

流动注射荧光猝灭法测定磷酸二氢盐*

林旭聪, 谢增鸿** , 陈国南

(福州大学化学系, 福建 福州 350002)

摘 要: 在 $\text{pH} = 5.4$ 的 $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4\text{HCl}$ 缓冲溶液中, 建立 $\text{Ce}(\text{IV})-\text{NaCl}-\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 三元荧光熄灭体系, 结合流动注射技术和荧光猝灭定量数学模型 $\text{Ln}(F_0/F) = \text{Ln}K_{\text{MF}} + \text{Ln}K_e - \text{Ln}K_f + \text{Ln}[M]$, 考察 $\text{Ce}(\text{IV})$ 的阳离子型体测定 H_2PO_4^- 的可行性和适用性. 实验表明: 在 20°C , $\text{pH} = 4.0 \sim 6.0$ 时, $\text{Ce}(\text{IV})$ 的阳离子型体与磷酸根反应, 荧光猝灭程度显著; 当注射泵转速为 70 r/min , 样品测定速度为 50 h^{-1} , NaCl 浓度为 $0.20 \sim 0.30 \text{ mol/L}$ 时, H_2PO_4^- 的测定线性浓度区间为 $0.20 \sim 1.80 \mu\text{g/mL}$, 检测限 $\text{LOD}(3\sigma) = 0.003 \mu\text{g/mL}$, 样品回收率为 $97.3\% \sim 99.0\%$

关键词: 流动注射分析; 荧光猝灭; $\text{Ce}(\text{IV})$; 磷酸二氢盐

中图分类号: O657.32

文献标识码: A

文章编号: 1006-3757(2001)04-0215-04

随着大量富磷洗涤剂的使用和含磷污水的直接排放, 河流、湖泊和海洋严重富营养化, 水体自然生态平衡遭到破坏, 人类生活生产受到严重影响. 因而, 发展一种灵敏、耐用的分析测试技术以实现磷的在线分析, 实时检测水体磷污染状况, 为海洋污染调查中的重要项目^[1]. 目前, 传统的磷酸盐检测方法主要基于磷钼蓝法或磷钼酸盐-碱性离子对染料的光谱性质, 其操作繁琐、实时性差^[1,2]; ISE 离子选择电极和生物酶传感器制造材料昂贵, 制备工艺复杂, 难以在实际应用中推广^[3]. 流动注射分析法(FIA)选择性好, 采样微量化, 结合荧光测定技术, 其灵敏度高, 是目前高输出率和高重现性的实时测定方式^[4,5], 在其他领域测定磷酸盐也得到广泛应用^[6~9], 但迄今为止, 其在海水的磷酸盐监测中, 应用很少^[5]; 利用 $\text{Ce}(\text{IV})$ 在弱酸介质中的荧光检测水体中的无机磷酸盐尚未见报道. 因此本文建立 $\text{Ce}(\text{IV})-\text{NaCl}-\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 三元荧光熄灭体系, 基于停流 FIA 技术, 联合应用荧光光度法^[10], 利用 $\text{Ce}(\text{IV})$ 的阳离子型体在磷酸盐存在下产生荧光猝灭的光谱性质^[11], 考察其测定 H_2PO_4^- 的可行性和适用性, 探索新的测量水中磷酸盐的分析途径.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

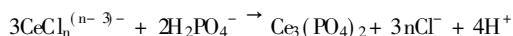
970CRT 荧光光度计(上海分析仪器总厂), IZ-2000 流动注射仪(沈阳肇发自动分析研究所).

Ce^{3+} 标准溶液: 称取 $\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (AR., Merck in Gernem) 0.0712 g , 溶于 500 mL 水中, 配制 $2.00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 溶液.

缓冲溶液: 取 200.0 g $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4$ (AR., 上海试剂研究所), 溶于 500 mL 水中, 加入 50.0 mL 浓 HCl (AR., 汕头西陇化工厂), $\text{pH} = 5.4$. 实验所用水为亚沸水, 其他试剂均为分析纯.

1.2 实验原理

在 $\text{pH} = 5.4$ 的 NaCl 与 $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4\text{HCl}$ 混合液中, Cl^- 浓度较大, Ce^{3+} 主要存在形为 $\text{CeCl}_n^{(n-3)-}$ ($n = 1 \sim 6$), 其在 254.0 nm 紫外光激发下产生荧光 ($\lambda = 358.0 \text{ nm}$), 与磷酸盐发生静电作用而使得 $\text{CeCl}_n^{(n-3)-}$ 的荧光产生猝灭, 化学反应为:



其猝灭程度与一定范围的磷酸根浓度成线性关系, 可应用于海水中磷酸盐含量的测定.

* 国家教育部《高等学校骨干教师资助计划》项目; 福建省自然科学基金资助研究课题(D9910009); 福建省科技三项资助研究课题(K99037).

** 通讯联系人.

收稿日期: 2001-08-25; 收到修改稿日期: 2001-10-16.

1.3 实验方法

以蠕动泵 B 推动 Ce^{3+} 溶液、缓冲溶液+ NaCl 溶液和 H_2PO_4^- 试液 3 种溶液(Ce^{3+} 溶液和缓冲溶液+ NaCl 混合液经化学组合块混合), 经采样管采样后, 旋转转子 60° , 进入 Inject 模式, 以蠕动泵 A 推动试样注入流通池, 检测其荧光猝灭程度, 测定 H_2PO_4^- , 其工作流程见图 1。

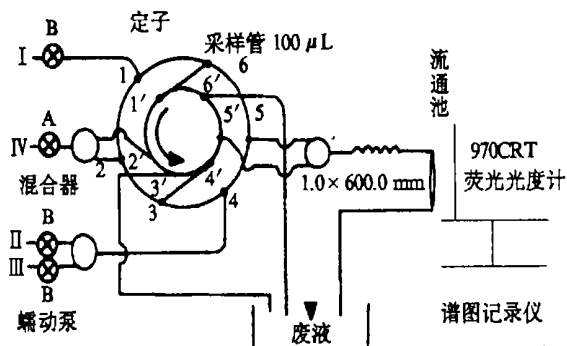


图1 流动注射流程图

iv. H_2PO_4^- 试样, Ce^{3+} 溶液,

④ 缓冲液+ NaCl 溶液, ⑤ 载液(亚沸水)

1~6: 定子注射孔; 1'~6': 转子注射孔

Fig. 1 Schematic diagram of flow injection system

iv. H_2PO_4^- samples, Ce^{3+} standard solution,

④ Buffer solution + NaCl aqueous solution

⑤ Carrier (Re-distilled water)

1~6: The input point of stator, 1'~6': The output point of rotor

2 结果与讨论

2.1 荧光光谱

以蠕动泵 B 推动 Ce^{3+} 溶液和缓冲液+ NaCl 混合液, 采样 100 μL , $S_{\text{灵敏度}} = 4$, Slit: $E_x = 5 \text{ nm}$, $E_m = 10 \text{ nm}$ 时, $\text{CeCl}_n^{(n-3)-}$ 荧光激发和发射波长分别为 254 nm 与 358 nm; 采样注射 H_2PO_4^- 溶液 100 μL , 体系的荧光强度发生猝灭, 其猝灭程度随 H_2PO_4^- 增加而增强(图 2)。

2.2 测定条件的选择

2.2.1 pH 的影响

随 pH 增加, pH 为 3.0~4.0, $\text{CeCl}_n^{(n-3)-}$ 荧光强度增强; pH 为 4.0~5.0 和 6.0~7.5, 荧光强度下降, 在 pH 为 6.0~7.5, Ce^{3+} 与 OH^- 形成氢氧化物沉淀, 荧光熄灭; 当 pH 大于 8.0, Ce^{3+} 与 OH^- 形成氢氧根配合物, 荧光增强, 波长发生位移; pH 为 5.0~6.0 时, 体系荧光强度稳定, 为测定最佳 pH 范围。

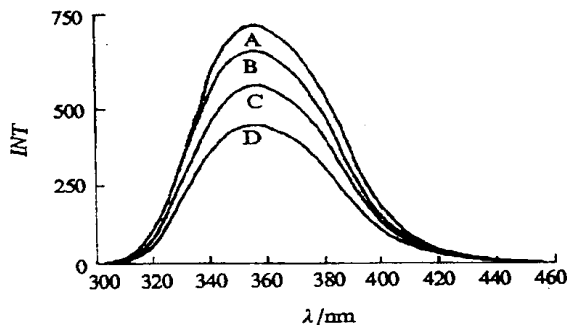


图2 荧光猝灭光谱

Fig. 2 Spectra of fluorescent quenching

H_2PO_4^- ($\mu\text{g/mL}$): (A) 0.00, (B) 1.00, (C) 2.00, (D) 4.00

2.2.2 试剂加入顺序的影响

实验表明, 按 Ce^{3+} 溶液+ H_2PO_4^- + 缓冲溶液和 NaCl 混合液顺序加入, 磷酸根先与 Ce^{3+} 反应完全而不干扰在 pH=5.40 条件下的 $\text{CeCl}_n^{(n-3)-}$ 的形成, 其荧光强度值稳定, 平衡时间短(t 小于 20 s); 按 Ce^{3+} 溶液+ NaCl 溶液+ H_2PO_4^- 和缓冲溶液混合液顺序加入, $\text{CeCl}_n^{(n-3)-}$ 稳定, 过量的 Cl^- 在 pH=5.4 缓冲溶液中与磷酸根共存, 相互竞争而反应抑制, 阻碍了 $\text{Ce}_3(\text{PO}_4)_2$ 的形成, 其荧光稳定时间长(t 约等于 45 min), 故选择第一种试剂加入顺序。

2.2.3 采样量的影响

实验考察了采样量为 25 μL , 50 μL , 80 μL , 100 μL , 150 μL , 200 μL 时体系的荧光响应, 表明随采样量的增加, 体系中试剂的有效浓度增加, 荧光响应强度逐渐增强, 体系灵敏度变高, 故加大采样量有利于磷酸盐的测定; 由于采样量大会增加试剂的消耗, 在实际测定使用时尽量减少试剂损耗量, 故采样量为 100 μL 较为理想。

2.2.4 转速的影响

调节蠕动泵的转速以控制载流的流动速度, 考察其对体系荧光强度的影响, 实验表明, 随载流流速的增强, 体系荧光强度缓慢增强。当转速较低时(r 小于 45 r/min), 载流流动缓慢, 荧光峰较宽, 且在流通池中易出现回流而产生严重拖尾, 不利于精确测定; 转速较高时(r 大于 75 r/min), 荧光响应较好, 但其强度受载流影响而不稳定, 测量误差大; 而转速中等时(r 等于 60~75 r/min), 体系响应灵敏, 荧光强度稳定, 为最佳流速。故采用转速 r 等于 70 r/min 为体系载液的流动速度。

2. 2. 5 氯化钠浓度的选择

在Ce(Ⅲ)-NaCl 体系中, NaCl 浓度对体系的荧光强度有较大影响. 在弱酸性条件下, Ce(Ⅲ) 与Cl⁻ 形成CeCl_n⁽ⁿ⁻³⁾⁻ 的能力随Cl⁻ 浓度的增大而增强, 当Cl⁻ 浓度大于0.20 mol/L, 溶液中Ce(Ⅲ) 基本完全配合形成CeCl_n⁽ⁿ⁻³⁾⁻, 体系荧光强度恒定.

2. 3 磷酸盐测定线性范围及检测限

荧光强度猝灭值~ 浓度曲线线性区间小, 不能准确测定磷酸盐的线性浓度. 应用荧光猝灭数学模型 $\ln(F_0/F) = \ln K_{MF} + \ln K_e - \ln K_F + \ln[M]$, 增强猝灭曲线线性, 准确表明磷酸根与CeCl_n⁽ⁿ⁻³⁾⁻ 的猝灭作用.

结果表明, 在H₂PO₄⁻ 浓度为0.20~ 4.00 μg/mL 体系中, 荧光猝灭显著(图3), 强度比值对数 $\ln(F_0/F)$ 与H₂PO₄⁻ 浓度在较大范围内呈良好线性关系(图4); 其线性测定区间为0.20~ 1.80 μg/mL(图5), 方程为 $y = 0.068\ 2x - 0.006\ 8$, $R^2 = 0.992\ 7$, 检测限 $LOD(3\delta) = 0.003\ \mu\text{g/mL}$.

浓度较大时会干扰H₂PO₄⁻ 的测定.

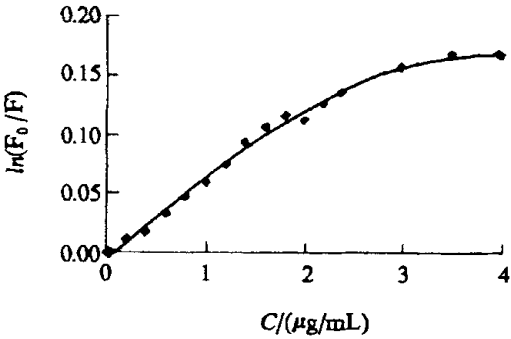


图4 磷酸根响应范围
Fig. 4 Response range of phosphate

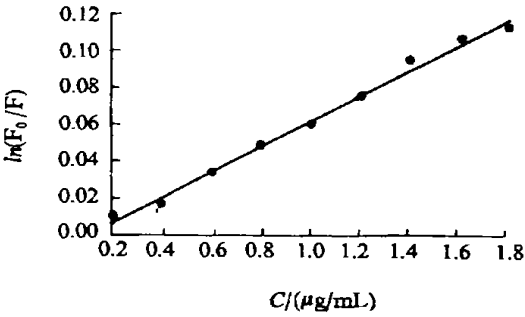


图5 磷酸盐工作曲线
Fig. 5 Calibration graph of phosphate

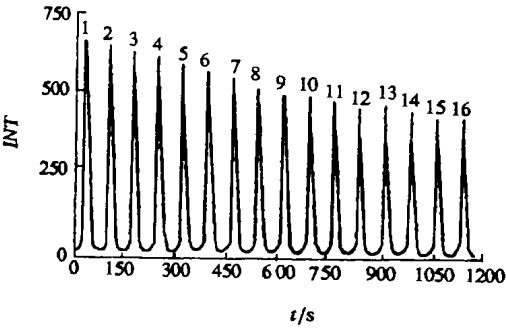


图3 流动注射荧光猝灭光谱图

Fig. 3 Fluorescence quenching spectra with FIA

H₂PO₄⁻ (μg/mL): (1) 0.00 (2) 0.20 (3) 0.40 (4) 0.60
(5) 0.80 (6) 1.00 (7) 1.20 (8) 1.40 (9) 1.60 (10) 1.80
(11) 2.00 (12) 2.20 (13) 2.40 (14) 3.00 (15) 3.50 (16) 4.00

2. 4 共存离子的影响

加入Mg²⁺、Ca²⁺、Fe³⁺、Mn²⁺、Ni²⁺、CO₃²⁻、Ac⁻、SO₄²⁻、SiO₃²⁻ 离子, 测定其荧光猝灭程度. 当测定误差小于3%, 体系中共存的Fe³⁺ 干扰较大, 加入Ac⁻ 离子可较好地消除干扰; Mg²⁺、Ca²⁺、Mn²⁺、Ni²⁺、Ac⁻、SO₄²⁻ 离子的干扰较小, 随浓度增大变化不明显, |ΔF₀/F| 为0.003~ 0.016, |Δln(F₀/F)| 为0.001~ 0.007; CO₃²⁻、SiO₃²⁻ 的|ΔF/F| 为0.05~ 0.09, |Δln(F₀/F)| 为0.02~ 0.04,

表1 共存离子对H₂PO₄⁻ (0.50 μg/mL) 测定的
干扰允许限(误差≤3%)

Table 1 Tolerance limit for the different species in the detection of
H₂PO₄⁻ (0.50 μg/mL) with error that was less than 3%

共存离子	允许限(摩尔比)	共存离子	允许限(摩尔比)
Mg ²⁺	1 000	CO ₃ ²⁻	50
Ca ²⁺	600	Ac ⁻	500
Mn ²⁺	450	SO ₄ ²⁻	200
Ni ²⁺	420	SiO ₃ ²⁻	40
Fe ³⁺	< 25		

2. 5 试样测定

在pH= 5.4, NaCl 浓度为0.20 mol/L 的条件下, 测定三个H₂PO₄⁻ 模拟样品及三个实际样品的回收率, 测定结果如下.

表 2 磷酸盐模拟样品的测定

Table 2 Analytical result of artificial samples

模拟试样	加入量 ($\mu\text{g/mL}$)	实际测定量* ($\mu\text{g/mL}$)	回收率 (%)
x_1	0.50	0.49	98.0
x_2	1.00	0.99	99.0
x_3	1.50	1.46	97.3

* 五次测定平均值

表 3 磷酸盐样品的测定

Table 3 Analytical result of phosphate samples

样 品	测定量 ($\mu\text{g/mL}$)	加入量 ($\mu\text{g/mL}$)	总测定量 ($\mu\text{g/mL}$)	回收率 (%)
A	0.16	1.00	1.14	98.2
B	0.26	1.00	1.32	104.7
C	0.25	1.00	1.27	101.5

A 福州大学护校河水样, B 福州西河水样, C 福州大学水池水样

参考文献:

[1] Ian D Mckelvie, Darren M W Peat and Paul J Worsfold. Technique for the quantification and speciation of phosphate in natural waters[J]. Analytical Proceedings including Analytical communications, 1995, 32 437~ 445.

[2] Jose L F C Lima, Antonio O S S Rangel, M Renata S Sonto. Flow injection system with gas diffusion for the sequential determination of total nitrogen and phosphorus in vegetables [J]. Fresenius J Anal Chem, 1997, 358 657~ 662.

[3] Arnold De Marco, Bobby Pejic, Zuliang Chen. Flow injection potentiometric determination of phosphate in waste waters and fertilizers using a cobalt wire ion-selective electrode[J]. Analyst, 1998, 123: 1635~ 1640.

[4] ZuLiang Chen, Pauline Grierson, Mark A Adams. Direct determination of phosphate in soil extracts by potentiometric flow injection using a cobalt wire electrode[J]. Analytical Chimica Acta, 1998, 363 191~ 197.

[5] LiliJa K Shpigun, Irina Ya Kolotyckina and YuriJ A Zobtov. Experience with flow injection analysis in marine chemical research[J]. Analytical Chimica Acta, 1992, 261 307~ 314.

[6] 宋功武. 流动注射荧光法测定磷和砷[J]. 光谱学与光谱分析, 1999, 19(3): 466~ 467.

[7] Chalk, Stuart J, Tyson, Julian F. Flow injection reagent introduction by supported liquid and nafion membranes: determination of phosphate[J]. Talanta, 1994, 41(10): 1797~ 1805.

[8] Oshima, Mitsuko, Goto, Nobutake, Susanto, Joko P et al. Determination of phosphate as aggregates of ion associates by light scattering detection and application to flow injection[J]. Analyst, 1996, 121 (8): 1085~ 1088.

[9] 朱玉瑞, 傅 强, 腾恩江, 刘廷良. 流动注射分光光度法测定水中痕量正磷酸盐[J]. 山东师大学报, 1998, 26(4): 456~ 461.

[10] XIE Zeng-hong, GUO Liang-qia, KE Zi-hou et al. Fluorescence spectrophotometric determination of trace ammonia[J]. Chemical Journal of Chinese Universities (Supplement), 1999, (20): 433.

[11] 黄承志, 李克安, 童沈阳. 在 NaCl 介质中小牛胸腺 DNA 对 Ce(Ⅲ) 荧光猝灭的机理研究. 分析化学, 1997, 25(7): 768~ 772.

Phosphate Determination Based on Fluorescence Quench of Cerium(Ⅲ) Complex with Flow Injection Analysis

LIN Xuecong, XIE Zeng-hong, CHEN Guonan

(Department of Chemistry, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: The fluorescence spectra of cerium(Ⅲ) emitted at 358 nm exited at 254 nm in sodium chloride medium. A new FIA method using fluorescent quenching for the determination of phosphate was proposed. It was based on the ability of phosphate to inhibit the formation of a strongly fluorescent complex of cerium(Ⅲ) with NaCl in (CH₂)₆N₄⁺ HCl buffer solution (pH= 5.4), for the electrostatic interaction of the positive species of Ce(Ⅲ) in water with the negative charge of phosphate. With the analysis model $\ln(F_0/F) = \ln K_{MF} + \ln K_e - \ln K_F + \ln[M]$ based fluorescent quenching, optimal chemical conditions for fluorescent quenching of the $CeCl_n^{(3-n)-}$ (n= 1~ 6) positive species by phosphates in samples were studied. The measurement throughput was 50 h⁻¹, and the concentration ranges of sodium chloride were 0.20 ~ 0.30 mol/L. Within the range of H₂PO₄⁻ from 0.20 to 1.80 $\mu\text{g/mL}$, calibration graph was obtained and the limit of detection was 0.003 $\mu\text{g/mL}$. The recoveries of artificial samples ranged from 97.3 % to 99.0 %.

Key word: flow injection analysis; fluorescent quenching; cerium(Ⅲ); phosphate

Classifying number: O657.32