

氢氧化镁共沉淀法测定海水中纳摩尔级活性磷酸盐

徐燕青 高生泉 陈建芳* 王奎 金海燕 袁梁英 李宏亮

(国家海洋局海洋生态系统与生物地球化学重点实验室, 国家海洋局第二海洋研究所, 杭州 310012)

摘 要 利用海水中 Mg^{2+} 与 OH^- 生成沉淀时会共沉淀 PO_4^{3-} 的特性, 富集海水中 PO_4^{3-} , 富集后的 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 沉淀用酸溶解, 应用磷钼蓝-分光光度法测定。对试剂用量、离心速度及时间、 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 溶解用酸种类、 H/Mo 等实验参数和条件进行了优化。并采用与常规磷钼蓝法介质一致的 H_2SO_4 作为 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 沉淀溶解用酸, 减少混合试剂中 H_2SO_4 的比例, 提前用于 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 沉淀溶解, 减少了沉淀溶解时间, 提高了检测效率, 同时解决了测试介质 H/Mo 过高的问题。在优化条件下, 改进的共沉淀方法的回收率为 97.2% ~ 100.9%, 空白值为 $(4.88 \pm 0.29) \text{ nmol/L}$; 方法检出限为 2.42 nmol/L 。对大洋表层海水活性磷酸盐测定, 其相对标准偏差为 2.1% ~ 4.8%。

关键词 活性磷酸盐; 纳摩尔级磷测定; 镁共沉淀法; 寡营养盐区

1 引 言

大洋真光层中活性磷酸盐浓度往往极低, 通常在纳摩尔级水平^[1-2], 远低于目前常用的磷钼蓝分光光度法的检出限^[3]。由于受低浓度活性磷酸盐测定技术的限制, 上层大洋活性磷酸盐的数据相当缺乏。近年来, 很多学者都致力于建立更灵敏的海水低浓度活性磷酸盐测定方法。如 Huang 等^[4]利用阳离子染色, 与磷钼酸盐相结合形成孔雀绿, 灵敏度比常规钼蓝法提高 5 倍。但该方法存在试剂稳定性差, 显色不稳定, 在酸性条件下会引起有机磷的水解等问题。Liang 等^[5]利用鲁米诺化学发光法测定水样中磷, 该方法灵敏度较高, 满足低磷测定的要求, 但方法受海水中的 Ca^{2+} , Mg^{2+} 的严重干扰, 只适于淡水中低浓度磷的测定要求。两种常用方法为: (1) 根据朗伯-比尔定律, 采用增加比色皿长度的方法提高测定灵敏度, 如 Zhang 等^[6]采用 2m 长的波导纤维作为流通池, 其检出限可达 0.5 nmol/L , 但增加光程在理论上并不提高信噪比, 而且存在光的衰减和光学元件的连接等问题^[6]。(2) 采用液相萃取、固相萃取和共沉淀预等预富集法^[7-11], 其中被普遍接受和认可的方法是镁共沉淀法 (MAGIC)。此方法于 1992 年由 Karl 等提出^[9], 利用海水所含 Mg^{2+} , 添加 OH^- , 使其产生絮状的 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 沉淀, 吸附活性磷酸盐, 达到富集效果。其特点是预富集过程在磷钼酸盐化合物形成之前, 仅对样品进行富集, 所以空白相对较低^[9], 富集倍数能达到 5 ~ 100 倍, 所用仪器简单。

目前, 对 MAGIC 已有一些相关报道^[12-14], 但作者在应用该方法时发现, 如按文献报道的流程和操作步骤, 往往出现空白高、重现性差等问题。本研究采用与常规磷钼蓝法介质一致的 H_2SO_4 溶液作为 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 沉淀溶解用酸, 减少混合试剂中 H_2SO_4 的比例, 提前用于溶解 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 沉淀, 加快了 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 沉淀溶解的速度, 提高了检测效率, 同时解决了测试介质 H/Mo 过高的问题。本方法已成功应用于太平洋上层海水 (0 ~ 200 m) 中活性磷酸盐测定。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

所用仪器为 UV-4206 分光光度计 (日本岛津公司), HITACHI-CR22G II 高速冷冻离心机。实验器皿预先经 10% HCl 浸泡至少 24 h, 当天使用当天清洗。所有试剂均为分析纯以上, 实验用水均为 Millipore 超纯水 ($18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)。1 mol/L NaOH 溶液, 0.25 mol/L H_2SO_4 溶液, 1000 $\mu\text{mol/L}$ 磷酸盐标

2010-05-24 收稿; 2010-08-18 接受

本文系国家自然科学基金项目 (No. 40676044)、国际海底区域研究开发“十一五”项目 (No. DYXM-115-01-3-3) 和国家海洋局第三海洋研究所基本科研业务费专项资助

* E-mail: biogoe_chen@hotmail.com

准储备液 50 $\mu\text{mol/L}$ 磷酸盐标准使用液(当天配制) 54 g/L 抗坏血酸溶液。混合试剂: 30 g/L 钼酸铵溶液、3 mol/L H_2SO_4 溶液、1.4 g/L 酒石酸锑钾溶液以体积比 40: 40: 20 混匀。

2.2 实验方法

2.2.1 标准工作曲线绘制 在 5 个 500 mL 离心管中分别准确移入 0.2 0.4 0.6 和 0.8 mL 的 50 $\mu\text{mol/L}$ 磷酸盐标准使用液, 用大洋陈化海水稀释至 400 mL 混匀; 加入 5.0 mL 1 mol/L NaOH 溶液, 剧烈振摇 5 min, 静止 5 min, 重复振摇 5 min。放于离心机(8000 r/min)离心 40 min, 倾尽上清海水。加入 10.0 mL 0.25 mol/L H_2SO_4 溶液, 使沉淀完全溶解; 加入 0.70 mL 钼酸铵- H_2SO_4 -酒石酸锑钾混合试剂, 混匀, 加入 0.40 mL 54 g/L 抗坏血酸溶液, 摇匀; 15 min 后, 在分光光度计上, 用 5 cm 比色池于 882 nm 波长处测定各溶液的吸光值; 绘制磷酸盐标准工作曲线。

2.2.2 水样的测定 量取 400 mL 样品于离心管中, 按照工作曲线绘制步骤, 测定水样的吸光值(A), 用工作曲线回归方程计算得相应水样中磷酸盐浓度。

3 结果与讨论

3.1 预富集倍数及 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 共沉淀条件

$\text{Mg}(\text{OH})_2$ 共沉淀的最佳条件是以生成最小的沉淀量而获取最高的磷回收率。文献 [9, 12, 14] 分别选择海水样和 NaOH 溶液的体积比为 40: 1, 80: 1, 250: 1.75。文献 [9] 利用 $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ 标记方法, 证明 1000 $\times g$ 离心 60 min 对 50 mL 样品的处理较为合理, 且认为离心力大于 12000 $\times g$ 是没有必要的。文献 [20] 的离心力选用 1500 $\times g$ 对 250 mL 样品离心 10 min。

本实验对海水样品与 NaOH 溶液体积比、离心速度及时间等条件进行了优化, 结果见图 1 和图 2。最终选取海水样品 400 mL 与 NaOH 溶液的体积比为 80: 1, 离心速度为 8000 r/min, 离心时间为 40 min。

3.2 空白值的控制

空白值是影响痕量分析方法优劣的最基本参数。在低浓度磷酸盐测定的过程中, 影响空白值的主要因素是介质和试剂的纯度。而对于介质的选择, 很多实验推荐用去磷海水(镁共沉淀法除去海水中的磷)或配制人工海水用于工作曲线的制作。

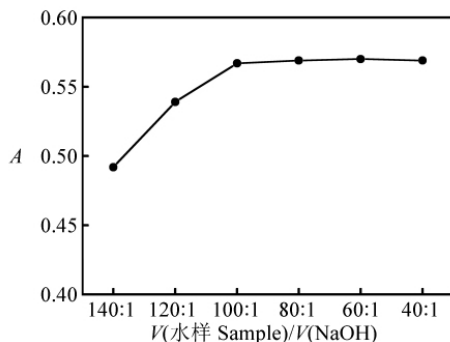


图 1 海水样品和 NaOH 溶液体积比的影响
Fig. 1 Effect of volume ratio of sea water sample and NaOH solution on Mg-induced coprecipitation (MAGIC)

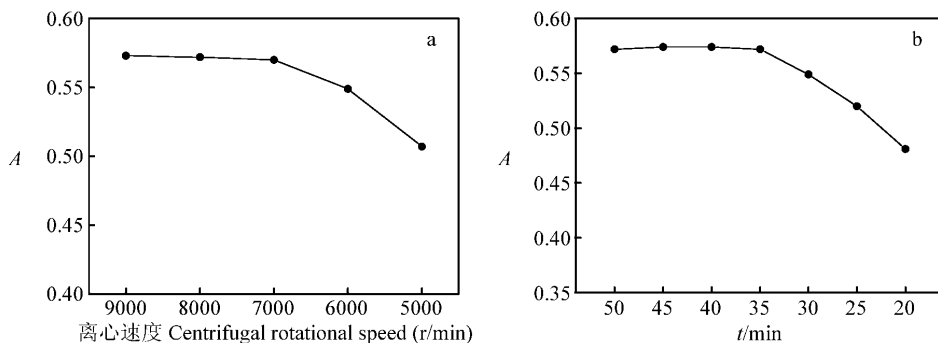


图 2 离心速度 (a) 和离心时间 (b) 对 MAGIC 方法结果的影响

Fig. 2 Effect of centrifugation speed (a) and centrifugation times (b) on MAGIC

对比去磷海水、人工海水及不同海区的表层陈化海水的空白值, 结果表明: 人工海水及近海表层陈化海水空白相对较高, 空白的吸光度分别为 0.0316 和 0.0234。以陈化半年以上的寡营养区大洋表层海水和去磷海水为介质, 空白值较低, 分别为 0.0154 和 0.0134。但以去磷海水为介质, 经过镁共沉淀法去磷后, 溶液中 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 被大量消耗, 对 P 吸附能力减弱, 多次沉淀后会造成标线“失真”。因此, 本实验选择大洋寡营养盐区表层陈化海水作为工作曲线介质。如无大洋表层陈化海水, 也可选择去磷海水, 但共沉淀去磷次数

不应超过 3 次。对大洋表层陈化海水平行测定 6 次,得到介质的空白值为(4. 88 ± 0. 29) nmol/L。

3.3 酸种类及用量的选择

本实验关键的影响因素是酸的加入量,既要使 Mg(OH) ₂ 沉淀能较快溶解,又要保证溶液中最终的 H/Mo 保持在 60 ~ 80^[15]。以往报道^[9,12,14]的方法均选择 HCl 溶液溶解 Mg(OH) ₂ 沉淀,但实际操作过程中发现: Mg(OH) ₂ 沉淀能较快溶解的酸用量,会导致最终溶液的 H/Mo 过高;而 H/Mo 保持在 60 ~ 80 时的酸用量对 Mg(OH) ₂ 沉淀的溶解十分缓慢(>30 min)。根据常规磷钼蓝法中显色所需酸的介质,本研究采用 H₂SO₄ 溶液溶解 Mg(OH) ₂ 沉淀,并减少混合试剂中 H₂SO₄ 的比例,提前用于溶解 Mg(OH) ₂ 沉淀,不仅减少了沉淀溶解时间,提高了检测效率,同时解决了测试介质 H/Mo 过高的问题,并使溶液介质与常规方法保持一致。

本实验确定条件为: 10. 0 mL 0. 25 mol/L H₂SO₄ 溶解 Mg(OH) ₂,显色用混合试剂 0. 70 mL。Mg(OH) ₂ 沉淀溶解只需 5 ~ 10 min,且最终溶液 H/Mo 在 70 ~ 80 内。

3.4 方法的检出限、回收率和精密度

以大洋陈化海水为样品基底,加标浓度为 10 nmol/L,平行测定 6 次,结果为(10. 06 ± 0. 72) nmol/L,计算得方法检出限为 2. 4 nmol/L。加标浓度(10 nmol/L) 小于 5 倍的检出限,计算所得的方法检出限有效。本方法检出限大大低于常规方法的检出限(0. 02 μmol/L)^[16]。

以大洋海水为基底,分别加入 20. 0, 40. 0 和 60. 0 nmol/L 磷酸盐标准溶液,用上述方法进行回收率测定。结果表明,磷酸盐回收率为 97. 2% ~ 100. 9%(表 1)。对两个大洋表层海水分别平行测定 5 次,平均值分别为 20. 12 和 80. 1 nmol/L,相对标准偏差分别为 4. 8% 和 2. 1%,优于目前海洋监测规范方法(相对标准偏差 ± 10%)^[16]。

PO₄³⁻ 浓度在 5 ~ 100 nmol/L 范围内与吸光度呈良好的线性关系。线性方程为 $y = 0. 0028x - 0. 005$,线性相关系数 $R^2 = 0. 9984$ 。

表 1 方法的加标回收率
Table 1 Recovery of phosphate

海水样品 Sea water sample	海水本底浓度 Background (nmol/L)	加入磷酸盐量 PO ₄ ³⁻ added (nmol/L)	测得浓度 Found (nmol/L)	回收率 Recovery (%)
No. 1	5. 1	20. 0	25. 0	98. 0
	5. 1	40. 0	45. 1	100. 0
	5. 1	60. 0	65. 0	99. 8
	10. 8	20. 0	30. 5	97. 2
No. 2	10. 8	40. 0	50. 9	100. 9
	10. 8	60. 0	70. 8	100. 0

3.5 大洋海水的测定

应用本方法对西太平洋 0 ~ 200 m 水柱部分水样进行了测定。水样采自于 2008 年第 20 次大洋考察期间,用 CTD-rosette 采水器采集。水样采集后现场经 0. 45 μm 醋酸纤维滤膜过滤,储存于 500 mL 高密度聚乙烯瓶,冷冻保存^[17],测定结果见表 2。西太平洋调查区 100 m 以上水柱活性磷酸盐浓度一般都低于 75. 0 nmol/L; 上层水柱(2 ~ 30 m) 水样磷酸盐浓度低于 20. 0 nmol/L。应用 MAGIC 方法可以准确测得海水中低含量的磷酸盐,满足寡营养盐海区磷的生物地球化学研究和磷循环研究的需求。

表 2 西太平洋上层水柱磷酸盐浓度
Table 2 Concentrations of phosphate in upper water column in the West Pacific Ocean

水深 Depth (m)	磷酸盐浓度 Concentration of phosphate (nmol/L)				
	Arog01	PO01	PO03	MC02	MC03
2	17. 47	19. 82	14. 41	9. 15	17. 41
30	23. 00	19. 53	6. 83	8. 15	13. 30
50	18. 88	29. 29	13. 69	7. 60	42. 36
100	72. 29	39. 12	43. 22	12. 12	55. 01
200	161. 10	123. 98	99. 21	56. 23	106. 98

致 谢 国家海洋局第二海洋研究所赵宏樵、张东声、江巧文、陈春辉在采样期间给与帮助,实验期

间得到俞萍等人的大力支持,谨致谢忱。

References

- 1 Wu J F, William S, Edward A B, Karl D M. *Science*, **2000** 289(5480): 759 ~ 762
- 2 Bjorkman K, Thomson A L, Karl D M. *Aqua. Microb. Ecol*, **2000** 22(2): 185 ~ 198
- 3 Strickland J D H, Parsons T R. *Fisheries Research Board of Canada, Ottawa*, **1972**: 71 ~ 80
- 4 Huang X L, Zhang J Z. *Anal. Chim. Acta*, **2006** 580(1): 55 ~ 67
- 5 Liang Y, Yuan D X, Li Q L, Lin Q M. *Anal. Chim. Acta*, **2006** 571(2): 184 ~ 190
- 6 Zhang J Z, Chi J. *Environ. Sci. Technol.*, **2002** 36(5): 1048 ~ 1053
- 7 Haberer J L, Brandes J A. *Mar. Chem.*, **2003** 82(3-4): 185 ~ 196
- 8 LANG Ying, YUAN Dong-Xing, LIN Qing-Mei(梁英,袁东星,林庆梅). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2005**, 33(7): 1053 ~ 1057
- 9 Karl D M, Tien G. *Limnol. Oceanogr.*, **1992** 37(1): 105 ~ 116
- 10 Liang Y, Yuan D X, Li Q L, Lin Q M, *Mar. Chem.*, **2007** 103(1-2): 122 ~ 130
- 11 Anagnostou E, Sherrell R M. *Limnol. Oceanogr. : Methods*, **2008** 6(1): 64 ~ 74
- 12 YUAN Liang-Ying, DAI Min-Han(袁梁英,戴民汉). *Oceanologia and Limnologia Sinica*(海洋与湖沼), **2008**, 39(3): 202 ~ 208
- 13 ZHU Lai-Min, LI Ben(朱赖民,李犇). *Acta Oceanologica Sinica*(海洋学报), **2008** 30(3): 148 ~ 152
- 14 Rimmelin P, Moutin M. *Anal. Chim. Acta*, **2005** 548(1-2): 174 ~ 182
- 15 Pai S C, Chung-cheng Y, Riley J P. *Anal. Chim. Acta*, **1990** 229: 115 ~ 120
- 16 State Oceanic Administration of China(国家海洋局). *Criterion of Oceanic Monitoring*(海洋监测规范), Gb17378. 4-1998. Beijing(北京): Ocean Press(海洋出版社), **1991** 179: 277 ~ 281
- 17 Dore J E, Houlihan T, Hebel D V, Tien G, Tupas L, Karl D M. *Marine Chemistry*, **1996** 53(3-4): 173 ~ 185

Determination of Reactive Phosphate in Nanomolar Level in Sea Water with $\text{Mg}(\text{OH})_2$ Co-precipitation

XU Yan-Qing, GAO Sheng-Quan, CHEN Jian-Fang*, WANG Kui,

JIN Hai-Yan, YUAN Liang-Yin, LI Hong-Liang

(Second Institute of Oceanography, State Ocean Administration, Laboratory of Marine Ecosystem and Biogeochemistry, State Ocean Administration, Hangzhou 310012)

Abstract PO_4^{3-} in seawater was co-precipitation by the formation of brucite $[\text{Mg}(\text{OH})_2]$, initiated by the addition of NaOH. The precipitate was collected by centrifugation and dissolved in acidic solution for the determination of soluble reactive phosphorous (SRP) with classical phosphomolybdic method. Based on other previous study, the experimental parameters and conditions, including the volume of reagent, centrifugation speed and time, kinds of acid, H/Mo ratio, were optimized. A part of H_2SO_4 in mixed reagent was used for dissolved precipitate not only to keep the same medium with following phosphomolybdenum blue procedure, but also to speed greatly precipitate dissolved and reduce the high H/Mo ratio in solution before. Under the optimized conditions, the recoveries, blank and limits of detection of the proposed method were 97.2% ~ 100.9%, $(4.88 \pm 0.29) \text{ nmol/L}$, and 2.42 nmol/L , respectively. The RSDs ranged from 2.1% to 4.8% for the seawater samples. The method had been used to determine the concentrations of phosphate in the upper water (0 ~ 200 m) of the Pacific Ocean successfully.

Keywords Reactive phosphate; Low-level phosphate; Magnesium-induced co-precipitation; Oligotrophic area

(Received 24 May 2010; accepted 18 August 2010)