

# 磷的原子吸收分析法测定 石墨炉原子吸收法与比色法的比较\*

林少雯 凯拉·尤森 (挪威国家维生素研究所)

## 摘 要

用石墨炉原子吸收法(PE-5000AAS)测定了生物制品中的磷,研究了湿消化法及不同的石墨管涂布试剂。基于NBS标准样品和水产制品中磷含量测定的情况,对石墨炉原子吸收法和标准比色法进行了评价并讨论了这二种方法的利弊。

## 引 言

磷是一种所有生命体所必需的重要常量元素。它和钙一起组成骨骼的主要成份,它也存在于脂类和蛋白质之中。一般认为如能从膳食中摄得足量的钙和蛋白质即可满足人体对磷的需求,但膳食中过量的纤维素以及植酸会对上述平衡产生不良影响。已发现磷元素对动物体内痕量元素的保留具有阻抑作用<sup>[1,2]</sup>,在鱼类营养研究中通过测定鱒鱼血清中的磷含量可以间接地测定血清中的磷脂含量<sup>[3]</sup>。

正因为磷是一种常量元素,所以大多数测磷方法的灵敏度是足够高的。然而仍有必要寻求一种具有更好的重现性、可靠性和回收率的测磷方法,以满足在研究动物代谢机理时测定微量磷元素的需要。

本研究比较了无火焰石墨炉原子吸收分析法(GFAA)和经典比色法(CM)的测磷方法。CM基于磷—钒—钼盐黄色复合物的测定,常用于油类中磷含量的测定但也适用于其它生物样品<sup>[5]</sup>。通过研究GFAA系统中的一些操作因子,比较了石墨管的不同涂布原料和涂布工艺对该法重现性、回收率等的影响。评价了二种不同的样品消化方法对磷含量测定回收率的影响。

### 1. GFAA

## 实 验

### 仪 器:

本文收到日期 1983 年 1 月 7 日

\*定于 1983 年 6 月 26—7 月 1 日在荷兰阿姆斯特丹召开的第 23 届国际光谱分析学术大会秘书处已正式将本论文列入该届会议口头宣读论文议程。

Perkin-Elmer 5000 型原子吸收分光光度仪

HGA-76 高温石墨炉

Perkin-Elmer AS-1 自动进样器

Perkin-Elmer-56 型记录仪

Zeiss PM2 型分光光度计

磷元素无极放电灯源

氙灯背景校正器

Perkin-Elmer 普通石墨管和涂布管

2. CM

标准 Technicon 自动分析仪

40 型—Tecafor AB 消化装置

试 剂:

1. GFAA

所用的酸均为超纯(Suprapure)等级的 Merck 产品

所用的水均为去离子蒸馏水

30% 过氧化氢: Merck 试剂纯

1000 微克/毫升磷标准溶液: Merck 产品

10% (w/v) 镧溶液: 将 29.32 克  $\text{La}_2\text{O}_3$  [99.99%, Fluka 试剂纯(瑞士产品)]溶于 50 毫升浓硝酸中, 加入适量水, 并以水定容至 250 毫升

1%  $\text{ZrOCl}_2$  乙醇溶液

$\text{SiCl}_4$  纯溶液 Fluka 试剂纯

酸混合液: 混合等体积的浓硝酸和高氯酸

2. CM

浓硫酸(比重 1.84) Merck 试剂纯

$\text{K}_2\text{SO}_4$ -Se 催化剂片(KJELTAB AUTO)每片含 1.5 克硫酸钾和 7.5 毫克硒。

2.6N 酸混合液: 取 200ml 酸混合液, 倾入适量水中, 冷却后以水定容至 1000ml。

钼—钒试剂

试剂A: 将 20 克钼酸铵(Merck 试剂纯)溶于 200 毫升水中加热, 然后冷却。

试剂B: 将 1 克钒酸铵(Merck)试剂纯溶于 150 毫升沸水中冷却后加入 24 毫升浓  $\text{HNO}_3$ - $\text{HClO}_4$  混合液(体积比 1:1)

试剂C: 在不停搅拌的同时, 将试剂A缓缓地加到试剂B中并以水定容至 1 升。

消化方法

方法 1: 将 50~200 毫克冷冻干燥的样品置于容积为 20 毫升的带盖的 Sovirel 瓶中, 加入 2 毫升混合酸溶液, 同时制备空白。拧紧瓶盖并置于家用压力锅内, 加热至锅中的水煮沸, 加上 2 公斤限压阀然后在  $110^\circ\text{C}$  下保持 20 小时。冷却后将样品消化液移入 10 毫升容量瓶中并以水定容至刻度<sup>[6]</sup>。测定前以 1% 的混合酸溶液将样品消化液适当稀释。用标准添加法测定磷含量, 记录峰高及峰面积值。

方法 2: 凯氏消化法

将 200 毫克冷冻干燥的样品置于容积为 75 毫升的消化管中, 加入 3 毫升浓硫酸。将消

化管置于带有温度控制仪的 40 型 Tecator-AB 消化装置中并加热至温度达 200℃, 向管内加入一片催化剂, 进一步升温至 375℃ 并在此温度下保持一小时。关闭加热器, 降温一小时, 冷却后以水稀释至 75 毫升。取出适量样品消化液用比色法测定磷含量。

### 石墨管涂布步骤:

将 Perkin-Elmer 普通石墨管分别浸泡在 1%  $ZrOCl_2$  的乙醇液或纯的  $SiCl_4$  液中过夜<sup>[9]</sup>, 然后用超声波处理法(A 法)或用负压处理法(B 法)除去石墨管孔隙中的气体以利于涂布溶液的渗透<sup>[9,10]</sup>。

A 法: 将浸泡在涂布液中的石墨管置于超声波发生器中处理 20 分钟。

B 法: 将盛有浸泡液和石墨管的烧杯置于真空干燥皿中(涂布液需将石墨管盖没), 在负压条件下保持 10 分钟, 然后在常压下保持 5 分钟, 如此重复三次。

将纯  $SiCl_4$  作为涂布剂, 把经上述处理的管子置于水中过夜以使  $SiCl_4$  水解成  $SiO_2$ 。然后在 110℃ 下干燥 10 分钟。将干燥过的管子置于石墨炉中, 在 500℃ 下保持 10 秒, 1500℃ 下保持 20 秒, 在 2650℃ 保持 6 秒由此制成碳化硅石墨管。

将 1%  $ZrOCl_2$  乙醇液作为涂布剂, 把经上述处理的管子置于烘箱内, 在 105℃ 下干燥 2 小时, 然后将该管置于石墨炉中, 在 120 秒内将炉温逐渐升至 1500℃, 在 2600℃ 下将管子加热 5 秒, 这一加热处理 (2600℃ × 5 秒) 需重复三次, 由此制成碳化锆石墨管。

### 测定步骤:

#### 1. GFAA 法

将适量稀释的样品消化液加入进样杯中, 每个样品消化液需用三个进样杯, 在其中的两个杯内加入一定量的磷标准溶液。(标准添加法)。

#### 2. CM 法

用 2.6N 的硝酸—高氯酸混合液(体积比 = 1:1) 稀释浓度为 1000 微克/毫升的磷标准溶液制备一系列浓度的工作标准溶液。其浓度必须大于待测样品的浓度范围。在 430nm 波长下测定样液和工作标准溶液的吸光度值进行回归分析处理, 由此得到校正标准曲线。从该曲线即可求出样液中的磷浓度, 再乘稀释因子便可计算出样品中的磷含量。

## 结果和讨论

### GFAA 操作温度的选择:

表一总结了 GFAA 法的诸操作参数

表 - GFAA 法的诸操作参数

#### 1. 仪器参数

波长	213.5/213.6nm
狭缝	0.7 nm
光源	无极放电灯—9 瓦
信号模式	消光值, 峰高
读数时间	6 秒

惰性气体	氩气纯度(99.9%)
石墨炉形式	普通型及涂布型
氘背景校正器	采用
进样体积	20 微升

## 2. 升温程序

干燥            120℃     到达该温度后保持 30 秒钟, 氩气流量240毫升/分钟  
 灰化            1400℃    自 120℃ 至 600℃ 需时 45 秒, 自 600℃ 至 1400℃ 需时近似零秒, 氩气流量 240毫升/分钟  
 原子化          2650℃    自 1400℃ 至 2650℃ 需时近似零秒在 2650℃ 下保持 5 秒, 其间中止氩气流通。

将 20 微升 5 毫克/毫升的磷标准溶液注入碳化硅石墨炉, 进样后在 120℃ 下干燥 20 秒, 用 40 秒钟的时间使炉温“爬坡”式地从 120℃ 升至 600℃ 然后锐升至 1400℃, 这种升温方法与将炉温从 120℃ 直接锐升至 1400℃ 的升温方法相比具有更好的重现性。最后, 在 2650℃ 下将样品原子化 5 秒钟, 其间停止氩气的流动。

将标准样品牡蛎(SRM1566)的试样消化液适当稀释, 使其在灰化温度为 1400℃ 时给出与 5 微克/毫升磷标准溶液所对应的吸光度值相似的信号。样液进样量也为 20 微升。

原子化温度若低于 2650℃ 吸光度值则显著下降; 原子化时间若短于 5 秒钟则导致“记忆效应”。最大功率加热可使磷迅速而又均匀地原子化, 从而获得合理的原子化信号。若使原子化温度呈“爬坡式”上升而非锐升, 则样品消化液的原子化信号下降, 而磷标准溶液的原子化信号下降 10%。

图 1 显示了在使用碳化硅石墨管时, 以标准样品牡蛎试样消化液和磷标准溶液为样品, 将灰化温度从 400℃ 升高到 1500℃ 所得到的吸光度值曲线图型。用碳化锆和普通石墨管可以得到相似的图型。

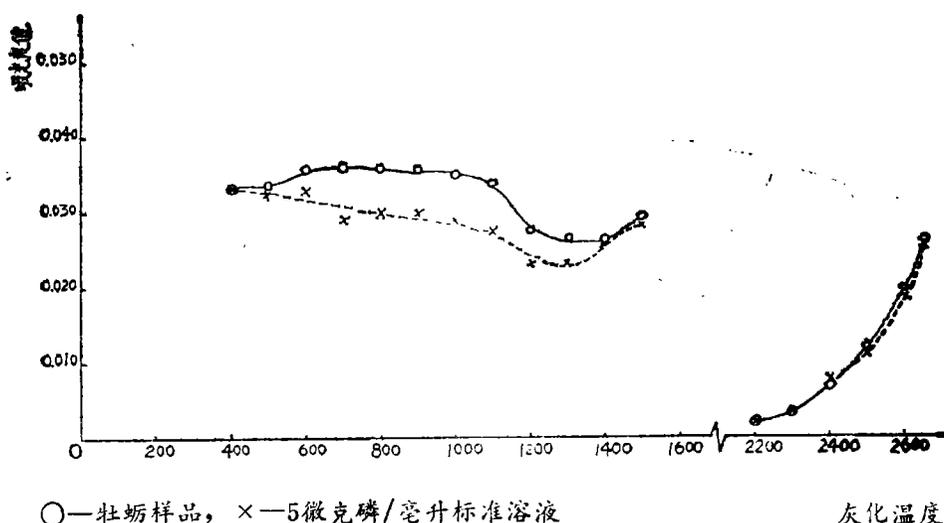
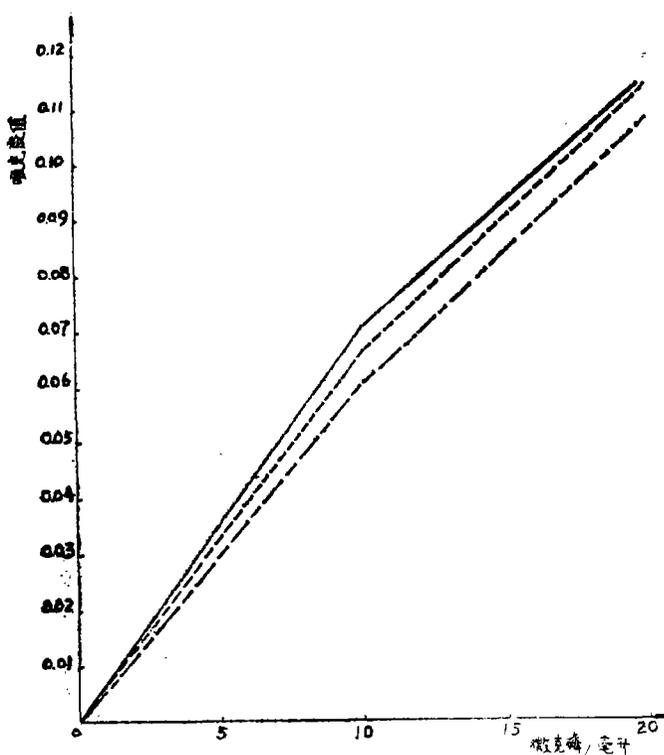


图 1 最佳灰化和原子化温度曲线(操作条件见表一)

实验结果表明, 就涂布管的灵敏度和重现性而言, 二种涂布工艺之间并无显著差异。为方便起见, 故使用超声波处理涂布法。

对于所研究的三种石墨管：碳化锆，碳化硅和普通石墨管，当进样量为20微升时，校正曲线的线性范围一直延续到10微克磷/毫升。(图2)与普通石墨管的灵敏度相比，碳化锆石墨管的灵敏度要高出10—15%，而碳化硅石墨管则要高出8~10%。在本工作中用金属碳化物涂布石墨管看来并不能延长管子的使用寿命。当样液浓度为5微克磷/毫升的20%混合酸溶液(HNO<sub>3</sub>:HClO<sub>4</sub>)(体积比=1:1)时，这样70次后，原子化信号将下降30%；但当混合酸溶液浓度为0.1%时，则大约在进样400次后，原子化信号才下降30%。有关报道关于普通石墨管之间灵敏度差异较大的现象在本工作中未曾发现。

介质效应



—锆涂布管    ---硅涂布管    -·-普通管

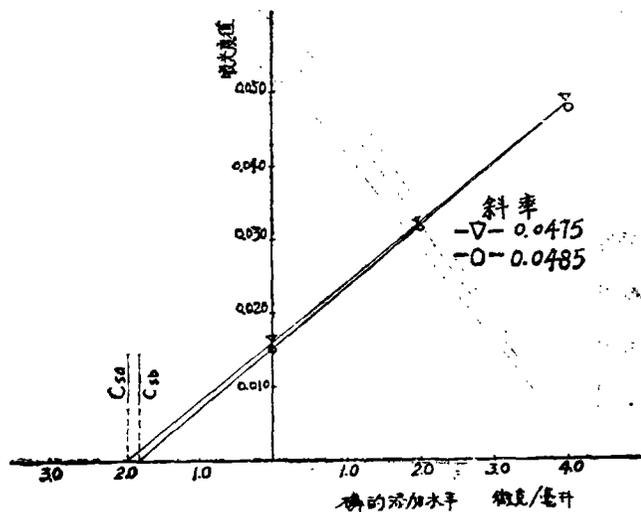
图2 对应于不同石墨的校正曲线

表二 不同介质对磷吸光度值的影响(吸光度值×10<sup>3</sup>)<sup>a</sup>

介 质	石墨管	介 质 (%)						
		0.01	0.05	0.1	0.5	1.0	5	10
HCl(v/v)	普通管	17	19	19	20	19	20	20
	碳化锆管	18	18	20	21	21	20	20
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (v/v)	普通管	14	18	18	18	20	16	15
	碳化锆管	15	16	14	15	16	13	12
HNO <sub>3</sub> (v/v)	普通管	18	18	19	20	22	20	18
	碳化锆管	17	18	18	19	21	20	18
HNO <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1:1)(v/v)	普通管	17	17	18	19	18	18	17
	碳化锆管	19	20	19	19	20	19	17
HClO <sub>4</sub> (v/v)	普通管	20	20	21	27	30	26	22
	碳化锆管	21	21	24	28	32	28	26
HClO <sub>4</sub> /HNO <sub>3</sub> (1:1)(v/v)	普通管	18	20	21	26	28	26	21
	碳化锆管	20	22	23	28	31	29	26
La(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (w/v)	普通管	22	23	23	35	55	61	52

a. 进样量20微升，标准液中磷浓度10微克/微升，实验条件如表一所示。

在以 GFAA 测定痕量元素时作为介质的高氯酸对信号的阻抑作用已有不少报道<sup>[12,13]</sup> Koirtiyohann<sup>[14]</sup> 和 Slavin 等人<sup>[15]</sup> 研究了高氯酸对铝和其它元素测定的作用及其机理。他们发现当在样液中有高氯酸存在时, 铝有可能以一种键合的化合物存在从而降低原子化程度。然而对磷而言, 高氯酸却起相反的作用。由表二可知, 随样液中高氯酸浓度的增加, 信号增大, 当高氯酸浓度达到 1% 时, 信号达到最大值。磷的最佳原子化状态是借助于  $\text{La}(\text{NO}_3)_2$  的添加而达到的。在样液中加入 5% 铜使灵敏度达到仅以 1% 硝酸作介质的 2.9 倍, 仅以 1% 氯酸作介质的 1.9 倍。



—△— 样品消化后添加磷标准液  
—○— 样品消化前添加磷标准液  
回收率  $R\% = C_{sb}/C_{sa} \times 100\%$

图 3 基于标准添加法的回收率试验

#### 回收率

基于标准添加法测定回收率。在样品消化前加入一定量的磷标准液由此测得  $C_{sb}$ ; 在样品消化后加入一定量的磷标准液由此测得  $C_{sa}$ , 如二曲线重合则回收率为 100%。图 3 的曲线表示回收率为 96%。对上述三种石墨管进行了回收率测定; 对应于每一种管子进行 6 组平行测定。普通管的回收率为  $99 \pm 6\%$ ; 碳化硅管为  $96 \pm 4\%$ , 而碳化锆管为  $102 \pm 3\%$ 。

#### 重视性

用 GFAA 法测定同一样液 10 次[菠菜标准样品 SRM1570]来研究不同石墨管的重现性。对

应于普通石墨管。碳化硅管和碳化锆管, 相对标准偏差分别为 8.1%, 3.6% 和 5.2%。GFAA 法的总重现性由表三所示, 如用普通管则相对标准偏差为 9% 如用金属碳化物涂布管则可得到更好的重现性, 相对偏差为 5%。

表三 用消化法 1—原子吸收分光光度法及不同的石墨管测得的 NBS 样品中的磷含量(克/公斤干基<sup>a)</sup>平行测定 10 次)

样 品	普通管		碳化锆管		碳化硅管		NDS 标定值
	$\bar{x}^{b)}$	S.D. <sup>c)</sup>	$\bar{x}$	S.D.	$\bar{x}$	S.D.	
菠菜(SRM 1570)	5.5	0.5	5.5	0.3	5.6	0.3	$5.5 \pm 0.2^d)$
牡蛎组织(SRM 1566)	8.1	0.9	7.8	0.5	7.7	0.4	$8.1^e)$

a) 按 NBS 规定法干燥 b, c) 均数和标准偏差 d) 置信限 95% e) 未标定值

#### 准确度

为了评价本法的准确度, 测定 3 NBS 的标准样品。表三的结果表明石墨管的表面处理对准确度优劣无明显作用。三种石墨管均给出很好的准确度。当用普通管测定未经标定的牡

蛎标准样品时, 所得的结果高于用涂布管测得的值, 而后者与最近报道的结果相符合。

用标准添加法比标准曲线法可得到更准确的结果。(表四)在普通石墨管和碳化硅管之间并无显著差异。

表四 采用消化法1—原子吸收分光光度法测定NBS样品中磷含量  
时标准添加法和标准曲线法的比较(克/公斤干基, 平行测定4次)

样 品	普 通 管				碳 化 硅 管				NBS 标定值
	S.C. <sup>a)</sup>		S.D. <sup>d)</sup>		S.C.		S.A.		
	$\bar{x}$ <sup>c)</sup>	S.A. <sup>b)</sup>	$\bar{x}$	S.D.	$\bar{x}$	S.D.	$\bar{x}$	S.D.	
菠菜(SRM 1570)	5.9	0.3	5.5	0.5	6.3	0.3	5.6	0.4	5.5±0.2 <sup>a)</sup>
牡蛎组织 (SRM 1566)	8.3	0.5	8.1	0.8	8.1	0.4	7.7	0.9	8.1 <sup>f)</sup>

a) 标准曲线法 b) 标准添加法, 添加水平: 2 微克/毫升 4 微克/毫升  
c, d) 均数和标准偏差 c) 置信限 95% f) 未标定值

#### 比色法

对磷而言, 磷钼呈色反应的一个值得注意的特征是在该反应中只有溶解态的正磷酸盐离子才能与试剂作用显色。因此必须在比色分析前将以其它形式存在的磷氧化成正磷酸盐离子。

表五记录的数据显示了用二种不同方法(消化法1—GFAA 测定和消化法2—CM 测定)同一样品所得的磷含量值之间的差异。显而易见, 使用消化法2—CM 法时, 有相当一部份磷并非以正磷酸盐离子的形式存在。在比色以前将消化液煮沸可使回收率改善8%。但结果仍显著偏低。当采用消化法1—CM 法时, 所测得的菠菜标准样品中磷含量在标定值之间, 但所测得的牡蛎标准样品中的磷含量低于采用消化法1—GFAA 法所得到的结果(表六)。

表五 用比色法测磷时, 二种不同的消化方法<sup>a)</sup>对分析结果的影响  
(克/公斤, 干基, 平行测定4次)

样 品	消化法2 (B)		消化法1 (A)		$\frac{A}{B} \times 100$	NBS 标定值
	$\bar{x}$ <sup>b)</sup>	S.D. <sup>c)</sup>	$\bar{x}$	S.D.		
菠菜(SRM 1570)	4.53	0.12	5.60	0.10	81	5.5±0.2 <sup>d)</sup>
牡蛎组织(SRM 1566)	6.42	0.15	6.53	0.12	98	8.1 <sup>e)</sup>
鱼类制品 no.1	5.83	0.13	6.16	0.11	95	
鱼类制品 no.2	3.20	0.08	4.87	0.08	66	
鱼类制品 no.3	3.18	0.08	4.99	0.08	64	
鱼类制品 no.4	3.98	0.07	6.36	0.10	63	
鱼类制品 no.5	4.56	0.10	6.88	0.14	66	

a) 具体方法见本文“消化步骤” b, c) 均数和标准偏差  
d) 置信限95% e) 未标定值

表六 采用消化法1时,不同的测定方法(原子吸收分光光度法和比色法)对分析结果的影响(克/公斤,干基,平行测定6次)

样 品	原子吸法 <sup>a)</sup>		比 色 法		NBS 标 定 值
	$\bar{x}$ <sup>b)</sup>	S.D. <sup>c)</sup>	$\bar{x}$	S.D.	
菠菜(SRM 1570)	5.5	0.36	5.43	0.10	5.5±0.2 <sup>d)</sup>
牡蛎组织(SRM 1566)	7.7	0.40	6.53	0.12	8.1 <sup>e)</sup>

a) 采用碳化硅涂布管 b,c) 均数和标准偏差 d) 置信限95% e) 未标定值

图4显示了由比色法和原子吸收分光光度法分别测定鱼类制品中磷含量时二组结果之间的高度相关性。比色法的重现性优于原子吸收法,但准确度劣于后者。

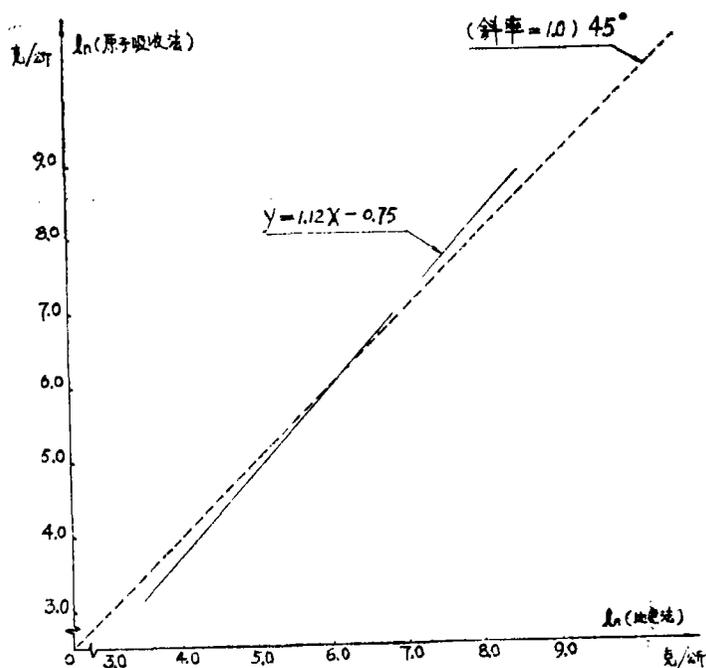


图4 用比色法和原子吸收分光光度法测得的鱼类制品中磷含量的比较

作者对 L.R.Njaa 博士在比色分析方面的帮助谨表谢意。

#### 参 考 文 献

- [1] C.A.Cabell and I.P.Earle, J.Am.Sci., 24 (1965) 800.
- [2] E.R.Monsen and J.D.Cook, Am.J.Clin.Nutr., 29 (1976) 1142.
- [3] T.H.Mc Cartney, Fish.Res.Bull.N.Y., 30 (1967).
- [4] A.Prevot and M.Gente-Jauniaux, At.Absorption Newslett.,17 (1978) 1.
- [5] F.J.Langmyhr and I.M.Dahl, Anal.Chim.Acta, 131 (1981) 303.
- [6] K.Julshamn and O.R.Brxxkan, At.Absorption Newslett. 13 (1975) 49.
- [7] K.Julshamn, Fisk. Dir. Skr., Ser. Ernxring, 1 (1981) 161.

- [ 8 ] A. Driedger and W. R., Seitz, *Anal. Chem.*, 51 (1979) 1197.
- [ 9 ] T. M. Vickrey, G. V. Harrison and G. J. Ramelow, *At. Spectrosc.*, 1 (1980) 116.
- [10] I. Havezov, E. Russeva and N. Jordanov, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 296 (1979) 125.
- [11] J. V. O'Neill and R. A. Webb, *J. Sci. Fd. Agric.*, 21 (1970) 217.
- [12] K. Julshamn, *At. Absorpt. Newsl.*, 16 (1977) 149.
- [13] A. Pilate, P. Geladi and F. Adams, *Talanta*, 24 (1975) 512.
- [14] S. R. Koirtyojann, E. D. Glass and F. E. Lichte, *Appl. Spectrosc.*, 35 (1981) 22.
- [15] W. Slavin, G. R. Carnrick and D. C. Manning, *Anal. Chim. Acta*, 138 (1982) 103.

Optimization of the Determination of phosphorus by  
Atomic Absorption, a Comparison of a Flameless  
Graphite Furnace Atomic Absorption System  
with a Colorimetric Method.

*Lin Shao-wen*

*Kaare Julshamn (Government Vitamin Institute Norway)*

Abstract

Analyses of phosphorus in biological samples have been optimized by using a graphite furnace atomic absorption (P-E 5000 AAS) technique. Wet digestion procedures and the effects of different impregnation materials in the graphite tubes have been studied. The GFAA-procedure and a standard colorimetric method were evaluated with respect to performance and applicability to the determination of phosphorus in NBS-materials and samples of marine origin. The relative merits of the two methods will be discussed.