

HY

中华人民共和国海洋行业标准

HY/T XXXXX—XXXX

海水中痕量活性磷酸盐的测定
流动分析-磷钼蓝固相萃取-分光光度法

Determination of seawater trace dissolved reactive phosphorus-Flow
analysis, solid phase extraction of phosphomolybdenum blue and
spectrophotometric detection

(报批稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中华人民共和国自然资源部 发布

目 次

前言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 方法原理.....	1
5 试剂与材料.....	2
6 仪器和设备.....	3
7 样品采集与保存.....	4
8 分析步骤.....	4
9 结果计算与记录.....	6
10 精密度和准确度.....	6
11 质量保证和质量控制.....	6
12 注意事项.....	7
附录 A（规范性）海水中痕量活性磷酸盐的测定分析记录.....	8
附录 B（规范性）海水中痕量活性磷酸盐测定的质量控制要求.....	9
参考文献.....	10

前 言

本文件按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中华人民共和国自然资源部提出。

本文件由全国海洋标准化技术委员会（SAC/TC 283）归口。

本文件起草单位：厦门大学、自然资源部第三海洋研究所。

本文件主要起草人：马剑、袁东星、张元标、刘宝敏、韩爱琴。

海水中痕量活性磷酸盐的测定

流动分析-磷钼蓝固相萃取-分光光度法

1 范围

本文件规定了采用流动分析-磷钼蓝固相萃取-分光光度法测定海水中痕量活性磷酸盐的方法原理、试剂与材料、仪器和设备、样品采集与保存、分析步骤、结果计算与记录、精密度和准确度、质量保证和质量控制的要求。

本文件适用于海水中 nmol/L 级别痕量活性磷酸盐的测定。样品富集体积为 60 mL 时，本方法的检出限为 6 nmol/L ，测定下限为 10 nmol/L 。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 12763.4 海洋调查规范 第4部分：海水化学要素调查

GB 17378.2 海洋监测规范 第2部分：数据处理与分析质量控制

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 方法原理

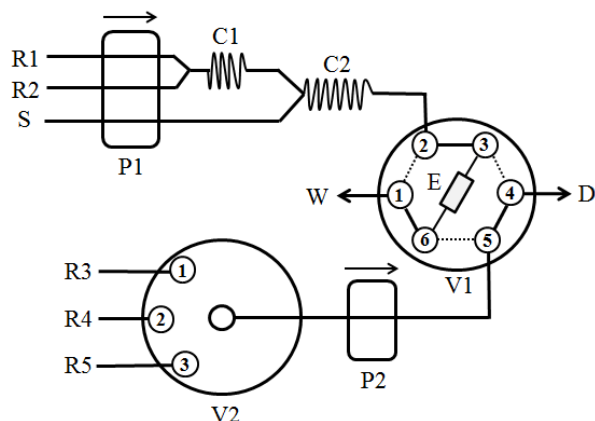
4.1 流动分析系统工作原理

样品与试剂在蠕动泵的推动下进入分析模块，在密闭的管道中按设定的顺序和比例进行混合、反应、固相萃取、洗脱，洗脱液进入分光光度检测器测定吸光值，计算样品中被测物质的含量。

4.2 化学反应原理

在酸性条件下，海水样品中的活性磷酸盐在酒石酸锑钾的催化下，与钼酸铵反应生成磷钼酸化合物，进而被抗坏血酸还原生成磷钼蓝化合物，该化合物富集在固相萃取小柱上，经碱性溶液洗脱后，用分光光度检测器在 710 nm 波长处测定。

参考分析流路图见图 1。



说明:

P1——蠕动泵 1	P2——蠕动泵 2	C1——试剂混合盘管, 1 m
C2——反应盘管, 5.5 m	V1——六通阀	V2——多位选择阀
E——固相萃取小柱 (见 5.22)	D——分光光度检测器	R1——钼酸铵混合使用液 (见 5.11)
R2——抗坏血酸使用液 (见 5.13)	R3——氯化钠使用液 (见 5.15)	R4——氢氧化钠使用液 (见 5.17)
R5——超纯水	S——样品	W——废液

图 1 流动分析-磷钼蓝固相萃取-分光光度法测定痕量活性磷酸盐的分析流路图

5 试剂与材料

除非另有说明, 在分析中均使用确认为分析纯的化学试剂, 实验用水均为新制备的超纯水 (电阻率大于等于 $18.0\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$)。

- 5.1 硫酸 (H_2SO_4): $\rho(\text{H}_2\text{SO}_4)=1.84\text{ g/mL}$ 。
- 5.2 钼酸铵 ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$)。
- 5.3 酒石酸锑钾 ($\text{KSbOC}_4\text{H}_4\text{O}_6\cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$)。
- 5.4 抗坏血酸 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$)。
- 5.5 氯化钠 (NaCl)。
- 5.6 氢氧化钠 (NaOH)。
- 5.7 盐酸 (HCl): 优级纯, $\rho(\text{HCl})=1.19\text{ g/mL}$ 。
- 5.8 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4): 优级纯, 在 $110\text{ }^\circ\text{C}\sim 115\text{ }^\circ\text{C}$ 烘干并恒重后, 保存在干燥器中。
- 5.9 硫酸溶液 (1+1)。配制方法为: 在不断搅拌下将 150 mL 浓硫酸 (见 5.1) 缓缓加入到 150 mL 水中。
- 5.10 钼酸铵混合贮备液。配制方法为: 称取 13 g 钼酸铵 (见 5.2) 溶于 100 mL 水中; 称取 0.35 g 酒石酸锑钾 (见 5.3) 溶于 100 mL 水中。在不断搅拌下, 将钼酸铵溶液缓缓加入到 300 mL 硫酸溶液 (见 5.9) 中, 再加入酒石酸锑钾溶液, 混合均匀。该溶液贮存于棕色玻璃瓶中, 在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下避光保存。溶液变混浊时, 应重配。

- 5.11 钼酸铵混合使用液。配制方法为：量取 36mL 钼酸铵混合贮备液（见 5.10），用水稀释至 100mL，盛于高密度聚乙烯瓶中，现用现配。
- 5.12 抗坏血酸贮备液： $c(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6) = 100\text{g/L}$ 。配制方法为：称取 10g 抗坏血酸（见 5.4）溶于 100mL 水中，贮存于棕色试剂瓶中，在 4℃ 下避光保存，可稳定 1 个月。
- 5.13 抗坏血酸使用液： $c(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6) = 18\text{g/L}$ 。配制方法为：量取 18mL 抗坏血酸贮备液（见 5.12），用水稀释至 100mL，盛于高密度聚乙烯瓶中，现用现配。
- 5.14 氯化钠贮备液： $c(\text{NaCl}) = 2\text{mol/L}$ 。配制方法为：称取 58.4g 氯化钠（见 5.5）溶于 500mL 水中，贮存于高密度聚乙烯瓶中，室温下可保存 6 个月。
- 5.15 氯化钠使用液： $c(\text{NaCl}) = 0.2\text{mol/L}$ 。配制方法为：量取 10mL 氯化钠贮备液（见 5.14），用水稀释至 100mL，盛于高密度聚乙烯瓶中，现用现配。
- 5.16 氢氧化钠贮备液： $c(\text{NaOH}) = 10\text{mol/L}$ 。配制方法为：称取 40g 氢氧化钠（见 5.6）溶于 100mL 水中，贮存于高密度聚乙烯瓶中，室温下可保存 6 个月。
- 5.17 氢氧化钠使用液： $c(\text{NaOH}) = 0.2\text{mol/L}$ 。配制方法为：量取 2mL 氢氧化钠贮备液（见 5.16），用水稀释至 100mL，盛于高密度聚乙烯瓶中，现用现配。
- 5.18 10%（V/V）盐酸溶液。配制方法为：量取 139mL 盐酸（见 5.7），用水稀释至 500mL，盛于高密度聚乙烯瓶中，现用现配。
- 5.19 磷酸盐标准贮备液： $c(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 8000\mu\text{mol/L}$ 。配制方法为：准确称取 1.0880g 磷酸二氢钾（见 5.8）溶于水中，并定容至 1000mL，贮存于高密度聚乙烯瓶中，在 4℃ 下保存，可稳定 6 个月。
- 5.20 磷酸盐标准中间液： $c(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 200\mu\text{mol/L}$ 。配制方法为：准确量取 2.50mL 磷酸盐标准贮备液（见 5.19），用水稀释并定容至 100mL，盛于高密度聚乙烯瓶中，现用现配。
- 5.21 磷酸盐标准使用液： $c(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 10.0\mu\text{mol/L}$ 。配制方法为：准确量取 5.00mL 磷酸盐标准中间液（见 5.20），用水稀释并定容至 100mL，盛于高密度聚乙烯瓶中，现用现配。
- 5.22 固相萃取小柱。Oasis® HLB 小柱¹⁾：3cm³/60mg。
- 5.23 蠕动泵泵管。试剂泵管内径 0.89mm，样品泵管内径 2.06mm。
- 5.24 聚四氟乙烯管。流路管道和混合盘管内径 0.75mm，进样管和反应盘管内径 1.5mm。

6 仪器和设备

- 6.1 商品化或实验室自制的流动分析装置，参见图 1，主要由下列各部分组成：
- 蠕动泵；
 - 多位选择阀；
 - 六通阀；
 - 流动分析用分光光度检测器，配 20mm 流通池；
 - 数据处理及仪器控制软件。
- 6.2 分析天平：感量为 0.0001g。
- 6.3 普通天平：感量为 0.01g。

¹⁾ Oasis® HLB 小柱是由美国 Waters 公司提供的产品的商品名。给出这一信息是为了方便本文件的使用者，并不表示对该产品的认可。如果其他产品具有相同的效果，那么可使用这些等效产品。

6.4 一般化学实验室常用的仪器和设备。

7 样品采集与保存

样品采集与保存措施如下：

- a) 采样前，应依次用 10% (V/V) 盐酸溶液（见 5.18）、超纯水清洗所有接触样品的器皿；
- b) 采样过程注意防止污染，应戴无营养盐污染的一次性手套，每采一次样品应更换手套；
- c) 先用样品将高密度聚乙烯瓶润洗三次以上，再将样品采集于瓶中；
- d) 采集的样品一般无需过滤，如果必须过滤，要特别注意防止过滤过程中引入污染；
- e) 样品采集后宜现场分析，若无法及时分析，可置于冰箱中冷藏或-20℃冷冻保存，冷藏不能超过 48 h，冷冻不宜超过 30 d。

8 分析步骤

8.1 仪器调试

按照图 1 所示连接分析系统。开机后，先用超纯水代替试剂，检查整个分析流路的密闭性及液体流动的通畅性，待基线稳定后（约 20 min），将各管道的入口端置入对应的试剂或样品中。

8.2 仪器运行程序设定

按表 1 设定运行程序和参数，分析流路参见图 1，具体步骤如下：

- a) 步骤 1，在 P1（蠕动泵 1）的推动下，样品和 R1（钼酸铵混合使用液）、R2（抗坏血酸使用液）进入管路，清洗并充满反应盘管；在 P2（蠕动泵 2）的推动下，R3（氯化钠使用液）预淋洗固相萃取小柱；
- b) 步骤 2，在 P2（蠕动泵 2）的推动下，R4（氢氧化钠使用液）洗脱已富集在柱上的前一个样品的反应产物磷钼蓝，送往检测器测定前一个样品的吸光值，检测波长为 710 nm，流通池长度为 20 mm；
- c) 步骤 3，在 P2（蠕动泵 2）的推动下，超纯水清洗固相萃取小柱；
- d) 步骤 4，在 P1（蠕动泵 1）的推动下，样品和 R1（钼酸铵混合使用液）、R2（抗坏血酸使用液）混合并反应，生成的反应产物磷钼蓝在固相萃取小柱上富集。

表 1 分析系统的运行程序

步骤	蠕动泵 1 流速 ^a mL/min	蠕动泵 2 流速 ^a mL/min	六位阀 阀位	多位选择 阀位	持续时间 s	说明
1	12.0（样品） 2.2（试剂）	2.0（氯化钠使用液）	虚线位	1	40	样品和 R1（钼酸铵混合使用液）、R2（抗坏血酸使用液）清洗管路；R3（氯化钠使用液）预淋洗固相萃取小柱

表 1 分析系统的运行程序（续）

步骤	蠕动泵 1 流速 ^a mL/min	蠕动泵 2 流速 ^a mL/min	六位阀 阀位	多位选择 阀位	持续时间 s	说明
2	0.0	2.0（氢氧化钠 使用液）	虚线位	2	40	R4（氢氧化钠使用液）洗脱固相萃取小柱上上一个样品的反应产物磷钼蓝，检测器测定吸光值
3	0.0	2.0（超纯水）	虚线位	3	40	超纯水清洗固相萃取小柱
4	7.5（样品） 1.4（试剂）	0.0	实线位	3	480 或 240 ^b	样品和 R1（钼酸铵混合使用液）、R2（抗坏血酸使用液）混合并反应，生成的反应产物磷钼蓝在固相萃取小柱上富集
^a 流速为实测流速。 ^b 选择标准系列 I 绘制标准曲线时，时间设置为 480s；选择标准系列 II 绘制标准曲线时，时间设置为 240s。						

8.3 标准系列溶液的制备

标准系列 I：分别量取 0.00mL、0.10mL、0.25mL、0.50mL、0.75mL 和 1.00mL 的磷酸盐标准使用液（见 5.21），用超纯水稀释并定容至 100mL，制备 6 个浓度点的标准系列。活性磷酸盐的浓度分别为：0.0nmol/L、10.0nmol/L、25.0nmol/L、50.0nmol/L、75.0nmol/L 和 100.0nmol/L。

标准系列 II：分别量取 0.00mL、0.50mL、1.00mL、1.50mL、2.00mL、2.50mL 和 3.00mL 的磷酸盐标准使用液（见 5.21），用超纯水稀释并定容至 100mL，制备 7 个浓度点的标准系列。活性磷酸盐的浓度分别为：0.0nmol/L、50.0nmol/L、100.0nmol/L、150.0nmol/L、200.0nmol/L、250.0nmol/L 和 300.0nmol/L。

8.4 标准曲线的绘制

根据待测样品浓度，选择合适的标准系列（见 8.3），依次从低浓度到高浓度取适量标准系列溶液，置于样品瓶中，启动分析系统进行测定。以测定吸光值（峰高）为纵坐标，对应的活性磷酸盐浓度为横坐标，绘制标准曲线。

8.5 样品测定

取适量海水样品，采用 8.4 相同的条件，进行样品的测定。

8.6 空白试验

用超纯水代替样品，按照 8.5 样品测定步骤进行空白试验。

9 结果计算与记录

对 8.4 绘制的标准曲线进行线性拟合后，得到标准曲线拟合方程。样品中活性磷酸盐的浓度按照式 (1) 进行计算。测定分析记录表见附录 A。

$$c = \frac{y-b}{a} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

c——样品中活性磷酸盐的浓度，单位为纳摩尔每升 (nmol/L)；

y——测定的吸光值 (峰高)；

b——标准曲线拟合方程的截距；

a——标准曲线拟合方程的斜率。

计算结果表示到小数点后一位。

10 精密度和准确度

10.1 精密度

7 家实验室分别对活性磷酸盐浓度为 40.0nmol/L 和 150.0nmol/L 的样品进行了测试 (n=10~11)，测定平均值分别为 39.6nmol/L~43.7nmol/L 和 144.2nmol/L~158.4nmol/L；重复性标准差分别为 1.7nmol/L 和 2.9nmol/L；重复性限分别为 4.6nmol/L 和 8.1nmol/L；再现性标准差分别为 2.1nmol/L 和 5.3nmol/L；再现性限分别为 6.0nmol/L 和 14.7nmol/L。

在同一实验室，由同一操作者使用相同设备，按相同的测试方法，并在短时间内对同一被测对象相互独立进行测试获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的 20%，以大于 20% 的情况不超过 5% 为前提。

在不同的实验室，由不同的操作者使用不同的设备，按相同的测试方法，对同一被测对象相互独立进行测试获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的 20%，以大于 20% 的情况不超过 5% 为前提。

10.2 准确度

取适量浓度为 3.20μmol/L 的活性磷酸盐国家一级标准物质，用超纯水稀释至 160.0nmol/L 作为样品，由 7 家实验室分别使用本方法进行测试，结果的相对偏差范围为-3.4%~5.1%。7 家实验室分别对浓度为 8.4nmol/L~20.6nmol/L 的实际海水样品进行加标回收测定，加标浓度为 25.0nmol/L~30.0nmol/L，回收率范围为 91.0%~107.3%。

11 质量保证和质量控制

质量保证和质量控制应按照 GB 17378.2 和 GB/T 12763.4 的相关规定执行。

每批样品或连续测定8 h后应测定一个方法空白样、一组检测样品加标样、一组平行双样；有条件的再测定一个标准参考物质样品。方法空白样以超纯水替代样品，测定步骤同样品。测定结果应符合附录B的规定。

建议每分析10个样品，使用标准曲线中间浓度溶液进行校准核查。如果测定值与理论值的相对误差在 $\pm 10\%$ 之内，说明分析系统在可控范围内。如果相对误差超过 $\pm 10\%$ ，说明分析系统失控，则应检查仪器、试剂溶液是否正常，确定无疑后重新配制、测定、绘制标准曲线，上一个合格检查值之后测定的样品需重新测定，并依照新的标准曲线计算浓度。

12 注意事项

本方法操作中应注意如下事项：

- 实验用超纯水应当天制备，以避免空白过高；
- 试剂和环境温度会影响分析结果，冰箱内贮存的试剂应放置至室温后再使用，分析过程中宜保持室温恒定，温度波动不宜过大；
- 每批样品分析均应绘制标准曲线。实验过程中使用新配制的试剂或标准系列溶液时，应重新绘制标准曲线；
- 建议每测定约 100 个样品更换一次固相萃取小柱，并重新绘制标准曲线；
- 每批样品测试前、测试后或测试过程中出现基线漂移、管路堵塞等情况时，可采用以下方式清洗管路：移除固相萃取小柱，使用超纯水清洗管路 20min。

附录 A
(规范性)
海水中痕量活性磷酸盐的测定分析记录

海水中痕量活性磷酸盐的测定分析记录见表 A.1。

表 A.1 海水中痕量活性磷酸盐的测定分析记录表
(流动分析-磷钼蓝固相萃取-分光光度法)

海区_____ 调查船_____ 采样日期_____年_____月_____日

仪器型号_____ 分析日期_____年_____月_____日 共_____页 第_____页

序号	站号	样品编号	吸光值 (峰高)			样品中活性磷酸盐浓度 nmol/L	备注
			平行 1	平行 2	平均值		
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
备注	标准曲线线性回归拟合方程: $y = ac + b$ ($a =$ $b =$ $r =$)						

分析者:

校对者:

附录 B
(规范性)

海水中痕量活性磷酸盐测定的质量控制要求

海水中痕量活性磷酸盐测定的数据质量控制要求见表 B.1。

表 B.1 海水中痕量活性磷酸盐测定的质量控制要求

项目	参数	要求	频率
方法空白样	空白浓度	<6.0 nmol/L	每次绘制校准曲线前测定
检测样品加标样	加标回收率	80%~120%	测定每批样或连续测定 8h 应做
平行双样	平行双样相对偏差 ^a	≤±10%	测定每批样或连续测定 8h 应做
<p>^a 平行双样相对偏差以下式计算：</p> $\eta = \frac{ c_1 - c_2 }{c_1 + c_2} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(B.1)$ <p>式中： η——相对偏差； c_1、c_2——平行双样测得的活性磷酸盐浓度，nmol/L。</p>			

参 考 文 献

- [1] GB 17378.3 海洋监测规范 第3部分：样品采集、贮存与运输
 - [2] GB 17378.4 海洋监测规范 第4部分：海水分析
 - [3] HY/T 147.1 海洋监测技术规程 第1部分：海水
-