

研究报告

固相萃取-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, 厦门大学环科中心, 厦门 361005)

摘 要 磷钼蓝 (PMB) 与十六烷基三甲基溴化铵 (CTMAB) 可生成疏水性的 PMB-CTMAB 离子缔合物, 被 Sep-Pak C₁₈ 小柱萃取富集, 基于此建立了 SEP-PAK C₁₈ 小柱固相萃取-分光光度法测定海水中痕量活性磷酸盐的新方法。对洗脱液酸度、萃取流速、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-CTMAB 在 SEP-PAK C₁₈ 小柱上可被有效地定量萃取; 盐度在 25~45 范围内, 对测定结果没有影响。在优化的实验条件下, 以盐度为 35 的人工海水作为基底, 方法的线性范围为 0.18~4.00 μg/L; 平均回收率为 98.5%; 检出限为 0.05 μg/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 2.7%~5.6%。与广泛采用的 MAGIC 法比较, 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 Sep-Pak C₁₈ 柱, 固相萃取, 磷钼蓝, 活性磷酸盐, 十六烷基三甲基溴化铵

1 引 言

磷是海洋浮游植物生长所必需的物质基础^[1]。随着对磷的生物地球化学循环研究的深入, 磷的分析测定方法成为海洋环境科学研究中的关键。

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, 其检出限为 10 μg/L^[2]。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中磷的平均含量为 1.2 μg/L^[3], 远远低于该方法的检出限。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^[4]、鲁米诺化学发光法^[5]、有机溶剂萃取浓缩法^[6]以及 Mg(OH)₂ 共沉淀 (MAGIC) 法^[7]等。这些方法中只有 MAGIC 法成功地运用于海水中低含量活性磷酸盐的分析。MAGIC 法利用海水中的 Mg²⁺ 与 OH⁻ 生成 Mg(OH)₂ 沉淀时会共沉淀 PO₄³⁻ 的特性来富集 PO₄³⁻, 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^[8,9]的方法, 但该方法消耗试样体积大, 且费时费力, 一般实验条件下定量测定含磷量低于 μg/L 级的海水样, 需要 500 mL 以上的水样, 耗时 7 h。固相萃取 (solid phase extraction, SPE) 是上世纪 70 年代后期发展起来的一种样品预处理技术^[10], 已被广泛应用于有机分析中基质的消除以及被分析物的富集^[11]。近年来, 亦逐渐被应用于金属络合物^[12,13]的分析。键合硅胶 C₁₈ 是 SPE 常用的一种填充剂^[14], 主要用于萃取非极性和弱极性的有机物。磷钼蓝属弱极性化合物, 作为阴离子可与阳离子表面活性剂十六烷基三甲基溴化铵 (cetyltrimethylammonium bromide, CTMAB) 生成 PMB-CTMAB 非极性离子缔合物, 更为有效地为 C₁₈ 萃取。基于此, 本研究建立了 C₁₈ 小柱固相萃取-分光光度法测定海水中痕量活性磷酸盐的新方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

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); 津腾 GM-Q 33 型隔膜真空泵 (天津市腾达过滤器件厂); DL-1 型固相萃取器 (国家色谱研究中心); 电热恒温

2004-12-01 收稿; 2005-02-05 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 20277030) 资助项目

水浴锅(上海医疗器械五厂); Sep-Pak C₁₈小柱(美国 Millipore公司)。所有实验器皿用 1:4(V/V)盐酸浸泡 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, (NH₄)₆M₇O₂₄·7H₂O(A. R., 国药集团)经乙醇重结晶后,配制成 14% (W/W)钼酸铵溶液,过 Sep-Pak C₁₈小柱,得纯化的钼酸铵溶液,然后按文献[2]所述与 H₂SO₄(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℃干燥至恒重的 KH₂PO₄(A. R., 上海化学试剂总厂)配制成 300 mg P/L的标准储备液,用时稀释成 150 μg/L标准工作液; 0.5 g/L CTMAB(A. R., 国药集团)水溶液;无水乙醇(A. R., 上海振兴试剂一厂);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 MgSO₄·7H₂O(A. R., 国药集团)与 NaCl(A. R., 上海化学试剂公司)按文献[2]所述配制,采用 MAGIC法除磷。实验用水为反渗透纯水。

2.2 实验方法

移取适量磷酸盐标准工作液置于 200 mL 试样瓶中,用盐度为 35 的人工海水稀释至 150 mL,依次加入 1.0 mL 钼酸铵混合溶液、3.0 mL 100 g/L 的抗坏血酸,摇匀; 35℃水浴中加热显色 8 min后,加入 1.5 mL 0.5 g/L 的 CTMAB 溶液,摇匀;于 35℃水浴中加热反应 25 min后,立即以低于 20.4 mL/min 的流速过事先用乙醇活化的 Sep-Pak C₁₈小柱,萃取溶液中的 PMB-CTMAB 离子缔合物;依次用适量水与无水乙醇洗去小柱上吸附的杂质,再用 1.5 mL 0.56 mol/L 的硫酸乙醇溶液洗脱 PMB-CTMAB 至 1 cm 比色皿中,以洗脱剂为参比,用分光光度计于 700 nm 处,测其吸光度 A。

3 结果与讨论

3.1 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,以洗脱剂为参比,绘制 400~1100 nm 范围内 PMB-CTMAB 洗脱液与 PMB 洗脱液的吸收光谱(见图 1)。PMB-CTMAB 洗脱液光谱图呈现两个较大的吸收峰,最大吸收波长分别位于 700 nm 和 791 nm,与 PMB 洗脱液的光谱相比,两个最大吸收峰均略有红移,本实验以 700 nm 作为 PMB-CTMAB 缔合物的测定波长。

3.2 洗脱剂及萃取流速的选择

变化乙醇中硫酸浓度,其它参数同 2.2 考察了乙醇中酸度对洗脱效果的影响,以洗脱液的吸光度为洗脱指标,结果如图 2 所示。在无水乙醇中加酸可以明显增强洗脱效果,随着硫酸浓度的增大,洗脱能力增强。当浓度达 0.42 mol/L 时,洗脱能力达最大,再增加硫酸浓度对洗脱不再有影响。纯乙醇溶剂很难完全洗脱强非极性 PMB-CTMAB 缔合物,加酸后, PMB-CTMAB 缔合物被破坏,形成阴离子 PMB 与阳离子 CTMAB,而被较完全脱附。根据实验结果,选择 0.56 mol/L 的硫酸乙醇溶液作为本实验的洗脱剂。

固相萃取时,试样过柱流速即萃取流速对萃取效果有影响。流速过快,溶液中的目标物被吸附不完全;流速过慢则耗时过多。恒定其它实验参数如 2.2 所述,考察了萃取流速效应。当试样流速低于 20.4 mL/min 时,萃取效率几乎不受影响,表现为洗脱液的吸光度几乎不变。因此,控制本实验的萃取流速低于 20.4 mL/min。

3.3 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⁺]/[M₇O₂₄²⁻] 比例^[15],固定 [H⁺]/[M₇O₂₄²⁻] 为 74^[2],以 150 mL 3.5% 人工海水加标样为研究对象,研究了钼酸铵混合溶液、抗坏血酸以及 CTMAB 用量对 PMB-CTMAB 形成的影响。

钼酸铵混合溶液用量过少,磷钼蓝反应不完全;用量增加,磷钼蓝反应趋向完全,但溶液的酸度增大,不利于 PMB-CTMAB 离子缔合物生成。恒定其它实验参数,对钼酸铵混合溶液的用量进行了优化,实验结果见图 3。从图 3 可见,钼酸铵混合溶液的用量为 1.0 mL 时,洗脱液的吸光度最大,即 PMB-CTMAB 的生成量最大。考虑方法的灵敏度,实验选择钼酸铵混合溶液用量为 1.0 mL。

实验考察了抗坏血酸用量(1~4 mL)对 PMB-CTMAB 形成的影响。固定其它实验参数,当 150 mL 试样溶液中 100 g/L 抗坏血酸溶液加入量大于 2.5 mL,即溶液中抗坏血酸浓度达 1.7 g/L 后,吸光度出

现平台,说明该实验条件对 PMB-CTMAB 的形成最为有利,过量的抗坏血酸无影响。因此,选择抗坏血酸用量为 3.0 mL

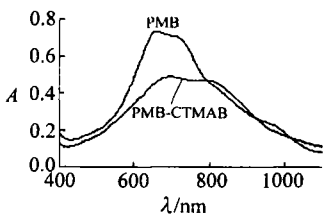


图 1 PMB 和 PMB-CTMAB 的吸收光谱

Fig. 1 Absorption spectra of phosphomolybdenum blue (PMB) and PMB-cetyltrimethylammonium bromide (CTMAB)

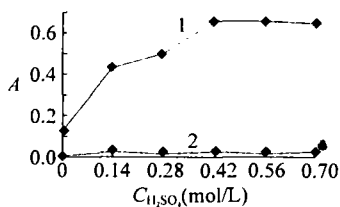


图 2 洗脱剂酸度对洗脱效果的影响

Fig. 2 Effect of H₂SO₄ concentration on the elution
1. [P] 3.0 μg/L; 2. 空白(blank)。

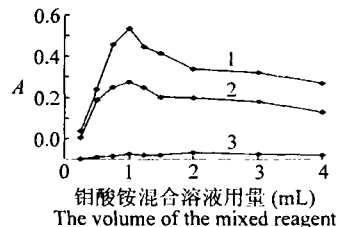


图 3 钼酸铵混合溶液用量的影响

Fig. 3 Effect of the volume of the mixed reagent added
1. [P] 3.0 μg/L; 2. [P] 1.5 μg/L; 3. 空白(blank)。

CTMAB 与 PMB 生成非极性缔合物而被固相萃取。固定其它实验参数如 2.2 所述,考察了 CTMAB 用量对 PMB-CTMAB 形成的影响(如图 4)。溶液中加入与不加 CTMAB 溶液,对萃取的影响显著。相对于 PMB-CTMAB 离子缔合物, PMB 的极性较强,不易被萃取。实验所选择的波长为 700 nm,即 PMB 测定的常用波长。溶液中未加 CTMAB 时洗脱液的吸光度几乎为零,说明 PMB 几乎不被萃取。溶液中 CTMAB 浓度大于 4.2 mg/L,即 150 mL 溶液中 CTMAB 加入量为 1.25 mL 时,生成了最大量的 PMB-CTMAB,进一步增加 CTMAB 用量几乎没有影响。实验选择 150 mL 溶液中加入 0.5 g/L CTMAB 1.5 mL。

3.4 反应时间的影响

本研究中显色时间指试样中加入钼酸铵混合溶液与抗坏血酸后,生成 PMB 所耗时间;缔合时间是 CTMAB 与 PMB 发生离子对缔合反应的时间。实验发现,在本实验条件下,当显色时间超过 5 min 后,显色反应达平衡(如图 5a)。CTMAB 与 PMB 的缔合反应需 25 min 后才能达平衡(如图 5b)。因此,实验选择显色时间为 8 min,缔合时间为 25 min。

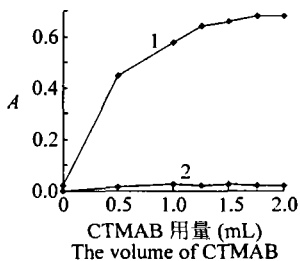


图 4 CTMAB 用量的影响

Fig. 4 Effect of the volume of CTMAB added
1. [P] 3.0 μg/L; 2. 空白(blank)。

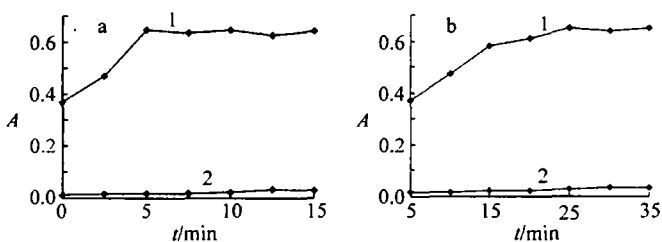


图 5 显色时间(a)和缔合时间(b)的影响

Fig. 5 Effect of color developing time (a) and ion-pair reaction time (b)
1. [P] 3.0 μg/L; 2. 空白(blank)。

3.5 温度的影响

考察了不同温度下吸光度与磷浓度的关系,结果见表 1。温度越高,工作曲线的斜率越大,即方法的灵敏度越高,说明温度的升高有利于显色与缔合反应的进行。但空白值也同时增加。综合考虑,选择 35℃ 作为实验温度。

3.6 盐度的影响

海水盐度越大,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。在选择的最佳条件下,测定了 2.0 μg/L 的人工海水加标样及相应空白吸光度随盐度的变化,结果示于图 6。盐度大于 25 时,加标试样与空白的吸光度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 0.5 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 25 时, 离子强度为 0.49。大洋海水的盐度比较稳定, 在 35 左右, 故认为在实际样品测定中, 盐度的一般变化对离子对缔合反应的影响可以忽略。

表 1 不同温度下吸光度与磷浓度的关系

Table 1 The regression equation of standard curves under different temperatures

T / °C	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	斜率 Slope	空白值 Blank
25	$A = 0.111C_P (\mu\text{g/L}) + 0.006$	0.9979	0.111	0.007
35	$A = 0.205C_P (\mu\text{g/L}) + 0.038$	0.9985	0.205	0.023
40	$A = 0.434C_P (\mu\text{g/L}) + 0.056$	0.9999	0.434	0.040

3.7 工作曲线、检出限与试剂空白

在所选择的最佳条件下, 绘制工作曲线。吸光度与磷浓度成正比, 线性范围为 0.18~4.0 $\mu\text{g/L}$, 其回归方程为 $A = 0.035 + 0.206C_P$ ($n = 7$, $r = 0.9994$), 式中 C_P 的单位为 $\mu\text{g/L}$ 。

方法检出限 (method detection limit MDL) 的确立参照文献 [16], 即取基底加标试样 $n (\geq 4)$ 份, 平行经历预处理与仪器分析全过程, 据 $\text{MDL} = \sigma_{t_{f, 0.01}} (\text{单边}) = \sigma_{t_{f, 0.02}} (\text{双边})$ 计算 MDL, 式中 σ 为标准偏差, 加标浓度须 $\leq 5 \text{MDL}$ 。据此, 以中国南海海水经 MAGIC 法除 P 后为样品基底, 加标浓度为 0.18 $\mu\text{g/L}$, 平行测定 9 次, 结果为 $0.18 \pm 0.017 \mu\text{g/L}$, 得 MDL 方法为 0.05 $\mu\text{g/L}$, 与 MAGIC 法的 0.03 $\mu\text{g/L}$ 相近。

在最佳实验条件下, 11 次不同时间测定空白的吸光度, 得平均值 $A = 0.026 \pm 0.005$ 。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。

3.8 基底加标回收率、柱寿命和样品测定

以中国南海海水为基底, 加标浓度分别为 0.5、1、2、3 和 4 $\mu\text{g/L}$, 测得基底加标曲线为 $A = 0.068 + 0.203C_P$ ($\mu\text{g/L}$, $r = 0.9992$), 加标回收率平均值为 98.5%。在本实验条件下, Sep-Pak C_{18} 小柱的重复使用次数可达 100 次以上。

用本实验建立的方法与 MAGIC 法分别对 3 个取自中国南海的海水样进行测定, 并对两者的结果做统计检验, 结果列于表 2。表 2 表明, 本法用于海水测定, 与 MAGIC 法的测定结果无显著差异。

表 2 海水样中 P 的测定结果

Table 2 The results of phosphor in seawater samples

试样 Samples	测得值 Found ($\mu\text{g/L}$)		统计检验结果 (t 检验) Statistic results with t test
	本法 Proposed method	MAGIC 法 MAGIC method ^a	
1	$1.86 \pm 0.05 (n = 7, \text{RSD} = 2.7\%)$	$1.83 \pm 0.15 (n = 7, \text{RSD} = 8.2\%)$	无显著差异 No significant difference
2	$1.95 \pm 0.11 (n = 4, \text{RSD} = 5.6\%)$	$2.00 \pm 0.05 (n = 4, \text{RSD} = 2.5\%)$	无显著差异 No significant difference
3	$1.03 \pm 0.03 (n = 4, \text{RSD} = 2.9\%)$	$1.03 \pm 0.03 (n = 4, \text{RSD} = 2.9\%)$	无显著差异 No significant difference

MAGIC: magnesium hydroxide-induced coprecipitation method

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提供, 特此感谢。

References

- Smith S.V. *Limnol. Oceanogr.*, **1984**, 29(6): 1149~1160
- State Oceanic Administration of China (国家海洋局). *Criterion of Oceanic Monitoring* (海洋监测规范). Beijing (北京): Ocean Press (海洋出版社), **1991**, 179, 277~281
- Pan Jianming (潘建明), Hu Chuanyu (扈传昱), Chen Jianfang (陈建芳), Liu Xiaoya (刘小涯), Zhou Huaiyang (周怀阳), Ji Weidong (暨卫东). *Acta Oceanologica Sinica* (海洋学报), **2004**, 26(1): 40~47

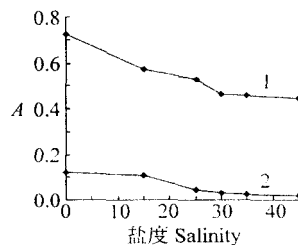


图 6 盐度的影响

Fig 6 Effect of salinity

1. [P] 2.0 $\mu\text{g/L}$; 2. 空白 (blank), $n = 3$.

- 4 Zhang J Z, Chi J. *Environ. Sci. Technol.*, **2002**, 36(5): 1048~1053
- 5 Zui O V, Birks J W. *Anal. Chem.*, **2000**, 72(7): 1699~1703
- 6 Shoji M, Toshiaki W, Kyoji T. *Talanta*, **1984**, 31(4): 235~240
- 7 Karl D M, Tien G. *Limnol. Oceanogr.*, **1992**, 37(1): 105~116
- 8 Chen Y L, Chen H Y, Karl D M, Masayuki T. *Continental Shelf Research*, **2004**, 24(4-5): 527~541
- 9 Angie T B, Karl D. *Limnol. Oceanogr.*, **1998**, 43(7): 1565~1577
- 10 Jardas Z S. *Chimica*, **1978**, 32(12): 484
- 11 Dinson B P, Brocato S, Majors R E. *American Laboratory*, **1986**, (10): 82~94
- 12 Ali A, Shen Hong(沈宏), Xu Guangming(徐光明), Yin Xuefeng(殷学锋). *Chin. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报), **1998**, 19(11): 1746~1748
- 13 Samcoglu S, Elil. *Anal. Chim. Acta*, **2002**, 452(1): 77~83
- 14 Hennion M C. *J. Chromatogr. A*, **1999**, 856(1-2): 3~54
- 15 Drummond L, Mather W. *Anal. Chim. Acta*, **1995**, 302(1): 69~74
- 16 Berger W, McCarty H, Smith R K. *Environmental Laboratory Data Evaluation*. GA, The United States Genim Publishing Corporation, **1996**, 2~11

Trace Analysis of Orthophosphates in Seawater with Solid Phase Extraction and Spectrophotometry

Liang Ying, Yuan Dongxing*, Lin Qingmei

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

Abstract An ion pair compound of phosphomolybdenum blue (PMB) with cetyltrimethylammonium bromide (CTMAB) can be extracted by solid phase extraction technique on C₁₈ column. Based on this, a novel method was established to determine trace orthophosphates in seawater. Experimental parameters, including acid concentration of the eluant, the extracting flow rate, the reagent concentrations, the reaction time and temperature, were optimized. The effect of salinity was also investigated. The results showed that PMB-CTMAB could be efficiently extracted, and the extraction was not influenced by the salinity within 25 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 found to be 0.18 to 4.0 μg/L P, 98.5% and 0.05 μg/L P, respectively. The RSDs ranged from 2.7% to 5.6% for the real seawater samples. Three seawater samples were analyzed with both the proposed method and magnesium hydroxide-induced coprecipitation (MAGIC) method, and the results showed no significant difference with t test. The proposed method had the advantages of being more sensitive, faster and sampler saving.

Keywords Sep-Pak C₁₈ column, solid phase extraction, phosphomolybdenum blue, orthophosphates, cetyltrimethylammonium bromide

(Received 1 December 2004; accepted 5 February 2005)