄糖盐酸盐为原料,通过 5 步反应得到目标产物 6,通过 western blot 实验表明化合物 6 可以高效标记 *O*-GlcNAc 糖基化蛋白。因化合物 6 结构中含有叠氮官能团,可利用叠氮-炔基环加成反应进行荧光标记和目标蛋白富集,对 *O*-GlcNAc 糖基化蛋白质的标记及其相关研究有重要的细胞生物学意义。此外,实验中还发现了一种有趣的中间体 7,并通过 NMR 和 HRMS 等确定其结构,结果表明中间体 7 是一种与姜黄素结构类似的化合物,具有较强的荧光性能。因此,我们推测中间体 7 将来可用于开发一种高效、低毒的新型光敏剂,其次可能在诱导细胞凋亡、活血止痛具有重要的生物学意义^[25-27]。

参 考 文 献

- [1] CATTANEO A, CHIRICHELLA M. Targeting the post-translational proteome with intrabodies[J]. *Trends Biotechnol*, 2019, 37(6): 578-591.
- [2] TORRES M P, DEWHURST H, SUNDARARAMAN N. Proteome-wide structural analysis of PTM hotspots reveals regulatory elements predicted to impact biological function and disease[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2016, 15(11): 3513-3528.
- [3] HEATH J M, SUN Y, YUAN K, et al. Activation of AKT by O-linked N-acetylglucosamine induces vascular calcification in diabetes mellitus[J]. *Circulation Research*, 2014, 114(7): 1094-1102.
- [4] PENG C, ZHU Y, ZHANG W, et al. Regulation of the hippo-YAP Pathway by glucose sensor O-GlcNAcylation[J]. *Molecular Cell*, 2017, 68(3): 591-604.
- [5] YANG W H, KIM J E, NAM H W, et al. Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability[J]. *Nature Cell Biology*, 2006, 8(10): 1074-1083.
- [6] MOREMEN K W, TIEMEYER M, NAIRN A V. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2012, 13(7): 448-462.
- [7] 施杰. 蛋白质 O-GlcNAc 糖基化的探针[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2020, 6: 609-616.
- [8] 邓瑞萍, 郭书娟, 陶生策. O-GlcNAc 糖基化功能研究最新进展[J]. *生命科学*, 2013, 05: 495-503.
- [9] 李楠, 李忻琳, 韦立红, 林忠. 蛋白质 O-GlcNAc 糖基化修饰的生物合成途径与检测方法[J]. *中华妇幼临床医学杂志(电子版)*, 2018, 06: 736-739.
- [10] 张炜琳, 王鑫怡, 严方. 蛋白质 O-GlcNAc 修饰与肿瘤糖代谢关系的研究进展[J]. *中国药科大学学报*, 2019, 50: 127-134.
- [11] CHAIYAWAT P, NETSIRISAWAN P, SVASTI J, et al. Aberrant O-GlcNAcylated proteins: new perspectives in breast and colorectal cancer[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2014, 5(2): 193.
- [12] MIR A M, BOUREME D, BUZY A, et al. O-GlcNAcylation stabilizes β -catenin through direct competition with phosphorylation at threonine 41[J]. *Faseb Journal Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2014, 28(8): 3325-3338.
- [13] BANERJEE P S, MA J, HART G W. Diabetes-associated dysregulation of O-GlcNAcylation in rat cardiac mitochondria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(19): 6050-6055.
- [14] VAIDYANATHAN K, WELLS L. Multiple tissue-specific roles for the O-GlcNAc post-translational modification in the induction of and complications arising from type II diabetes[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(50): 34466-34471.
- [15] HART G W, HOUSLEY M P, SLAWSON C. Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins[J]. *Nature*, 2007, 446(7139): 1017-1022.
- [16] BANERJEE P S, LAGERLF O, and Hart G W. Roles of O-GlcNAc in chronic diseases of aging[J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2016, 51: 1-15.
- [17] HANOVER J A, CHEN W, BOND M R. O-GlcNAc in cancer: an oncometabolism-fueled vicious cycle[J]. *Journal of Bioenergetics*, 2018, 50(3): 155-173.
- [18] BRAIDMAN I, CARROLL M, DANCE N, et al. Characterisation of human N-acetyl-beta-hexosaminidase C. [J]. *Febs Letters*, 1974, 41(2): 181-184.
- [19] VOCADLO D J, HANG H C, KIM E J, et al. A chemical approach for identifying O-GlcNAc-modified proteins in cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(16): 9116-9121.
- [20] 韩小见, 温银行, 郑路, 等. 代谢标记小分子探针 6-炔基-2 乙酰氨基半乳糖的合成[J]. *化学研究与应用*, 2020, 32: 442-446.
- [21] DARABEDIAN N, GAO J, CHUH K N, et al. The metabolic chemical reporter 6-Azido-6-deoxy-glucose further reveals the substrate promiscuity of O-GlcNAc transferase and catalyzes the discovery of intracellular protein modification by O-Glucose[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(23): 7092-7100.
- [22] GUO J, ZHANG G, MA J, et al. Detection and identification of O-GlcNAc-modified proteins using 6-azido-6-deoxy-N-acetyl-galactosamine [J]. *Organic & biomolecular chemistry*, 2019, 17(17): 4325-4334.
- [23] HAO Y, FAN X, SHI Y, et al. Next-generation unnatural monosaccharides reveal that ESRRB O-GlcNAcylation regulates pluripotency of mouse embryonic stem cells[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 4065.
- [24] LI J, WANG J, WEN L, et al. An OGA-resistant probe allows specific visualization and accurate identification of O-GlcNAc-modified proteins in cells[J]. *Acs Chemical Biology*, 2016, 11: 3002-3006.
- [25] TOMASZEWSKA J, KOWALSKA K, KORONIAK S K. Glucosamine- and galactosamine-based monosaccharides with highly fluorinated motifs[J]. *Journal of Fluorine Chemistry*, 2016, 191: 1-13.
- [26] MAGINI A, POLCHI A, DI M D, et al. Curcumin analogue C1 promotes hex and gal recruitment to the plasma membrane via mTORC1-independent TFEB activation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(6): 1363.
- [27] HAI X, GE L, et al. Inhibitory effect of curcumin analogs on tissue factor procoagulant activity and their preliminary structure-activity relationships[J]. *Medicinal chemistry research: an international journal for rapid communications on design and mechanisms of action of biologically active agents*, 2013, 22(7): 3242-3246.
- [28] ANTO R J, SUKUMARAN K, KUTTAN G, et al. Anticancer and antioxidant activity of synthetic chalcones and related compounds[J]. *Cancer Letters*, 1995, 97(1): 33-37.

天然抗氧化剂及协同作用研究进展

刘贺¹,朱奕昊¹,刘亭亭²,任永芳²,王正平^{2,3},刘敏^{1,2}

(1.聊城大学 化学化工学院,山东 聊城 252059;2.聊城大学 生物制药研究院,山东 聊城 252059;

3.聊城高新生物技术有限公司,山东 聊城 252059)

摘要 随着人们生活水平的不断提高,低毒、高效的天然抗氧化剂成为当下研究热点。多酚类、维生素类和多糖类化合物因具有较强的抗氧化活性而备受研究者关注。天然抗氧化剂与蛋白的结合可能会对其抗氧化活性产生影响。浓度是影响不同天然活性成分间抗氧化协同性的重要因素,抗氧化能力会随着活性成分浓度的增加而逐渐增强,但协同性不一定增强。此外,相同抗氧化剂的复配溶液在不同抗氧化模型中的协同性存在一定差异。响应曲面法可以为最大协同性配比的筛选提供实验方案。综述了天然抗氧化活性成分、蛋白对抗氧化性的影响、一些天然抗氧化剂之间的协同作用以及协同性的优化方法,以期为开发并优化具有协同作用的天然抗氧化剂提供思路。

关键词 天然抗氧化剂;协同作用;蛋白;响应曲面法

中图分类号 TS202.3

文献标识码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Research Progress on Natural Antioxidants and Their Synergistic Effect

LIU He¹, ZHU Yihao¹, LIU Tingting², REN Yongfang²,
WANG Zhengping^{2,3}, LIU Min^{1,2}

(1.School of Chemistry and Chemical Engineering, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China;

2.Institute of BioPharmaceutical Research, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China;

3.Liaocheng High-Tech Biotechnology Co., Ltd., Liaocheng 252059, China)

Abstract With the continuous improvement of people's living standards, natural antioxidants with low toxicity and high efficacy have become a research hotspot. Polyphenols, vitamins and polysaccharide compounds have attracted much attention from researchers because of their strong antioxidant activity. The binding of natural antioxidants to proteins may affect their antioxidant activity. Concentration is an important factor affecting the antioxidant synergy between different natural active ingredients. The antioxidant ability of active ingredients will gradually increase with their increasing concentration, but their synergy may not necessarily increase. In addition, the synergy between the same antioxidants in the mixed solution is different in different antioxidant models. Response surface methodology (RSM) can provide experimental

收稿日期:2020-12-06

基金项目:国家自然科学基金项目(22073039)资助

通讯作者:刘敏,女,汉族,博士,教授,硕士生导师,研究方向:物理药学及天然活性成分包封, E-mail: panpanliumin@163.com。

schemes for the screening of the ratios with the maximum synergy. In this paper, the natural antioxidant active ingredients, the influence of proteins on antioxidant activity, the synergistic effects of some natural antioxidants and the optimization methods for synergy were summarized. This will provide ideas for the development and optimization of synergistic natural antioxidants.

Key words natural antioxidants; synergistic effect; proteins; response surface methodology

0 引言

从天然产物中提取出来的活性成分是我国医药宝库的重要组成部分,很多活性成分具有抗氧化作用。与合成的抗氧化剂相比,这些天然抗氧化物质具有毒性小、活性强等优点^[1]。近年来,对天然抗氧化剂的研究越来越广泛而深入。当两种或多种抗氧化活性成分共同使用时,若其抗氧化作用优于同浓度下两种或多种单一成分的抗氧化作用之和,表明这些活性成分之间存在协同抗氧化作用^[2]。具有协同性的活性成分共同使用时不仅会提高疗效,还可以降低成本^[1]。

由于正常的生理代谢过程产生的自由基一般不会对人体造成伤害,但是过量的自由基会引发各种疾病,加速人体衰老^[3]。一些慢性疾病如糖尿病和高血压,主要是因为体内氧化和抗氧化体系的失衡所引起的^[4],所以需要补充抗氧化剂清除体内过量的自由基以恢复体内平衡。抗氧化剂尤其是具有协同性的天然抗氧化剂对清除自由基具有显著效果。抗氧化剂在使用过程中会不可避免地会与食品蛋白或人体蛋白结合,这就可能对抗氧化剂的活性产生影响。本文主要对天然抗氧化活性成分、蛋白对抗氧化性的影响、一些天然抗氧化剂的协同作用以及协同作用的优化进行了综述。

1 天然抗氧化活性成分

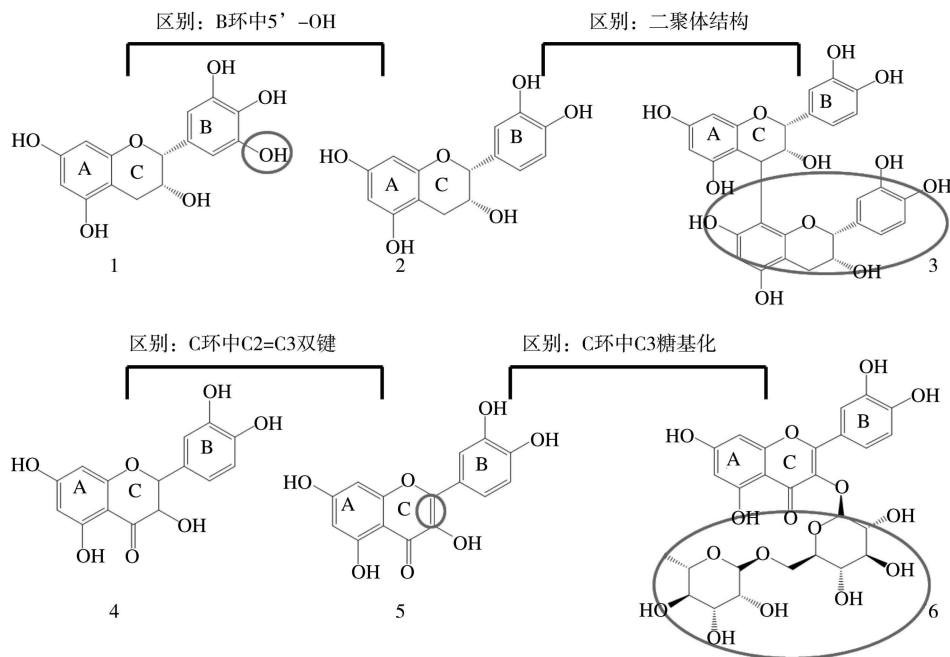
合成的抗氧化剂如二丁基羟基甲苯(BHT)、叔丁基对苯二酚(TBHQ)等对人体有一定的毒性,所以植物中存在的安全、低毒、廉价、高效的天然抗氧化活性成分受到人们的广泛关注。目前研究较多的天然抗氧化活性成分主要有多酚类、维生素类、多糖类等化合物,其中多酚类化合物根据其结构的不同又可划分为黄酮类、芪类、酚酸类等化合物^[5]。

天然多酚类化合物种类繁多,在植物界分布广泛并且来源丰富,其共同特点是因含有多个酚羟基而具有良好的抗氧化活性。因此他们的抗氧化能力一直是天然植物化学、天然药物和食品应用研究的重点。这些物质可以减轻活细胞和组织中蛋白质、脂类和碳水化合物的氧化损伤,从而降低某些慢性疾病的发病风险^[6]。多酚类化合物的抗氧化机理主要包括以下几个方面:通过单电子转移和氢原子转移直接清除自由基;与过渡金属离子络合;抑制与氧化相关的酶如脂肪氧合酶和黄嘌呤氧化酶的活性;提高抗氧化酶如超氧化物歧化酶、过氧化物酶的活性^[7-9]。本课题组^[10]利用维生素C(VC)做阳性对照比较了白皮杉醇和氧化白藜芦醇的抗氧化活性,这两种多酚类物质的抗氧化活性明显强于VC。B环中的羟基位置对抗氧化活性有显著的影响,如白皮杉醇B环中位于邻位的两个酚羟基容易形成分子内氢键,这一结构特性赋予了白皮杉醇较强的抗氧化活性。羟基数、位置以及是否含有双键对抗氧化剂的活性具有一定的影响。Zeng等人^[11]比较了六种结构相似天然抗氧化剂(图1)的抗氧化活性,活性顺序为:原花青素B2活性大于表儿茶素活性,表没食子儿茶素活性大于表儿茶素活性,槲皮素活性大于黄旗松素活性,槲皮素活性大于芦丁活性。比较他们结构的差异,B环中5'-OH、C环中C2=C3双键以及二聚体结构提高了活性物质的抗氧化活性,C环中C3糖基化使活性物质的抗氧化性降低。尽管多酚类化合物具有良好的抗氧化活性,但特殊的分子结构导致其稳定性和溶解性较差,降低了其在体内的吸收效率^[7]。

维生素是人体必需的营养物质,VC和维生素E(VE)分别是水溶性和脂溶性抗氧化剂。VC可以减少和中和自由基,如过氧化氢。VE可以通过与脂质过氧化链反应中产生的脂质自由基反应来保护膜不被氧

化^[12]。番茄红素是维生素类化合物中有效的抗氧化剂,能使活性氧失活,它去除单线态氧的能力是 VE 的 10 倍^[13]。补充适量的维生素可以在体内发挥较好的抗氧化作用,但是摄入过多会引起中毒,增加机体的氧化损伤。

多糖类化合物能够影响与自由基相关酶的活性从而表现出一定的抗氧化活性,并且能够通过调节免疫系统来防止衰老^[14]。罗敏等人^[15]通过体内外抗氧化实验研究米胚多糖的抗氧化能力,体外抗氧化实验表明米胚多糖具有一定的清除自由基的能力,并且清除自由基能力具有浓度依赖性,体外实验表明米胚多糖可以提高小鼠血清及组织中抗氧化酶活性。王晓敏等人^[16]采用 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基、羟基自由基和超氧阴离子自由基清除实验表明山药多糖的抗氧化活性显著高于 VC,具有较好的体外抗氧化活性。多糖类化合物提取简单、来源丰富、种类繁多,但是其分子量大、提取纯度低、结构复杂,其抗氧化作用与哪些结构有关还需深入研究^[17]。



注:1:表没食子儿茶素; 2:表儿茶素; 3:原花青素 B2; 4:黄旗松素; 5:槲皮素; 6:芦丁。

图 1 6 种结构相似的天然抗氧化活性物质

2 蛋白对抗氧化活性的影响

天然抗氧化剂在食品和制药领域应用广泛,在使用过程中不可避免地与食品蛋白或人体蛋白发生相互作用。蛋白与抗氧化剂的相互作用可能会降低或升高抗氧化剂的抗氧化活性^[18]。本课题组的研究^[10]发现,氧化白藜芦醇和白皮杉醇与溶菌酶或胰蛋白酶的结合导致这两种活性物质的抗氧化活性降低。这是因为两种酶与活性物质的结合遮蔽了具有自由基清除能力的羟基,从而削弱了抗氧化剂的供氢能力,这也说明溶菌酶和胰蛋白酶可以保护活性物质不被氧化。此外,溶菌酶对这两种活性成分抗氧化活性的影响程度大于胰蛋白酶,这是因为两种酶与活性物质的相互作用强度不同。在 Zhang 等人^[19]的研究中发现,在 DPPH 模型中人血清白蛋白与酚酸类抗氧化剂的结合提高了自由基清除能力。人血清白蛋白中的巯基占血清中游离巯基的 80%,其本身具有一定的抗氧化活性,所以人血清白蛋白与抗氧化剂结合后总抗氧化能力提升。赵焕烽等人^[20]研究了 β -乳球蛋白对黑米花色苷抗氧化性的影响。黑米花色苷、 β -乳球蛋白和 β -乳球蛋白-黑米花色苷的自由基清除率分别为 72.56%、36.66% 和 85.72%,虽然总抗氧化能力提升,但是 β -乳球蛋白-黑米花色苷复合物较黑米花色苷的自由基清除率增加值小于 β -乳球蛋白的自由基清除率。所以 β -乳球蛋白还是由于与黑米花色苷结合形成的氢键造成了羟基遮蔽,使黑米花色苷的抗氧化活性降低。总之,蛋白与活性物质的相互作用以及蛋白自身的抗氧化性是影响抗氧化能力的主要因素。若蛋白与抗氧化剂结合作用强,

则可能由于对羟基的强掩蔽而使抗氧化剂的抗氧化能力降低。反之,结合作用弱则可能会由于蛋白具有一定的抗氧化能力,从而提高了总抗氧化能力。表1中列举了一些其他蛋白对抗氧化活性的影响。

表1 不同蛋白对抗氧化活性的影响

蛋白	活性物质	抗氧化活性变化	抗氧化模型	文献
牛血清白蛋白	白藜芦醇	降低	ABTS	[21]
α -乳白蛋白	白藜芦醇	升高	ABTS	[21]
牛血清白蛋白	花青素	降低	ABTS/DPPH	[22]
乳蛋白	绿原酸	降低	DPPH	[23]
胰蛋白酶	槲皮素	降低	DPPH	[24]

注:ABTS:2,2-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸。

3 天然抗氧化剂之间的协同作用

不同活性物质之间相互作用会产生协同、拮抗和加和作用^[25,26]。抗氧化活性物质之间产生协同作用主要是因为:(1)生成了抗氧化活性更高的抗氧化剂;(2)抗氧化剂的整合效应;(3)不同溶解度的抗氧化剂的相互作用;(4)不同作用机制的抗氧化剂的相互作用^[27]。评价协同作用的参数有协同系数(SE)和联合指数(CI),计算公式如^[28,29]

$$\rho_{\text{ESC}}(\%) = 100 - \frac{(A_1 - A_0)}{A} \times 100, \quad (1)$$

$$\rho_{\text{TSC}}(\%) = (\rho_{\text{ESC1}} + \dots + \rho_{\text{ESCn}}) - \frac{\rho_{\text{ESC1}} \times \dots \times \rho_{\text{ESCn}}}{10^{2(n-1)}}, \quad (2)$$

$$SE = \frac{\rho_{\text{ESC}}}{\rho_{\text{TSC}}}, \quad (3)$$

其中 ρ_{ESC} 为实验清除率, A_1 为加入抗氧化剂的自由基溶液吸光度, A_0 为相同浓度抗氧化剂的吸光度, A 为不加抗氧化剂的自由基溶液吸光度, ρ_{TSC} 为理论清除率

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2}, \quad (4)$$

其中 $(D)_1$ 、 $(D)_2$ 分别为混合溶液清除率为 $x\%$ 中两种抗氧化剂的浓度; $(D_x)_1$ 、 $(D_x)_2$ 分别为两种抗氧化剂单独作用时清除率为 $x\%$ 时的浓度。当协同系数大于1或联合指数小于1时表现为协同作用。

3.1 天然多酚类化合物与其他抗氧化剂的协同作用

多酚类化合物因其对人体健康大有裨益而受到科学界的广泛关注,这类化合物含有多个酚羟基使其成为供氢体,可提供与自由基配对的电子。多酚类化合物抗氧化活性强,能与其他抗氧化剂一起在体内发挥抗氧化作用,有效清除体内的自由基^[30]。

绿原酸和芦丁在DPPH自由基、超氧自由基和脂质过氧化体系中均具有良好的协同抗氧化性^[31]。在DPPH模型中,芦丁和绿原酸的浓度分别为7.5、14 $\mu\text{mol/L}$ 时协同系数最大,协同系数达1.35。并且,混合浓度增大后,协同系数有减小的趋势。这说明混合浓度升高会使清除能力增强,但是不代表协同性会随浓度的升高而增强。绿原酸的协同性不仅与浓度配比有关,还与两者的抗氧化活性差异有关。当抗氧化活性差别较大时,抗氧化性强的抗氧化剂所占比例越大,协同性越好^[32]。

Mao等人^[33]研究发现桂花和绿茶在DPPH模型中存在协同抗氧化性。桂花和绿茶是对人体健康有益的两种天然作物,这两种植物之间的协同性在于各种抗氧化活性成分的协同性累积,其中绿茶中的没食子酸与桂花中的毛蕊花糖苷之间的协同性为这两种植物的协同性贡献最大。

相同比例的抗氧化剂在不同的抗氧化模型中由于作用机理不同会产生不同的协同效果。Skroza等人^[34]研究了白藜芦醇与儿茶素、没食子酸、咖啡酸之间的协同性。儿茶素与白藜芦醇之间的协同性用多种实验方法均被证实。在铁离子还原(FRAP)模型中,白藜芦醇与儿茶素或咖啡酸之间存在协同性,并且咖啡

酸与白藜芦醇的协同性大于儿茶素与白藜芦醇这一组合。在 DPPH 模型中,只发现了白藜芦醇与儿茶素之间存在协同性,而咖啡酸与白藜芦醇之间存在着拮抗性。

Ciosek 等人^[35]研究了黄酮类化合物与生育三烯酚在脂质体系中的相互作用。氧化作用主要发生在脂质相中,通过再引发机制,位于油水界面的黄酮类化合物与生育三烯酚相互作用,产生协同作用。并且,当抗氧化活性强的抗氧化剂位于形成自由基的相中,而活性较低的抗氧化剂存在于界面时,会产生最大的协同效应。Bo 等人^[36]对草本植物与天然抗氧化剂在 DPPH 模型中的协同作用进行研究,发现加入脂溶性抗氧化剂(如槲皮素和 α -生育酚)比加入水溶性抗氧化剂(如抗坏血酸和儿茶素)更容易产生协同作用。并且在脂溶性或水溶性抗氧化剂与草本植物相互作用的体系中,改变脂溶性抗氧化活性物质的浓度,协同系数有明显的改变;但是改变水溶性抗氧化剂浓度,协同系数无明显改变,这说明脂溶性抗氧化剂在 DPPH 模型协同体系中起主导作用。

3.2 天然维生素类化合物与其他抗氧化剂的协同作用

不同抗氧化剂之间的协同作用强度取决于它们之间的相互作用,任何一种抗氧化剂浓度的变化都会对协同作用效果产生影响。Liu 等人^[37]对番茄红素、VE、VC 和 β -胡萝卜素四种抗氧化剂之间的协同作用利用 DPPH 模型进行了研究。四组分混合溶液协同作用最强时,番茄红素、VC、VE 和 β -胡萝卜素的浓度分别为 15、0.16、5 和 10.83 $\mu\text{mol/L}$,协同系数为 1.34。在三组分混合溶液中,只有番茄红素+VE+VC 的组合显示协同抗氧化性。在两组分的混合溶液中,只有含番茄红素的混合溶液有协同性,原因是番茄红素使 VE 再生,VC 使番茄红素再生。Fabre 等人^[38]和 Pan 等人^[29]的研究也证实了由于抗氧化剂的再生可以使得体系中产生协同抗氧化性。

浓度和不同的浓度对比对协同性产生显著影响在 Zora 等人^[39]的研究中也有所体现。番茄红素+叶黄素、番茄红素+ β -胡萝卜素、 α -生育酚+ β -胡萝卜素之间存在明显的协同抗氧化性,并且番茄红素+叶黄素这一组合的协同性最强,协同系数为 1.47。 β -胡萝卜素和 α -生育酚的协同性在 Zou 等人^[40]的研究中也被证实。 β -胡萝卜素和 α -生育酚的结合有效地抑制了脂质过氧化,两组分的过氧化值远远低于单一组分的过氧化值,说明这两种活性组分之间具有协同抗氧化性。这两者之间的协同性可以用 α -生育酚的再生来解释。

3.3 天然多糖类化合物与其他抗氧化剂的协同作用

多糖和酚类抗氧化剂的协同抗氧化研究相对较少,有研究表明灵芝孢子多糖和茶黄素在 ABTS 模型中有协同抗氧化作用^[41]。两种抗氧化剂具有协同性可能是因为灵芝孢子多糖和茶黄素之间的修复再生产生新的酚类化合物。白海娜等人^[42]用联合指数评价了多糖和多酚类化合物的协同抗氧化性,原花青素+黑木耳多糖、白藜芦醇+黑木耳多糖在 DPPH 和 ABTS 模型中具有协同抗氧化性,咖啡酸+黑木耳多糖、儿茶素+黑木耳多糖在 DPPH 中有协同抗氧化性。这些组合具有协同抗氧化性可能有两个原因:一是与自身结构有关,二是两种抗氧化剂相互作用产生新的抗氧化物质。

4 协同作用的响应面优化

响应曲面法(RSM)常被食品工业用于开发和优化新产品和工艺,已有研究将该方法用于协同抗氧化性的实验中^[43]。图 2 为响应面优化示意图,最高点为最大协同系数值,底面坐标可以得到各物质的最优浓度。响应曲面法可以检查两种化合物之间所有可能的组合,从而可以确定抗氧化剂之间的协同性,并得到最大协同系数以及对应的浓度配比。孙玥等人^[44]通过响应曲面分析分别得到了阿魏酸、根皮素和 VE 在 DPPH、ABTS 和 FRAP 模型中的最大协同系数以及对应的物质的量分数。通过响应面的优化处理可以找到一个最佳的复配比例,这在配方应用中具有很大的潜力。

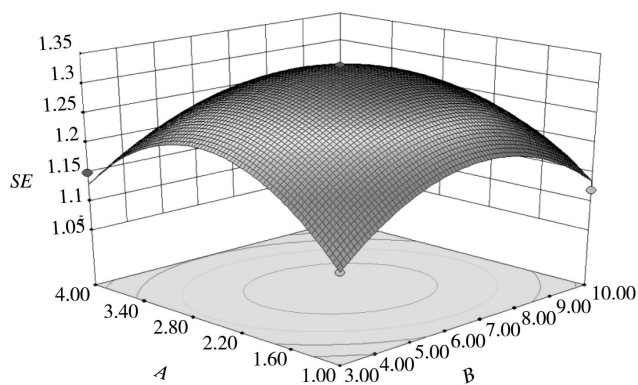


图 2 响应面优化示意图

5 总结与展望

具有抗氧化活性的天然成分越来越受到人们的关注,食用含有抗氧化活性成分的食物可以延缓衰老,提高人体免疫力。而具有协同性的两种或多种抗氧化剂的联合使用不仅可以有效提高体系的抗氧化活性,还可以大大降低产品的成本,因而成为食品等诸多领域的研究热点。浓度是物质间是否具有协同性的一个重要因素,任何一种抗氧化剂浓度的改变都会对体系的协同抗氧化作用产生影响。

在过去的研究中,抗氧化活性物质之间具有协同性已经被研究证实,采用多种抗氧化剂共同作用可以有效提高抗氧化能力,但是抗氧化剂间最大协同性下的浓度配比尚未进行充分研究。不同抗氧化剂之间的相互作用会产生不可预测的活性,所以响应曲面优化具有重要意义。最佳浓度配比的得出,对于优化食品添加剂或药物配方,提高经济效益具有重要指导意义。由于协同性在不同的氧化模型中结果有差异,所以在实验时宜采用多种模型来验证。在今后的实验中,有必要开展体内实验从而进一步阐释其相互作用机制。

参 考 文 献

- [1] LIU D, LI Y, QIAN Y, et al. Synergistic antioxidant performance of lignin and quercetin mixtures[J]. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 2017, 5(9): 8424-8428.
- [2] PEREIRA A C D S, WURLITZER N J, DIONÍSIO A P, et al. Synergistic, additive and antagonistic effects of fruit mixtures on total antioxidant capacities and bioactive compounds in tropical fruit juices[J]. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 2015, 65(2): 119-127.
- [3] 楚秉泉, 方若思, 李玲, 等. 洋甘菊各萃取相抗氧化活性及其有效成分分析[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(8): 1-6.
- [4] 王悠, 苗泽龙, 乔婷, 等. 天然产物的活性成分抗炎和抗氧化研究概述[J]. *科学技术创新*, 2015(22): 77-78.
- [5] 徐铭, 黄靖, 方靖, 等. 多酚类化合物摄入与结直肠癌关系的病例对照研究[J]. *营养学报*, 2017, 39(4): 349-356.
- [6] ZHANG L, MCCLEMENTS D J, WEI Z, et al. Delivery of synergistic polyphenol combinations using biopolymer-based systems; advances in physicochemical properties, stability and bioavailability[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019(4): 1-15.
- [7] 符莎露, 吴甜甜, 吴春华, 等. 植物多酚的抗氧化和抗菌机理及其在食品中的应用[J]. *食品工业*, 2016, 37(6): 242-246.
- [8] 鲁晓翔. 黄酮类化合物抗氧化作用机制研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2012, 33(3): 220-224.
- [9] SHI R, ZHANG Q Y, VRIESEK OOP F, et al. Preparation of organogel with tea polyphenols complex for enhancing the antioxidation properties of edible oil[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(33): 8379-8384.
- [10] LIU M, LIU T T, SHI Y B, et al. Comparative study on the interaction of oxyresveratrol and piceatannol with trypsin and lysozyme: binding ability, activity and stability[J]. *Food & Function*, 2019, 10(12): 8182-8194.
- [11] ZENG Y X, SONG J J, ZHANG M M, et al. Comparison of in vitro and in vivo antioxidant activities of six flavonoids with similar structures[J]. *Antioxidants*, 2020, 9(8): 732.
- [12] HIDAYAH N, LUBIS R, NURHAITA. Comparison of vitamin, anthocyanin, and bioactive compounds from gajah and padi jengkol (archidendron jiringa) peel as potential natural antioxidants[C]. // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2020.
- [13] IMRAN M, GHORAT F, HAQ I U, et al. Lycopene as a natural antioxidant used to prevent human health disorders[J]. *Antioxidants*, 2020, 9: 706.
- [14] YANG H, HUA J L, WANG C. Anti-oxidation and anti-aging activity of polysaccharide from *Malus micromalus* Makino fruit wine[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 121: 1203-1212.
- [15] 罗敏, 陈德经, 季晓辉. 米胚多糖的组成及抗氧化性研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2018, 30: 923-929.
- [16] 王晓敏, 林霖雨, 李康丽, 等. 超声波辅助提取山药多糖及体外抗氧化性研究[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(12): 24-28.
- [17] 刘玉婷, 李井雷. 多糖体外抗氧化活性研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(6): 214-219.
- [18] LIU F G, SUN C X, YANG W, et al. Structural characterization and functional evaluation of lactoferrin-polyphenol conjugates formed by free-radical graft copolymerization[J]. *RSC Advances*, 2015, 5(20): 15641-15651.
- [19] ZHANG Y Y, WU S M, QIN Y H, et al. Interaction of phenolic acids and their derivatives with human serum albumin; structure-affinity relationships and effects on antioxidant activity[J]. *Food Chemistry*, 2017, 240: 1072-1080.
- [20] 赵焕焦, 吕晓玲, 王梦姝, 等. β -乳球蛋白与黑米花色苷的相互作用[J]. *食品科学*, 2017, 38(9): 85-90.
- [21] CHENG H, FANG Z, WUSIGALE, et al. Complexation of trans- and cis-resveratrol with bovine serum albumin, β -lactoglobulin or α -lactalbumin[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 81: 242-252.
- [22] 周瑞, 董学艳, 景浩. 不同溶液中牛血清白蛋白与花青素相互作用特征及抗氧化性[J]. *食品科学*, 2013, 34(15): 11-16.

- [23] LIU J W, WANG Q Y, ZHANG H, et al. Interaction of chlorogenic acid with milk proteins analyzed by spectroscopic and modeling methods[J]. *Spectroscopy Letters*, 2016, 49(1): 44-50.
- [24] 倪孟婷, 樊美慧, 胡兴, 等. 槲皮素与胰蛋白酶的作用机制及其抗氧化活性[J]. *南昌大学学报*, 2017, 41(3): 244-248.
- [25] JIANG H W, LI H Y, YU C W, et al. The evaluation of antioxidant interactions among 4 common vegetables using isobolographic analysis [J]. *Journal of Food Science*, 2015, 80(6): C1162-C1169.
- [26] WANG S S, WANG D M, LIU Z H, et al. Synergistic, additive and antagonistic effects of potentilla fruticosa combined with EGb761 on antioxidant capacities and the possible mechanism[J]. *Industrial Crops & Products*, 2015, 67: 227-238.
- [27] CHEN W J, ZOU M M, MA X B, et al. Co-encapsulation of EGCG and quercetin in liposomes for optimum antioxidant activity[J]. *Journal of Food Science*, 2018, 84(1): 111-120.
- [28] LUIS A, DUARTE A P, PEREIRA L, et al. Interactions between the major bioactive polyphenols of berries: effects on antioxidant properties[J]. *European Food Research and Technology*, 2018, 244(1): 175-185.
- [29] PAN Y, DENG Z Y, ZHENG S L, et al. Daily dietary antioxidant interactions are due to not only the quantity but also the ratios of hydrophilic and lipophilic phytochemicals[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(34): 9107-9120.
- [30] SHAVANDI A, BEKHIT A E D A, SAEEDI P, et al. Polyphenol uses in biomaterials engineering[J]. *Biomaterials*, 2018, 167: 91-106.
- [31] 贾贵东, 杨建雄. 芦丁与绿原酸协同抗氧化活性的研究[C]. // 药用植物化学与中药有效成分分析研讨会论文集, 2008.
- [32] 杨凯舟, 翟晓娜, 王佳良, 等. 绿原酸协同抗氧化机理的电化学和光谱-色谱学研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2016, 36(8): 2405-2413.
- [33] MAO S Q, WANG K D, LEI Y K, et al. Antioxidant synergistic effects of osmanthus fragrans flowers with green tea and their major contributed antioxidant compounds[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 1-10.
- [34] SKROZA D, MEKINIL G, SVILOVI S, et al. Investigation of the potential synergistic effect of resveratrol with other phenolic compounds: a case of binary phenolic mixtures[J]. *Journal of food composition and analysis*, 2015, 38: 13-18.
- [35] KALUCKA M N, DWIECKI K, SIGER A, et al. Antioxidant synergism and antagonism between tocotrienols, quercetin and rutin in model system[J]. *Acta Alimentaria: An International Journal of Food Science*, 2013, 46(3): 260-270.
- [36] BAE I Y, KWAK B Y, LEE H G, et al. Synergistic antiradical action of natural antioxidants and herbal mixture for preventing dioxin toxicity[J]. *Food Science & Biotechnology*, 2012, 21(2): 491-496.
- [37] LIU D H, SHI J, IBARRA A C, et al. The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C, and β -carotene mixtures on the DPPH free radical[J]. *Food Science & Technology*, 2008, 41(7): 1344-1349.
- [38] FABRE G, BAYACH I, BERKA K, et al. Synergism of antioxidant action of vitamins E, C and quercetin is related to formation of molecular associations in biomembranes[J]. *Med Chem Comm*, 2015, 51(36): 7713-7716.
- [39] KOTÍKOVÁ Z, LACHMAN J, HEJTMÁNKOVÁ A, et al. Determination of antioxidant activity and antioxidant content in tomato varieties and evaluation of mutual interactions between antioxidants [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2011, 44 (8): 1703-1710.
- [40] ZOU L, AKOH C C. Oxidative stability of structured lipid-based infant formula emulsion: effect of antioxidants[J]. *Food Chemistry*, 2015, 178: 1-9.
- [41] 张乃珣, 尹红力, 刘冉, 等. 茶黄素与真菌多糖联合清除 ABTS 自由基活性的比较[J]. *现代食品科技*, 2017, 33(2): 21-28, 34.
- [42] 白海娜, 王振宇, 张华, 等. 多酚类化合物与黑木耳多糖协同抗氧化作用研究[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(22): 124-127.
- [43] CAPITANI C D, CARVALHO A C L, BOTELHO P B, et al. Synergism on antioxidant activity between natural compounds optimized by response surface methodology[J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2009, 111(11): 1100-1110.
- [44] 孙玥, 余燕影, 曹树稳. 阿魏酸、根皮素和水溶性 VE 的抗氧化协同效应及其配方优化[J]. *食品科学*, 2012(3): 39-44.

国产药物辅料磺丁基倍他环糊精钠的 注射安全性研究

申 健¹, 孙 涛²

(1.潍坊学院 化学化工与环境工程学院, 山东 潍坊 261061; 2.复旦大学 药学院, 上海 201203)

摘 要 磺丁基倍他环糊精钠(Sulfobutyl beta cyclodextrin sodium, SBCD),作为一种重要的、对多种药物可起包结作用的药用辅料,长期以来受控于国外“Cyclolab”等公司,是我国药物辅料界一款著名的被“卡脖子”的产品。对国产SBCD的注射安全性考察,是重要的破局式研究。分别对国产SBCD的取代度、溶血性、肾上皮细胞毒性,以及其超大剂量静脉注射安全性,进行了系统性研究。相比于原研市售产品,国产SBCD表现出了相当的溶血安全性和肾上皮细胞毒性;且在SD大鼠进行动物水平研究发现,国产SBCD拥有良好的超大剂量静脉注射安全性。研究为国产SBCD突破国外产品封锁和进一步的市场应用提供重要参考依据。

关键词 国产辅料;磺丁基倍他环糊精钠;溶血性;肾毒性;超大剂量注射安全性

中图分类号 R94

文献标识码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Study on the Injection Safety of Domestic Medicinal Excipient Sulfobutyl Beta Cyclodextrin Sodium

SHEN Jian¹, SUN Tao²

(1.School of Chemistry and Chemical Engineering, Weifang University, Weifang 261061, China;

2.School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China)

Abstract Sulfobutyl beta cyclodextrin sodium (SBCD) can be employed as medicinal excipients for many pharmaceuticals via an inclusion model. However, for a long period, the SBCD production was limited by external incorporations such as Cyclolab, which has been always regarded as a famous “bottleneck” pharmaceutical product. The study on the injection safety of domestic SBCD is an important ice-breaking area. In this work, the substitution degree, hemolysis, renal toxicity, safety of supreme large injection doses of domestic SBCD were studied in detail. Compared with the original marketed product, domestic SBCD show comparable hemolysis and renal safety. Based on the in vivo experiments obtained from SD rats, the domestic SBCD possessed favorable biosafety upon supreme large injection doses. This work will provide important reference for breaching the blockade of foreign products and further marked application of the domestic SBCD.

收稿日期: 2021-02-01

基金项目: 科技部“科技助力经济2020”重点专项项目(山东省立项列表序号16)资助

通讯作者: 孙涛, 男, 汉族, 博士, 副教授, 研究方向: 功能导向的靶向药物递释系统, E-mail: sunt@fudan.edu.cn。

Key words domestic excipient; sulfobutyl beta cyclodextrin sodium; hemolysis; renal toxicity; safety of supreme large injection doses

0 引言

新冠疫情(COVID-19)仍在全球肆虐。2020年5月1日,美国食品药品监督管理局(U.S. Food and Drug Administration, FDA)授予“吉利德科学”公司的抗病毒药物——瑞德西韦以紧急使用权,用于新冠的临床治疗^[1]。SBCD(图1(a))是瑞德西韦的主要成药辅料,在瑞德西韦药物分子制剂化过程中起到了重要的增溶、保护等作用。据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)的数据,瑞德西韦的12%(重量/体积比)由SBCD构成^[2]。

SBCD是美国“Cydex”公司开发出的倍他环糊精的重要衍生物^[3]。SBCD是由1,4-丁烷磺内酯与倍他环糊精羟基发生取代反应制备,其上市产品的平均取代度为6.2-6.9。SBCD具备良好的水溶性,溶解度超过50 g;其生物稳定性优于母体倍他环糊精;且其对小分子药物的包合力更强;肾毒性更低,溶血性和生物刺激性均较小。因此,SBCD被广泛应用于提高许多小分子药物的注射成药性能^[4]。但SBCD的生产及销售,长期以来被匈牙利Cyclolab公司垄断,是我国一款著名的被“卡脖子”的药用辅料产品。在当今复杂国际形势下,开发、研究和实现国产化的SBCD,显得尤为重要。近年来经过不断努力,国产SBCD的生产制备等有了新突破,特别是国内最大的环糊精类产品生产公司——山东滨州智源生物科技有限公司,在环糊精的基础和应用研究领域有了显著进展。进一步缩小与国外先进辅料产品在各方面的差距,是当前亟待研究的课题。

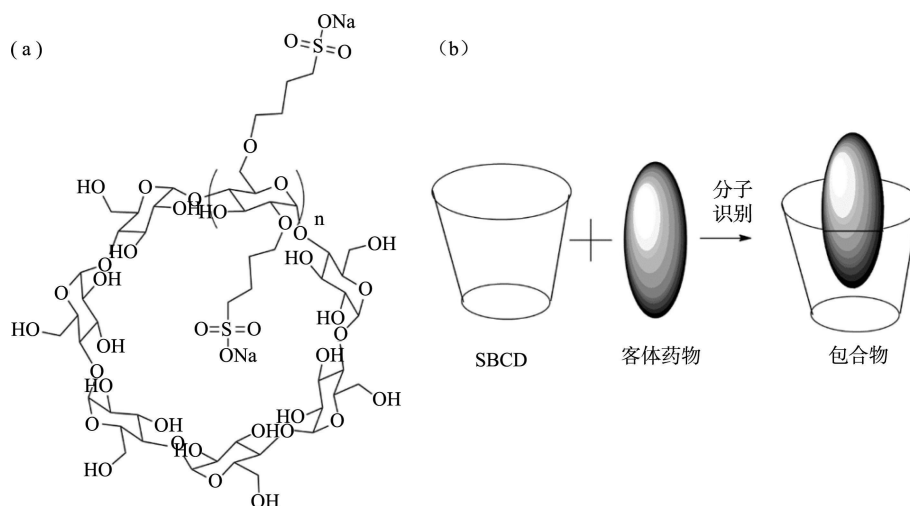


图1 (a)SBCD的化学结构示意图;(b)SBCD与客体药物通过分子识别作用形成包合物的过程

从新药研发角度看,人类使用的药品及辅料都必须经过严格的毒理实验测试,前期需采用动物实验进行安全性评价,以证明其对人体无急、慢性毒性,且无致癌、致病、致畸、致毒、致突变、致残的作用^[4]。SBCD主要通过包合作用增溶和稳定小分子药物,这种超分子主客体式成药形式(一般是1:1的摩尔比,图1(b)),而SBCD分子量一般大于常见小分子药物,这注定在成药过程中SBCD用量相比于其他类型的药用辅料要大得多。加上SBCD可直接用于注射剂型,因此对其毒理学研究是非常有必要的。鉴于国产SBCD仍属于“卡脖子”级产品,其安全性和大剂量注射研究,成为制约其推广的瓶颈,本课题的开展显得尤为重要。

1 材料和方法

1.1 药物、试剂与器械

SBCD为山东滨州智源生物科技有限公司生产,批号SB20200413、SB20200505、SB20200517,生产日期为2020年4-5月,有效期至2022年4-5月。0.9%生理盐水,自配;75%酒精,自配;1 mL注射器;40 mL灌注注射器;大鼠固定笼。

1.2 动物

清洁级 SPF 级 SD 大鼠 25 只,雄性 13 只,雌性 12 只。饲养温度:20-23 °C,湿度:50%-60%,试验前大鼠禁食(不禁水)12 h。

1.3 SBCD 取代度的测定

利用美国药典中推荐 SBCD 测定标准的毛细管电泳的方法来检测 SBCD 取代度^[5]。具体如流动相:乙腈:0.1 M 硝酸钾水溶液(1:4,体积比);待检测 SBCD 溶液浓度:10 mg/mL;检测器:示差折光检测器;检测器温度:35±2 °C;分离柱:7.8 mm×30 cm 分析柱,填充 L37 填料;流速:1.0 mL/min;进样量:20 μL。

1.4 红细胞悬液的制备

SD 雄性大鼠眼睑取血 3 mL,3000 r/min 离心 10 min 去除血浆和纤维蛋白原等,留沉淀红细胞,再加入 10 倍量的生理盐水,重复离心步骤,反复洗涤三次,至上清液澄清无色,留得的红细胞沉淀用生理盐水配成 2% 的混悬液,待用。

1.5 溶血作用测定

用生理盐水分别配置浓度为 10、20、50、100、150 mg/mL 的磺丁基-β-环糊精溶液,EP 管中加入 200 μL 红细胞悬液和 800 μL SBCD 溶液,摇匀后,置于 37 °C 中缓慢摇晃 1 h,将温育好的试管溶液以 3000 r/min 离心 10 min 后,取上清液转入 96 孔板中,用酶标仪读取每个试管溶液的 OD 值,选择的波长为 545 nm,阳性对照为蒸馏水,阴性对照为生理盐水。用下面方程式计算溶血率

$$n = (OD_t - OD_{nc}) / (OD_{pc} - OD_{nc}) \times 100\%$$

其中 OD_t 为受试管吸光度; OD_{nc} 为阴性管吸光度; OD_{pc} 为阳性吸光度。

1.6 细胞培养

HEK-293 细胞用含 10% 胎牛血清和 100 IU/mL 的双抗(青霉素-链霉素)的 DMEM 培养基,置于 37 °C,饱和湿度 5% CO_2 的细胞培养箱中培养,待细胞汇合度达到 70%-80% 时,用 0.25% 的胰蛋白酶消化传代或制成单细胞悬液,继续培养。

1.7 SBCD 对 HEK-293 细胞存活率的影响

取对数生长期的 HEK-293 细胞制成单细胞悬液,调整细胞密度为 5×10^3 个/mL,接种于 96 孔板,每孔 100 μL,将 96 孔板置于 37 °C,饱和湿度 5% CO_2 的细胞培养箱中培养 24 h,待其贴壁完全后,每孔分别更换浓度为 150、100、50、20、10 mg/mL 的两个批次和原研 SBCD 培养基溶液,设置空白孔(无细胞培养基)和对照空(有细胞,但培养基内不加 SBCD),培养 24 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 增强型溶液,培养箱内培养 1 h,利用酶联免疫检测仪测定各孔在 450 nm 波长处的光密度 OD 值。则细胞存活率 m 为

$$m = [(A_s - A_b) / (A_c - A_b)] \times 100\%$$

其中 A_s 为实验孔(含有细胞的培养基、CCK-8、环糊精)的吸光度; A_c 为对照孔(含有细胞的培养基、CCK-8、无环糊精)的吸光度; A_b 为空白孔(不含细胞和环糊精的培养基、CCK-8)的吸光度。

1.8 高浓度 SBCD 注射液配置

SBCD 注射液现配现用。精确称取 SBCD 25 g,加入到 30 mL、0.9% 的生理盐水中,在室温、避光下超声 2 h,溶解至完全澄清透明状态,避光储存在 4 °C 冰箱中。

1.9 大鼠的大剂量静脉注射实验

大剂量静脉注射预实验:先取清洁级 SD 大鼠 4 只,体重 190-210 g,雌雄各半。注射前大鼠称重,利用大鼠固定装置固定大鼠,75% 酒精消毒尾静脉,尾静脉注射给药(3000 mg/kg 体重),每周给药一次,给药时观察大鼠反应,给药后观察大鼠行为,给药 2 次。给药 2 周内观察大鼠生存率。

大剂量静脉注射实验:取清洁级 SD 大鼠 25 只,雄性 13 只,雌性 12 只,体重 190-210 g。注射前大鼠称重,利用大鼠固定装置固定大鼠,75% 酒精消毒尾静脉,以 1.0 mL/250 g 尾静脉注射 0.9% 生理盐水,注射速度为 0.5 mL/min,每周给药 1 次,给药时观察大鼠反应,给药后观察大鼠行为,给药 2 次。给药 2 周内观察大鼠生存率。

1.10 大鼠的大剂量静脉注射后灌流实验

将大鼠以 10% 水合氯醛(0.3-0.4 mL/100 g)或戊巴比妥钠(5-6 mg/100 g)麻醉。切勿麻醉过量,否则大

鼠可能在灌流前死亡。大鼠麻醉后,沿剑突上剪开 0.5 cm 皮肤,钝性分离,不要随意剪以防出血,出血量过大会直接影响灌流效果。后再剪开皮肤、暴露肌层,而后仍需钝性分离肌层暴露肋骨,用有齿镊将肋骨提起,U 字型剪开、翻起后以血管钳固定,此时心脏暴露,用眼科剪将心尖部剪裂,用平头灌注针从心尖裂处稍用力即刺入左心室,顺势上探,遇脱空感则为入主动脉。灌流前用生理盐水冲洗输液器并排掉气泡。打开输液器后,开始灌注 37 °C 温生理盐水,见右心耳明显充盈后,将右心耳剪开后使血涌出。灌注前 20 s,维持速度 60-80 滴/min,防止初期灌注过快冲破肺部血管致使口鼻出水,使灌流效果不佳;之后控制在 150-180 滴/min,在灌流 400 mL 生理盐水(含 150 μ L 肝素注射液)后,后迅速换上 4 °C 的多聚甲醛(4%)生理盐水溶液,约 20-40 s 内可见大鼠全身明显抽动,约 30-60 s 后渐止,多聚甲醛灌注应先快后慢,前 3-5 min 以同生理盐水的速度灌,而后可控制于 60-90 滴/min,灌流结束后需将组织取出,置于 4 °C 的多聚甲醛(4%)生理盐水溶液中后固定 24 h,之后石蜡切片并利用苏木精-伊红染色法(Hematoxylin-eosin staining, HE)染色,利用显微镜观察 HE 染色结果。

2 结果和讨论

2.1 SBCD 取代度研究

倍他环糊精是由 7 个 D-吡喃葡萄糖构成的环状低聚糖,每个葡萄糖残基上有 3 个可被取代的羟基(分别是 1、2、6 位),而 SBCD 是由倍他环糊精作为反应原料,在碱性条件下,羟基被 1,4-丁烷磺酸内酯烷基化的钠盐^[6]。因此,不同的投料比、加料顺序和反应温度等条件不同,会导致 SBCD 的取代度有区别。随着 SBCD 取代度的不同,其包含性能、稳定性,乃至下游溶血性、安全性等参数或性能也均会不同^[7]。我们利用毛细管电泳的方法,检测了原研和国产 SBCD 的取代度的差别。由图 2 结果可以看出,原研和国产 SBCD 的取代度差别不大,峰形略有细微差异,峰值取代度均在 7 左右。因此理论上,原研和国产 SBCD 对同一小分子药物的包含性能差别不大。

2.2 溶血性

环糊精类衍生物在用于注射给药辅料时,安全性是需考虑的第一因素。尽管 FDA 已经批准其在食品和药品中的应用,但在内部报告中仍提到:考虑到环糊精类衍生物溶血性,对其参与的注射剂型需额外慎重^[8]。红细胞破裂,血红蛋白逸出称为红细胞溶解,简称溶血。溶血指标是辅料用于注射剂型前一个非常重要的参考依据^[9]。在辅料生物相容性测试时,如出现严重溶血行为,则该测试辅料不能用于注射剂型。根据《药物非临床研究质量管理规范》,辅料的溶血性测试遵循随机、对照、重复的原则来进行,观察测试辅料对受试动物红细胞的影响。

SBCD 浓度小于 50 mg/mL 时,试管红细胞全部下沉,上清液呈现无色澄明状态,无溶血现象出现。浓度为 100、150 mg/mL 时,溶液呈淡红色,管底有红细胞残留。国产批号 SB20200413、SB20200505、原研组浓度为 150 mg/mL 时,溶血百分比分别为 13.7%,16.3%,14.5%。结果如下。

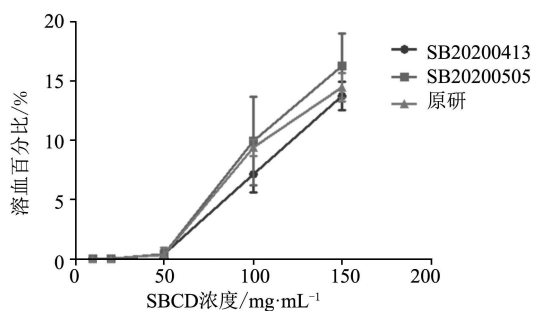


图3 不同浓度的 SBCD 浓度的溶血百分比

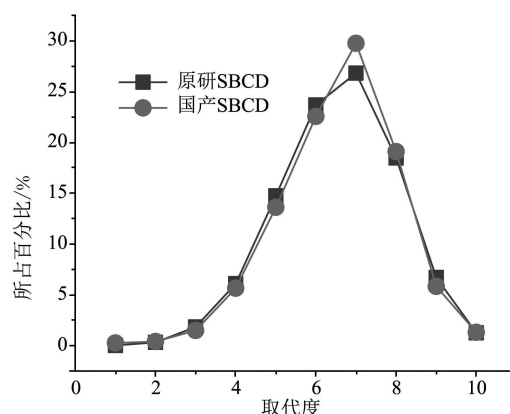


图2 原研和国产 SBCD(批号 SB20200413)的取代度比较结果

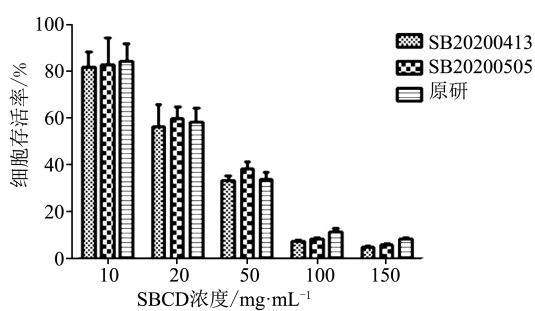


图4 不同浓度的 SBCD 的细胞存活率

智源提供的两批 SBCD 产品在 50 mg/mL 时,仍展现了令人满意的有限溶血行为。与原研相比,所有

数据点均无统计学差异。SB20200505 批次,溶血性能甚至优于原研产品。该实验初步为智源 SBCD 产品,可用于注射剂辅料提供了进一步佐证。

辅料的本身性质、杂质、pH、无机盐(引起渗透压变化)等均可能导致溶血,本实验的进行,验证了智源提供的两批 SBCD 产品在以上指标中均不亚于原研产品。

2.3 肾毒性

人胚胎肾细胞 293(HEK-293),是一个衍生自人胚胎肾细胞的细胞系。对 HEK-293 的细胞毒性进行研究,可用于初步表征药物辅料对人体正常组织、特别是肾组织的生理毒性^[10]。三组细胞存活率随 SBCD 浓度升高逐渐降低,SBCD 浓度 10 mg/mL 时,孵育 24 h 后细胞存活率大于 80%,各组之间的细胞存活率并未存在显著差异(图 4)。

智源提供的两批 SBCD 产品在 10 mg/mL 时,HEK-293 细胞仍有 80%以上存活,证明了其较低的细胞毒性。与原研相比,所有数据点均无统计学差异。该实验初步为智源 SBCD 产品,在用于注射剂辅料时,不会造成生理毒性提供了进一步佐证。

2.4 超大剂量注射安全性

SBCD 可作为增强生物相容性、络合剂、增溶剂、渗透剂、稳定剂、片剂或胶囊剂的稀释剂、粘度增加剂和降低水的活性等,用于注射剂、口服固体制剂、眼用制剂、鼻内制剂、吸入剂和外用制剂,还可以作为渗透压剂或增溶剂用于控制制剂等。

因为 SBCD 分子量较大,所包裹的药物一般都是小分子化合物,一般是 1:1 应用进行包合^[11]。因此,如果后期进行静脉给药的话,环糊精的用量会比真正的发挥疗效的药用量大的多。因此,对 SBCD 的生物安全性,特别是大剂量注射的安全性考察,显得尤为重要^[12]。因此本项研究中,选取了超大剂量的 SBCD 剂量(3000 mg/kg 体重,远远大于常规注射所需浓度)^[13],直接注射进动物体内观察动物的生存和主要脏器变化。如此剂量被证实安全,可顺延推测低于此剂量的 SBCD 的生物安全性也是良好的。综合前期实验中发现的优秀的耐溶血性,可结合在一起得到 SBCD 大剂量注射的安全性良好的结论。

表 1 大鼠静脉注射大剂量给药预实验结果

观察项目	肤色、毛色	呼吸	眼鼻口腔分泌物	行为活动	行为学	死亡
结果	正常	正常	正常	正常	注射时尖叫	无

表 2 大鼠静脉注射大剂量给药正式实验结果

观察项目	肤色、毛色	呼吸	眼鼻口腔分泌物	行为活动	行为学	死亡
结果	正常	正常	正常	正常	注射时明显躁动、尖叫	无

第 1 周给药:25 只大鼠第一次给药完毕后,3000 mg/kg 体重。尾静脉打药时大鼠比较暴躁,可能与浓度大时有一定渗透压刺激性有关。生存率 100%。给药后大鼠正常进食饮水,无反常现象。

第 2 周给药:尾静脉打药时大鼠仍然比较暴躁。生存率仍是 100%。大鼠体重稳步上升,24 h 内监测体温,无显著性变化。但是需要注意的是:6 只大鼠(24%)给药尾部部位出现红肿、皮肤轻度溃烂现象。

第 3 周给药:尾静脉打药时大鼠比较暴躁。生存率仍是 100%。大部分大鼠体重稳步上升,24 h 内监测体温,无显著性变化。给药后大鼠尾部出现轻微颤抖现象。

20 只大鼠(80%)给药尾部部位出现红肿、皮肤轻、中度溃烂现象。因此可以认为,磺丁基-β-环糊精钠生物相容性良好,即时是超大剂量下也不会出现死亡现象。但是超大剂量下 SBCD 会导致给药溶液胶体渗透压上升,致使给药部位有一定刺激性,在用药时需要注意少量多次、低渗溶液配制药物等操作。经动物伦理委员会动物福利准则评估,给药 3 次后,如再次给药会导致动物较强疼痛感,不适合继续给药,因此将给药次数停留在 3 次。以上结果均表明表明 SBCD 静脉给药安全度较大,为注射用药的包合辅料的临床应用提供了参考依据。

环糊精本身是有淀粉经酶发酵所得,属于典型的低聚糖结构。某些细菌(如大肠杆菌),有可能利用环糊精或其衍生物作为碳源,进行繁殖,因此热源是环糊精系列产品的重要控制指标。本实验中,给药前后大鼠体温均无明显变化,证明智源生产的 SBCD 热原控制良好。

给药周期结束后,大鼠麻醉后分别经生理盐水和 4%多聚甲醛灌流,包括心肝脾肺肾等主要脏器解剖切

片后,经 HE 染色结果如下。经分析,主要脏器无明显异常现象(图 5)。

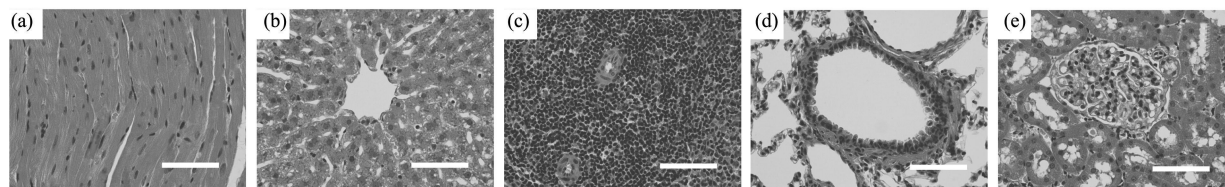


图 5 超大剂量 SBCD 尾静脉给药(批号 SB20200517)三周后主要脏器的 HE 染色处理结果(放大 400 倍),
(a)-(e)分别为心、肝、脾、肺、肾(比例尺为 25 μm)

3 结论

进一步发展我国“卡脖子”的技术,是当前国内科研界孜孜不倦追求的目标。SBCD 作为一种在药物制剂领域需求量巨大,效果良好的材料,其国产化的目标,在当今科研和国际形势下显得尤为迫切,而制剂材料的安全性为首要考虑因素^[13]。本文对国产的 SBCD 的取代度、溶血行为、对肾上皮细胞毒性,以及超大剂量静脉注射安全性等关键数据和指标进行了评估。我们研究发现,山东滨州智源生物科技公司,作为国内环糊精生产和应用领域的领军者,其生产的 SBCD 的安全性能指标上,基本已达到或超过了 Cydex 公司原研水平,这为打破国外公司对该关键产品的垄断,奠定了重要基础。

参 考 文 献

- [1] RUBIN D, CHAN-TACK K, FARLEY J, et al. FDA approval of remdesivir—a step in the right direction[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2020, 383:2598-2600.
- [2] DRAKSLER P, MIKAC U. The impact of molecular mass and tablet composition[J]. *Acta Pharmaceutica*, 2020, 71(2):25-33.
- [3] KUMAR S V, POLICE A, PANDEY P, et al. Optimization of sulfobutyl-ether-beta-cyclodextrin levels in oral formulations to enhance progesterone bioavailability[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2021, 12:208-212.
- [4] DRAKSLER P, MIKAC U, LAGGNER P, et al. Polyethylene oxide matrix tablet swelling evolution; The impact of molecular mass and tablet composition[J]. *Acta Pharmaceutica*, 2020, 71(2):215-243.
- [5] CALTABIANO A M. Quantitation of sulfobutyl ether-beta-cyclodextrin (Captisol (TM)) in Vestipitant IV solution by liquid chromatography with ultraviolet (UV) detection[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, 118:276-283.
- [6] MA D-Y, ZHANG Y-M, XU J-N. The synthesis and process optimization of sulfobutyl ether beta-cyclodextrin derivatives, *Tetrahedron*, 2016, 72(22):3105-3112.
- [7] ANRAKU M, HIRAGA A, IOHARA D, et al. Slow-release of famotidine from tablets consisting of chitosan/sulfobutyl ether beta-cyclodextrin composites[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, 487(1/2):142-147.
- [8] HUANG X X, ZHOU C L, WANG H, et al. Pharmacokinetics, efficacy, and safety evaluation of docetaxel/hydroxypropyl- sulfobutyl-beta-cyclodextrin inclusion complex[J]. *AAPS PharmSciTech*, 2011, 12(2):665-672.
- [9] DA SILVA E, SHAHGALDIAN P, CPLEMAN A W. Haemolytic properties of some water-soluble para-sulphonato-calix-[n]-arenes[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2004, 273(1/2):57-62.
- [10] WANG H, XIE X, ZHANG F, et al. Evaluation of cholesterol depletion as a marker of nephrotoxicity in vitro for novel beta-cyclodextrin derivatives[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2011, 49(6):1387-1393.
- [11] RAMESH K V R N S, YADAV H K S, SARHEED, et al. Characterization of sulfobutyl ether beta-cyclodextrin binary and ternary inclusion complexes of loratadine[J]. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 2020, 14(4):634-644.
- [12] WANG M, JIANG J, CAI Y, et al. In vitro and in vivo evaluation of a posaconazole-sulfobutyl ether-beta-cyclodextrin inclusion complex [J]. *Biomedical Chromatography*, 2018, 32(12):e4364.
- [13] DONALISIO M, ARGENZIANO M, RITTA M, et al. Acyclovir-loaded sulfobutyl ether-beta-cyclodextrin decorated chitosan nanodroplets for the local treatment of HSV-2 infections[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2020, 587:119676.
- [14] LUKE D R, TOMASZEWSKI K, DAMLE B, et al. Review of the basic and clinical pharmacology of sulfobutylether- β -cyclodextrin (SB-ECD)[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, 99(8):3291-3301.

基于分子系统发育分析的京冀太行山区 丝膜菌属分类研究

王科¹,刘冬梅²,李国杰³,杜卓¹,郭耀宾¹,谢孟乐^{4,5},魏铁铮¹

(1.中国科学院微生物研究所,真菌学国家重点实验室,北京,100101;2.中国环境科学研究院,生态研究所,北京,100012;
3.河北农业大学,园艺学院,保定,河北,071001;4.吉林农业大学,食药菌教育部工程研究中心,长春,
吉林,130118;5.东北师范大学,生命科学学院,长春,吉林,130024)

摘要 基于 ITS 序列,运用最大似然法构建系统发育树,结合形态特征,对采集自北京市和河北省境内太行山区的丝膜菌属(*Cortinarius*)真菌标本进行分类鉴定。本文报道了这一研究发现的 29 个物种,其中 18 个种为中国新记录种。此外,基于模式标本序列分析的结果,证实田园丝膜菌应为黄褐丝膜菌的异名。本文提供了每个物种分子鉴定的参考序列和核心参考文献,为今后开展我国北方地区丝膜菌属物种资源调查提供依据。

关键词 大型真菌;分类学;ITS 序列;分子系统发育分析

中图分类号 Q939

文献标识码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Taxonomy of *Cortinarius* spp. from Taihang Mountains in Beijing Municipality and Hebei Province on the Base of Molecular Phylogenetic Analysis

WANG Ke¹, LIU Dongmei², LI Guojie³, DU Zhuo¹, GUO Yaobin¹,
XIE Mengle^{4,5}, WEI Tiezheng¹

(1.State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;
2. Institute of Ecological Environment, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China;
3. College of Horticulture, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China; 4. Engineering Research Center
of Edible and Medicinal Fungi, Jilin Agricultural University, Changchun 130024, China; 5. School of Life
Sciences, Northeast Normal University, Changchun 130024, China)

Abstract The samples of *Cortinarius* (Agaricales) species collected from Taihang Mountains in Beijing and Hebei Province were identified based on the phylogenetic analysis of ITS sequences using Maximum likelihood analysis and morphological characteristics. In this study, 29 species were reported in such area, of which 18 species were new to China. In addition, result from phylogenetic analysis based on ITS sequences from the type materials shows *C. pastoralis* is a synonym of *C. epsomiensis*. The standard sequences and

收稿日期: 2021-02-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31270072); 生态环境部生物多样性调查与评估项目(2019HJ2096001006); 中国科学院战略生物资源服务网络计划生物标本馆经典分类学青年人才项目(ZSBR-001)资助

通讯作者: 魏铁铮, 男, 汉族, 博士, 副研究员, 研究方向: 伞菌系统学, E-mail: weitiezheng@163.com.

core references for molecular identification of each species are provided as the basis for future investigation of *Cortinarius* resources in northern China.

Key Words macrofungi; taxonomy; ITS; molecular phylogenetic analysis

丝膜菌属 [*Cortinarius* (Pers.) Gray 1821] 隶属于担子菌门 (Basidiomycota)、蘑菇纲 (Agaricomycetes Doweld)、蘑菇目 (Agaricales Underw)、丝膜菌科 (Cortinariaceae R. Heim ex Pouzar)^[1], 传统上包括具有蜘蛛丝状内菌幕, 担孢子锈褐至褐色、表面具疣状凸起的伞菌^[2]。丝膜菌属物种极为丰富, Index Fungorum 真菌名称数据库记录其种及种下分类单元名称已达 5585 个, 但仍有大量未知种类。一些丝膜菌属种类是重要野生食用菌, 如中华丝膜菌 (*Cortinarius sinensis* L.H.Sun, T.Z.Wei & Y.J.Yao)^[3] 是著名特产一贺兰山紫蘑菇中的一个种, 具有较高的经济价值。还有少数种类, 如奥莱丝膜菌 (*C. orellanus* Fr.) 和细鳞丝膜菌 (*C. speciosissimus* Kühner & Romagn) 等, 为致命的毒菌^[4]。

近年来, 分子系统学方法被广泛运用于丝膜菌属物种的鉴定和分类研究。Suárez-Santiago et al.^[5] 运用 ITS 序列分析, 对欧洲西南部地区的泰拉蒙亚属 (*Telamonia*) 部分种类的进行界定。Harrower et al.^[6] 通过 ITS 序列分析, 发现同种丝膜菌不同产地的材料基因序列存在差异, 表明存在隐存种。Liimatainen et al.^[7] 基于序列分析, 重新界定丝膜菌中黏盖亚属 (*Phlegmacium*)。Dima, et al.^[8] 基于 ITS 序列分析, 对产自北欧的 *Anomali*、*Spilomei* 和 *Bolares* 三个组进行了整理。Liimatainen, et al.^[9] 基于 ITS 序列分析结果, 明确了丝膜菌泰拉蒙亚属中 184 个种的 DNA 条形码, 清理了大量的同物异名。

我国丝膜菌属种类丰富多样, 分类研究极为薄弱, 尚有大量种类未被报道, 分子系统学研究亟待加强。2019-2020 年, 本项目组开展针对太行山区开展大型真菌资源调查, 基于 ITS 序列的系统发育分析, 发现了 29 种丝膜菌。本文报道相关研究结果, 以期推进我国丝膜菌属分类研究。

1 材料与方 法

1.1 标本采集、制备与入库保存

标本采集自北京市及河北省太行山区。标本采集时, 原生境拍照并记录信息。标本由烘箱烘干后, 经低温冷冻杀虫处理后存放于中国科学院微生物研究所菌物标本馆 (HMAS)。

1.2 形态观察与分类鉴定

依据野外照片和采集记录信息, 对标本的宏观特征进行观察, 主要包括子实体各组成结构的大小、形状、颜色、表面状况和质地等性状。借助光学显微镜, 观察干标本的担孢子、担子、囊状体、菌盖表皮等重要的显微特征。用手术刀片切取各部分组织, 浸没在 5% 的 KOH 溶液或蒸馏水中观察, 置于 400-1000 倍显微镜下观察。参照各物种相关核心形态分类文献, 进行形态分类鉴定。

1.3 分子系统发育分析

提取标本 DNA, 扩增其 ITS 序列并测序。参照和对比 GenBank 上下载的各相关物种可靠的 ITS 序列, 基于最大似然性分析法, 构建系统发育树, 对各标本进行分子鉴定。基于形态观察和分子系统发育分析的结果, 对标本进行分类鉴定, 给出正确的学名。

2 结 果

2.1 分子系统发育分析

经测序, 获得源自 29 种丝膜菌属物种的 113 份标本的 122 条 ITS 序列 (含 3 份标本的 12 条克隆 ITS 序列)。从 GenBank 下载了上述 29 个物种及其近缘种的可靠 ITS 序列 69 条, 作为系统发育分析的参照序列。以黏滑菇属的 2 个种, *Hebeloma aurantioumbrinum* 和 *H. louisae* 模式标本的 ITS 序列作为外群。全部 193 条 ITS 序列组成矩阵, 通过手工比对进行排序后, 采用 MEGA-X 进行最大似然性分析, 构建系统发育树。用于系统发育分析的各物种 ITS 序列及相关信息见表 1。

为更清晰地区分相似物种, 经过初步系统发育分析后, 将全部用于分析的丝膜菌属物种及其序列, 按照亲缘关系的远近, 划分为 4 个群组, 分别以黏滑菇属物种序列为外群, 进行深入的最大相似性分析, 构建 4 棵系统发育树。根据分子系统发育分析结果, 结合形态分类研究, 将本文所研究的太行山区丝膜菌属标本鉴定

为 29 个种。由于少数物种间的系统发育关系极为接近,为明确区分,需对其标本 ITS 序列的碱基进行对比分析,同时参考国外相关的系统发育研究成果,再加以区分和界定,各组系统发育树见图 1-图 4。

表 1 太行山区丝膜菌属系统发育分析相关序列信息

学名 Name	凭证标本 Voucher	产地 Locality	GenBank 编号 GenBank accession No.	参考文献 References
<i>Cortinarius absarokensis</i>	IB19830352, 主模式 (Holotype)	格陵兰 (Greenland)	DQ295099	[10]
<i>C.alboamarensis</i>	H. T. Niskanen 04-850, 主模式 (Holotype)	芬兰 (Finland)	NR_153042	GenBank
<i>C.albocyaneus</i>	HMAS291371	中国 (China)	MW555445	*
<i>C.albocyaneus</i>	HMAS291374	中国 (China)	MW555446	*
<i>C.albocyaneus</i>	HMAS291406	中国 (China)	MW555443	*
<i>C.albocyaneus</i>	HMAS291360	中国 (China)	MW555444	*
<i>C.albocyaneus</i>	HMAS291443	中国 (China)	MW555449	*
<i>C.albocyaneus</i>	HMAS291444	中国 (China)	MW555448	*
<i>C.albocyaneus</i>	HMAS291446	中国 (China)	MW555447	*
<i>C.albocyaneus</i>	S; CFP1177, 解释模式 (Epitype)	瑞典 (Sweden)	KX302206	[8]
<i>C.atroalbus</i>	HMAS291386	中国 (China)	MW555450	*
<i>C.atroalbus</i>	HMAS291398	中国 (China)	MW555451	*
<i>C.atroalbus</i>	HMAS291487	中国 (China)	MW555452	*
<i>C.atroalbus</i>	HMAS291516	中国 (China)	MW555453	*
<i>C.atroalbus</i>	TUB 011922	-	AY669687	[9]
<i>C.atrocaeruleus</i>	HMAS291394	中国 (China)	MW555456	*
<i>C.atrocaeruleus</i>	HMAS291395	中国 (China)	MW555458	*
<i>C.atrocaeruleus</i>	HMAS291413	中国 (China)	MW555454	*
<i>C.atrocaeruleus</i>	HMAS291414	中国 (China)	MW555455	*
<i>C.atrocaeruleus</i>	HMAS291455	中国 (China)	MW555457	*
<i>C.atrocaeruleus</i>	HMAS291457	中国 (China)	MW555459	*
<i>C.atrocaeruleus</i>	HMAS291497	中国 (China)	MW555460	*
<i>C.atrocaeruleus</i>	HMAS291505	中国 (China)	MW555461	*
<i>C.atrocaeruleus</i>	IB 1951/0161, 主模式 (Holotype)	奥地利 (Austria)	FN428992	[5]
<i>C.biriensis</i>	HMAS291460	中国 (China)	MW555462	*
<i>C.biriensis</i>	TEB638-15, 主模式 (Holotype)	挪威 (Norway)	NR_153081	GenBank
<i>C.bivelosimilis</i>	TN10-014, 主模式 (Holotype)	加拿大 (Canada)	MF379636	GenBank
<i>C.bivelus</i>	HMAS291494	中国 (China)	MW555463	*
<i>C.bivelus</i>	S; F44841, 新模式 (Neotype)	瑞典 (Sweden)	KP866159	[9]
<i>C.bivelus</i>	TUB 011897	德国 (Germany)	AY669682	[11]
<i>C.boreotrichus</i>	H 6032724, 主模式 (Holotype)	芬兰 (Finland)	MF379638	GenBank
<i>C.brunnei folius</i>	H; T. Niskanen 09-153	美国 (USA)	MT934926	[9]
<i>C.brunnei folius</i>	TN06-146 (H), 主模式 (Holotype)	芬兰 (Finland)	EU259284	[12]
<i>C.caninus</i>	BP; B. Dima DB5567	德国 (Germany)	KX302241	[8]
<i>C.caninus</i>	S; CFP627, 解释模式 (Epitype)	瑞典 (Sweden)	KX302250	[8]
<i>C.castaneus</i>	HMAS291411	中国 (China)	MW555464	*
<i>C.castaneus</i>	PC; PML275, 新模式 (Neotype)	法国 (France)	MT934954	[9]
<i>C.chrysomallus</i>	LY69_217, 主模式 (Holotype)	法国 (France)	DQ102670	[10]
<i>C.cotoneus</i>	HMAS291474	中国 (China)	MW555465	*

表 1 太行山区丝膜菌属系统发育分析相关序列信息(续)

学名 Name	凭证标本 Voucher	产地 Locality	GenBank 编号 GenBank accession No.	参考文献 References
<i>C.cotoneus</i>	OS579	挪威(Norway)	KC842423	[18]
<i>C.deci piens</i>	PML 366, 新模式(Neotype)	法国(France)	FN428988	[5]
<i>C.deci pientoides</i>	HMAS291436	中国(China)	MW555468	*
<i>C.deci pientoides</i>	HMAS291439	中国(China)	MW555469	*
<i>C.deci pientoides</i>	HMAS291461	中国(China)	MW555470	*
<i>C.deci pientoides</i>	HMAS291462	中国(China)	MW555472	*
<i>C.deci pientoides</i>	HMAS291463	中国(China)	MW555471	*
<i>C.deci pientoides</i>	HMAS291467	中国(China)	MW555466	*
<i>C.deci pientoides</i>	HMAS291468	中国(China)	MW555467	*
<i>C.deci pientoides</i>	HMAS291509	中国(China)	MW555473	*
<i>C.deci pientoides</i>	HMAS291510	中国(China)	MW555474	*
<i>C.deci pientoides</i>	HMAS291511	中国(China)	MW555475	*
<i>C.deci pientoides</i>	G:367, 主模式(Holotype)	法国(France)	MT935002	[9]
<i>C.desertorum</i>	HMAS291429	中国(China)	MW555476	*
<i>C.desertorum</i>	HMAS291469	中国(China)	MW555477	*
<i>C.desertorum</i>	PRM:154750, 主模式(Holotype)	捷克(Czech)	MT935008	[9]
<i>C.disjungendus</i>	HMAS291420, Clone 1	中国(China)	MW555478	*
<i>C.disjungendus</i>	HMAS291420, Clone 2	中国(China)	MW555479	*
<i>C.disjungendus</i>	HMAS291420, Clone 3	中国(China)	MW555480	*
<i>C.disjungendus</i>	HMAS291420, Clone 4	中国(China)	MW555481	*
<i>C.disjungendus</i>	HMAS291420, Clone 5	中国(China)	MW555482	*
<i>C.disjungendus</i>	H I.Kytovuori 98-861, 主模式(Holotype)	瑞典(Sweden)	NR_131838	GenBank
<i>C.disjungendus</i>	H:P.A.Karsten 4370, 后选模式(Lectotype)	芬兰(Finland)	KP013190	[14]
<i>C.elegantiomontanus</i>	IB19890226	美国(USA)	GU363465	[15]
<i>C.elegantiooccidentalis</i>	WTU JFA 13226, 主模式(Holotype)	美国(USA)	NR_131811	GenBank
<i>C.elegantior</i>	HMAS291369, Clone 1	中国(China)	MW555483	*
<i>C.elegantior</i>	HMAS291369, Clone 2	中国(China)	MW555484	*
<i>C.elegantior</i>	HMAS291369, Clone 3	中国(China)	MW555485	*
<i>C.elegantior</i>	HMAS249874, Clone 1	中国(China)	MW555486	*
<i>C.elegantior</i>	HMAS249874, Clone 2	中国(China)	MW555487	*
<i>C.elegantior</i>	HMAS249874, Clone 4	中国(China)	MW555488	*
<i>C.elegantior</i>	HMAS249874, Clone 5	中国(China)	MW555489	*
<i>C.elegantior</i>	IB20010192	欧洲(Europe)	GU363461	[15]
<i>C.elegantior</i>	TUB 011388	德国(Germany)	AY174850	[16]
<i>C.elegantior</i>	TUB 012709	欧洲(Europe)	EF014262	[17]
<i>C.epsomiensis</i>	K:74963, 主模式(Holotype)	英国(UK)	MK010952	[18]
<i>C.epsomiensis</i>	HMAS291356	中国(China)	MW555545	*
<i>C.epsomiensis</i>	HMAS291465	中国(China)	MW555546	*
<i>C.epsomiensis</i>	HMAS291466	中国(China)	MW555547	*

表 1 太行山区丝膜菌属系统发育分析相关序列信息(续)

学名 Name	凭证标本 Voucher	产地 Locality	GenBank 编号 GenBank accession No.	参考文献 References
<i>C. falsosus</i>	HMAS291376	中国(China)	MW555494	*
<i>C. falsosus</i>	HMAS291393	中国(China)	MW555496	*
<i>C. falsosus</i>	HMAS291416	中国(China)	MW555495	*
<i>C. falsosus</i>	HMAS291361	中国(China)	MW555493	*
<i>C. falsosus</i>	HMAS291437	中国(China)	MW555497	*
<i>C. falsosus</i>	HMAS291438	中国(China)	MW555492	*
<i>C. falsosus</i>	HMAS291440	中国(China)	MW555491	*
<i>C. falsosus</i>	HMAS291445	中国(China)	MW555498	*
<i>C. falsosus</i>	HMAS291471	中国(China)	MW555490	*
<i>C. falsosus</i>	PC:3886, 主模式(Holotype)	法国(France)	MT935040	[9]
<i>C. famatus</i>	HMAS291373	中国(China)	MW555499	*
<i>C. famatus</i>	HMAS291377	中国(China)	MW555500	*
<i>C. famatus</i>	HMAS291392	中国(China)	MW555501	*
<i>C. famatus</i>	HMAS291434	中国(China)	MW555502	*
<i>C. famatus</i>	HMAS291483	中国(China)	MW555503	*
<i>C. famatus</i>	HMAS291484	中国(China)	MW555504	*
<i>C. famatus</i>	HMAS291485	中国(China)	MW555505	*
<i>C. famatus</i>	HMAS291486	中国(China)	MW555506	*
<i>C. famatus</i>	HMAS291496	中国(China)	MW555507	*
<i>C. famatus</i>	HMAS291506	中国(China)	MW555509	*
<i>C. famatus</i>	HMAS291512	中国(China)	MW555510	*
<i>C. famatus</i>	HMAS291513	中国(China)	MW555508	*
<i>C. famatus</i>	PC:4099, 主模式(Holotype)	法国(France)	MT935043	[9]
<i>C. favrei</i>	HMAS291401	中国(China)	MW555511	*
<i>C. favrei</i>	VMS15	加拿大(Canada)	FJ717520	[6]
<i>C. favrei</i>	IB 19990627	中国(China)	AF325575	[19]
<i>C. ferrugineovelatus</i>	HMAS291370	中国(China)	MW555515	*
<i>C. ferrugineovelatus</i>	HMAS291372	中国(China)	MW555514	*
<i>C. ferrugineovelatus</i>	HMAS291419	中国(China)	MW555516	*
<i>C. ferrugineovelatus</i>	HMAS291354	中国(China)	MW555513	*
<i>C. ferrugineovelatus</i>	HMAS291358	中国(China)	MW555512	*
<i>C. ferrugineovelatus</i>	HMAS291441	中国(China)	MW555518	*
<i>C. ferrugineovelatus</i>	HMAS291442	中国(China)	MW555517	*
<i>C. ferrugineovelatus</i>	HMAS291472	中国(China)	MW555519	*
<i>C. ferrugineovelatus</i>	H 7017995, 主模式(Holotype)	瑞典(Sweden)	NR_131875	GenBank
<i>C. fulvopaludosus</i>	H 6033460, 主模式(Holotype)	芬兰(Finland)	NR_154868	GenBank
<i>C. glabrellus</i>	HMAS291447	中国(China)	MW555520	*
<i>C. glabrellus</i>	MICH 10357, 主模式(Holotype)	美国(USA)	NR_170846	GenBank
<i>C. glaucopoides</i>	MICH 10358, 主模式(Holotype)	美国(USA)	NR_157938	GenBank

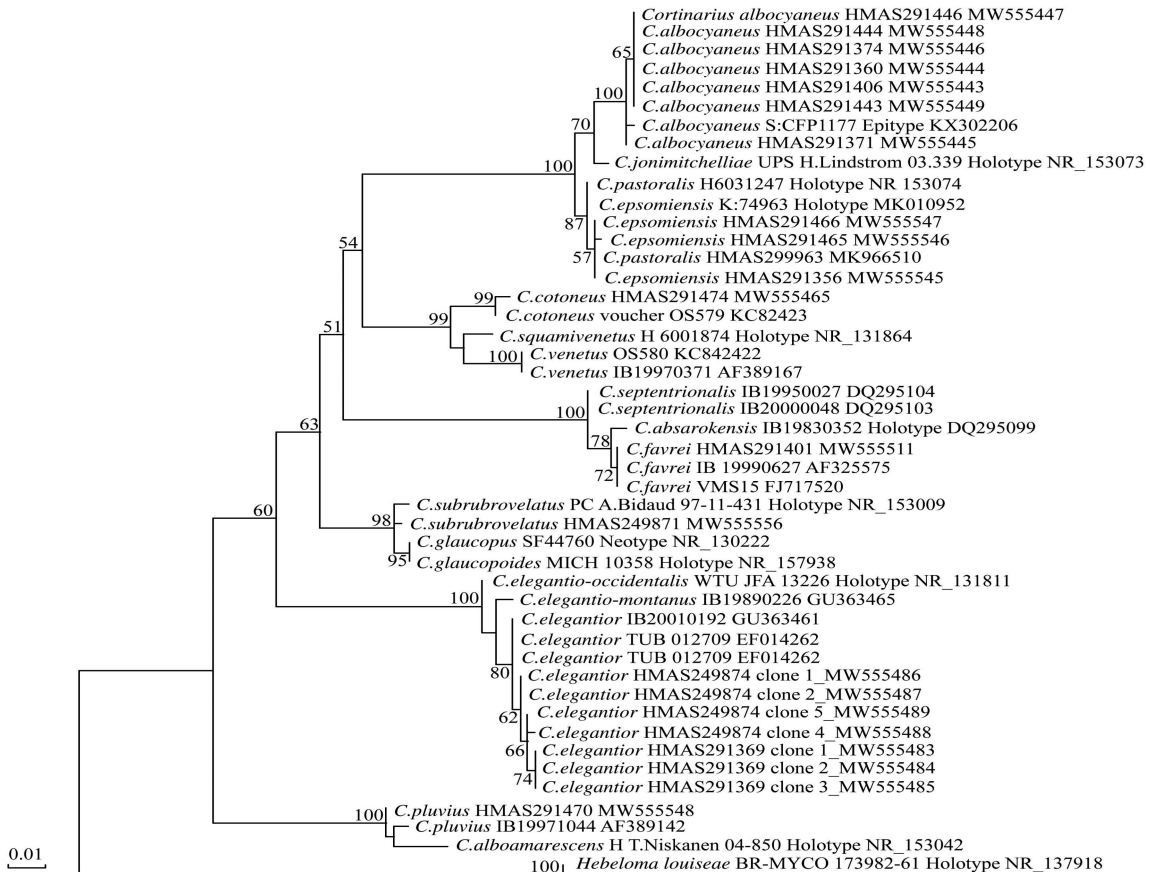
表 1 太行山区丝膜菌属系统发育分析相关序列信息(续)

学名 Name	凭证标本 Voucher	产地 Locality	GenBank 编号 GenBank accession No.	参考文献 References
<i>C.glaucopus</i>	S F44760,新模式(Neotype)	瑞典(Sweden)	NR_130222	GenBank
<i>C.hemitrichus</i>	HMAS291378	中国(China)	MW555523	*
<i>C.hemitrichus</i>	HMAS291357	中国(China)	MW555521	*
<i>C.hemitrichus</i>	HMAS291359	中国(China)	MW555522	*
<i>C.hemitrichus</i>	HMAS291435	中国(China)	MW555531	*
<i>C.hemitrichus</i>	HMAS291448	中国(China)	MW555524	*
<i>C.hemitrichus</i>	HMAS291451	中国(China)	MW555530	*
<i>C.hemitrichus</i>	HMAS291454	中国(China)	MW555526	*
<i>C.hemitrichus</i>	HMAS291456	中国(China)	MW555527	*
<i>C.hemitrichus</i>	HMAS291458	中国(China)	MW555528	*
<i>C.hemitrichus</i>	HMAS291499	中国(China)	MW555532	*
<i>C.hemitrichus</i>	HMAS291514	中国(China)	MW555525	*
<i>C.hemitrichus</i>	HMAS291515	中国(China)	MW555529	*
<i>C.hemitrichus</i>	F44875,新模式(Neotype)	瑞典(Sweden)	MT935113	[9]
<i>C.heterocyloideus</i>	06-247,主模式(Holotype)	挪威(Norway)	MF379632	GenBank
<i>C.heterocyclus</i>	S F14330,主模式(Holotype)	瑞典(Sweden)	NR_171337	GenBank
<i>C.heterodepressus</i>	H 6031902,主模式(Holotype)	芬兰(Finland)	NR_154869	GenBank
<i>C.himuleoarmillatus</i>	G 00052098,主模式(Holotype)	法国(France)	NR_131790	GenBank
<i>C.himuleocervinus</i>	HMAS281436	中国(China)	MW555535	*
<i>C.himuleocervinus</i>	HMAS281438	中国(China)	MW555534	*
<i>C.himuleocervinus</i>	HMAS291475	中国(China)	MW555533	*
<i>C.himuleocervinus</i>	HMAS249873	中国(China)	MW555536	*
<i>C.himuleocervinus</i>	H:T.Niskanen 12-175,主模式(Holotype)	美国(USA)	MG136827	GenBank
<i>C.hirtus</i>	PRM:154756,主模式(Holotype)	捷克(Czech)	MT935140	[9]
<i>C.impolitus</i>	MICH 10366	美国(USA)	NR_170848	GenBank
<i>C.jonimitchelliae</i>	H.Lindstrom 03.339,主模式(Holotype)	瑞典(Sweden)	NR_153073	GenBank
<i>C.minusculus</i>	HMAS291385	中国(China)	MW555538	*
<i>C.minusculus</i>	HMAS291367	中国(China)	MW555537	*
<i>C.minusculus</i>	HMAS291476	中国(China)	MW555539	*
<i>C.minusculus</i>	HMAS291479	中国(China)	MW555540	*
<i>C.minusculus</i>	H:T.Niskanen 12-031,主模式(Holotype)	芬兰(Finland)	MK211178	[20]
<i>C.minutulus</i>	HMAS291364	中国(China)	MW555541	*
<i>C.minutulus</i>	HMAS291517	中国(China)	MW555542	*
<i>C.minutulus</i>	HMAS291520	中国(China)	MW555543	*
<i>C.minutulus</i>	G:13297/157a,后选模式(Lectotype)	瑞士(Switzerland)	MT935232	[9]
<i>C.mucicola</i>	HMAS291415	中国(China)	MW555544	*
<i>C.mucicola</i>	H:T.Niskanen 09-205	美国(USA)	MT935237	[9]
<i>C.pastoralis</i>	H 6031247,主模式(Holotype)	芬兰(Finland)	NR_153074	GenBank
<i>C.pastoralis</i>	HMAS 279963	中国(China)	MK966510	[21]

表 1 太行山区丝膜菌属系统发育分析相关序列信息(续)

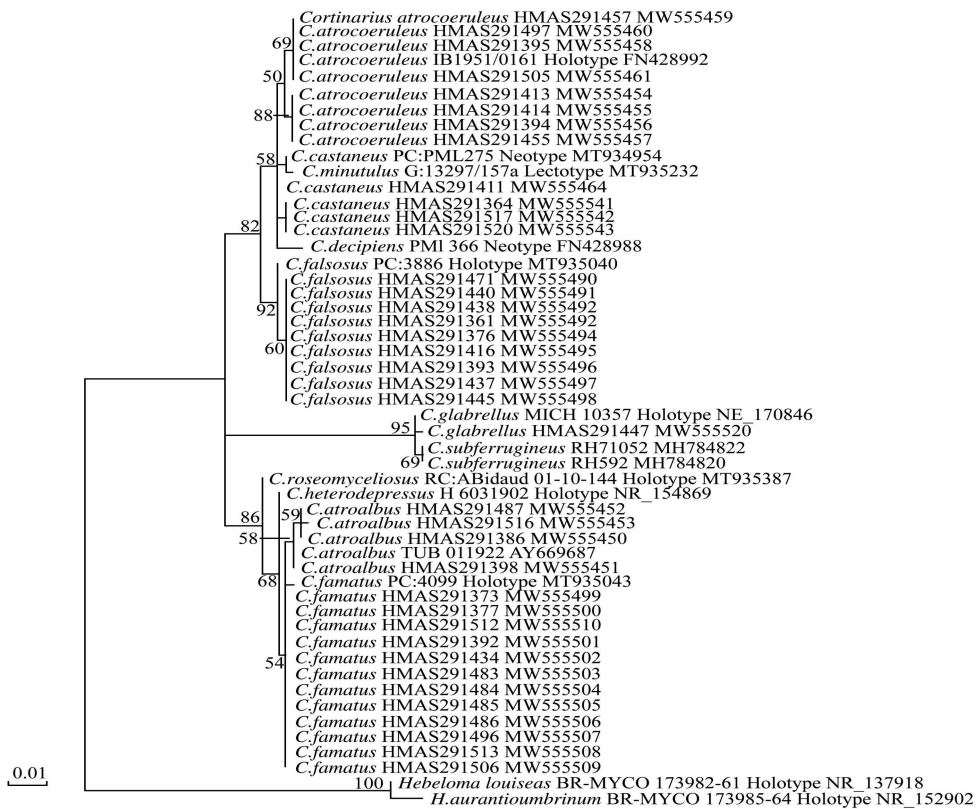
学名 Name	凭证标本 Voucher	产地 Locality	GenBank 编号 GenBank accession No.	参考文献 References
<i>C. pluvius</i>	HMAS291470	中国(China)	MW555548	*
<i>C. pluvius</i>	IB19971044	美国(USA)	AF389142	[22]
<i>C. roseomyceliosus</i>	PC: A. Bidaud 01-10-144, 主模式(Holotype)	法国(France)	MT935387	[9]
<i>C. saniosus</i>	HMAS291425	中国(China)	MW555549	*
<i>C. saniosus</i>	HMCFP739	瑞典(Sweden)	DQ102671	[23]
<i>C. scotoides</i>	HMAS291432	中国(China)	MW555550	*
<i>C. scotoides</i>	HMAS291464	中国(China)	MW555551	*
<i>C. scotoides</i>	G: 13312/166a, 主模式(Holotype)	瑞士(Switzerland)	MT935421	[9]
<i>C. septentrionalis</i>	IB19950027	挪威(Norway)	DQ295104	[10]
<i>C. septentrionalis</i>	IB20000048	格陵兰(Greenland)	DQ295103	[10]
<i>C. squamivenetus</i>	H 6001874, 主模式(Holotype)	芬兰(Finland)	NR_131864	GenBank
<i>C. suberythrinus</i>	HMAS291417	中国(China)	MW555553	*
<i>C. suberythrinus</i>	HMAS291459	中国(China)	MW555552	*
<i>C. suberythrinus</i>	G 56, 主模式(Holotype)	法国(France)	NR_171364	GenBank
<i>C. subferrugineus</i>	RH592	法国(France)	MH784820	GenBank
<i>C. subferrugineus</i>	RH71052	法国(France)	MH784822	GenBank
<i>C. subheterocyclus</i>	HMAS291433	中国(China)	MW555555	*
<i>C. subheterocyclus</i>	HMAS291522	中国(China)	MW555554	*
<i>C. subheterocyclus</i>	H 6029909, 主模式(Holotype)	芬兰(Finland)	MF379631	GenBank
<i>C. subpaleaceus</i>	H: I. Kytovuori 08-995, 主模式(Holotype)	芬兰(Finland)	MG136824	[9]
<i>C. subrubrovelatus</i>	HMAS249871	中国(China)	MW555556	*
<i>C. subrubrovelatus</i>	PC: A. Bidaud 97-11-431, 主模式(Holotype)	芬兰(Finland)	NR_153009	GenBank
<i>C. subscoitoides</i>	H: T. Niskanen 12-010, 主模式(Holotype)	芬兰(Finland)	MK211175	[20]
<i>C. subtilior</i>	HMAS291353	中国(China)	MW555557	*
<i>C. subtilior</i>	HMAS291427	中国(China)	MW555558	*
<i>C. subtilior</i>	G: 13316/167, 主模式(Holotype)	瑞士(Switzerland)	MT935534	[9]
<i>C. tenebricus</i>	HMAS291384	中国(China)	MW555562	*
<i>C. tenebricus</i>	HMAS291407	中国(China)	MW555559	*
<i>C. tenebricus</i>	HMAS291366	中国(China)	MW555561	*
<i>C. tenebricus</i>	HMAS291493	中国(China)	MW555563	*
<i>C. tenebricus</i>	HMAS291501	中国(China)	MW555560	*
<i>C. tenebricus</i>	HMAS291519	中国(China)	MW555564	*
<i>C. tenebricus</i>	G: 13514/168a, 主模式(Holotype)	瑞士(Switzerland)	MT935543	[9]
<i>C. venetus</i>	IB19970371	意大利(Italy)	AF389167	[22]
<i>C. venetus</i>	OS580	挪威(Norway)	KC842422	[13]
<i>Hebeloma aurantioumbrinum</i>	BR-MYCO 173985-64, 主模式(Holotype)	挪威(Norway)	NR_152902	GenBank
<i>H. louiseae</i>	BR-MYCO 173982-61, 主模式(Holotype)	挪威(Norway)	NR_137918	GenBank

注:模式标本序列编号以粗体字符标注; * 表示序列出自本研究。



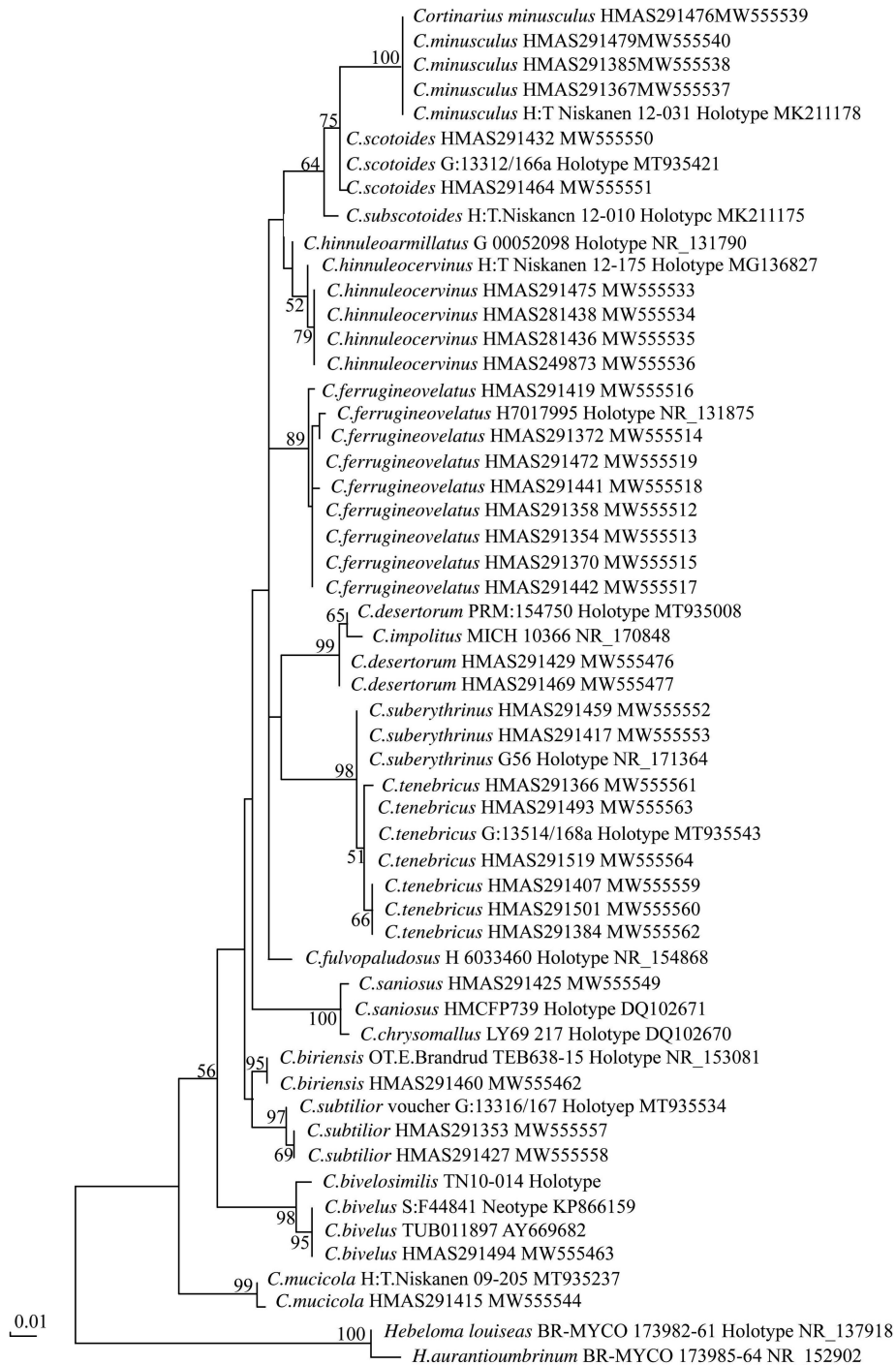
注:群组 1:白紫丝膜菌、棕绿丝膜菌、雅致丝膜菌、黄褐丝膜菌、黏黄丝膜菌、多雨丝膜菌和亚红幕丝膜菌。大于 50% 的 Bootstrap 值标注于分支处。

图 1 基于太行山区丝膜菌属 ITS 序列最大似然法分析



注:群组 2:黑盖丝膜菌、暗褐丝膜菌、栗色丝膜菌、湿小丝膜菌、褐盖丝膜菌和光滑丝膜菌。大于 50% 的 Bootstrap 值标注于分支处。

图 2 基于太行山区丝膜菌属 ITS 序列最大似然法分析



注: 群组 3: 比里丝膜菌、二环丝膜菌、褐小丝膜菌、锈幕丝膜菌、水褐丝膜菌、纤小丝膜菌、条纹丝膜菌、败血丝膜菌、红褐丝膜菌、亚砖红丝膜菌、细小丝膜菌和暗丝膜菌。大于 50% 的 Bootstrap 值标注于分支处。

图 3 基于太行山区丝膜菌属 ITS 序列最大似然法分析

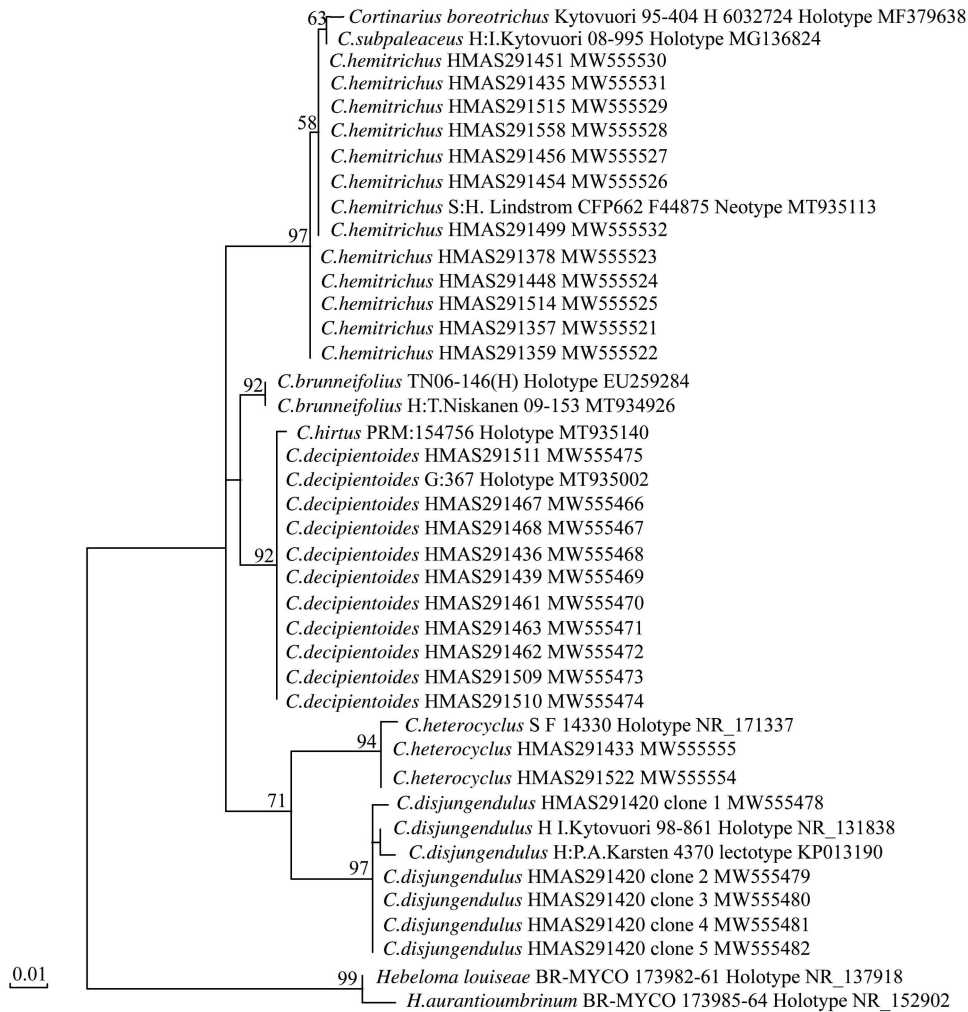
2.2 分类学

(1) 白紫丝膜菌 *Cortinarius albocyaneus* Fr., Monographia Hymenomycetum Sueciae 2:62 (1863)。

凭证标本: 北京市: 房山区, 百花山, HMAS 291443; HMAS 291444; HMAS 291446。河北省: 蔚县, 小五台山, HMAS 291491; 涞源县, 白石山, HMAS 291406; HMAS 291360; HMAS 291371; HMAS 291374; 平山县, 驼梁, HMAS 281437; HMAS 249872。

生境: 桦属(*Betula*)、落叶松(*Larix gmelinii*)和榆属(*Ulmus* spp.)林中。

白紫丝膜菌具有银白色带有紫色调的子实体。这个种被报道于西欧, 生长于山毛榉属(*Fagus*)林中^[24]。谢孟乐^[25]报道这个种分布于我国东北地区, 生长于桦属和落叶松混交林中。



注: 群组 4: 比里丝膜菌、双环丝膜菌、褐小丝膜菌、锈幕丝膜菌、水褐丝膜菌、纤小丝膜菌、条纹丝膜菌、败血丝膜菌、红褐丝膜菌、亚砖红丝膜菌、细小丝膜菌和暗丝膜菌。大于 50% 的 Bootstrap 值标注于分支处。

图 4 基于太行山区丝膜菌属 ITS 序列最大似然法分析

(2) 黑盖丝膜菌(本文新拟,中国新记录种) *Cortinarius atroalbus* M. M. Moser, Sydowia 45: 282 (1993)。

凭证标本: 河北省: 涞源县, 白石山, HMAS 291398; HMAS 291487; HMAS 291516; 平山县, 驼梁, HMAS 291386。

生境: 红桦(*Betula albosinensis*)、落叶松和榆属林中。

黑盖丝膜菌具有几乎黑色的菌盖和近白色的菌柄,其担孢子可长达约 10 μm 。Moser^[26] 基于产自美国的模式发表了这个种,生长于柳属(*Salix*)林中。

(3) 暗褐丝膜菌(本文新拟,中国新记录种) *Cortinarius atrocaeruleus* M. M. Moser ex M.M.Moser, Kleine Kryptogamenflora von Mitteleuropa -Die Blätter- und Baupilze (Agaricales und Gastromycetes) IIb/2: 336 (1967)。

凭证标本: 北京市: 门头沟区, 灵山, HMAS 291455; HMAS 291457。河北省: 阜平县, 天生桥, HMAS 291413; HMAS 291414; HMAS 291394; HMAS 291395; HMAS 291505; 灵寿县, 五岳寨, HMAS 291497。

生境: 辽东栎(*Quercus wutaishansea*)和油松(*Pinus tabuliformis*)林中。

这个种的菌盖为深褐色,从形态上与迷惑丝膜菌(*C. decipiens*)十分相似,曾被认为是后者的异名,但 Liimatainen 等^[9] 基于两者模式标本 ITS 序列分析的结果表明这两个种存在明显的差异。暗褐丝膜菌广布于欧洲,分布于云杉属(*Picea*)、桦属、杨属(*Populus*)和椴属(*Tilia*)林中^[27,28,29]。

(4) 比里丝膜菌(本文新拟,中国新记录种) *Cortinarius biriensis* Brandrud & Dima, Sydowia 69: 42 (2016)。

凭证标本:北京市:房山区,百花山,HMAS 291460。

生境:红桦林中。

比里丝膜菌的子实体非常纤小,很难从形态上将这个种与其他相近的小型丝膜菌区分开,其物种识别几乎完全依靠分子鉴定的结果。Brandrud 等^[30]基于产自挪威比里的模式标本报道了这个种,产自椴属林中。本研究发现自红桦林中。

(5) 双环丝膜菌 *Cortinarius bivellus* (Fr.) Fr., *Epicrisis Systematis Mycologici*:292 (1838)。

凭证标本:北京市:门头沟区,小龙门,HMAS 281441;房山区,百花山,HMAS 281644。河北省:涞源县,白石山,HMAS 291494;HMAS 291482;空中草原,HMAS 281640。

生境:红桦和榆属林中。

双环丝膜菌具有水浸状的黄褐色至锈褐色的菌盖,菌柄表面有显著的环纹,担孢子可长至 10 μm 。这个种在欧洲被报道生长在桦属林中^[31],在我国则生长在松属(*Pinus*)和栎属(*Quercus*)的混交林中^[32]。魏铁铮和姚一建^[32]报道了这个种分布于我国东北、西北和西南地区。

(6) 栗色丝膜菌 *Cortinarius castaneus* (Bull.) Fr., *Epicrisis Systematis Mycologici*:307 (1838)。

凭证标本:河北省,蔚县,小五台山,HMAS 291364;HMAS 291517;HMAS 291520;平山县,驼梁,HMAS 291411。

生境:桦属、杨属和槭属(*Acer*)林中。

栗色丝膜菌的菌盖中央具有深栗褐色的凸起,菌柄表面略带紫色。这个种被发现分布于西欧^[24,33]和北美^[34]。Keissler 和 Lohwag^[35]报道这个种分布于云南。根据 Liimatainen et al.^[9]的系统发育分析结果,栗色丝膜菌与 *Cortinarius minutulus* J.Favre 在系统学关系上极为接近,但该文章未将后者作为前者的异名。本研究也得到了相似的系统发育分析结果(见图 2),这两个种的关系有待于进一步探讨。*Cortinarius minutulus* 也有深褐色的菌盖,其它形态特征也与栗色丝膜菌相似^[31,36]。

(7) 棕绿丝膜菌 *Cortinarius cotoneus* Fr., *Epicrisis Systematis Mycologici*:289 (1838)。

凭证标本:河北省:平山县,驼梁国家级自然保护区,HMAS 291474。

生境:槭属和辽东栎林中。

棕绿丝膜菌的子实体带有橄榄色,菌盖表面由浓密的绒毛状小鳞片,担孢子近球形。在欧洲,这个种被报道生长于山毛榉属、榛属(*Corylus*)、鹅耳枥属(*Carpinus*)、栎属、椴树属和桦属林中^[31,37,38]。戴芳澜^[35]报道这个种分布于云南。

(8) 拟迷惑丝膜菌(本文新拟,中国新记录种) *Cortinarius decipientoides* Moëgne-Loec & Reumaux, *Bulletin Trimestriel de la Fédération Mycologique Dauphiné-Savoie* 28 (111):23 (1988)。

凭证标本:北京市:房山区,百花山,HMAS 291461;HMAS 291462;HMAS 291463;HMAS 291436;HMAS 291439;HMAS 291467;HMAS 291468。河北省:涞源县,白石山,HMAS 291509;HMAS 291510;HMAS 291511。

生境:红桦和榆属林中。

拟迷惑丝膜菌子实体褐色,担孢子可长至 14 μm 。这个种在欧洲分布于云杉属林中^[39,40]。

(9) 褐小丝膜菌(本文新拟,中国新记录种) *Cortinarius desertorum* (Velen.). G Garnier, *Bibliographie des Cortinaires D-O*:18 (1991)。

凭证标本:北京市:房山区,百花山,HMAS 291469。河北省:涞源县,白石山,HMAS 291418;HMAS 291429。

生境:红桦和榆属林中。

褐小丝膜菌具有小型的子实体和水浸状的褐色菌盖。最初报道于捷克斯洛伐克^[41]。

(10) 湿褐丝膜菌 *Cortinarius disjungendus* Kytöv, Liimat. & Niskanen, *Index Fungorum* 186:1 (2014)。

凭证标本:河北省:灵寿县,五岳寨,HMAS 291420。

生境:辽东栎和油松林中。

湿褐丝膜菌具有褐色的菌盖。这个种在瑞典被报道生长于云杉属林中^[42]。魏铁铮和刘铁志^[21]报道这

个种分布于内蒙古大兴安岭南部地区。

(11) 雅致丝膜菌 *Cortinarius elegantior* (Fr.) Fr., *Epicrisis Systematis Mycologici*:267 (1838)。

凭证标本:河北省,涞源县,空中草原, HMAS 291369; HMAS 249874。

生境:落叶松林中。

雅致丝膜菌具有鲜明的黄褐色的子实体和较大且表面有显著疣状凸起的担孢子。在欧洲和北美,这个种被报道生长在冷杉属和云杉属林中^[31,34,38]。邓叔群^[43]最早报道这个种分布于我国四川。

(12) 黄褐丝膜菌(本文新拟,中国新记录种) *Cortinarius epsomiensis* P.D.Orton, *The Naturalist London* 1958: 147 (1958)。

凭证标本:北京市:房山区,百花山, HMAS 291465; HMAS 291466。河北省:涞源县,白石山, HMAS291356。

生境:红桦和榆属林中。

黄褐丝膜菌具有中等大小的子实体、黄褐色的菌盖和近球形至宽椭圆形的担孢子。Liimatainen & Ainsworth^[18]报道这个种产自英国的半日花属(*Helianthemum*)等灌丛中。基于模式标本的 ITS 序列分析结果(见图 1),黄褐丝膜菌与田园丝膜菌(*C.pastoralis* Soop, H.Lindstr., Dima, Niskanen, Liimat.& Kytöv.)的序列差异极小,后者应为前者的异名。魏铁铮和刘铁志^[21]报道的田园丝膜菌也应鉴定为黄褐丝膜菌。

(13) 湿小丝膜菌(本文新拟,中国新记录种) *Cortinarius falsosus* Moënné-Locc & Reumaux, *Atlas des Cortinaires* 11:572 (2001)。

凭证标本:北京市:房山区,百花山景区, HMAS 291437; HMAS 291438; HMAS 291440; HMAS 291445; HMAS 291471。河北省:涞源县,白石山, HMAS 291376; 灵寿县,五岳寨, HMAS 291416; HMAS 291393; 平山县,驼梁, HMAS 291361。

生境:辽东栎、桦属、榆属和油松林中。

具有小型的子实体,菌盖褐色、水浸状,担孢子可长至 11 μm 。分布于西欧的松属、桦属、柳属和山毛榉属林中^[36,40]。

(14) 褐盖丝膜菌(本文新拟,中国新记录种) *Cortinarius famatus* Moënné-Locc & Reumaux, *Atlas des Cortinaires* 11:572 (2001)。

凭证标本:北京市:房山区,百花山, HMAS 291434。河北省:涞源县,空中草原, HMAS 291506; 白石山, HMAS 291373; HMAS 291377; HMAS 291483; HMAS 291484; HMAS 291485; HMAS 291486; HMAS 291512; HMAS 291513; 灵寿县,五岳寨, HMAS 291392; HMAS 291496; 平山县,驼梁, HMAS 291368。

生境:辽东栎、红桦、榆属和油松林中。

褐盖丝膜菌子实体小型或略大,菌盖褐色、水浸状。这个被报道分布于法国云杉属林中^[40]。

(15) 黏黄丝膜菌(本文新拟,中国新记录种) *Cortinarius favrei* D.M.Hend, *Notes from the Royal Botanical Garden Edinburgh* 22:593 (1958)。

凭证标本:河北省:涞水县,百草畔, HMAS 291401。

生境:松属、桦属和杨属。

黏黄丝膜菌菌盖和菌柄表面湿润时黏,菌盖黄褐色。报道于西欧和美国,分布于柳属林中^[26,31,44]。

(16) 锈幕丝膜菌(本文新拟,中国新记录种) *Cortinarius ferrugineovelatus* Kytöv, Liimat. & Niskanen, *Index Fungorum* 198:1 (2014)。

凭证标本:北京市:房山区,百花山, HMAS 291441; HMAS 291442; HMAS 291472。河北省:涞源县,空中草原, HMAS 291370; 白石山, 2019-08-21, HMAS 291404; 2020-8-4, HMAS 291419; HMAS 291354; HMAS 291358; HMAS 291372。

生境:红桦和榆属林中。

锈幕丝膜菌子实体纤小,菌盖暗褐色至黑褐色。Liimatainen^[7]报道了这个种分布于北欧、北美及伊朗,生长于云杉属混交林中。

(17) 光滑丝膜菌 *Cortinarius glabrellus* Kauffman, *Journal of Mycology* 13 (1):35 (1907)。

凭证标本:北京市:门头沟区,小龙门,HMAS 291447。

生境:辽东栎林中。

光滑丝膜菌具有光滑的水浸状褐色菌盖和表面近光滑的担孢子,分布于北美^[34]。谢支锡和王云^[45]报道这个种分布于我国东北地区,群生于栎属林中。

(18) 半毛盖丝膜菌 *Cortinarius hemitrichus* (Pers.) Fr., *Epicrisis Systematis Mycologici*; 302 (1838)。

凭证标本:北京市:门头沟区,清水镇,HMAS 291435; HMAS 291448; HMAS 291451; 灵山,HMAS 291454; HMAS 291456; HMAS 291458。河北省:涞源县,空中草原,HMAS 291499; 白石山,HMAS 291355; HMAS 291357; HMAS 291359; HMAS 291378; HMAS 291514; HMAS 291515。

生境:生长于桦属和榆属林中。

半毛盖丝膜菌具有灰褐色至褐色的菌盖,表面覆盖白色的绒毛或鳞片,菌褶浅紫灰色,担孢子表面有轻微疣状凸起。这个种分布于欧洲和北美,生长于桦属林中^[24,29,31,34]。卯晓岚等^[46]最早报道这个种分布于我国西藏。

(19) 水褐丝膜菌(本文新拟,中国新记录种) *Cortinarius hinnuleocervinus* Niskanen, Liimat. & Ammirati, *Index Fungorum* 344:2 (2017)。

凭证标本:河北省:阜平县,天生桥,HMAS 281438; HMAS 249873; 灵寿县,五岳寨 HMAS 281436; 平山县,驼梁,HMAS 291475。

生境:辽东栎、槭属和油松林中。

红褐丝膜菌具有红褐色的水浸状的菌盖,担孢子表面有强烈疣状凸起。Liimatainen^[47]报道这个种分布于北美柯属(*Lithocarpus*)和云杉属林中。

(20) 纤小丝膜菌(本文新拟,中国新记录种) *Cortinarius minusculus* Liimat & Niskanen, *Fungal Diversity* 96:182 (2019)。

凭证标本:河北省:涞源县,空中草原,HMAS 291479; 灵寿县,五岳寨,HMAS 291367; 平山县,驼梁,HMAS 291385。

生境:辽东栎、油松和落叶松林中。

这个种是丝膜菌中典型的小型种类。Hyde等^[20]报道这个种分布于北欧的桦属、榛属和杨属林中。

(21) 条纹丝膜菌(本文新拟,中国新记录种) *Cortinarius mucicola* A. H. Sm, *Lloydia* 7 (3): 208 (1944)。

凭证标本:河北省:阜平县,天生桥,HMAS 291415。

生境:桦属、杨属和油松林中。

条纹丝膜菌子实体小型至略大,具有水浸状的黄褐色菌盖,菌盖边缘有近透明的条纹。这个种分布于北美针叶林中^[48]。

(22) 多雨丝膜菌 *Cortinarius pluvius* (Fr.) Fr., *Epicrisis Systematis Mycologici*; 277 (1838)。

凭证标本:北京市:房山区,百花山,HMAS 291470。

生境:红桦林中。

多雨丝膜菌具有小型的子实体,表面黏,担孢子表面有轻微的疣状凸起。在欧洲,这个种被报道生长于松属、云杉属和桦属林中^[31,33,38,49]。谢孟乐^[25]报道这个种分布于我国东北地区的落叶松和桦属林中。

(23) 败血丝膜菌 *Cortinarius saniosus* (Fr.) Fr., *Epicrisis Systematis Mycologici*; 313 (1838)。

凭证标本:河北省:涞源县,白石山,HMAS 291421; 平山县,驼梁,HMAS 291409; HMAS 291425。

生境:桦属、辽东栎、榆属和油松林中。

败血丝膜菌菌盖黄褐色至褐色,有丝光。根据分子系统发育分析结果,这个种与 *C. chrysomallus* 极为接近(见图3)。Lindström et al.^[23]基于 ITS 系统发育分析的结果认为 *C. chrysomallus* 应为败血丝膜菌的同物异名。败血丝膜菌分布于西欧的赤杨(*Alnus japonica*)、杨、柳、松、桦属和榛属林中^[50,51,52,53]。袁明生和孙佩琼^[54]报道这个种分布于四川的针叶林中。

(24) 红褐丝膜菌(本文新拟,中国新记录种) *Cortinarius scotoides* J. Favre, *Ergebnisse der Wissenschaftlichen Untersuchungen des Schweizerischen Nationalparks* 5:204 (1955)。

凭证标本:北京市:门头沟区,百花山,HMAS 291432;房山区,百花山,HMAS 291464。

生境:红桦、辽东栎和油松林中。

红褐丝膜菌子实体小型,有红褐色的、具鳞片的菌盖。这个种报道于瑞士,分布于柳属林中^[31]。

(25) 亚砖红丝膜菌(本文新拟,中国新记录种) *Cortinarius suberythrinus* Moëgne-Loec, Bulletin Trimestriel de la Fédération Mycologique Dauphiné-Savoie 28 (111):24 (1988)。

凭证标本:北京市:门头沟区,灵山,HMAS 291459。河北省:涞源县,白石山,HMAS 291417。

生境:桦属林或稀树草甸中。

亚砖红丝膜菌子实体小型至稍大,菌盖红褐色。这个种报道自法国,分布于柳属林中^[33]。

(26) 亚杂环丝膜菌 *Cortinarius subheterocyclus* Liimat, Niskanen & Kytov, Index Fungorum 339:4 (2017)。

凭证标本:北京市:房山区,百花山,HMAS 291433。河北省:涞源县,白石山,HMAS 291522。

生境:红桦和榆属林中。

亚杂环丝膜菌的子实体红褐色,有水浸状的菌盖。这个种在北欧和西伯利亚有报道,常分布于云杉、松、桦、杨属的混交林中^[30,47]。我国报道于黑龙江,分布于杨、桦和榛属林中^[55]。

(27) 亚红幕丝膜菌(本文新拟,中国新记录种) *Cortinarius subrubrovelatus* (Bidaud) Kytöv, Liimat, Niskanen & Dima, Persoonia 33:128 (2014)。

凭证标本:北京市:门头沟区,灵山,HMAS 249871。

生境:桦属林中。

亚红幕丝膜菌子实体中型且粗壮,菌盖红褐色,菌柄表面附有红褐色内菌幕。这个种报道于欧洲,分布于杨属、榛属、山毛榉属、云杉属、冷杉属(*Abies*)和松属林中^[7,56]。

(28) 细小丝膜菌(本文新拟,中国新记录种) *Cortinarius subtilior* J. Favre, Ergebnisse der Wissenschaftlichen Untersuchungen des Schweizerischen Nationalparks 5:204 (1955)。

凭证标本:河北省:涞源县,白石山,HMAS 291403;HMAS 291427;HMAS 291353。

生境:红桦和榆属林中。

细小丝膜菌子实体小型,菌盖红褐色至栗褐色。这个种报道于欧洲,分布于柳属和仙女木属(*Dryas*)林中^[31,57,58]。

(29) 暗丝膜菌(本文新拟,中国新记录种) *Cortinarius tenebricus* J. Favre, Ergebnisse der Wissenschaftlichen Untersuchungen des Schweizerischen Nationalparks 5:204 (1955)。

凭证标本:河北省:蔚县,小五台山,HMAS 291407;HMAS 291366;HMAS 291384;HMAS 291493;HMAS 291501;HMAS 291519;平山县,驼梁,HMAS 291426。

生境:桦属、榆属、杨属和槭属林中。

暗丝膜菌子实体小型,菌盖黑褐色。这个种报道于西欧,分布于柳属和仙女木属林中^[31,52]。

3 讨论

近年来,随着菌物分子系统学的发展,越来越多丝膜菌物种被发现和报道。本研究所报道的29种丝膜菌中,包含18个中国新记录种,超过总数的62%;其中有9个种是国外学者近20年内发表的新种,超过总数的31%。随着形态分类与分子系统学手段相结合方法的应用,在太行山区乃至整个中国将会有更多的丝膜菌属物种被发现,其中必然会包括许多中国新记录种和新种。丝膜菌属是真菌界中已知的物种最多的属,相比之下,其形态分类鉴定所依据的特征却较为有限,因此,即使是丝膜菌属分类专家,仅仅依靠形态特征也难以区分如此众多的丝膜菌属物种。以此次太行山区调查所鉴定的丝膜菌属物种为例,比里丝膜菌、湿小丝膜菌、褐盖丝膜菌、锈幕丝膜菌、纤小丝膜菌、红褐丝膜菌、细小丝膜菌和暗丝膜菌等一些个体较小的物种,均具有深浅不一的褐色菌盖,且同一物种菌盖颜色因栖息地湿度等环境条件不同而变化,相似物种间无法通过稳定可靠的形态差异来明确界定。将基于ITS等特征性基因序列的分子系统学分析手段运用于丝膜菌属的分类研究,有助于区分许多形态上难以区分的相似物种,并揭示许多隐存的物种。此外,分子系统学分析方法也有力地支持了真菌分类单元的厘定工作。Liimatainen等^[9]基于ITS序列的系统发育分析,

对丝膜菌属中泰拉蒙亚属的 363 个物种进行整理,确认了其中的 184 个物种,发现了大量的同物异名。本研究基于模式标本序列的分析结果,也发现田园丝膜菌应为黄褐丝膜菌的异名。根据 Liimatainen 等^[9]提供 ITS 序列的比对结果,栗色丝膜菌与 *Cortinarius minutulus* 之间的差异很小,要明确二者间的相互关系还需更多形态学和分子系统学研究作为佐证。在支持真菌分类研究的同时,分子系统发育分析也能为分类学专业以外的人士提供了快速识别包括丝膜菌在内的菌物物种快速有效的方法,从而推进菌物学相关研究和应用领域的发展。

参 考 文 献

- [1] KIRK P M, CANNON P F, MINTER D W, et al. Dictionary of the fungi 10th ed[M]. Wallingford, UK: CAB International, 2008.
- [2] MOSER M M, HORAK E. *Cortinarius* Fr und nahe verwandte Gattungen in Südamerika[J]. Nova Hedwigia Beihefte, 1975, 52: 1-628.
- [3] YUAN H S, XU Lu, DAI Y C, et al. Fungal diversity notes 1277-1386: taxonomic and phylogenetic contributions to fungal taxa[J]. Fungal Diversity, 2020, 104: 1-266.
- [4] KELLER D H, MOSER M M, AMMIRATI J F. Orellanine and other fluorescent compounds in the genus *Cortinarius*, section *Orellani* [J]. Mycologia, 1985, 77: 667-673.
- [5] SUAREZ S V N, ORTEGA A, PEINTNER U, et al. Study on *Cortinarius* subgenus *Telamonia* section *Hydrocybe* in Europe, with especial emphasis on Mediterranean taxa[J]. Mycological Research, 2009, 113: 1070-1090.
- [6] HARROWER E, AMMIRATI J, CAPPUCINO A, et al. *Cortinarius* species diversity in British Columbia and molecular phylogenetic comparison with European specimen sequences[J]. Botany, 2011, 89: 799-810.
- [7] LIIMATAINEN K, NISKANEN T, DIMA B, et al. The largest type study of Agaricales species to date: bringing identification and nomenclature of *Phlegmacium* (*Cortinarius*) into the DNA era[J]. Persoonia, 2014, 33: 98-140.
- [8] DIMA B, LINDSTROM H, LIIMATAINEN K, et al. Typification of Friesian names in *Cortinarius* sections *Anomali*, *Spilomei* and *Bolares*, and description of two new species from northern Europe[J]. Mycological Progress, 2016, 15: 903-919.
- [9] LIIMATAINEN K, NISKANEN T, DIMA B, et al. Mission impossible completed: unlocking the nomenclature of the largest and most complicated subgenus of *Cortinarius*. *Telamonia* [J]. Fungal Diversity, 2020, 104: 291-331.
- [10] PEINTNER U. *Cortinarius alpinus* as an example for morphological and phylogenetic species concepts in ectomycorrhizal fungi[J]. Sommerfeltia, 2008, 31: 161-177.
- [11] GARNICA S, WEIβ M, OERTEL B, et al. A framework for a phylogenetic classification in the genus *Cortinarius* (Basidiomycota, Agaricales) derived from morphological and molecular data[J]. Canadian Journal of Botany, 2005, 83: 1457-1476.
- [12] NISKANEN T, LIIMATAINEN K, KYTOVUORI I. Two new species in *Cortinarius* subgenus *Telamonia*, *Cortinarius brunneifolius* and *C. leiocastaneus*, from Fennoscandia (Basidiomycota, Agaricales) [J]. Mycological Progress, 2008, 7: 239-247.
- [13] STENSRUD Ø, ORR R J S, REIER R K, et al. Phylogenetic relationships in *Cortinarius* with focus on North European species [J]. Karstenia, 2014, 54: 57-71.
- [14] LIIMATAINEN K, NISKANEN T, AMMIRATI J F, et al. *Cortinarius*, subgenus *Telamonia*, section *Disjungendi*, cryptic species in North America and Europe [J]. Mycological Progress, 2015, 14: 1016.
- [15] GARNICA S, SPAHN P, OERTEL B, et al. Tracking the evolutionary history of *Cortinarius* species in section *Calochroi*, with transoceanic disjunct distributions [J]. BMC Evolutionary Biology, 2011, 11: 213.
- [16] GARNICA S, WEIβ M, OERTEL B, et al. Phylogenetic relationships of European *Phlegmacium* species (*Cortinarius*, Agaricales) [J]. Mycologia, 2003, 95: 1155-1170.
- [17] GARNICA S, MUENZMAY T, SAAR G. *Cortinarius* subsektion *Elegantiores* in Europa [J]. Journal des J E C, 2006, 8: 79-102.
- [18] LIIMATAINEN I, AINSWORTH A M. Fifteen *Cortinarius* species associated with *Helianthemum* in Great Britain: results of a DNA-based analysis [J]. Field Mycology, 2018, 19(4): 119-135.
- [19] PEINTNER U, BOUGHER N L, CASTELLANO M A, et al. Multiple origins of sequestrate fungi related to *Cortinarius* (Cortinariaceae) [J]. American Journal of Botany, 2001, 88: 2168-2179.
- [20] HYDE K D, TENNAKOON D S, JEEWON R, et al. Fungal diversity notes 1036-1150: taxonomic and phylogenetic contributions on genera and species of fungal taxa [J]. Fungal Diversity, 2019, 96: 1-242.
- [21] 魏铁铮, 刘铁志. 赤峰市大兴安岭南部地区大型担子菌资源调查 [J]. 聊城大学学报(自然科学版), 2019, 32(6): 76-89.
- [22] PEINTNER U, MONCALVO J M, VILGALYS R. Toward a better understanding of the infrageneric relationships in *Cortinarius* (Agaricales, Basidiomycota) [J]. Mycologia, 2004, 96: 1042-1058.
- [23] LINDSTROM H, BENDIKSEN E, BENDIKSEN K, et al. Studies of the *Cortinarius saniosus* (Fr.: Fr.) Fr complex and a new closely related species, *C. aureovelatus* (Basidiomycota, Agaricales) [J]. Sommerfeltia, 2008, 31: 139-159.
- [24] MASSEE G. British Fungus - Flora, Vol II [M]. New York: George Bell & Sons, 1893.

- [25] 谢孟乐.东北地区丝膜菌属资源及分类学研究[D].长春:吉林农业大学,2018.
- [26] MOSER M.Studies on North American Cortinari III The *Cortinarius* flora of dwarf and shrubby Salix associations in the alpine zone of the Windriver Mountains, Wyoming, USA[J].Sydowia,1993,45:275-306.
- [27] MOSER M.Rare,debated and new taxa of the genus *Cortinarius* (Agaricales) [J].Fungi Non Delineati, 2001,15:1-57.
- [28] CONSIGLIO G, ANTONINI D, ANTONINI M. Il genere *Cortinarius* in Italia. Part quarta. A.M.B[M]. Trento: Fondazione Centro Studi Micologici, 2006.
- [29] BIDAUD A,MOENNE L P,REUMAUX P,et al.Atlas des Cortinaires [M].Editions Fédération Mycologique Dauphiné-Savoie,2010,19:1405-1540.
- [30] BRANDRUD T E,DIMA B,LIIMATAINEN K,et al.Telamonioid *Cortinarius* of the *C puellaris* group from calcareous Tilia forests[J].Sydowia,2017,69:37-45.
- [31] BREITENBACH J,KRANZLIN F.Fungi of Switzerland[M].Vol 5: Agarics 3rd part Cortinariaceae Luzern,Switzerland:Verlag Mykologia Luzern,2000.
- [32] WEI T Z,YAO Y J.Three species of *Cortinarius* new to China[J].Mycosystema,2013,32 (Suppl):160-166.
- [33] BIDAUD A,MOENNE L P,REUMAUX P,et al.Atlas des cortinaires [J].Editions Fédération Mycologique Dauphiné-Savoie,2000,10:411-526.
- [34] KAUFFMAN C H.*Cortinarius*.In North America Flora[J].1932,10 (5):282-348.
- [35] 戴芳澜.中国真菌总汇[M].北京:科学出版社,1979.
- [36] DE C G I.*Cortinarius* Ibero-Insulares I[J].Fungi Non Delineati,2007,41/42:1-272.
- [37] BRANDRUD T E,BENDIKSEN E.The *Cortinarius* species of calciphilous *Tilia-Corylus* and *Quercus-Corylus* woodlands of Fennoscandia,outposts of the temperate *Fagus* and *Quercus-Carpinus* forest types of C Europe[J].Journal des J E C,2001,3:105-113.
- [38] SOOP K.*Cortinarius* in Sweden[M].Mora,Sweden:Éditions Scientrix,2014.
- [39] REUMAUX P,MOENNE P.1988 En marge de l'Atlas des *Cortinaires* (2ème partie) [J].Bulletin Trimestriel de la Fédération Mycologique Dauphiné-Savoie,2004,28(111):23-26.
- [40] BIDAUD A,MOENNE P,REUMAUX P,et al.Atlas des Cortinaires [M].Editions Fédération Mycologique Dauphiné-Savoie,2001.
- [41] VELENOVSKY J.Novitates Mycologicae[M].1939.
- [42] NISKANEN T.Nomenclatural novelties[J].Index Fungorum,2014,186:1-2.
- [43] 邓叔群.中国的真菌[M].北京:科学出版社,1963.
- [44] HENDERSON D M.New and interesting Scottish Fungi[J].Notes from the Royal Botanical Garden Edinburgh,1958,22:593-599.
- [45] 谢支锡,王云.中国东北地区丝膜菌属研究[J].山西大学学报,1983,1983(1):71-88.
- [46] 卯晓岚,蒋长坪,欧珠次旺.西藏大型经济真菌[M].北京:北京科学技术出版社,1993.
- [47] LIIMATAINEN K,NISKANEN T,KYTOVUORI I.Nomenclatural novelties[J].Index Fungorum,2017,339:1-5.
- [48] SMITH A H.New and interesting *Cortinarius* form North America[J].Lloydia,1944,7:163-235.
- [49] SENN I B,WIEDMER E,BIERI G.*Cortinarius*-Arten der Grünerle (*Alnus viridis*) unter besonderer Berücksichtigung der Sporenmasse [J].Journal des J E C,2001,3:10-32.
- [50] CAMPO E.Cortinari del Friuli-Venezia Giulia[J].Journal des J E C,2003,5:15-24.
- [51] DE C G I.*Cortinarius* Ibero-insulares - 2[J].Fungi Non Delineati,2009,48/49:1-247.
- [52] BIDAUD A,CARTERET X,REUMAUX P,et al.Atlas des Cortinaires [M].Editions Fédération Mycologique Dauphiné-Savoie,2012.
- [53] CUTIERREZ C,BALLARA J,SUAREZ E,et al.Cortinarios de aparición primaveral 2[J].Journal Des J E C,2013,15:41-82.
- [54] 袁明生,孙佩琼.四川蕈菌[M].成都:四川科技出版社,1995.
- [55] CHENG G H,AN X Y,XIE M L,et al.New records of *Cortinarius* species collected from Heilongjiang Province in China[J].Journal of Fungal Research,2019,17(2):67-73.
- [56] BIDAUD,MOENNE L,REUMAUX,et al.Atlas des Cortinaires (Meyzieu) [M].Editions Fédération Mycologique Dauphiné-Savoie, 2008.
- [57] EYSSARTIER G,DELANNOY A.Notes sur quelques espèces arctiques et alpines[J].Fungi Non Delineati,2006,32:1-87.
- [58] DE C G I.*Cortinarius* Ibero-insulares - 4[J].Fungi Non Delineati,2014,71/72:1-248.

蓖麻生长素外输载体 PIN 蛋白家族 的生物信息学分析

郑钧伦, 罗 琼, 李子彤, 门淑珍

(南开大学 生命科学学院, 天津 南开 300071)

摘 要 PIN 蛋白家族是植物重要的生长素外输载体,通过介导细胞间的生长素极性运输来调控生长素在植物组织间的差异分布,从而调控植物的生长发育。**目的:**分离鉴定出蓖麻中 PIN 蛋白家族成员,为蓖麻生长素极性运输机制的研究奠定基础。**方法:**利用生物信息学分析软件,以拟南芥 PIN 基因家族序列为模板,在蓖麻基因组数据库中进行 PIN 基因鉴定,并对鉴定到的候选基因进行序列分析、所编码蛋白的结构域分析、信号肽预测、磷酸化位点分析以及系统进化分析。**结果:**蓖麻中共鉴定到 7 条编码 PIN 蛋白的同源序列,平均长度为 537 个氨基酸残基,平均分子量为 58.64 ku,均属于脂溶性较好的碱性蛋白,结构稳定,具有 9 至 10 个跨膜结构域。系统进化分析结果表明,蓖麻 PIN 基因与同属于大戟科的木薯、橡胶树和麻风树的 PIN 基因进化关系较为密切。利用蓖麻基因表达数据库对鉴定到的 *RcPIN* 基因的表达模式进行了分析,并利用 RT-PCR 进行了验证,结果表明,*RcPIN1-1* 和 *RcPIN1-2* 在根、叶、雌花和胚中表达水平较高,*RcPIN2* 主要在根中表达,*RcPIN3*、5、6 和 8 在所有检测的组织均有表达。

关键词 蓖麻;生长素;PIN 蛋白家族;生物信息学分析

中图分类号 Q94

文献标识码 A



开放科学(资源服务)标识码(OSID)

Bioinformatics Analysis of the Auxin Efflux Carrier PIN Proteins of *Ricinus communis* L.

ZHENG Junlun, LUO Qiong, LI Zitong, MEN Shuzhen

(College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract PIN family proteins are important auxin efflux carriers in plants, which regulate the differential distribution of auxin between plant tissues by mediating the polar auxin transport between cells, thus regulating the growth and development of plants. **Objective:** To isolate and identify PIN protein family members in castor bean and lay a foundation for the study of polar auxin transport mechanism in castor bean (*Ricinus communis* L.). **Methods:** Using bioinformatics analysis software, *Arabidopsis thaliana* PIN gene family sequences were used to identify the *RcPIN* genes in castor bean genome database. Sequence analysis, domain analysis, signal peptide prediction, phosphorylation site analysis and phylogenetic analysis of the identified candidate genes were carried out. **Results:** Seven PIN protein homologous sequences were identified in castor bean, with an average length of 537 amino acid residues and an average molecular weight of 58.64kD.

收稿日期:2020-12-05

基金项目:国家自然科学基金项目(31870230,31570247,91417308)资助

通讯作者:门淑珍,女,汉族,博士,教授,博士生导师,研究方向:植物生理与分子生物学,E-mail:shuzhenmen@nankai.edu.cn.

All of them were basic proteins with good fat-solubility, stable structure and with 9 to 10 transmembrane domains. Phylogenetic analysis demonstrated that *PIN* genes in castor bean is closely related to the ones in *Manihot esculenta*, *Jatropha curcas* and *Hevea brasiliensis*. Expression patterns of the *RcPIN* genes were analyzed using publicly available transcriptome database and by RT-PCR. The results showed that *RcPIN1-1* and *RcPIN1-2* genes were strongly expressed in root, leaf, female flower and embryo; *RcPIN2* gene was mainly expressed in root; *RcPIN3, 5, 6* and *8* genes were expressed in all the tissues examined.

Key words Castor bean (*Ricinus communis* L.); Auxin; PIN protein family; Bioinformatics

0 引言

生长素(auxin)广泛存在于各种植物中,是最早在植物体被发现并进行研究的激素之一。虽然结构简单,但其能实现的功能却十分复杂,在植物生长和发育的许多过程中都发挥着至关重要的作用。生长素通过在不同的组织建立浓度梯度影响植物细胞的伸长、分裂与分化等过程,从而调节植株的向重力性和向光性生长,调控植物组织器官的发育和分化,如胚的形成、器官发生和形态建成、花芽的萌发以及果实的发育与成熟等^[1,2]。一般认为,生长素在茎尖、根尖和正在发育的幼叶等生长活跃的组织中合成,通过维管系统以被动运输或主动运输的方式运送至目标组织和器官。研究表明,植物产生生长素浓度梯度主要是通过主动运输,该运输方式就是生长素所特有的极性运输(polar auxin transport, PAT)机制。

在极性运输的作用下,植物的一些发育特性开始出现,比如维管发生、顶端优势和向性生长等等^[2]。一般生长素在植物中的极性运输主要指茎尖向茎基部,以及茎基向根部的运输。进一步的研究表明,生长素极性运输除了上述运输途径外,还包括在组织内部的局部定向运输,例如生长素在根的表皮细胞和侧根冠细胞中的向基(从根尖向根基部)运输及其通过皮层细胞向根尖的回流^[3,4]。

生长素浓度梯度分布决定了植物的生长发育模式,而生长素的转运蛋白对于生长素的梯度分布起着关键作用。因此,对生长素极性运输的载体蛋白及其调节机制的研究是生长素研究的热点。截至现在,人们已经鉴定出几种生长素转运蛋白,包括 AUXIN1/LIKE-AUX1(AUX / LAX)、PIN-FORMED(PIN)、ATCB(ATP-binding cassette transporters B sub-family)转运蛋白和类 PIN 蛋白(PIN-LIKES, PILS)转运蛋白^[3,5]。这些生长素的载体蛋白根据亚细胞定位及功能不同可分成两类:一类定位于细胞质膜,作为生长素的输入或输出载体负责细胞间的生长素极性运输,包括 AUX/LAX 家族蛋白、大部分 PIN 家族蛋白以及 ATCB 转运蛋白;另一类主要定位于内质网膜,维持细胞内生长素的稳态^[3],包括 PILS 以及 PIN 蛋白的短链亚族成员。

PIN 蛋白由两侧的疏水区与一个位于中央的亲水区构成。研究最多的是拟南芥 AtPIN 家族,有 8 个成员(AtPIN1-AtPIN8),由于最先发现的 *atpin1* 突变体花序呈针状(pin-formed)而得名。后根据亲水环长度及亚细胞定位不同将其分为三个亚族:第一类包括 AtPIN1-AtPIN4 和 AtPIN7,它们都具有长的亲水环,极性定位于质膜;第二类包括 AtPIN5 和 AtPIN8,具有短的亲水环,定位于内质网膜;AtPIN6 属于第三类,具有较长的亲水环,具有质膜和内质网膜的双重定位^[5,6]。研究表明,*PIN* 基因家族是从同一祖先基因进化而来,其成员之间的蛋白结构的差异主要来自于其中央亲水环的差异,并通过对中央亲水环不同的磷酸化位点修饰使 AtPIN 蛋白家族成员功能各异^[6-8]。长链家族的 AtPIN1-AtPIN4 以及 AtPIN7 的功能研究比较深入,它们都极性定位于细胞膜,将胞内的生长素运输至细胞外,形成与维持组织中生长素的浓度梯度^[2-5,9]。PIN1 蛋白主要定位于维管组织细胞的底部细胞膜,参与生长素的极性运输,同时影响器官发生、维管分化、花芽和叶脉的形成^[2-5,9];PIN2 蛋白在根尖伸长区和胚中表达,也参与极性运输,调控植物的向重力生长^[10]。PIN1、PIN3、PIN4 和 PIN7 蛋白也参与根的向重力生长和茎的负向重力生长^[11]。此外, PIN3 和 PIN4 蛋白还参与控制植物的向光性生长,并与早期侧根的发育有关^[12]。PIN5 蛋白定位于内质网,负责生长素从胞质到内质网的运输,通过调节细胞质内的生长素浓度而参与侧根生长、早期胚的发生以及根与子叶的生长等一系列与生长素调控有关的植物发育过程^[13];PIN6 蛋白由于磷酸化作用的影响,使它既可以定位于细胞膜也可以定位于内质网,通过两种定位方式来同时调节胞内外的生长素极性运输与胞质间的生长

素动态平衡, PIN6 蛋白也参与了由生长素信号转导决定的植物发育过程, 如主/侧根的发育和生长、根毛的生长以及顶端优势的形成等等^[14]。PIN8 蛋白定位于内质网, 参与花粉、雄配子体以及孢子体的形成^[15]。

迄今为止, 人们已经通过全基因组测序在三十余种植物中鉴定出 PIN 基因家族, 成员数目在 4(地钱, *Marchantia polymorpha*) 至 23(大豆, *Glycine max*) 之间^[3]。遗传学分析证明, 在进化过程中的基因组重复是导致 PIN 基因在不同物种中的数量差异的主要原因。尽管人们对 PIN 蛋白家族的研究在不断深入, 许多植物的 PIN 基因也不断被发现, 但一些需要受到研究关注的植物却一直没有研究。蓖麻(*Ricinus communis L.*) 是大戟科(Euphorbiaceae) 蓖麻属(*Ricinus*) 下的唯一物种。它原产于非洲, 目前在中国、印度和巴西均有大面积栽培。作为世界十大油料作物之一, 蓖麻产出的蓖麻籽可以用于提炼榨取蓖麻油, 其不仅可以作为生物柴油, 而且还是化工领域中重要的原材料之一。在人类对生态环境保护日益重视的今天, 由于蓖麻的含油量高、油质好且具有一定的可再生性, 被认为是最有希望的石油替代者^[16]。

本研究以功能已基本明确的拟南芥 PIN 蛋白家族序列为参考, 在蓖麻基因组数据库中检索蓖麻编码 PIN 蛋白的同源基因序列, 并通过生物信息学方法系统分析目的基因的序列信息, 以及该基因家族的进化关系和保守基序特征, 旨在为将来开展蓖麻 PIN 蛋白家族的生物学功能研究提供参考信息, 为蓖麻生长素的极性运输机制研究奠定基础, 为蓖麻种植行业的发展提供理论依据。

1 实验方法

1.1 实验材料

蓖麻种子由南开大学生命科学学院的李秀兰老师提供, 于南开大学生命科学学院试验田种植。剪取水培蓖麻幼苗的根、土中正常生长植株二叶期的茎和叶、盛花期植株的雌花、雄花和果实组织用于提取表达分析所用的总 RNA。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成。采用北京全式金生物技术有限公司 RNA 提取试剂盒(ET121) 提取蓖麻各组织材料的总 RNA。采用北京全式金生物技术有限公司反转录试剂盒(AE301) 合成 cDNA 第一链。

表 1 RT-PCR 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')
ReACTIN7_F	ACTGGAATGGTGAAGGCTGG
ReACTIN7_R	GCAGTCTCAAGTTCTTGCTCG
RePIN1-1_F	AGCCTCATTGGCCTTACCTG
RePIN1-1_R	CCCACCTTGTTCCTCCCTT
RePIN1-2_F	ATGATCACAGCTTTAGACTTTTACC
RePIN1-2_R	ACCATCTTCTTTAATCTCAGCTTC
RePIN2_F	GCTCAAGTGCCTCTCCAGTT
RePIN2_R	GTGGCCACGAAGACCAATA
RePIN3_F	AATGCTAGTGGCCCTTGGTC
RePIN3_R	GGATTTCGGCGCTGGATAAGA
RePIN5_F	CACTAGTCGTGGGTGTTCTT
RePIN5_R	TAACACCGGAAGCGACACAA
RePIN6_F	AATACCCTGCGCCATTCA
RePIN6_R	CACAAATGAACCGGATCGCC
RePIN8_F	TGTCTACCATGTGGTGGCTT
RePIN8_R	GCTTGCCCATATCAGACCCA

1.2.2 *RcPIN* 基因在蓖麻各组织的表达。以上述获得的 cDNA 为模板,利用 *RcPIN* 基因的特异引物进行 RT-PCR。利用蓖麻的 *RcACTIN7* 基因作为内参。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表 1。

1.2.3 生物信息学分析工具。实验使用的序列数据来自于 TAIR 数据库、NCBI 数据库和 Phytozome 数据库。通过生物信息学手段分析蓖麻中编码 PIN 蛋白的同源基因,使用的生物信息学分析工具如表 2。

表 2 生物信息学分析工具

软件/数据库名称	版本/网址	使用功能
TAIR ^[17]	https://www.arabidopsis.org/	拟南芥序列查找
NCBI BLAST	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	BLAST 分析
Phytozome ^[18]	https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!search?show=BLAST	BLAST 分析
maizeGDB ^[19]	https://www.maizegdb.org/	玉米序列查找
RGAP 7 ^[20]	http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml	水稻序列查找
ExPASy ^[21]	http://web.expasy.org/protparam/	理化性质分析
CDD ^[22]	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd	保守结构域分析
MAFFT Version 7 ^[23,24]	https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/	多序列比对
MEGA ^[25-28]	Version 7.0.26	进化树构建
GSDS2.0 ^[29]	http://gsds.cbi.pku.edu.cn/	基因结构分析
SOPMA ^[30]	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html	二级结构分析
HMMTOP ^[31,32]	http://www.enzim.hu/hmmtop/index.php	跨膜结构域分析
TMRPres2D ^[33]	http://biophysics.biol.uoa.gr/TMRPres2D/index.jsp	跨膜结构域绘制
SignalP5.0 ^[34]	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/index.php	信号肽预测
NetPhos 3.1 ^[35,36]	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/	磷酸化位点分析
Jalview ^[37]	Version 2.11.1.0	序列比对图绘制
RcDB	https://woodyoilplants.iflora.cn/	基因表达分析
TBtools ^[38]	Version 0.674	热图绘制

2 实验结果

2.1 蓖麻 PIN 蛋白家族的序列分析

为了检索蓖麻中编码 PIN 蛋白的同源序列,以拟南芥的 8 条 PIN 蛋白序列为模板,在蓖麻基因组数据库中进行比对,删除掉得分较低的亚型,共获得 7 条蓖麻 PIN 蛋白序列,对其逐一进行分析。

表 3 蓖麻 PIN 蛋白家族成员信息

蛋白	RcPIN1-1	RcPIN1-2	RcPIN2	RcPIN3	RcPIN5	RcPIN6	RcPIN8
序列编号	LOC_8269287	LOC_8283128	LOC_8289123	LOC_8258189	LOC_8275005	LOC_8277845	LOC_8276026
氨基酸数量(aa)	592	609	637	646	357	565	356
分子量(u)	64079.060	66926.160	69389.300	70391.180	38889.160	61771.950	39047.540
理论等电点(pI)	8.780	8.880	9.240	8.170	8.260	9.040	9.520
不稳定系数(II)	33.440	34.120	39.240	39.350	35.210	35.550	33.800
亲水性系数(GRAVY)	0.247	0.040	0.120	0.094	0.787	0.282	0.635
脂溶指数(AI)	98.990	86.190	88.370	91.520	114.710	101.650	122.250
Mem_trans	9-190,	9-190,	9-190,	9-190,	10-350	10-189,	9-351
结构域位置	431-591	415-604	476-636	485-641		380-560	

理化性质分析结果显示,蓖麻 PIN 蛋白平均长度约为 537 个氨基酸残基,平均分子量为 58.64 ku。编

码氨基酸最长的是 RcPIN3 蛋白,长度为 646 个氨基酸残基,预测分子量为 70.39 ku;编码氨基酸最短的是 RcPIN8 蛋白,长度为 356 个氨基酸,预测分子量为 39.05 ku。蓖麻 PIN 蛋白的理论等电点变化范围在 8.17 (RcPIN3)至 9.52(RcPIN8)之间,均大于 7,平均理论等电点为 8.84,结果如表 3 所示。不稳定系数分析结果显示,RcPIN1-1、RcPIN1-2、RcPIN2、RcPIN3、RcPIN5、RcPIN6、RcPIN8 蛋白不稳定系数均小于 40,为稳定蛋白。它们的脂溶指数都较高,证明它们脂溶性较好。亲水性系数分析结果显示,根据亲水性系数正值为亲水性,负值为疏水性,介于-0.5 至+0.5 之间为两性蛋白的原则^[39],RcPIN5、RcPIN8 蛋白为疏水性蛋白,其余蛋白均为两性蛋白。保守结构域分析结果显示,除了 RcPIN5、RcPIN8 只有一个 Mem_trans 保守结构域外,其余 PIN 蛋白均具有两个 Mem_trans 保守结构域,结果如表 3 所示。

通过比对拟南芥和蓖麻的 PIN 蛋白序列,构建进化树,然后进行基因结构分析,结果显示,拟南芥与蓖麻聚集到一起的基因均有较为相似的基因结构,如图 1 所示。RcPIN1-1、RcPIN1-2 与 AtPIN1 均有 5 个内含子,6 个外显子。AtPIN2 有 8 个内含子,9 个外显子,而 RcPIN2 有 5 个内含子,6 个外显子。RcPIN3、AtPIN3、AtPIN4 和 AtPIN7 均有 5 个内含子,6 个外显子。RcPIN5 和 AtPIN5 均有 4 个内含子,5 个外显子。RcPIN6 与 AtPIN6 均有 6 个内含子,7 个外显子。AtPIN8 与 RcPIN8 均有 5 个内含子,6 个外显子。

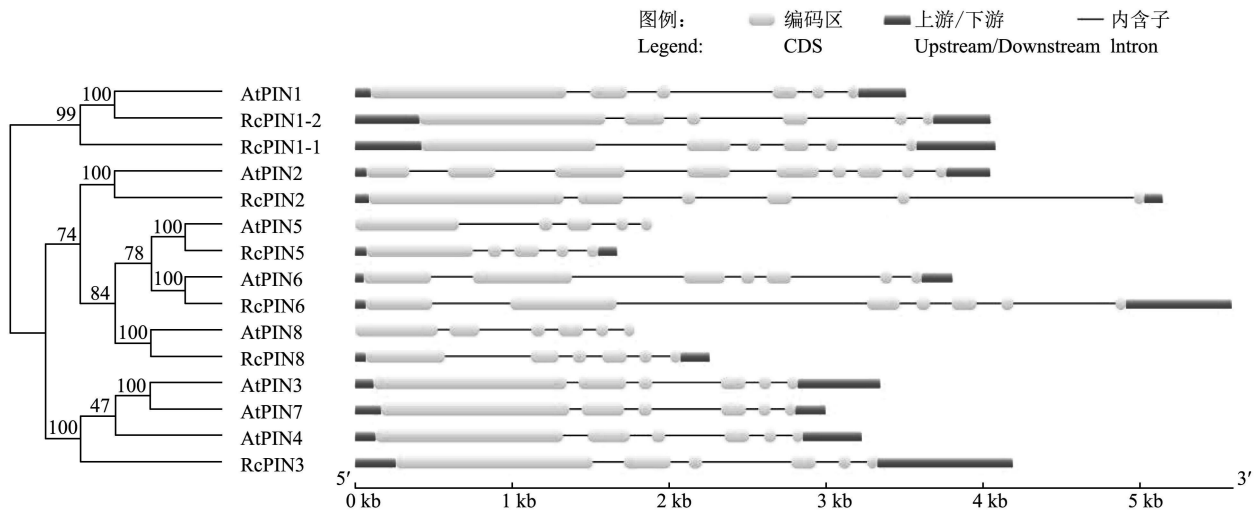


图 1 拟南芥与蓖麻 PIN 蛋白家族的进化关系与基因结构

对蓖麻 PIN 蛋白的二级结构进行分析,结果如表 4 所示。从二级结构分析结果可以看出,它们的二级结构主要由 α 螺旋、延伸链、 β 转角和无规则卷曲组成。其中 RcPIN1-1、RcPIN1-2、RcPIN2、RcPIN3 和 RcPIN6 的二级结构的数量表现为无规则卷曲> α 螺旋>延伸链> β 转角,而 RcPIN5 和 RcPIN8 则表现为 α 螺旋>无规则卷曲>延伸链> β 转角, β 转角是这些蛋白中数量最少的结构。

表 4 蓖麻 PIN 蛋白家族的二级结构

基因	α 螺旋	延伸链	β 转角	无规则卷曲
RcPIN1-1	180(30.14%)	90(15.20%)	31(5.24%)	291(49.16%)
RcPIN1-2	189(31.03%)	93(15.27%)	29(4.76%)	298(48.93%)
RcPIN2	194(30.46%)	100(15.70%)	30(4.71%)	313(49.14%)
RcPIN3	204(31.58%)	108(16.72%)	35(5.42%)	299(46.28%)
RcPIN5	188(52.66%)	51(14.29%)	20(5.60%)	98(27.45%)
RcPIN6	195(34.51%)	88(15.58%)	25(4.42%)	257(45.49%)
RcPIN8	198(55.62%)	49(13.76%)	21(5.90%)	88(24.72%)

PIN 蛋白主要负责将生长素转运至胞外,是植物细胞重要的跨膜蛋白,因此跨膜结构域是其重要特征。跨膜结构域分析结果显示,所有 AtPIN 家族与 RcPIN 家族成员均有 N 端和 C 端两个疏水区域(5 次跨膜)

和一个中央的亲水环(图 2)。亲水环结构位于细胞内。RcPIN1-1、RcPIN1-2、RcPIN2、RcPIN3 以及 RcPIN6 蛋白的亲水环较长,而 RcPIN5 和 RcPIN8 蛋白的亲水环较短。分别与 AtPIN1、AtPIN2、AtPIN3、AtPIN6、AtPIN5 以及 AtPIN8 对应,拓扑结构相似性非常高(图 2)。

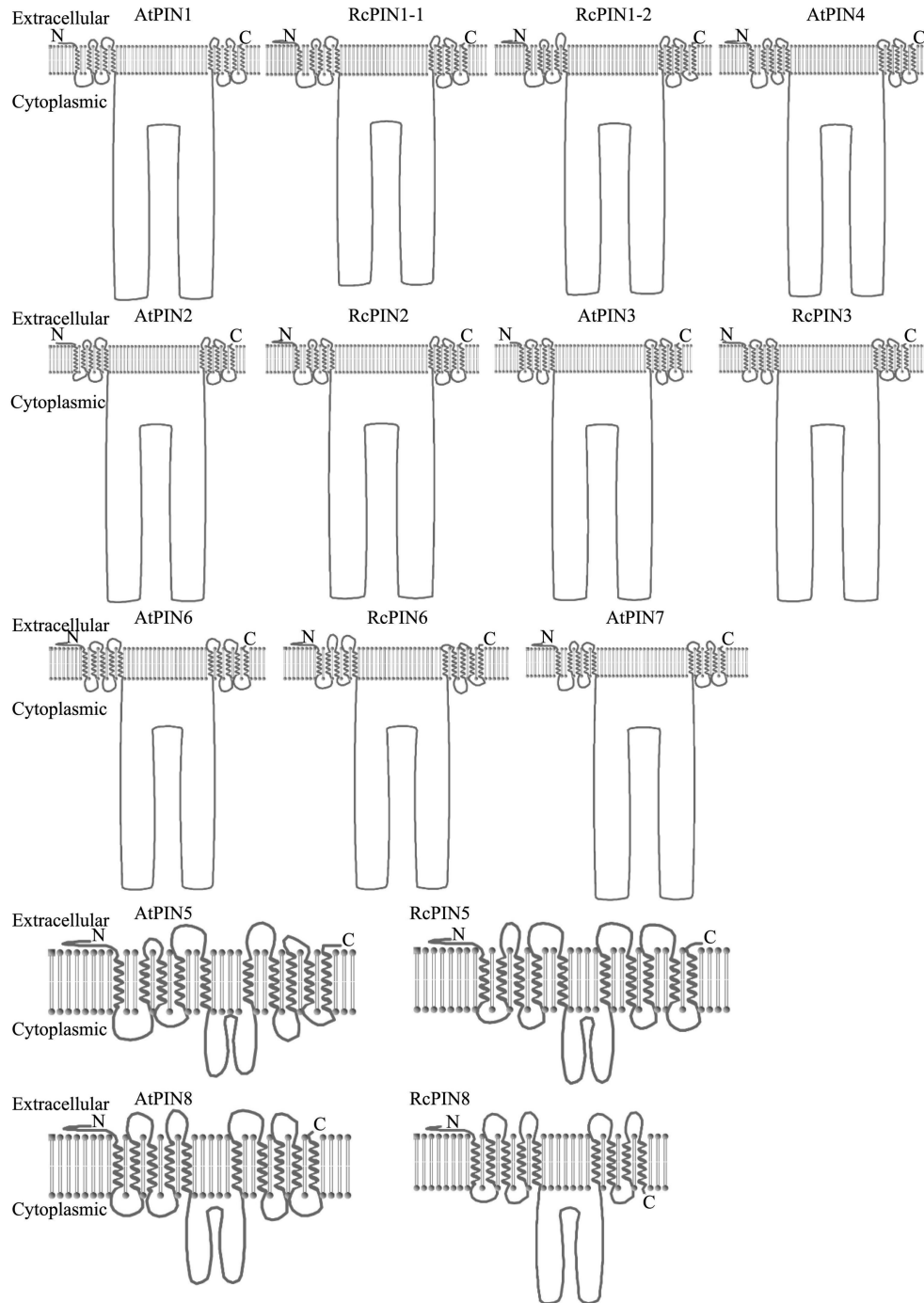


图 2 拟南芥与蓖麻 PIN 蛋白家族的跨膜结构域

使用 SignalP 5.0 在线工具预测拟南芥与蓖麻 PIN 蛋白的信号肽,结果发现这 15 个 PIN 蛋白均不存在信号肽(分析结果未展示),暗示 PIN 蛋白不会向细胞外表达,为非分泌性蛋白。PIN 蛋白的磷酸化对其细胞膜极性定位和转运活性有重要影响,因此,使用 NetPhos 3.1 在线工具分析了拟南芥与蓖麻 PIN 蛋白的磷酸化位点。结果显示,与拟南芥类似,蓖麻 PIN 蛋白的磷酸化位点也大多分布于蛋白序列中间的亲水环区域,潜在的磷酸化位点多数为丝氨酸残基和苏氨酸残基,少数为酪氨酸残基(图 3)。

使用 Mafft Version 7 在线工具进行序列比对后用 Jalview 软件绘制出序列比对分析图,结果如图 4 所示。结果表明,PIN 家族蛋白的两端跨膜结构域较为保守,而构成中央亲水环的氨基酸序列差异较大。

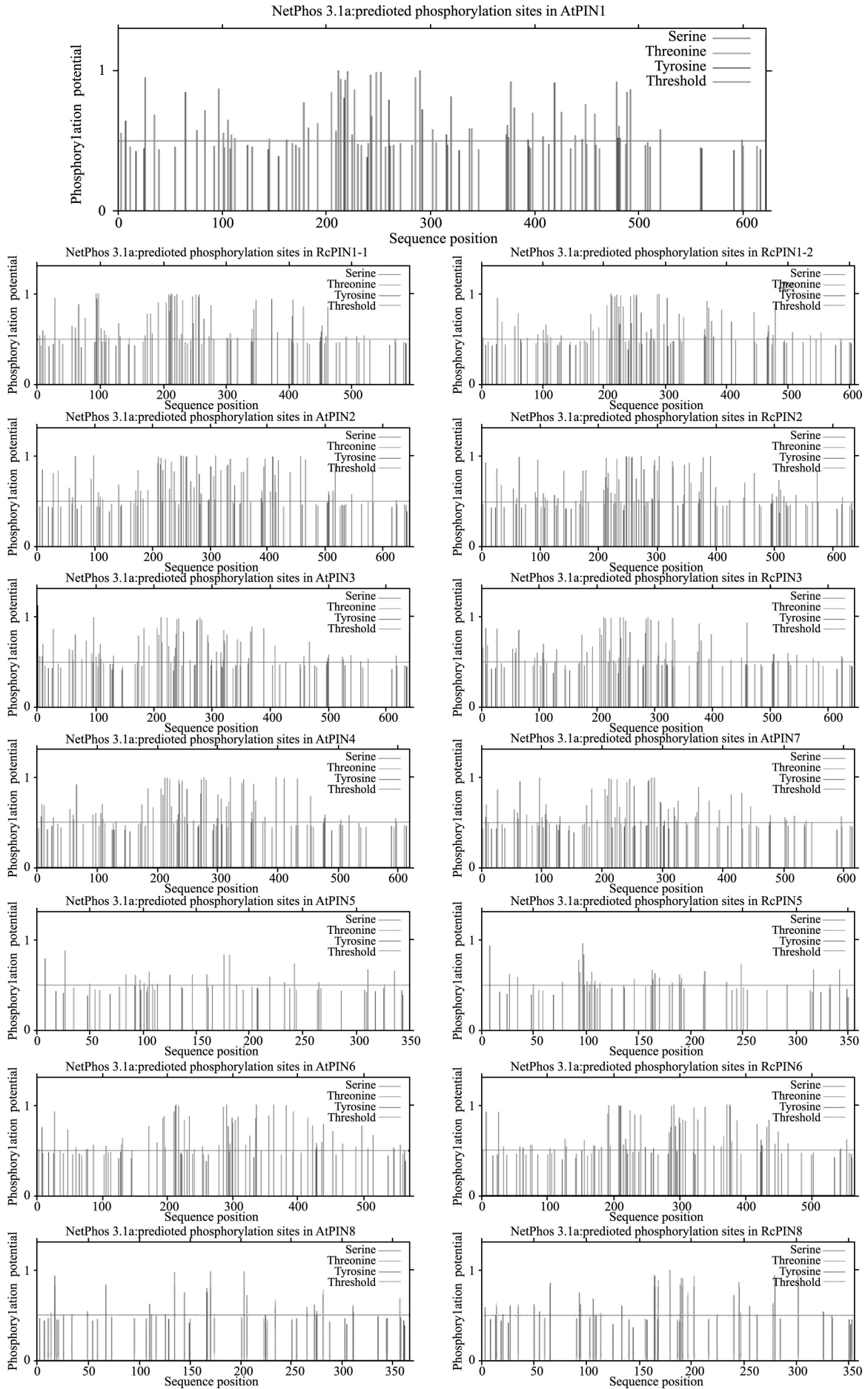
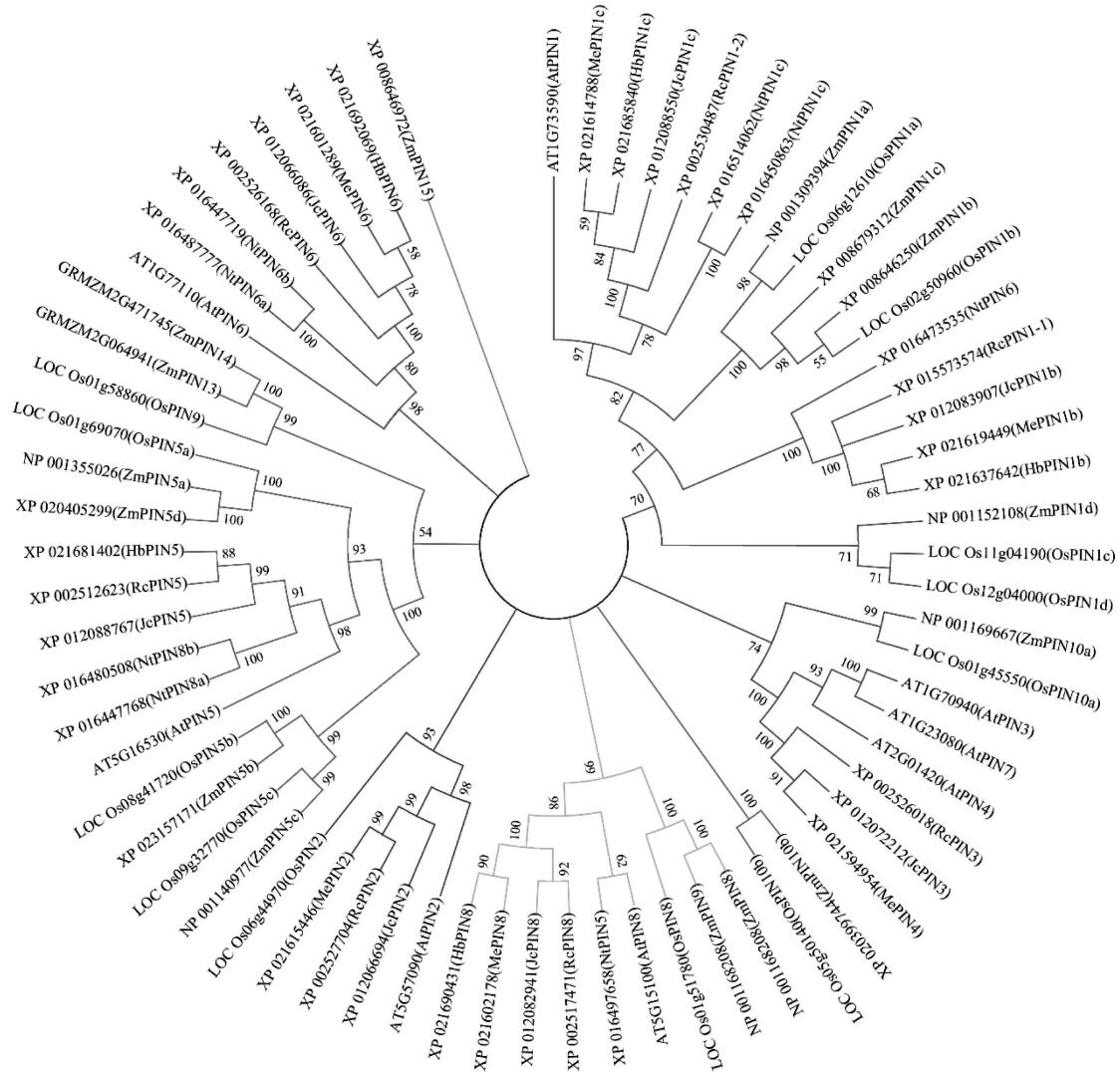


图3 拟南芥与蓖麻 PIN 蛋白家族的磷酸化位点预测

2.2 蓖麻PIN基因家族的系统进化分析

选择双子叶植物烟草,大戟科的木薯、橡胶树和麻风树,单子叶植物水稻和玉米作为分析对象,与蓖麻和拟南芥PIN蛋白序列一起置于MEGA7.0软件中使用邻接法构建进化树。结果显示,蓖麻与同科的木薯、橡胶树和麻风树聚在一起,表示PIN蛋白在大戟科植物中序列比较保守。拟南芥和烟草等双子叶植物聚拢于一起,而单子叶植物水稻和玉米聚拢于一起。此结果与植物分类学一致,结果如图5所示。



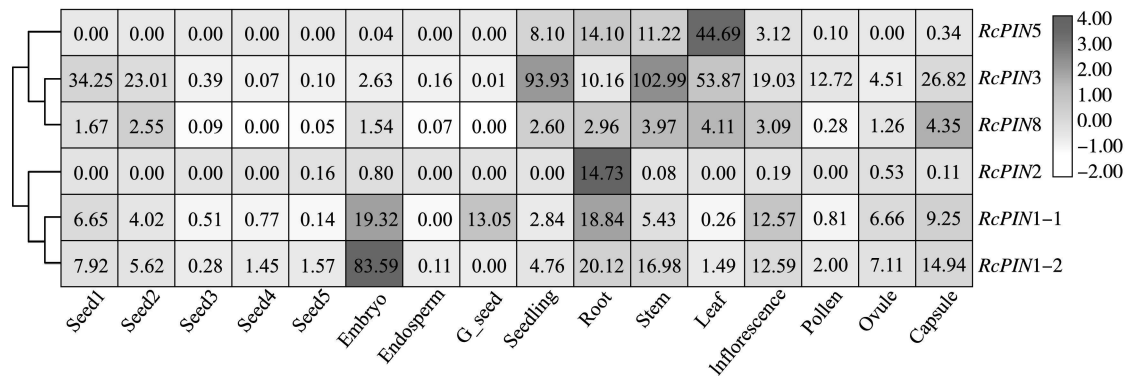
注:At:拟南芥;Rc:蓖麻;Me:木薯;Hb:橡胶树;Jc:麻风树;Nt:烟草;Os:水稻;Zm:玉米。

图5 蓖麻与其他植物的PIN蛋白家族系统进化树分析

2.3 蓖麻PIN基因的表达分析

为了初步研究所筛选出的PIN蛋白的功能,我们首先利用蓖麻基因表达数据库(RcDB, <https://woodyoilplants.iflora.cn/>),对这些PIN基因的表达模式进行了分析。结果显示,*RcPIN1-1*和*RcPIN1-2*基因在胚和根中的表达水平较高,而且*RcPIN1-1*基因在胚中的表达水平明显强于其它组织(图6),暗示其在胚发育中有重要的功能。*RcPIN2*基因在根中特异表达。*RcPIN3*基因在所有检测的组织中均有表达,且在幼苗、茎、叶片和幼嫩的种子中表达水平较高。*RcPIN5*基因主要在叶、根和茎中表达,而且在叶片中表达水平明显强于其它组织。在该数据库中未检索到*RcPIN6*基因的表达。而相对于其它的蓖麻PIN基因,*RcPIN8*在所有组织中的表达均较弱(图6)。

我们进一步利用RT-PCR对这些*RcPIN*基因的组织表达水平进行了验证,实验结果与上述数据库的结果基本吻合(图7)。*RcPIN1-1*和*RcPIN1-2*基因在根、叶、雌花和幼嫩的种子中表达水平较高;*RcPIN2*基因主要在根中表达;*RcPIN3*、*5*、*6*和*8*基因在所有检测的组织均有表达,其中*RcPIN5*基因的表达水平较低。



注:比例尺表示标准化后的相对表达水平,无色框表示较低的表达水平,有色框表示基因的转录水平较高;种子 1-5 表示种子的不同发育阶段(10-50 天)。

图 6 蓖麻 PIN 基因家族在不同组织中的表达模式

3 讨论与分析

本研究共检索出 7 条蓖麻 PIN 基因序列,根据其于拟南芥 PIN 基因序列相似程度分别命名 *RcPIN1-1*、*RcPIN1-2*、*RcPIN2*、*RcPIN3*、*RcPIN5*、*RcPIN6*、*RcPIN8*。这些蛋白均呈碱性,序列长度为 356-646 个氨基酸残基,分子量大小为 38.89-70.39 ku。其中 *RcPIN5*、*RcPIN6* 和 *RcPIN8* 的氨基酸长度小于 *RcPIN1-1*、*RcPIN1-2*、*RcPIN3*,符合上述亚族分类规律。这 7 种 *RcPIN* 蛋白均为稳定蛋白,但 *RcPIN2* 和 *RcPIN3* 不稳定系数接近 40,无法确切判断。除 *RcPIN5* 和 *RcPIN8* 蛋白为疏水性蛋白外,其余 *RcPIN* 蛋白均为两性蛋白。另外,*RcPIN5*、*RcPIN6* 和 *RcPIN8* 有相比于其他蛋白更高的脂溶指数。研究认为,脂溶指数更高说明 *PIN5*、*PIN6* 和 *PIN8* 所在亚族的蛋白质热稳定性更高^[8]。推测这两个特性与其亲水环长度较小有关。信号肽预测结果显示,蓖麻 PIN 蛋白与拟南芥 PIN 蛋白一样都为非分泌性蛋白。从二级结构和跨膜结构域分析来看,与其他蛋白相比,*RcPIN5* 和 *RcPIN8* 的二级结构的构成不同,且跨膜结构域的亲水环结构较不明显,由于其氨基酸长度较短,这可能导致 *RcPIN5* 和 *RcPIN8* 跨膜结构域模型与其他成员有差别。序列比对结果表明,*PIN* 蛋白序列两端的序列较为保守,而中间的亲水环区域则差异较大。据此推测,其不同的生物学功能可能与其亲水环的差异有关。这些结果进一步从生物信息学的角度证明了拟南芥典型 *PIN* 的中心胞质亲水环(HL 结构域)是导致它们功能差异的原因之一^[7,39]。系统进化分析显示,蓖麻和与其同属大戟科的木薯、橡胶树和麻风树进化关系较为密切,与双子叶模式植物拟南芥和烟草的进化关系也较为亲密,可以参照这些植物 *PIN* 蛋白已知的生物学功能对蓖麻 *PIN* 蛋白进行下一步的研究。

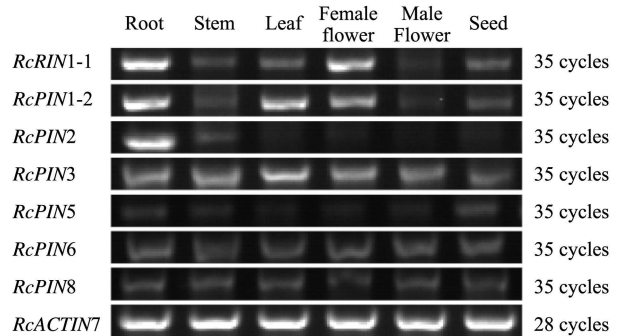


图 7 蓖麻 PIN 基因家族在不同组织中的转录水平

我们注意到,蓖麻中似乎缺少与 *AtPIN4* 以及 *AtPIN7* 类似的蛋白。*AtPIN3*、*AtPIN4* 和 *AtPIN7* 蛋白属同一亚族,在系统进化树中可以看到,*AtPIN3*、*AtPIN4* 和 *AtPIN7* 蛋白聚成一个枝,进化关系十分密切。与蓖麻同属大戟科的植物同样缺少 *PIN3*、*PIN4* 和 *PIN7* 中的一个或两个,这些植物的生物信息学研究亦出现类似的结果。研究表明,*AtPIN3*、*AtPIN4* 和 *AtPIN7* 的进化关系亲密且生物学功能较为冗余,原因是拟南芥中的 *AtPIN1*、*AtPIN3*、*AtPIN4* 和 *AtPIN7* 基因来源于进化中最近发生的一次染色体重复^[7,39,40]。

蓖麻具有适应能力强、含油量高和经济效益高等特点,获取的蓖麻油粘度较高,摩擦系数较低,适合作为工业用油。获得产油率高、生长周期短且可用于大规模种植的优良转基因植株是蓖麻育种的首要目标,对蓖麻的市场地位与国家的新能源战略布局均有较大提升。生长素作为植物中重要的内源性激素,对植株的生

长素作为植物中重要的内源性激素,对植株的生

长发育影响较大。生长素相关基因对蓖麻生长发育及抗逆性的研究,可为蓖麻育种提供有益的线索。PIN蛋白是生长素极性运输的主要承担者,目前对其在拟南芥等植物生长发育过程中功能的研究已有许多进展。若能以此为依据,探明蓖麻中PIN蛋白的生物学功能,则可以为其生长素极性运输机制的研究奠定基础,为选育蓖麻新品种和蓖麻种植行业的发展提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] 宋丽珍,王逸,杨青华,等.生长素在植物胚胎早期发育中的作用[J].植物学报,2013,48(4):371-380.
- [2] 李俊华,种康.植物生长素极性运输调控机理的研究进展[J].植物学通报,2006,23(5):466-477.
- [3] ZHOU J J,LUO J.The PIN-FORMED auxin efflux carriers in plants[J].International Journal of Molecular Sciences,2018,19(9):2759.
- [4] 郑元,周安佩,刘玉鲲,等.植物生长素极性运输及调控机制的研究进展[J].云南农业大学学报(自然科学),2013,28(6):878-884.
- [5] 邹纯雪,门淑珍.生长素的外输载体PIN蛋白家族研究进展[J].中国细胞生物学学报,2013(5):574-582.
- [6] ZHANG Y Z,HARTINGER C,WANG X J,et al.Directional auxin fluxes in plants by intramolecular domain-domain coevolution of PIN auxin transporters[J].New Phytologist,2020,227(5):1406-1416.
- [7] ZHANG Y Z,RODRIGUEZ L,LI L X,et al.Functional innovations of PIN auxin transporters mark crucial evolutionary transitions during rise of flowering plants[J].Science Advances,2020,6(50):eabc8895,[2021-02-02].http://advances.sciencemag.org/.DOI: 10.1126/sciadv.abc8895.
- [8] ARMENGOT L,MARQUÈ S-BUENO M M,JAILLAIS Y.Regulation of polar auxin transport by protein and lipid kinases[J].Journal of Experimental Botany,2016,67(14):4015-4037.
- [9] FRIML J,VIETEN A,SAUER M,et al.Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis[J].Nature,2003,426(6963):147-53.
- [10] RIGO G,AYAYDIN F,TIETZ O,et al.Inactivation of plasma membrane-localized CDPK-RELATED KINASE5 decelerates PIN2 exocytosis and root gravitropic response in Arabidopsis[J].Plant Cell,2013,25:1592-1608.
- [11] RAKUSOVA H,ABBAS M,HAN H,et al.Termination of shoot gravitropic responses by auxin feedback on PIN3 polarity[J].Current Biology,2016,26:3026-3032.
- [12] DING Z,GALVÁN-AMPUDIA C S,DEMARSY E,et al.Light-mediated polarization of the PIN3 auxin transporter for the phototropic response in Arabidopsis[J].Nature Cell Biology,2011,13(4):447-52.
- [13] MRAVEC J,SKUPA P,BAILLY A,et al.Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter[J].Nature,2009,459:1136-1140.
- [14] SIMON S,SKUPA P,VIAENE T,et al.PIN6 auxin transporter at endoplasmic reticulum and plasma membrane mediates auxin homeostasis and organogenesis in Arabidopsis[J].New Phytologist,2016,211:65-74.
- [15] DAL BOSCO C,DOVZHENKO A,LIU X,et al.The endoplasmic reticulum localized PIN8 is a pollen-specific auxin carrier involved in intracellular auxin homeostasis[J].Plant Journal,2012,71:860-870.
- [16] 王光明.蓖麻育种与栽培[M].北京:中国农业出版社,2013.
- [17] BERARDINI T Z,REISER L,LI D H,et al.The Arabidopsis information resource:making and mining the "gold standard" annotated reference plant genome[J].Genesis,2015,53(8):474-85.
- [18] GOODSTEIN D M,SHU S Q,HOWSON R,et al.Phytozome: a comparative platform for green plant genomics[J].Nucleic Acids Research,2012,40(1):1178-1186.
- [19] PORTWOOD J L II,WOODHOUSE M R,CANNON E K,et al.MaizeGDB 2018: the maize multi-genome genetics and genomics database [J].Nucleic Acids Research,2019,47(D1):D1146-D1154.
- [20] KAWAHARA Y,BASTIDE M,HAMILTON J P,et al.Improvement of the Oryza sativa nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data[J].Rice,2013,6(1):4-10.
- [21] WILKINS M R,GASTEIGER E,BAIROCH A,et al.Protein identification and analysis tools in the ExPASy server[J].Methods in Molecular Biology (Clifton,N J),1999,112:531-52.
- [22] LU S N,WANG J Y,CHITSAZ F,et al.CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020[J].Nucleic Acids Research,2020,48(D1):265-268.
- [23] KATO H K,ROZEWICKI J,YAMADA K D.MAFFT online service:multiple sequence alignment,interactive sequence choice and visualization[J].Briefings in Bioinformatics,2019,20(4):1160-1166.

- [24] KURAKU S,ZMASEK C M,NISHIMURA O,et al.aLeaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity[J].Nucleic Acids Research,2013(41):22-28.
- [25] SAITOU N,NEI M.The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees[J].Molecular Biology and Evolution,1987(4):406-425.
- [26] FELSENSTEIN J.Confidence limits on phylogenies:an approach using the bootstrap[J].International Journal of Organic Evolution,1985(39):783-791.
- [27] ZUCKERKANDL E,PAULING L.Evolutionary divergence and convergence in proteins[M].1965.
- [28] KUMAR S,STECHER G,TAMURA K.MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J].Molecular Biology and Evolution,2016(33):1870-1874.
- [29] HU B,JIN J P,GUO A Y,et al.GSDS 2.0:an upgraded gene feature visualization server[J].Bioinformatics,2015,31(8):1296-1297.
- [30] COMBET C,BLANCHET C,GOURJON C,et al.NPS@:network protein sequence analysis[J].Trends in Biochemical Sciences,2000,25,3(291):147-150.
- [31] TUSNADY G E,SIMON I.Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction [J].Journal of Molecular Biology,1998,283:489-506.
- [32] TUSNADY G E,SIMON I.The HMMTOP transmembrane topology prediction server[J].Bioinformatic,2001,17:849-850.
- [33] IOANNIS C S,THEODORE D L,PANTELIS G B,et al.TMRPres2D: high quality visual representation of transmembrane protein models[J].Bioinformatics,2004,20:3258-3260.
- [34] ALMAGRO ARMENTEROS J J,TSIRIGOS K D,SONDERBY C K,et al.SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks[J].Nature Biotechnology,2019,37(4):420-423.
- [35] BLOM N,GAMMELTOFT S,BRUNAK S.Generic predictions:Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites[J].Journal of Molecular Biology,294(5):1351-1362,1999.
- [36] BLOM N,SICHERITZ-PONTEN T,GUPTA R,et al.Kinase specific predictions:prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence[J].Proteomics,2004,4(6):1633-1649.
- [37] WATERHOUSE A M,PROCTER J B,MARTIN D M A,et al.Jalview Version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench[J].Bioinformatics,2009,25(9):1189-1191.
- [38] CHEN C J,XIA R,CHEN H,et al.TBtools,a Toolkit for Biologists integrating various HTS-data handling tools with a user-friendly interface[J].Molecular Plant,2020,13(8):1194-1202.
- [39] IVAN A,TEALE W D,TREBAR M,et al.The PIN auxin efflux facilitators:evolutionary and functional perspectives[J].Trends in Plant Science,2005,10(4):170-177.
- [40] WANG J R,HU H,WANG G H,et al.Expression of PIN genes in rice (*Oryza sativa* L): tissue specificity and regulation by hormones[J].Molecular Plant,2009,2(4):823-831.

文章编号 1672-6634(2021)05-0100-11

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2021.05.013

山东半岛沿岸潮间带小型底栖动物类群 组成与分布格局

赵美红^{1,2}, 刘晓收^{1,2}

(1.中国海洋大学 海洋生命学院,山东 青岛 266003;2.中国海洋大学 海洋生物多样性与进化研究所,山东 青岛 266003)

摘要 为研究山东半岛沿岸潮间带小型底栖动物的类群组成和分布格局,于2019年3-10月在山东半岛沿岸10个潮间带区域对小型底栖动物进行了定量调查。结果表明,小型底栖动物的平均丰度为 524.96 ± 443.72 (ind. · 10 cm⁻²),平均生物量为 398.48 ± 308.37 (μg · 10 cm⁻²)。受人为影响较少的潮间带区域,包括位于海阳麻姑岛的M05区域、位于荣成天鹅湖的M07区域、位于庙岛群岛砣矶岛的M10区域,小型底栖动物丰度较高。中潮带的小型底栖动物丰度大于高潮带和低潮带。共鉴定出11个小型底栖动物类群,分别是自由生活海洋线虫、桡足类、甲壳类幼体、介形类、动吻类、双壳类、涟虫类、涡虫类、多毛类、缓步类和腹毛类。在丰度方面,海洋线虫丰度为 473.90 ± 421.68 (ind. · 10 cm⁻²),占小型底栖动物丰度的90.27%,其次为桡足类,占6.42%。在生物量方面,海洋线虫的干重生物量最大,为 189.56 ± 168.67 (μg · 10 cm⁻²),占小型底栖动物总生物量的47.57%,其次是多毛类,占28.87%。小型底栖动物的生物量与中值粒径呈现显著正相关。小型底栖动物群落受多种环境参量的综合影响,解释其变异度的最佳环境因子组合为间隙水温度、盐度和沉积物含水量。

关键词 小型底栖动物;类群组成;分布格局;潮间带;山东半岛

中图分类号 Q959.17

文献标识码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Taxa Composition and Distribution Patterns of Meiofauna in the Intertidal Zones of Shandong Peninsula

ZHAO Meihong^{1,2}, LIU Xiaoshou^{1,2}

(1.School of Marine Life Sciences,Ocean University of China,Qingdao 266003,China;2.Institute of Evolution and Marine Biodiversity,Ocean University of China,Qingdao 266003,China)

Abstract In order to assess the taxa composition and distribution patterns of meiofauna in the intertidal zones of Shandong Peninsula,a quantitative survey of meiofauna in 10 intertidal zones along Shandong Peninsula was conducted from March to October 2019.The average values of abundance and biomass of meiofauna were 524.96 ± 443.72 (ind. · 10 cm⁻²) and 398.48 ± 308.37 (μg · 10 cm⁻²), respectively.The sites less affected by human activities,including Sites M05 (Magu Island of Haiyang),M07 (Swan Lake of Rongcheng),and M10 (Tuoji Island) had higher values of meiofaunal abundance.Compared with high and

收稿日期:2021-03-26

基金项目:国家自然科学基金项目(41976131);生态环境部“生物多样性调查、观测和评估”专项资助

通讯作者:刘晓收,男,汉族,博士,教授,博士生导师,研究方向:海洋底栖生态学,E-mail:liuxs@ouc.edu.cn.

low tidal zones, mid-tidal zones supported higher meiofaunal abundance. A total of 11 meiofaunal taxa were found, including free-living marine nematodes, copepods, crustacean larva, ostracods, kinorhynchans, bivalves, cumaceans, turbellarians, polychaetes, tardigrades, and gastropods. The values of abundance and biomass of free-living marine nematodes were 473.90 ± 421.68 (ind. $\cdot 10 \text{ cm}^{-2}$) and 189.56 ± 168.67 ($\mu\text{g} \cdot 10 \text{ cm}^{-2}$), respectively. Free-living marine nematodes were the most dominant group, accounting for 90.27% and 47.57% of the total abundance and biomass of meiofauna, respectively, followed by copepods and polychaetes. The sediment median grain size was correlated significantly with the meiofaunal biomass. The community structure of meiofauna were jointly affected by a variety of environmental parameters. The combination of interstitial water temperature, salinity and sediment water content was the best combination of environmental factors to explain the variance of meiofaunal community.

Key words meiofauna; taxa composition; distribution pattern; intertidal zone; Shandong Peninsula

0 前言

潮间带是位于大潮期的最高潮位和最低潮位之间的海岸,是海洋与陆地之间的交混地带^[1]。潮间带的理化环境(如盐度、温度、有机碳含量、沉积物粒度分布暴露时间等)呈明显的梯度变化^[2]。潮间带生态系统生态因子复杂多样、生物多样性高、区系成分复杂且群落类型多种多样,并与人类活动有密切的关系^[3]。

小型底栖动物指能通过 $500 \mu\text{m}$ 孔径筛网但不能通过 $42 \mu\text{m}$ 或 $31 \mu\text{m}$ 孔径筛网的底栖动物^[4]。小型底栖动物数量大、种类多、分布广,具有较高的周转率^[5],是底栖食物网中十分重要的一环。同时它们还是许多经济鱼类、虾类和贝类幼体阶段的优质饵料^[6,7]。小型底栖动物的多样性格局、群落结构及生物量变动直接控制着大型经济无脊椎动物幼体的补充^[5],在连接碎屑食物链、初级生产力以及水层-底栖耦合过程中起着重要作用^[8]。小型底栖动物具有刺激微生物生产、加速有机物降解、促进营养物质再循环等多方面的作用^[9]。因此,小型底栖动物的群落结构和分布特征在基础研究和应用研究方面一直备受重视^[10]。

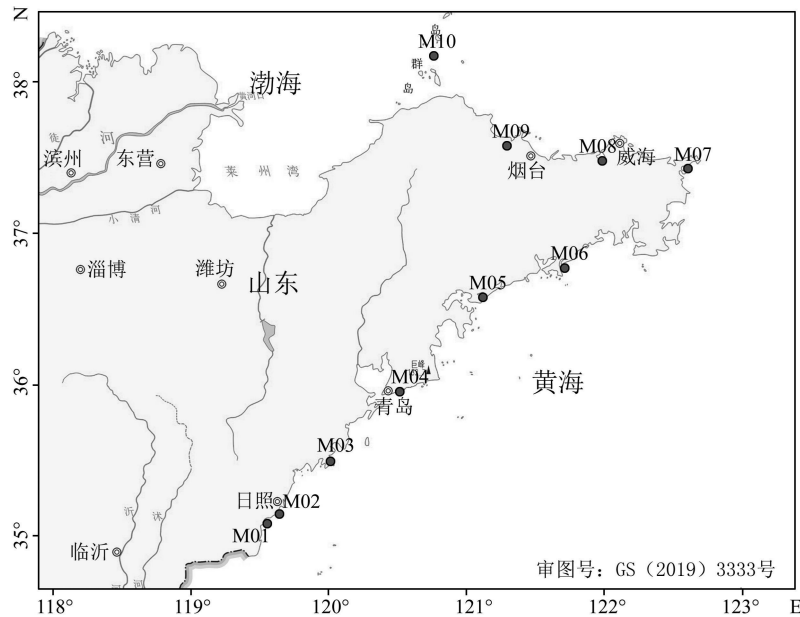
我国潮间带小型底栖动物的研究始于 20 世纪 80 年代中期,主要是张志南等^[11,12]在秦皇岛、大连等潮间带的研究。近年来,潮间带小型底栖动物的研究在丰度、生物量时空分布的基础上,逐步开展了小型底栖动物对踩踏^[13]、有机污染^[14]等人类活动响应的研究。目前,国内潮间带小型底栖动物研究主要集中于特定潮间带的季节动态变化研究方面^[1,2],但对山东半岛沿岸潮间带整体分布格局的研究还未见报道。

山东半岛($35^{\circ}05' - 37^{\circ}50' \text{N}$, $119^{\circ}16' - 122^{\circ}42' \text{E}$)是中国最大的半岛,在山东省东部,位于胶莱谷地以东,伸入渤海、黄海间,东西最长 290 km,南北最宽 190 km,最窄处 50 km,三面环海,位于重要的生态地理位置。本文根据对山东半岛沿岸潮间带小型底栖动物的定量调查,结合环境因子,对山东半岛沿岸潮间带小型底栖动物的类群组成、分布格局等方面进行研究,分析了山东半岛沿岸潮间带小型底栖动物对人为扰动及环境变化的响应,为我国潮间带小型底栖生物生态学的深入研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 研究区域与野外采样

2019 年 3 月到 10 月,在山东半岛沿岸日照、青岛、烟台、威海等地共计 10 个区域(图 1;表 2)进行了潮间带沉积物环境因子和小型底栖动物现场采样。除 M05 区域只在高潮带、中潮带进行采样以外,在每个区域的大潮期间分高、中、低潮三个潮带分别进行采样,其中各区域中的高、中、低潮带分别用 H、M、L 表示。使用内径为 2.9 cm 的取样管(塑料注射器改装)在每个区域的每个潮带取 3 个长度为 8 cm 的芯样,分成 0-4 cm、4-8 cm,分别装入 125 mL 的广口瓶中,加入 5% 的福尔马林溶液进行样品固定。同时取一定量的表层沉积物用于沉积物粒度、有机质、叶绿素等环境因子的测定分析,以上用于测定环境因子的样品立即放入 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰柜冷冻保存。



注: M01:日照付疃河口, M02:日照灯塔景区, M03:青岛琅琊台, M04:青岛第二海水浴场, M05:海阳麻姑岛, M06:威海乳山口, M07:荣成天鹅湖, M08:威海双岛湾, M09:烟台夹河口, M10:砣矶岛。

图1 山东半岛沿岸潮间带小型底栖动物调查区域分布图

1.2 环境因子的测定

沉积物有机质的测定参照《海洋监测规范》中的重铬酸钾氧化-还原容量法进行^[15]。沉积物粒度分析采用 Master Sizer 3000 型激光粒度仪进行测定。叶绿素含量的测定采用分光光度法^[16]。温度、盐度和 pH 值通过 YSI 600XLM 水质分析仪的现场测定直接获得。

1.3 小型底栖动物的室内分选

分选前首先在每瓶样品中加入 3-5 mL 虎红染液混合均匀, 染色 24 h, 使用倒清液淘洗法进行小型底栖动物的分离, 淘洗 7 次后将样品倒在 0.5 mm (小型底栖动物的上限) 和 0.031 mm (小型底栖动物的下限) 两层网筛上用自来水冲洗^[17]。在解剖镜下将所有的后生小型底栖动物挑出, 按小型底栖动物各类群分开装瓶并计数, 分别用 5% 的甲醛溶液保存于 5 mL 玻璃样品瓶中。

1.4 数据处理与分析

小型底栖动物的丰度一般以每 10 cm² 所包含的生物个体数来表示。根据取样管的直径 (2.9 cm), 将每个区域的小型底栖动物丰度换算为每 10 cm² 的个体数。小型底栖动物的生物量测定方法采用换算法。利用小型底栖动物各个类群的丰度值, 乘以相对类群的平均干重得到小型底栖动物各个类群的生物量^[18]。小型底栖动物各主要类群的平均个体干重如表 1。

使用 ArcGIS 10.2 中的 Arc Map 进行调查区域图、各区域的丰度和生物量等平面图的制作。使用 PRIMER 6.0 软件中的 PCA 对环境因子进行了主成分分析, 以获取对区域环境差异起主要作用的环境因子。同时采用 PRIMER 6.0 软件中的 BIO-ENV 和 RELATE 对群落结构及环境因子的相关性及相关系数的显著性进行了分析, 以揭示环境因子及其组合对小型底栖动物群落结构的影响。使用 SPSS 19.0 中的 Spearman 相关分析 (Spearman Correlation Analysis) 对小型底栖动物的丰度与各种环境因子进行相关性分析。

表 1 小型底栖动物的个体平均干重换算系数

类群	个体干重/ μg
线虫 Nematoda	0.4
桡足类 Copepoda	1.86
多毛类 Polychaeta	14
双壳类 Bivalvia	4.2
介形类 Ostracoda	26
涡虫类 Turbellaria	3.5
缓步动物 Tardigrada	3.5
甲壳类幼体 Crustacean larvae	0.11
动物类 Kinorhyncha	2
涟虫 Cumacea	3.5
腹毛类 Gastrotricha	4.2

2 结果与分析

2.1 环境因子

山东半岛沿岸潮间带各区域的环境因子如表 2 所示。10 个区域间隙水的温度变化范围为 11-27 °C, 平均水温为 15.8 ± 5.86 °C, M02 区域的水温最低, M04 区域的水温最高。10 个区域间隙水的盐度的变化范围为 24‰-40‰, 平均盐度为 33.2 ± 5.09 ‰, M06 区域的盐度最高, M01 区域的盐度最低。

表 2 山东半岛沿岸潮间带调查区域环境因子

区域	东经/°	北纬/°	温度/°C	盐度/‰	潮带	叶绿素 <i>a</i> 含量 / $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	沉积物 含水率/%	有机质 含量/%	中值粒径/mm	沉积物类型
M01	119.4511	35.2994	12	24	H	1.240	15.5	3.073	1.100	砾质砂
					M	2.012	17.9	5.688	0.820	砾质砂
					L	0.463	19.1	8.934	0.740	砾质砂
M02	119.5667	35.3947	11	28	H	0.016	20.9	1.306	0.340	含砾砂
					M	1.044	22.3	0.398	0.300	砾质砂
					L	0.090	22.8	8.993	0.340	砾质砂
M03	119.9107	35.6593	13	30	H	1.773	25.7	5.211	0.141	砂
					M	3.507	27.2	9.513	0.148	砂
					L	2.346	26.8	8.763	0.140	砂
M04	120.3495	36.0503	27	33	H	0.142	9.2	1.921	0.230	砂
					M	0.113	18.0	5.106	0.281	砂
					L	0.272	24.0	11.10	0.230	砂
M05	120.9869	36.6214	17	37	H	1.048	31.8	8.539	0.015	粉砂
					M	0.376	33.1	19.65	0.028	砂质粉砂
					H	0.779	24.1	12.98	0.129	粉砂质砂
M06	121.6247	36.7639	13	40	M	0.214	24.7	8.426	0.146	粉砂质砂
					L	0.434	22.8	3.124	0.208	砂
					H	0.311	20.9	4.970	0.246	砂
M07	122.5814	37.3486	14	38	M	0.244	15.8	5.982	0.304	砂
					L	0.381	15.1	5.309	0.334	砂
					H	1.298	20.6	9.813	0.249	砂
M08	121.9628	37.4736	12	37	M	0.920	18.9	0.768	0.267	砂
					L	4.222	22.8	7.412	0.233	砂
					H	0.852	18.4	1.656	0.224	粉砂质砂
M09	121.2939	37.5744	13	35	M	2.030	26.5	3.136	0.041	砂质粉砂
					L	1.447	23.2	3.245	0.163	粉砂质砂
					H	0.215	22.1	4.951	0.296	砂
M10	120.7531	38.17	26	30	M	0.684	21.5	5.738	0.212	砂
					L	1.165	22.5	1.855	0.173	粉砂质砂

10 个调查区域的沉积物含水率变化范围为 9.20%-33.10%, 平均含水率为 21.87 ± 4.94 %, 其中 M04 区域的含水率最低, M05 区域的含水率最高。在不同潮带中, 高潮带含水率的变化范围为 9.20%-31.8%, 平均值为 $20.92\% \pm 6.02\%$, 其中 M04 区域高潮带的含水率最低, M05 区域高潮带的含水率最高; 中潮带含水率的变化范围为 15.80%-33.10%, 平均值为 $22.59\% \pm 5.33\%$, 其中 M07 区域中潮带的含水率最低, M05 区域

的含水率最高;除 M05 区域外,低潮带含水率的变化范围为 15.1%-26.80%,平均值为 22.12%±3.29%,其中 M07 区域低潮带的含水率最低,M03 区域低潮带的含水率最高。

10 个调查区域沉积物的有机质含量介于 0.39%-19.65%之间,平均值为 6.12%±4.21%,其中 M09 区域的有机质含量最低,M05 区域的有机质含量最高。在不同潮带中,高潮带的有机质含量介于 1.31%-12.99%之间,平均值为 5.44%±3.88%,其中 M02 区域高潮带有机质含量最低,M06 高潮带有机质含量最高;中潮带的有机质含量介于 0.39%-19.65%,平均值为 6.44%±5.48%,其中 M02 区域中潮带的有机质含量最低,M05 区域中潮带的有机质含量最高;除 M05 区域外,低潮带的有机质含量介于 1.85%-11.10%之间,平均值为 6.52%±3.24%,其中 M10 区域低潮带的有机质含量最低,M04 区域低潮带的有机质含量最高。

10 个调查区域沉积物叶绿素 *a* 含量介于 0.016-4.222 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 之间,平均值为 1.022±1.020 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,其中 M04 区域叶绿素 *a* 的含量最低,M03 区域叶绿素 *a* 的含量最高。在不同潮带中,高潮带的叶绿素 *a* 含量介于 0.0162-1.774 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 之间,平均值为 0.768±0.58 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,其中 M02 区域高潮带叶绿素 *a* 含量最低,M03 区域高潮带的叶绿素 *a* 含量最高;中潮带的叶绿素 *a* 含量介于 0.113-3.507 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 之间,平均值为 1.115±1.090 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,M04 区域中潮带的叶绿素 *a* 含量最低,M03 区域中潮带的叶绿素 *a* 含量最高;除 M05 区域外,低潮带的叶绿素 *a* 含量介于 0.091-4.222 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 之间,平均值为 1.201±1.340 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,M02 区域低潮带的叶绿素 *a* 含量最低,M08 区域低潮带的叶绿素 *a* 含量最高。

10 个调查区域沉积物中值粒径的变化范围为 0.015-1.100 mm,平均值为 0.278±0.230 mm,其中 M05 区域的中值粒径最小,M01 区域的中值粒径最大。从不同潮带来看,高潮带中值粒径的变化范围为 0.015-1.100 mm,平均值为 0.297±0.301 mm;中潮带中值粒径的变化范围为 0.028-0.820 mm,平均值为 0.254±0.227 mm;除 M05 区域外,低潮带中值粒径的变化范围为 0.140-0.740 mm,平均值为 0.284±0.186 mm,其中 M03 区域低潮带的中值粒径最小。M01 区域高中低潮的中值粒径都是最大的,在高潮带,中潮带 M05 区域的中值粒径都是最小的。

PCA 结果如图 2 所示。PC1 与 PC2 轴累计可解释环境变异度的 64.3%。对 PC1 轴贡献较大的依次为沉积物中值粒径、沉积物含水率、间隙水盐度、有机质含量、沉积物叶绿素 *a* 含量和间隙水温度;对 PC2 轴贡献较大的依次为沉积物叶绿素 *a* 含量、间隙水温度、沉积物含水率、间隙水盐度、沉积物中值粒径和有机质含量。

对温度、盐度、叶绿素 *a*、有机质含量、中值粒径这 5 个环境因子进行了 Pearson 相关性分析,结果表明(表 3),盐度与中值粒径呈极显著负相关($r = -0.647; p < 0.01$);沉积物含水率与沉积物有机质含量呈显著正相关($r = 0.555; p < 0.01$),与中值粒径呈极显著负相关($r = -0.553; p < 0.01$)。由结果可知,沉积物环境因子间相互影响相互作用,其中尤为突出的是,中值粒径与盐度、沉积物含水率之间的相互作用。

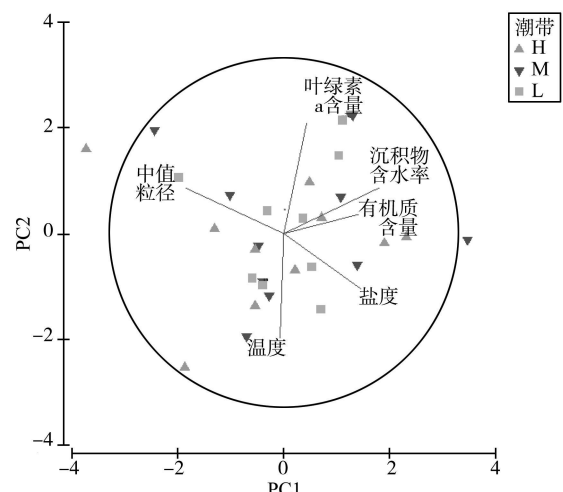


图 2 山东半岛沿岸潮间带调查区域环境因子主成分分析图

表 3 山东半岛沿岸潮间带环境因子相关性分析结果

	温度/℃	盐度/‰	叶绿素 <i>a</i> 含量/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	沉积物含水率/%	有机质含量/%
盐度/‰	-0.038				
叶绿素 <i>a</i> 含量/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	-0.324	-0.11			
沉积物含水率/%	-0.137	0.178	0.285		
有机质含量/%	-0.002	0.207	0.043	0.555**	
中值粒径/mm	-0.196	-0.647**	-0.049	-0.553**	-0.216

注: ** :在 0.01 水平(双侧)上显著相关); * :在 0.05 水平(双侧)上显著相关。

2.2 小型底栖动物

2.2.1 小型底栖动物的类群组成。在本次调查中,共鉴定出 11 个小型底栖动物类群,包括自由生活海洋线虫、桡足类、甲壳类幼体、介形类、动物类、双壳类、涟虫类、涡虫类、多毛类、缓步类和腹毛类。各类型丰度生物量及其所占百分比如表 4 所示。可知,小型底栖动物的平均丰度为 $524.96 \pm 443.72 \text{ ind.} \cdot 10 \text{ cm}^{-2}$,平均生物量为 $398.48 \pm 308.37 \mu\text{g} \cdot 10 \text{ cm}^{-2}$ 。海洋线虫是绝对的优势类群,占小型底栖动物丰度的 90.27%;桡足类次之,占 6.42%;多毛类再次,占 1.56%。线虫、桡足类和多毛类的数目之和为 98.26%,其余类之和仅为 1.74%。

从生物量来看,线虫的干重生物量最大,为 $189.56 \pm 168.67 \mu\text{g} \cdot 10 \text{ cm}^{-2}$,占小型底栖动物总生物量的 47.57%;其次是多毛类,为 $115.05 \pm 100.70 \mu\text{g} \cdot 10 \text{ cm}^{-2}$,占总数的 28.87%;居生物量第三的是桡足类,其干重生物量为 $62.73 \pm 127.53 \mu\text{g} \cdot 10 \text{ cm}^{-2}$,占总数的 15.74%;线虫、多毛类和桡足类的生物量之和为 92.18%,其他类的生物量较小,其总和为 7.82%。

桡足类的丰度大于多毛类,但是由于多毛类的个体平均干重 $14.00 \mu\text{g}$ 大于桡足类的个体平均干重 $1.86 \mu\text{g}$,所以多毛类的总体生物量比桡足类大。

表 4 山东半岛沿岸潮间带各类群小型底栖动物的丰度和生物量

类群	丰度/ $\text{ind.} \cdot 10 \text{ cm}^{-2}$	丰度百分比/%	生物量/ $\mu\text{g} \cdot 10 \text{ cm}^{-2}$	生物量百分比/%
线虫	473.90 ± 421.68	90.27	189.56 ± 168.67	47.57
桡足类	33.72 ± 68.56	6.42	62.73 ± 127.53	15.74
多毛类	8.21 ± 7.19	1.57	115.05 ± 100.70	28.87
甲壳幼	0.88 ± 1.81	0.17	0.09 ± 0.20	0.02
介形	0.01 ± 0.09	0.00	0.45 ± 2.44	0.11
动物	0.01 ± 0.09	0.00	0.03 ± 0.19	0.01
双壳类	2.22 ± 8.10	0.42	9.36 ± 34.02	2.35
涟虫	0.01 ± 0.09	0.00	0.06 ± 0.33	0.02
涡虫	5.17 ± 8.39	0.99	18.10 ± 29.38	4.54
缓步类	0.36 ± 1.24	0.07	1.27 ± 4.35	0.32
腹毛类	0.41 ± 1.16	0.08	1.75 ± 4.88	0.44
总计	524.96 ± 443.72	100	398.48 ± 308.37	100

表 5 山东半岛沿岸潮间带调查区域小型底栖动物丰度分布

区域	小型底栖动物丰度/ $\text{ind.} \cdot 10 \text{ cm}^{-2}$				
	H	M	L	平均值	比较
M01	817.9 ± 231.49	1080.0 ± 196.65	869.4 ± 102.36	922.5 ± 138.86	$M > L > H$
M02	135.3 ± 29.31	418.1 ± 85.51	524.6 ± 118.88	359.3 ± 201.18	$L > M > H$
M03	397.8 ± 198.08	690.7 ± 103.76	541.8 ± 162.96	543.4 ± 146.45	$M > L > H$
M04	29.7 ± 9.85	30.3 ± 12.02	573.6 ± 75.92	211.2 ± 313.82	$L > M > H$
M05	1233.9 ± 322.29	759.9 ± 235.78	-	996.9 ± 355.23	$H > M$
M06	391.3 ± 288.56	261.0 ± 104.00	73.7 ± 13.23	242.0 ± 159.65	$H > M > L$
M07	661.4 ± 58.67	744.7 ± 201.16	150.5 ± 51.53	518.9 ± 321.77	$M > H > L$
M08	108.5 ± 6.83	2033.8 ± 91.04	165.1 ± 91.82	769.1 ± 1095.54	$M > L > H$
M09	125.7 ± 85.54	354.4 ± 39.82	139.8 ± 78.55	206.7 ± 128.16	$M > L > H$
M10	244.9 ± 37.02	1006.8 ± 72.49	658.9 ± 87.89	636.9 ± 381.43	$M > L > H$
平均	414.7 ± 384.10	737.9 ± 562.62	410.8 ± 283.65	524.9 ± 443.72	$M > H > L$

2.2.2 小型底栖动物丰度分布。由表 5 和图 3 可知,10 个区域小型底栖动物的丰度介于 $206.7\text{--}996.9 \text{ ind.} \cdot 10 \text{ cm}^{-2}$ 之间,平均值为 $540.7 \pm 188.00 \text{ ind.} \cdot 10 \text{ cm}^{-2}$,其中 M09 区域小型底栖动物丰度最低,M05 区域小型底栖动物丰度最高。在不同潮带中,高潮带的小型底栖动物的丰度介于 $29.8\text{--}1233.9 \text{ ind.} \cdot 10 \text{ cm}^{-2}$ 之间,平均值为 $414.7 \pm 384.10 \text{ ind.} \cdot 10 \text{ cm}^{-2}$,其中 M04 区域高潮带小型底栖动物丰度最低,M05 区域高潮带的小型底栖动物丰度最高;

中潮带的小型底栖动物丰度介于 $30.3\text{--}2033.7 \text{ ind.} \cdot 10 \text{ cm}^{-2}$ 之间,平均值为 $737.9 \pm 562.62 \text{ ind.} \cdot 10 \text{ cm}^{-2}$,M04 区域中潮带的小型底栖动物丰度最低,M08 区域中潮带的小型底栖动物丰度最高;除 M05 区域外,低潮带的小型底栖动物丰度介于 $73.7\text{--}869.4 \text{ ind.} \cdot 10 \text{ cm}^{-2}$ 之间,平均值为 $410.8 \pm 283.65 \text{ ind.} \cdot 10 \text{ cm}^{-2}$,M06 区域低潮带的小型底栖动物丰度最低,M01 区域低潮带的小型底栖动物丰度最高。

在 10 个调查区域中,有 6 个区域的中潮带小型底栖动物丰度大于高潮带与低潮带,调查区域高潮带与低潮带的小型底栖动物丰度相差不大。

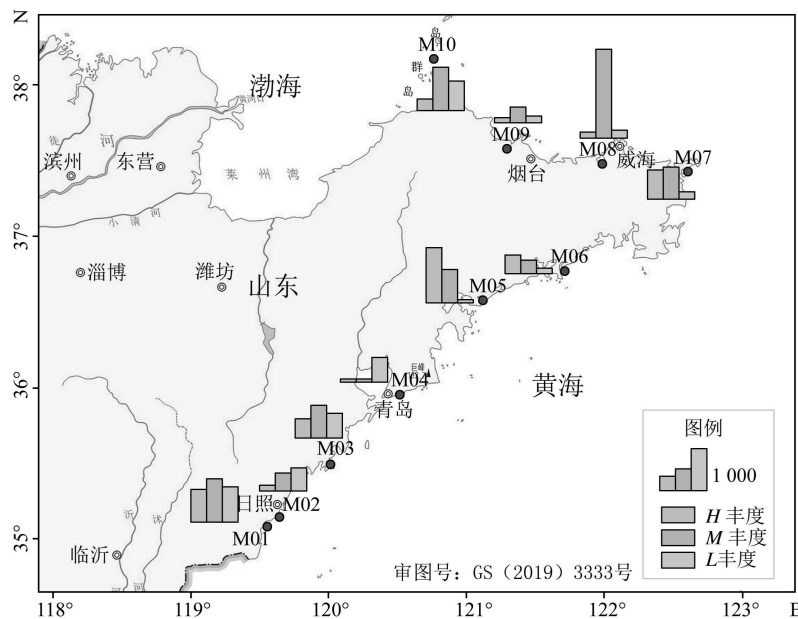


图 3 山东半岛沿岸高、中、低潮带小型底栖动物丰度分布图(单位: $\text{ind.} \cdot 10 \text{ cm}^{-2}$)

表 6 山东半岛沿岸潮间带调查区域小型底栖动物生物量分布

区域	小型底栖动物生物量/ $\mu\text{g} \cdot 10 \text{ cm}^{-2}$				比较
	高潮带(H)	中潮带(M)	低潮带(L)	平均值	
M01	1037.47 ± 450.92	892.09 ± 146.99	517.55 ± 50.79	815.71 ± 268.25	$H > M > L$
M02	177.73 ± 31.20	366.36 ± 24.23	329.52 ± 51.84	291.21 ± 99.98	$M > L > H$
M03	190.30 ± 72.04	464.44 ± 23.13	403.39 ± 96.25	352.71 ± 143.93	$M > L > H$
M04	39.38 ± 8.58	53.81 ± 37.49	388.07 ± 69.23	160.42 ± 197.29	$L > M > H$
M05	725.47 ± 195.45	390.26 ± 139.71		558.12 ± 237.38	$H > M$
M06	215.37 ± 125.05	155.44 ± 54.59	107.82 ± 27.49	159.55 ± 53.89	$H > M > L$
M07	677.52 ± 83.23	1096.40 ± 349.73	265.36 ± 30.52	679.77 ± 415.52	$M > H > L$
M08	152.58 ± 36.56	1064.26 ± 200.12	458.49 ± 570.65	558.45 ± 463.98	$M > L > H$
M09	122.30 ± 71.22	237.12 ± 24.46	93.89 ± 65.86	151.10 ± 75.84	$M > H > L$
M10	132.28 ± 29.36	455.18 ± 53.45	345.41 ± 110.72	310.95 ± 164.18	$M > L > H$
平均	347.09 ± 338.16	517.53 ± 371.91	323.28 ± 145.59	398.48 ± 308.37	$M > H > L$

2.2.3 小型底栖动物生物量分布。由表 6 和图 4 可知,10 个区域小型底栖动物的生物量介于 $151.10\text{--}815.71$

$\mu\text{g} \cdot 10 \text{ cm}^{-2}$ 之间,平均值为 $395.97 \pm 105.95 \mu\text{g} \cdot 10 \text{ cm}^{-2}$,其中 M09 区域小型底栖动物生物量最低,M01 区域小型底栖动物生物量最高。

在不同潮带中,高潮带的小型底栖动物的生物量介于 $39.38\text{-}1037.47 \mu\text{g} \cdot 10 \text{ cm}^{-2}$ 之间,平均值为 $347.09 \pm 338.16 \mu\text{g} \cdot 10 \text{ cm}^{-2}$,其中 M04 区域高潮带小型底栖动物生物量最低,M01 区域高潮带的小型底栖动物生物量最高;中潮带的小型底栖动物生物量介于 $53.81\text{-}1096.40 \mu\text{g} \cdot 10 \text{ cm}^{-2}$ 之间,平均值为 $517.53 \pm 371.91 \mu\text{g} \cdot 10 \text{ cm}^{-2}$,M04 区域中潮带的小型底栖动物生物量最低,M07 区域中潮带的小型底栖动物生物量最高;除 M05 区域外,低潮带的小型底栖动物生物量介于 $93.89\text{-}517.55 \mu\text{g} \cdot 10 \text{ cm}^{-2}$ 之间,平均值为 $323.28 \pm 145.59 \mu\text{g} \cdot 10 \text{ cm}^{-2}$,M09 区域低潮带的小型底栖动物生物量最低,M01 区域低潮带的小型底栖动物生物量最高。

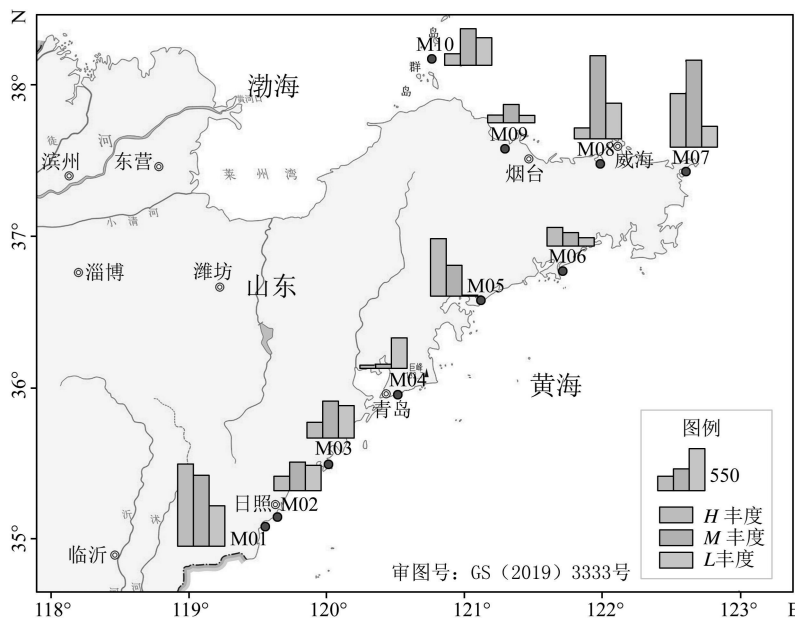


图 4 山东半岛沿岸高、中、低潮带小型底栖动物生物量分布图(单位: $\mu\text{g} \cdot 10 \text{ cm}^{-2}$)

2.2.4 小型底栖生物丰度、生物量与环境因子的相关性分析。Pearson 相关性分析结果(表 7)表明,小型底栖动物的生物量与沉积物中值粒径呈显著正相关($0.469, p < 0.05$)。小型底栖动物群落与环境因子之间的 BIOENV 分析结果表明(表 8),小型底栖动物群落受多种环境参量的综合影响,解释其群落结构变异的最佳环境因子组合为间隙水温度、盐度和沉积物含水量,其相关系数为 0.230。RELATE 检验表明小型底栖动物和环境因子(非)相似性矩阵之间没有显著性相关($p = 0.70 > 0.05$)。

表 7 山东半岛沿岸潮间带小型底栖动物丰度、生物量与环境因子的相关性分析结果

	MA	MB	T	S	Chl-a	W	OM	Md
MA	1	0.810**	-0.084	-0.173	0.059	0.147	0.069	0.199
MB	0.810**	1	-0.249	-0.176	0.144	-0.106	-0.011	0.469*

注: ** :在 0.01 水平(双侧)上显著相关; * :在 0.05 水平(双侧)上显著相关; MA :小型底栖动物丰度; MB : (meiofauna biomass)小型底栖动物生物量(meiofauna biomass); T :温度(Temperature); S :盐度(Salinity); Chl-a :叶绿素含量(Chlorophyll-a content); W :含水量(Water content); OM :有机质含量(Organic matter content); Md :中值粒径(Median grain size)

3 讨论

3.1 山东半岛沿岸小型底栖动物分布格局

小型底栖动物丰度受多种生物与非生物因素的影响,非生物因素包括季节、水温、水深、pH、沉积物粒度、叶绿素 a 含量等;生物因素有大型底栖动物活动的干扰、捕食作用等^[19]。与以往研究结果相同,自由生

活线虫是小型底栖动物中最优势的类群,大约占小型底栖动物的 60%-90%^[4],在某些生境中可达到 90%以上^[20]。对于潮间带,诸如人为踩踏、沙子采挖和海滩清洁等人类活动可能直接影响海洋底栖生态系统中的小型底栖动物丰度^[13]。研究区域小型底栖动物丰度分布不均匀,小型底栖动物丰度较高的几个区域,M05 区域、M07 区域、M08 区域和 M10 区域都是受人为影响较少的潮间带。M05 区域位于海阳麻姑岛,是大面积的泥滩,属于被私人承包的区域,受人为踩踏影响很小;M07 区域位于荣成天鹅湖,虽说是旅游景点,但由于采样时间为 4 月份,在保护生境时间内,人流量很少;M10 区域位于长岛中的一个非景点岛屿,少有游客。小型底栖动物丰度较小的区域,例如 M09,位于烟台夹河口,采样过程中陆续有很多当地人来采样地点挖蛭子和蛤蜊;M04 区域青岛第二海水浴场也是青岛市人流量比较大的景点。旅游者的踩踏会直接影响沉积物的含水量、气水渗透性,压缩沉积物会导致沉积物溶氧量的降低^[21],进而导致小型底栖动物丰度的降低。

沉积物粒径在潮间带沉积物微环境中被认为是重要的物理因子,尤其是在大尺度的空间分布上^[22]。另外小型底栖动物的分布及类群组成受许多沉积环境因子的综合影响^[3]。环境因子之间存在互相影响的关系,沉积物粒度特征可以通过影响其他环境因子,间接影响小型底栖动物群落^[23]。沉积物颗粒越细,含水率越高,越有利于有机质保存,从而有机质含量越高^[24]。沉积物中的叶绿素 *a*,有机质含量是底栖动物的食物来源,也是其生存的重要有机环境^[25]。M05 区域的小型底栖丰度最高,M05 区域沉积物含水率最高且沉积物有机质含量也最高,中值粒径最小。M09 区域小型底栖动物丰度最低,M09 区域沉积物有机质含量最低。

在 10 个区域中,有 6 个区域的中潮带小型底栖动物丰度与生物量大于高潮带与低潮带,调查区域高潮带与低潮带的小型底栖动物丰度与生物量相差不大。以往的研究^[26-28]也表明中潮带往往是小型底栖动物的最佳生存环境,因为中潮带的有机质输入、间隙水溶解氧含量以及水分保持到达最佳的平衡点,能支撑相对较高的底栖生物丰度和生物多样性。

3.2 与其他潮间带海域小型底栖动物的比较

与其他潮间带小型底栖动物研究相比(表 9),本次研究小型底栖动物丰度较低。本次研究调查的小型底栖动物丰度小于青岛第二海水浴场和石老人海水浴场^[29],青岛第二海水浴场和石老人海水浴场小型底栖动物丰度与中值粒径和有机质含量显著正相关,还受到叶绿素含量与人为扰动的影响。可能是由于本次调查期间,M04 区域采样时间是在夏季,夏季的潮间带间隙水温度较高,小型底栖动物会向沉积物深处迁移^[13];另外夏季游客量增多,旅游者的踩踏会影响到小型底栖动物的分布,沙滩的机械清理在清除了人为垃圾的同时也清除了有机碎屑^[28],会导致小型底栖动物丰度的降低。

本次研究调查的小型底栖动物丰度也小于双台子河口^[1],其为我国最北端的河口潮间带,潮间带较为平缓,属典型光滩,并且双台子河口区域小型底栖动物丰度也高于我国其他砂质潮间带报道。

本次研究也低于厦门大德记沙滩小型底栖动物丰度,厦门大德记沙滩沉积物粗砂含量高,具有较好的渗透性^[19],为其间生活的底栖生物滞留颗粒和溶解性的有机物质。薛家岛砂质潮间带小型底栖动物丰度^[14]也高于本次调查研究,薛家岛砂质潮间带远离市区,游客践踏等扰动较低,并且采样点海滩附近的污水处理厂排放口常年排放的污水以及大型鲍鱼养殖厂排出的养殖废水导致其海滩的有机质含量比青岛其他旅游沙

表 8 山东半岛沿岸潮间带小型底栖动物丰度与环境因子 BIOENV 分析结果

环境因子变量数	相关系数	环境因子变量组合
3	0.230	T, S, W
2	0.221	T, W
1	0.216	W
2	0.211	S, W
3	0.203	T, W, Md
4	0.185	T, S, W, Md
2	0.185	W, Md
3	0.164	S, W, Md
4	0.164	T, S, W, Md
4	0.144	T, S, Chl-a, W

注: T: 温度(Temperature); S: 盐度(Salinity); Chl-a: 叶绿素含量(chlorophyll-a content); W: 含水量(Water content); OM: 有机质含量(Organic matter content); Md: 中值粒径(Median grain size)

滩高。

本次研究小型底栖动物丰度高于南极菲尔德斯半岛^[8]。山东半岛处于北温带,相较于南大洋温度高,沉积物有机质含量高,更适合小型底栖动物的生存。另外在南极菲尔德斯半岛小型底栖动物调查中,涡虫属于除线虫外的优势类群,较粗的沉积物中为小型底栖动物提供了更大的生存空间,更适于相对较大个体的底栖动物生存,在碎石底质中,涡虫类群占比较高。

表 9 山东半岛沿岸潮间带小型底栖动物丰度和优势类群与其他潮间带的比较

研究海域	丰度/ind. · 10 cm ⁻²	丰度优势类群	资料来源
青岛第二海水浴场	1167.3	线虫、涡虫	李佳等 ^[29] , 2012
青岛石老人海水浴场	1130.2	线虫、涡虫	李佳等 ^[29] , 2012
三亚大东海砂质潮间带	595.77	线虫、桡足	骆添等 ^[30] , 2020
大连金沙滩潮间带	425.2	线虫、桡足	臧瑜等 ^[2] , 2020
青岛沧口潮间带	936.02	线虫	付姗姗等 ^[31] , 2012
青岛薛家岛潮间带	1384.69	线虫、涡虫	韦晓慧等 ^[14] , 2013
厦门大德记沙滩	660.2	桡足类、线虫、缓步类	慕芳红等 ^[19] , 2020
双台子河口砂质潮间带	3530	线虫	杨纯懿等 ^[1] , 2020
南极菲尔德斯半岛	256.8(8.5-1698.5)	线虫、涡虫	刘晓收等 ^[8] , 2020
山东半岛沿岸潮间带	524.96	线虫、桡足	本研究

4 结论

本文对山东半岛沿岸日照、青岛、烟台、威海等地共计 10 个区域小型底栖动物进行了研究,包括小型底栖动物的类群组成、丰度与生物量的分布格局。结果表明,共发现 11 个小型底栖动物类群,包括自由生活海洋线虫、桡足类、甲壳类幼体、介形类、动吻类、双壳类、涟虫类、涡虫类、多毛类、缓步类和腹毛类。山东半岛沿岸潮间带小型底栖动物平均丰度为 524.96 ± 443.72 ind. · 10 cm⁻²,其中海洋线虫丰度占绝对优势,占总丰度的 90.27%,桡足类占比 6.42%。小型底栖动物平均生物量为 398.48 ± 308.37 μg · 10 cm⁻²,海洋线虫的干重生物量最大,为 189.56 ± 168.67 μg · 10 cm⁻²,占总生物量的 47.57%,其次是多毛类,占 28.87%。小型底栖动物的生物量与中值粒径呈现显著正相关。小型底栖动物群落结构受多种环境参量的综合影响,解释其变异度的最佳环境因子组合为间隙水温度、盐度和沉积物含水量。小型底栖动物丰度表现出区域差异,海阳麻姑岛、荣成天鹅湖和砣矶岛等受人活动影响较小的区域丰度相对较高。青岛第二海水浴场和烟台夹河口等游客量大,受人类活动影响大的区域小型底栖动物丰度较低。相对于国内其他潮间带小型底栖动物研究,本调查区域小型底栖动物丰度较低,海洋线虫丰度占小型底栖动物总丰度的绝对优势与以往研究相似。

参 考 文 献

- [1] 杨纯懿,张龙辉,杜永芬,等.双台子河口砂质潮间带小型底栖动物的群落结构及其对环境的响应[J].海洋与湖沼,2020,51(3):572-582.
- [2] 臧瑜,孙燕,杨丽莉,等.大连金沙滩小型底栖生物时空分布特征及影响因素[J].海洋科学,2020,44(2):76-89.
- [3] MOENS T, BRAECKMAN U, DERYCKE S, et al. Ecology of free-living marine nematodes[M]. Research Gate, 2013.
- [4] HIGGINS R P, THIEL H. Introduction to the study of Mei fauna[M]. Washington, DC: Smithsonian Institution Press, 1988.
- [5] MONTAGNA P A. Rates of metazoan mei faunal microbivory: A review[J]. Vie et Milieu, 1995, 45(1): 1-9.
- [6] GERLACH S A. On the importance of marine mei fauna for benthos communities[J]. Oecologia, 1971, 6(2): 176-190.
- [7] COULL B C. Role of mei fauna in estuarine soft-bottom habitats[J]. Australian Journal of Ecology, 1999, 24(4): 327-343.
- [8] 刘晓收,王笑笑,王璐,等.南极菲尔德斯半岛潮间带小型底栖动物初步研究[J].极地研究,2020,32(3):281-289.
- [9] 张志南,周红,华尔,等.中国小型底栖生物研究的 40 年——进展与展望[J].海洋与湖沼,2017,48(4):657-671.

- [10] ALVES A S, CAETANO A, COSTA J L, et al. Estuarine intertidal meiofauna and nematode communities as indicator of ecosystem's recovery following mitigation measures[J]. *Ecological Indicators*, 2015, 54: 184-196.
- [11] 张志南. 秦皇岛砂滩海洋线虫的数量研究[J]. *青岛海洋大学学报*, 1991, 21(1): 63-75.
- [12] 张志南, 党宏月, 于子山. 青岛湾有机质污染带小型底栖生物群落的研究[J]. *青岛海洋大学学报*, 1993, 23(1): 83-91.
- [13] 华尔, 林佳宁, 冯颂, 等. 踩踏对砂质滩小型底栖动物的影响: 现场扰动实验初步结果[J]. *中国海洋大学学报*, 2010, 40(10): 63-68.
- [14] 韦晓慧, 慕芳红, 杨世超. 青岛薛家岛砂质潮间带小型底栖生物丰度和生物量[J]. *中国海洋大学学报*, 2013, 43(10): 60-66.
- [15] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 海洋监测规范 第5部分: 流积物分析[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [16] 王荣. 荧光法测定浮游植物色素计算公式的修正[J]. *海洋科学*, 1986, 10(3): 1-5.
- [17] 张志南, 钱国珍. 小型底栖生物取样方法的研究. *海洋湖沼通报*[J]. 1990(4): 37-42.
- [18] 刘晓收, 许嫒, 张敬怀, 等. 南海北部深海小型底栖动物丰度和生物量[J]. *热带海洋学报*, 2014, 33(2): 52-59.
- [19] 慕芳红, 张婷, 李佳, 等. 厦门大德记沙滩小型底栖动物的时空分布及影响因素[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2020, 50(9): 34-45.
- [20] 乔春艳, 郝映东, 陆洋, 等. 南海北部潮间带自由生活线虫的生物量及生物多样性初步研究[J]. *聊城大学学报(自然科学版)*, 2021, 34(2): 65-72.
- [21] WYNBERG R P, BRANCH G M. Disturbance associated with bait collection for sand prawns (*Callinassa kraussi*) and mud prawns (*Upogebia africana*): long term effects on the biota of intertidal sandflats[J]. *Journal of Marine Research*, 1994, 52: 523-528.
- [22] GIÈRE O. Meiobenthology: the microscopic motile fauna of aquatic sediments[J]. *Meiobenthology: The Microscopic Motile Fauna of Aquatic Sediments*, 2009(7): 15-27.
- [23] TREBUKHOVA Y, MILJUTIN D, PAVLYUK O, et al. Changes in deep-sea metazoan meiobenthic communities and nematode assemblages along a depth gradient (North-western Sea of Japan, Pacific) [J]. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 2013, 86-87: 56-65.
- [24] 何蕾, 华尔, 刘晓收, 等. 夏、秋季渤海小型底栖动物类群组成及分布特征[J]. *生态学报*, 2019, 39(8): 2794-2805.
- [25] Wang X X, Liu X S, Xu J H. Distribution Patterns of Meiofauna Assemblages and Their Relationship With Environmental Factors of Deep Sea Adjacent to the Yap Trench, Western Pacific Ocean[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2019, 6: 725.
- [26] HUSTON M. A general hypothesis of species diversity[J]. *The American Naturalist*, 1979, 113: 81-101.
- [27] PATTNAIK A, RAO M V L. Composition and distribution of interstitial meiofauna of the sandy beach at Gopalpur, south Orissa coast [J]. *Indian Journal of Marine Sciences*, 1990, 19(3): 165-170.
- [28] GHESKIERE T, HOSTE E, VANAVERBEKE J, et al. Horizontal zonation patterns and feeding structure of marine nematode assemblages on a macrotidal, ultra-dissipative sandy beach (De Panne, Belgium) [J]. *Journal of Sea Research*, 2004, 52(3): 211-226.
- [29] 李佳, 华尔, 张志南. 青岛砂质潮间带小型底栖动物分布及季节动态[J]. *应用生态学报*, 2012, 23(12): 3458-3466.
- [30] 骆添, 梁宸梓, 孙燕, 等. 三亚大东海砂质潮间带小型底栖生物的时空分布及影响因素[J]. *海洋科学*, 2020, 44(2): 36-44.
- [31] 付姗姗, 慕芳红, 杨世超. 青岛沧口潮间带小型底栖生物的时空分布研究[J]. *中国海洋大学学报*, 2012, 42(9): 124-130.