

沉淀分离富集-分光光度法测定 海水中痕量活性磷酸盐

梁 英, 袁东星, 林庆梅

(厦门大学 近海海洋环境科学国家重点实验室, 环境科学研究中心, 福建 厦门 361005)

摘要: 十六烷基三甲基溴化铵 (cetyltrimethylammonium bromide, CTAB) 可与磷钼蓝 (phosphomolybdenum blue, PMB) 生成水难溶的 PMB-CTAB 离子缔合物沉淀, 从而分离富集水溶液中的 PMB。该沉淀易溶于硫酸乙醇溶液, 溶液在 700 nm 有强吸收, 基于此建立了沉淀分离富集-分光光度法测定海水中痕量活性磷酸盐的新方法。对溶剂酸度、试剂用量、反应时间与温度等实验参数进行了优化选择, 并考察了盐度对测定结果的影响。实验结果表明, PMB 可被 CTAB 有效地定量沉淀; 盐度在 15~45 范围内, 对测定结果无影响。在优化的实验条件下, 以盐度为 35 的人工海水为基底, 做空白加 P 标实验, 方法的线性范围为 0.30~8.00 $\mu\text{g/L}$, 平均回收率为 95.0%, 方法检测限为 0.10 $\mu\text{g/L}$ 。对实际海水中痕量活性磷酸盐进行测定, 相对标准偏差 (RSD) 为 4.4%~7.1%, 与广泛采用的 MAGIC 法比较, 置信度为 99% 时结果无显著差异。新方法具有消耗试样体积小、测定速度快等优点。

关键词: 沉淀富集; 磷钼蓝; 活性磷酸盐; 十六烷基三甲基溴化铵

中图分类号: P734.4 文献标识码: A 文章编号: 1007-6336(2006)03-0081-05

Determination of trace orthophosphates in seawater by spectrophotometry with precipitation preconcentration

LIANG Ying, YUAN Dong-xing, LIN Qing-mei

(State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Environmental Science Research Center, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: An ion pair compound of phosphomolybdenum blue (PMB) with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) precipitated from aqueous solution can be easily dissolved in sulfuric acid ethanol solution. Based on this, a novel method was established to determine the trace orthophosphates in seawater. The experimental parameters, including acid concentration in the solvent, the reagent concentrations, the reaction time and temperature, were optimized. The effect of salinity was also studied. The results showed that PMB could be efficiently precipitated by CTAB, and the precipitation was not influenced by the salinity within 15 and 45. Under the optimized conditions, using artificial seawater (35) as a matrix, the linearity, the recovery and the detection limit of the proposed method were 0.30 to 8.00 $\mu\text{g/L}$, 95.0% and 0.10 $\mu\text{g/L}$, respectively. The RSDs ranged from 4.4 to 7.1% for the real seawater samples. Two seawater samples were analyzed with both the proposed method and magnesium hydroxide-induced coprecipitation (MAGIC) method. The results showed no significant difference with t test and confidence interval 99%. The proposed method has the advantages to be fast detection and little sample.

Key words: precipitation preconcentration; phosphomolybdenum blue; orthophosphates; cetyltrimethylammonium bromide

磷钼蓝 (phosphomolybdenum blue, PMB) 分光光度法是海水中活性磷酸盐的经典测定方法, 其检测限为 10 $\mu\text{g/L}$ ^[1]。而在一些寡营养盐水域, 例如中国南海, 夏季表层水体活性磷酸盐的平

均含 P 量为 1.2 $\mu\text{g/L}$ ^[2], 远低于该方法的检测限。近年来, 国内外很多学者致力于探索更灵敏的测定新方法, 如长光程流通池法^[3]、鲁米诺化学发光法^[4]、有机溶剂萃取浓缩法^[5]以及氢氧化

* 收稿日期: 2005-04-13, 修订日期: 2005-06-01

基金项目: 国家自然科学基金 (20277030)

作者简介: 梁英 (1975), 女, 湖南涟源人, 博士研究生, 就职于桂林电子工业学院八系, 主要从事环境化学研究。

镁共沉淀 (magnesium hydroxide-induced coprecipitation, MAGIC)法^[6]等。

这些方法中只有 MAGIC 法成功地应用于海水中低含量活性磷酸盐的分析。MAGIC 法利用海水中的 Mg^{2+} 与 OH^- 生成 $Mg(OH)_2$ 沉淀时会共沉淀 PO_4^{3-} 的特性来富集 PO_4^{3-} , 具有灵敏度高、精密度好的优点, 是目前被海洋工作者广泛采用^[7,8] 与认可的一种方法, 但消耗试样体积大, 且费时耗力, 一般实验条件下需要 500 mL 水样, 耗时 7 h。因此, 发展更为灵敏快速的低含量磷酸盐分析方法一直为海洋工作者致力研究。

沉淀分离法是经典分离方法之一, 有机沉淀剂以其选择性强、灵敏度高和沉淀性能好等特点被广泛地应用于分离中。Christos 等人^[9] 发现磷钼黄 (yellow phosphomolybdenum complex, YPM) 可与阳离子表面活性剂十六烷基三甲基溴化铵 (cetyltrimethylammonium bromide, CTAB) 生成 YPM-CTAB 离子缔合物而被表面活性剂 Triton X-45 萃取。本实验发现, PMB 阴离子能与 CTAB 阳离子缔合, 形成 PMB-CTAB 离子缔合物沉淀。基于此, 建立了沉淀分离富集-分光光度法测定海水中痕量活性磷酸盐的新方法。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器和试剂

722 型分光光度计 (厦门分析仪器厂), HP-8453 紫外-可见分光光度计 (美国 Agilent 公司), LD4-2 型离心机 (北京医用离心机厂), 电热恒温水浴锅 (上海医疗器械五厂)。所有实验器皿用 1:4 (V/V) HNO_3 浸泡 30 min 后, 用反渗透纯水超声清洗。

钼酸铵混合溶液: 为了降低试剂空白, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 7H_2O$ (A. R., 国药集团) 经无水乙醇 (A. R., 上海振兴试剂一厂) 重结晶后, 配制成 14% (W/V) 钼酸铵溶液, 过 SEP-PAK C18 小柱 (美国 Millipore 公司), 得纯化的钼酸铵溶液, 然后按文献^[1] 所述与 H_2SO_4 (G. R., 上海振兴试剂一厂)、酒石酸锑钾 (A. R., 天津化学试剂有限公司) 混合配制成钼酸铵混合溶液。100 g/L 的抗坏血酸 (A. R., 国药集团) 溶液当天配制。磷酸盐标准溶液: 用在 110 °C 干燥至恒重的 KH_2PO_4 (A. R., 上海化学试剂总厂) 配制成含 P 300 mg/L 的标准储备液, 用时稀释成含 P 150 μ g/L 标准工作液。5.0 g/L CTAB (A. R., 国药集团) 水溶液。硫酸

乙醇溶液: 将适量的浓硫酸缓慢加入无水乙醇中配制而成。人工海水: 用 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (A. R., 国药集团) 与 NaCl (A. R., 上海化学试剂公司) 按文献^[1] 所述配制, 采用 MAGIC 法除 P。实验用水为反渗透纯水。

1.2 实验方法

移取适量磷酸盐标准工作液于 200 mL 试样瓶中, 用盐度为 35 人工海水稀释至 150 mL, 依次加入 2.0 mL 钼酸铵混合溶液、3.0 mL 100 g/L 的抗坏血酸, 摇匀; 30 °C 水浴中加热显色 10 min 后, 加入 1.5 mL 5.0 g/L 的 CTAB 溶液, 摇匀; 于 30 °C 水浴中沉淀 20 min 后, 转移至 80 mL 离心管中, 3 000 r/min 下分两次各离心 1.5 min 分离沉淀, 弃去上清液, 用 5.0 mL 0.50 mol/L 硫酸乙醇溶液充分溶解 PMB-CTAB 沉淀, 将溶液转移至 15 mL 离心管中, 在 3 000 r/min 下, 离心 2 min, 除去少量不溶于溶剂的盐, 用分光光度计于 700 nm 处, 取 3 cm 比色皿, 以溶剂为参比, 测溶液的吸光值 A 。

2 结果与讨论

2.1 吸收光谱的绘制和波长的选择

采用 HP-8453 紫外-可见分光光度计, 以硫酸乙醇溶液为参比, 绘制 400 ~ 1 100 nm 范围内 PMB-CTAB 硫酸乙醇溶液的吸收光谱。光谱图在 670 ~ 780 nm 范围内出现最大吸收平台, 故选择 700 nm 作为 PMB-CTAB 缔合物的测定波长。

2.2 溶剂的选择

硫酸乙醇溶液曾被 Christos 等人^[9] 作为溶剂, 溶解胶束相中的 YPM-CTAB 离子缔合物。据此, 本实验以人工海水为基底, 配制含 P 4.0 μ g/L 的加标样, 选择硫酸乙醇溶液作为溶剂, 变化乙醇中 H_2SO_4 浓度, 其它实验参数如 1.2 所述, 考察了乙醇中酸度对溶解效果的影响, 当溶剂中不含 H_2SO_4 时, 无论乙醇加入时间多长, 溶液中尚有大量蓝色颗粒物未溶, 说明纯无水乙醇无法完全溶解 PMB-CTAB 沉淀。随着溶剂中 H_2SO_4 浓度增大, 未溶的蓝色颗粒物迅速减少, 当 H_2SO_4 浓度达 0.5 mol/L 时, 溶液中只有少量白色粉末状沉淀未溶, 这些白色粉末状沉淀应是不溶于乙醇的无机盐, 说明在此条件下 PMB-CTAB 沉淀已完全溶解。采用不同酸度溶剂实验的对应空白与加标样溶液的吸光值见图 1。图 1 表明, 在较低酸度情况下, 试剂空白较大, 为钼酸盐在酸

度较低的乙醇中易转化成蓝色化合物造成;当溶剂中硫酸浓度高于 0.5 mol/L 时,试剂空白趋向最小,加标样的吸光值趋向平稳。因此,选择 0.5 mol/L⁻¹的硫酸乙醇溶液作为溶剂。

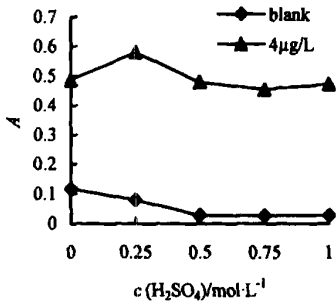


图 1 溶剂中 H₂SO₄ 浓度对空白与加标样溶液吸光值的影响

Fig. 1 Effect of H₂SO₄ concentration on absorbancy

2.3 试剂用量的选择

影响磷钼蓝生成反应的重要因素是溶液中的 [H⁺]/[MoO₄²⁻] 比例^[10], 根据规范^[1], 本实验固定 [H⁺]/[MoO₄²⁻] 为 74, 以 150 mL 盐度为 35 的人工海水加标样为对象, 研究了钼酸铵混合溶液、抗坏血酸以及 CTAB 用量对 PMB 及 PMB-CTAB 形成的影响。

钼酸铵混合溶液用量过少, PMB 反应不完全; 用量增加, PMB 反应趋向完全, 但溶液的酸度增大, 不利于 PMB-CTAB 沉淀的生成。恒定其它实验参数, 取 P 浓度为 4.0 μg/L, 对钼酸铵混合溶液的用量进行了优化, 实验结果示于图 2。从图 2 可见, 钼酸铵混合溶液的用量为 1.5 ~ 2.5 mL 时, 吸光值最大, 即 PMB-CTAB 沉淀的生成量最大。因此, 实验选择钼酸铵混合溶液用量为 2.0 mL。

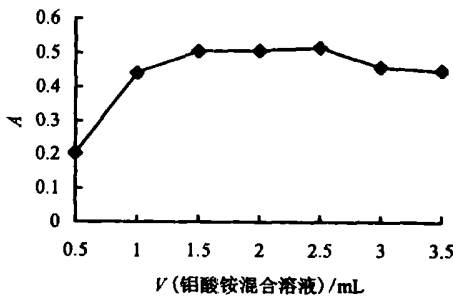


图 2 钼酸铵混合溶液用量对 PMB-CTAB 生成量的影响

Fig. 2 Effect of the volume of the mixed reagent added on PMB-CTAB formation

图 3。试验的 P 浓度为 4.0 μg/L, 其它实验参数恒定, 当 150 mL 试样溶液中 100 g/L 抗坏血酸溶液加入量大于 3.0 mL, 即溶液中抗坏血酸浓度达 2.0 g/L 后, 吸光值出现平台, 说明在该实验条件对 PMB-CTAB 的形成最为有利, 过量的抗坏血酸无影响。因此, 选择溶液中抗坏血酸溶液用量为 3.0 mL。

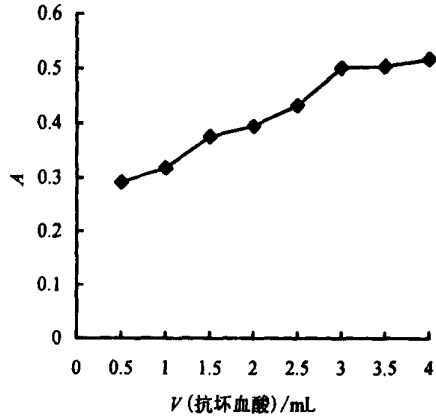


图 3 抗坏血酸用量对 PMB-CTAB 生成量的影响

Fig. 3 Effect of the volume of ascorbic acid added on PMB-CTAB formation

P 的浓度为 4.0 μg/L, 恒定其它实验参数如 1.2 所述, 考察了 CTAB 用量对 PMB-CTAB 沉淀形成的影响, 如图 4 所示。当溶液中 CTAB 浓度大于 33.3 mg/L 时, 即 150 mL 溶液中 CTAB 加入量为 1.0 mL 以上, 吸光值变化非常缓慢, 说明 PMB-CTAB 沉淀量几乎不随 CTAB 用量的增加而增加, 因此, 选择 150 mL 溶液中 5.0 g/L CTAB 加入量为 1.5 mL。

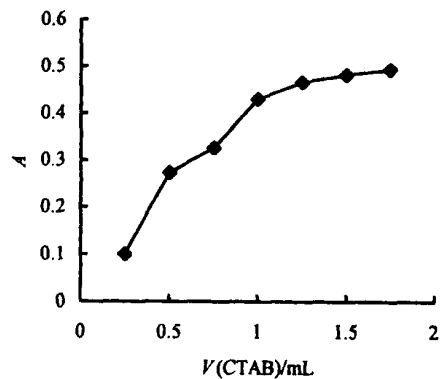


图 4 CTAB 用量对 PMB-CTAB 生成量的影响

Fig. 4 Effect of the volume of CTAB added on PMB-CTAB formation

2.4 显色与沉淀时间对 PMB-CTAB 生成量影响

本研究中显色时间指试样中加入钼酸铵混合

抗坏血酸浓度对 PMB-CTAB 形成的影响见

溶液与抗坏血酸溶液后,生成PMB所耗时间;沉淀时间指CTAB与PMB发生沉淀反应的时间。以含P 4 μg/L的人工海水加标样为实验对象,研究了显色与沉淀时间对PMB-CTAB生成量的影响,实验发现,显色时间超过5 min后,显色反应达平衡。在30 min内PMB-CTAB生成量随沉淀时间的延长呈增长趋势,20 min后增长速率变慢,如图5所示。在实际工作中,分析时间不宜太长,如能严格控制时间方法的重现性好,可以在沉淀反应尚未平衡时离心分离。本研究选择显色时间为10 min,沉淀时间为20 min。

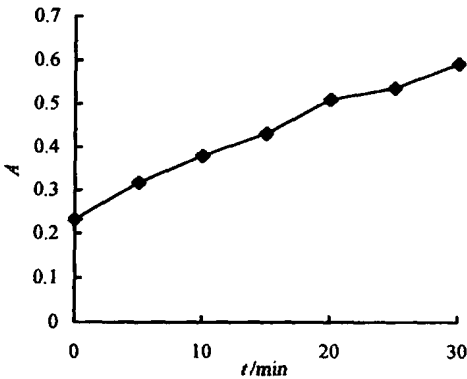


图5 沉淀时间对PMB-CTAB生成量的影响
Fig.5 Effect of precipitation reaction time on PMB-CTAB formation

2.5 温度对测定灵敏度与空白吸光值的影响
考察了不同温度下吸光值与磷浓度(0~6.0 μg/L)的关系,结果见表1。考虑到恒温控制的可操作性,选择30°C和40°C两个实验温度。表1表明,温度从30°C升至40°C,工作曲线斜率略有增大,即测定灵敏度略有增加,但空白值也同时增加。综合考虑灵敏度与空白值两因素,选择30°C作为实验温度。

表1 不同温度下磷的工作曲线

Tab. 1 The regression equations of P for different temperatures

t/°C	回归方程	r	n	斜率	空白值 A
30	$A = 0.104c_p + 0.024$	1	4	0.104	0.024
40	$A = 0.135c_p + 0.048$	0.9995	4	0.135	0.050

$r = 0.9979$), 式中 c_p 的单位为 μg/L。方法检测限的确立参照文献[11],以中国南海海水经MAGIC法除P后为样品基底,加P标浓度为0.30 μg/L,平行测定11次,结果为(0.283 ± 0.035) μg/L,得方法检测限为0.10 μg/L。

在最佳实验条件下,连续7 d内在不同时间测定空白的吸光值11次,得平均值(A)0.023 ±

2.6 盐度对PMB-CTAB生成量的影响

理论上,盐度越大,离子强度越大,离子的活度系数越小,离子的活度越低;反应物活度减小,不利于反应向生成物方向进行。因此考察了盐度对PMB-CTAB形成的影响。在选择的最佳条件下,测定了4.0 μg/L的人工海水加标样及相应空白吸光值随盐度的变化,结果示于图6。盐度从15增至45时,加标试样与空白的吸光值基本不受盐度变化的影响。其原因是当溶液中离子强度高于0.3时,根据德拜休克尔公式计算,离子的活度系数随离子强度的增加而非常缓慢地减少,人工海水盐度为15时,离子强度达0.3。本法的灵敏度高,测定的上下限均低,故适用于寡营养盐的大洋海水。大洋海水的盐度稳定,在35左右,故认为在实际样品测定中,大洋海水盐度的一般变化对PMB-CTAB沉淀反应的影响可以忽略。

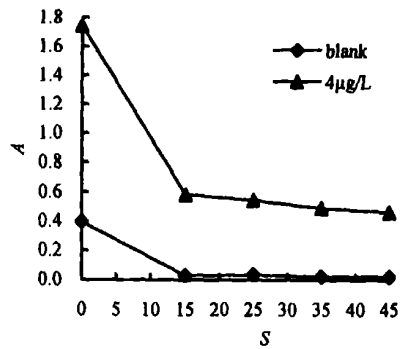


图6 盐度对PMB-CTAB生成量的影响
Fig. 6 Effect of salinity on PMB-CTAB formation

2.7 工作曲线、检测限与空白值

在所选择的最佳条件下,绘制工作曲线。吸光值与P浓度成正比,线性范围为0.30~8.0 μg/L,其回归方程为 $A = 0.041 + 0.101c_p$ ($n = 7,$

0.005。相对于其它低含量磷酸盐测定方法,本法具有较低的空白值。

2.8 基底加标回收率

以中国南海海水为基底,加P标浓度分别为0.1、2.4、6 μg/L,其它实验参数如1.2所述,测得基底加标曲线为 $A = 0.054 + 0.096c_p$ (μg/L, $r = 0.9992$),其斜率与工作曲线斜率之比即加标

回收率平均值为 95.0%。

2.9 与 MAGIC 法的比较

同时用本实验建立的方法与 MAGIC 法, 分别对 2 个取自中国南海的海水样进行测定, 结果列于表 2。表 2 表明, 本法用于海水测定, 当置信

度为 99% 时, 与 MAGIC 法结果无显著差异。

3 结 语

发现 PMB 可与 CTAB 生成沉淀, 基于此建立了测定海水中痕量活性磷酸盐的沉淀分离富集

表 2 海水样品的测定结果

Tab. 2 Analytical results for seawater samples

试样	$c/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$		t 检验, $P=99\%$
	本法	MAGIC 法	
1	1.13±0.08 ($n=4$, RSD=7.1%)	1.04±0.06 ($n=4$, RSD=5.9%)	无显著差异
2	1.82±0.08 ($n=3$, RSD=4.4%)	1.61±0.03 ($n=3$, RSD=1.9%)	无显著差异

—分光光度法, 对两个取自中国南海的海水样进行测定, 结果满意。与 MAGIC 法比较, 测定结果无显著差异。相对于 MAGIC 法, 本方法具有如下优点: (1)海水样品消耗少, 仅需 150 mL 海水样; (2)操作简单; (3)分析时间短, 4 个样的分析时间约为 45 min。

致谢: 本实验所用海水由厦门大学环科中心戴民汉教授与袁梁英同学提供, 特此感谢。

参考文献:

[1] GB 17387-1998. 海洋监测规范[S].

[2] 潘建明, 扈传昱, 陈建芳, 等. 南海海域海水中各形态磷的化学分布特征[J]. 海洋学报, 2004, 26(1): 40-47.

[3] ZHANG J Z, CHI J. Automated analysis of nanomolar concentrations of phosphate in natural waters with liquid waveguide [J]. Environ Sci Technol, 2002, 36: 1048-1053.

[4] ZUI O V, BIRKS J W. Trace analysis of phosphorus in water by sorption preconcentration and luminol chemiluminescence [J]. Anal Chem, 2000, 72: 1699-1703.

[5] SHOJI M, TOSHIKI W, KYOJI T. Solvent Extraction-spectrophotometric determination of phosphate with molybdate and

malachite green in river water and sea-water [J]. Talanta, 1984, 31: 235-240.

[6] KARL D M, TIEN G. MAGIC: A sensitive and precise method for measuring dissolved phosphorus in aquatic environments [J]. Limnol Oceanogr, 1992, 37: 105-116.

[7] CHEN Y L, CHEN H Y, KARL D M, *et al.* Nitrogen modulates phytoplankton growth in spring in the South China Sea [J]. Continental Shelf Research, 2004, 24: 527-541.

[8] ANGIE T B, KARL D. Application of a novel method for phosphorus determinations in the oligotrophic North Pacific Ocean [J]. Limnol Oceanogr, 1998, 43: 1565-1577.

[9] CHRISTOS Z K., DIMOSTHENIS L G, ATHANASIOS G V. The use of surfactant-based separation techniques for monitoring of orthophosphate in natural waters and wastewater [J]. The Science of the Total Environment, 2003, 305: 157-167.

[10] DRUMMOND L, MATHER W. Determination of phosphorus in aqueous solution via formation of the phosphoantimonymolybdenum blue complex re-examination of optimum conditions for the analysis of phosphate [J]. Analytica Chimica Acta, 1995, 302: 69-74.

[11] BERGER W, MCCARTY H, SMITH R K. Environmental Laboratory Data Evaluation [M]. Douglasville, GA: Genium Publishing Copration, 1996. 2-11.

(上接第 80 页) 以将流式细胞术与其它方法(如荧光标记的抗体)结合起来, 根据荧光信号的差异来区分不同的类群^[5]。总之, 应用流式细胞术进行病毒及病毒-宿主之间相互关系的研究, 不仅是在医学研究上, 在环境及海洋科学领域也有着其不可比拟的优势和进一步发展的潜力。

致谢: 衷心感谢法国 Roscoff 海洋研究所 Marie D 博士在本实验中的技术方法上给予的指导。

参考文献:

[1] LEGENDRE L, COURTIES C, TROUSSELLIER M. Flow

cytometry in oceanography 1989~1999: Environmental challenges and research trends [J]. Cytometry, 2001, 44: 164-172.

[2] MARIE D, BRUSSAARD C P D, THYRHAUG R, *et al.* Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(1): 45-52.

[3] FUHRMAN J A. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects [J]. Nature, 1999, 399: 541-548.

[4] MARIE D, PARTENSKY F, VAULOT D, *et al.* Current Protocols in Cytometry [M]. New York: John Wiley & Sons Inc, 1999. 1-15.

[5] BRUSSAARD C P D, MARIE D, BRATBAK G. Flow cytometric detection of viruses [J]. J Virol Methods, 2000, 85: 175-182.