

**ВАЛИДИРАНЕ НА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕН МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ
НА ОБЩО СЪДЪРЖАНИЕ НА ФОСФОР В ПОЧВИ И СЕДИМЕНТИ С ИЗПОЛЗВАНЕ
НА МИКРОВОЪЛНОВО РАЗЛАГАНЕ**

Любка Чепанова*, Иванка Маджарова*, Зара Анева
Регионална лаборатория – Бургас, Агенция по опазване на околната среда към МОСБ

**VALIDATION OF A SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF
TOTAL PHOSPHORUS IN SOILS AND SEDIMENTS USING A MICROWAVE-ASSISTED
DIGESTION**

Lubka Chepanova*, Ivanka Madgarova*, Zara Aneva
*Regional Laboratory – Bourgas, Environmental Executor Agency at Ministry of Environmental and
Waters
E-mail: zaneva@btu.bg*

ABSTRACT

Phosphorus is an important macronutrient and its accurate determination in environmental matrices such as soils and sediments is essential for understanding the biogeochemical cycling of the element, studying its role in ecosystem health and monitoring compliance with legislation. There are a few methods developed to extract and analyze total P in environmental for assessing the risk of phosphorus leaching and surface runoff. These methods are not designed for routine analysis and monitoring aims. The standard methods of phosphorus extraction are based usually on aqua regia digestion using a conventional heating, which is very prolonged and there is potential possibility of phosphorus species lost. The standard method microwave-assisted digestion is validated only for sludges and for an application with microwave systems only with a power control.

As a result of our work a microwave-assisted digestion procedures with aqua regia were developed and validated in order to determine the heavy metals content in environmental samples. These procedures with power control and temperature control of the microwave systems were adapted to the soil and sediment samples in order to determine the total phosphorus content by the spectrophotometric vanadatomolybdatophosphorus method, which is commonly used for soils. In this way the time of the microwave digestion step was limited up to 15 minutes instead of several hours needed for the conventional digestion. These procedures were validated using the certified reference materials NIST 2709 soil, BCR 684 river sediment and LKSD 4 lake sediment. The analytical characteristics of the method suggest the reliability of the method detection limit 0.006 % P, relative standard deviation 4.7 % , analytical recovery 107 % and relative expanded combined uncertainty 10 %.. A new way to overcome the influence of Fe on the spectrophotometric determination of phosphorus was proposed.

Key words: *phosphorus determination, microwave-assisted digestion, spectrophotometric method validation, soils and sediments*

ВЪВЕДЕНИЕ

Фосфорът (P) се определя в почвите от агрономическа гледна точка и с оглед на оценяване на риска от замърсяване на околната среда. Фосфорът е потенциален замърсител на водите поради процеси на

извличането му от почвите и седиментите и неговото наличие води до усилен растеж на водорасли, което има за резултат намаление на прозрачността, поява на мирис, загуба на естествена среда за живот и унищожаване на рибите [1-4]. В почвите фосфорът се съдържа като разтворими и неразтворими неорганични химични форми и като органични

съединения. В седиментите Р попада от водите и във вид на утайки от неразтворими съединения. Източници на Р са също листа, треви, еродирала почва и животински отпадъци.

Повишеното внимание към Р като замърсител в последните петнадесет години създава необходимост от методи за анализ, които са различни от тези за агрономически цели (определяне на количеството на нутриента в почвата, което е пропорционално на това, което се усвоява от растенията по време на растежа). Заключение на Техническият комитет WG-1 на Европейската общност е, че има малко обзори на реално използваните методи за оценяване на риска от замърсяване на околната среда с Р от почвите и методите не са рутинни [4,5].

Стандартният метод, регламентиран в DIN 38414 [6] за определяне на общо съдържание на фосфор в утайки и седименти, препоръчва екстракция с царска вода няколко часа при стайна температура и два часа при кипене с обратен хладник. Количеството на фосфора в киселия екстракт се определя спектрофотометрично като жълт ванадатомолибдатифосфорен комплекс.

Известно е, че през последното десетилетие голямо приложение при екстракцията на токсични елементи от почви и други твърди матрици намира микровълновата техника. За микровълново извличане на токсични метали и фосфор от утайки е наличен стандартен метод EN 13346 [7], в който се препоръчват две процедури с пет етапа за разлагане с царска вода в затворени и отворени съдове с програма за контрол на мощността. Продължителността е съответно 20 и 30 минути. Полученият екстракт е подходящ за определяне на As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, Zn и Р с помощта на спектрометрични методи. Този метод за микровълново разлагане е валидиран за канални утайки и не е изпитван за почви.

В резултат на наши предишни изследвания бяха разработени и валидирани 15 минутни микровълнови процедури за разлагане с царска вода в съдове под налягане на проби на околната среда с цел да се определи съдържанието на тежки метали. Тези процедури с контрол на мощността или на температурата на микровълновата система бяха впоследствие адаптирани за почва и седименти с оглед да се определи общото съдържание на Р чрез ванадатомолибдатифосфорния спектрофотометричен

метод. Приложен беше нов подход за елиминиране на влиянието на желязо при спектрофотометричното определяне на Р чрез математическа корекция. Методите бяха валидирани с използване на сертифицирани сравнителни материали (почва, речен и езерен седимент).

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

Апаратура и реактиви

Използваната апаратура включва: ахатова мелница и пресевна машина RETCH, спектрофотометри Perkin Elmer модел Lambda 2S и Agilent Diode – array (200-1000 nm), химически микровълнови системи ETHOS 900 с контрол на мощността и ETHOS TC с контрол на температурата или налягането с 6 тefлонови съдове (100 cm³), система за получаване на ултрачиста вода с обратна осмоза (≤ 18 mΩ).

Използваните реактиви са Merck р.а. и сертифицирани изходни стандартни разтвори на фосфор и желязо (1000 mg/dm³ PO₄³⁻ и Fe).

Процедура

Вземането на проби, механичната обработка и определянето на съдържанието на влага в пробите се извършва съгласно изискванията на стандартите [8-10]. Пробите се изсушават при температура 40 °С за да се избегне риска от загуби на летливи вещества.

Претеглят се проби от 1 g директно в тefлоновите съдове на микровълновата система, омекрат се с 1 cm³ вода, прибавят се последователно 7,5 cm³ HCl (37 %) и 2,5 cm³ HNO₃ (65 %) и съдовете се затварят херметично. При използване на микровълнова система с контрол на мощността се прилага програма с три етапа по 5 минути, съответно 250, 750 и 250 W. При програма с контрол на температурата се задават 180 °С - 5 минути за достигане на тази температура и 10 минути за нейното поддържане. След приключване на програмите съдовете се вентилират 5 минути и се охлаждат с вода 15 минути. След това пробите се филтрат през филтър „синя лента” в мерителни колби от 25 cm³. Полученият екстракт се използва за определяне на токсични метали чрез ААС или ИСП-МС. За определяне на Р чрез ванадатомолибдатифосфорния спектрофотометричен

метод към 2 cm^3 от екстракта се добавят 30 cm^3 вода и $2,0 \text{ cm}^3$ реагент и обемът се довежда до 50 cm^3 с вода. За пълно формиране на цветния комплекс са необходими 45 минути, след което абсорбцията на разтворите се измерва спрямо разтвор на празна проба при 406 nm в кювети от 10 mm . От измерената абсорбция се изважда тази, съответстваща на съдържанието на желязо съгласно калибрационното уравнение за Fe. Концентрацията на P в разтворите се оценява чрез калибрация ($0 - 3,3 \text{ mg/dm}^3 \text{ P}$) и се изчислява съдържанието на P в пробите в % или в mg/kg .

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Оптимизиране на спектрофотометричните параметри

Абсорбционният максимум на жълтия ванадатомолибдатифосфорен комплекс е в ултравиолетовата област, но спектрофотометричните измервания обикновено се извършват при дължина на вълната 406 nm , при която реагентът абсорбира минимално [11]. Екстракцията на P от почви и седименти в царска вода, обаче, е съпроводено с извличане на макрокомпонента желязо, който при тези условия образува жълт хлориден комплекс. За да се елиминира преченето от желязо се препоръчва добавянето му в стандартните разтвори и в празната проба в количества, еквивалентни на тези в пробите [6,11]. При анализиране на различни типове почви и седименти с вариращо съдържание на желязо и голям брой проби, както е при мониторинг, това усложнява много анализа. От друга страна, фиксирането на някаква средна стойност за съдържанието на желязо в обектите за анализ би довело до големи грешки при ниски съдържания на P. Ето защо беше изследвано влиянието на желязо върху абсорбционния сигнал при спектрометричните условия за определяне на P (Таблица 1). Получените данни за измерените абсорбции и представянето им в графичен вид спрямо концентрацията на Fe показаха, че тази зависимост е линейна в областта $0-12 \text{ \% Fe}$ в изсушена проба със средна грешка $3,74 \text{ \%}$, която е нормална за спектрофотометрични измервания. В интервала $12 - 15 \text{ \% Fe}$ абсорбцията се променя незначително.

Таблица 1. Абсорбционни данни (A) за стандартни разтвори на желязото, отговарящи на концентрация (C_{Fe}) $3,5 - 15 \text{ \% Fe}$ в изсушена проба

C_{Fe} (%)	Измерена A	Изчислена A	Грешка (%)
3,5	0,0221	0,0213	-3,61
6,0	0,0376	0,0365	-2,87
9,0	0,0574	0,0548	-4,57
12,0	0,0703	0,0730	-3,90
15,0	0,0744	-	-

Уравнението на калибрационната права (с корелационен коефициент $0,9974$), е следното:

$$A = 0,00609 \cdot C_{\text{Fe}}$$

Използвайки това уравнение при установено съдържание на Fe в същата проба и при прилагане на същата микровълнова процедура за разлагане, може да се извърши математическа корекция на измерената абсорбция на пробата, без да се добавя желязо към празната проба или към стандартите. За интервала $12 - 15 \text{ \% Fe}$ корекцията за абсорбцията има постоянна стойност.

Установеният линеен динамичен обхват на калибрирането при 406 nm и кювети 10 mm беше до $3,3 \text{ mg/dm}^3 \text{ P}$, а уравнението на калибрационната права при двулъчев спектрофотометър Lambda 2S с корелационен коефициент $0,99997$ е следното :

$$C (\text{mg/dm}^3 \text{ P}) = 13,57 A$$

Чувствителността на спектрофотометричния метод при тези условия е $dA/dC = 0,074$. Тя може да се подобри при необходимост чрез използване на кювети с по-голяма дължина.

При измерване с еднолъчев спектрофотометър Agilent Diode-array е получено уравнение на калибрационната права с коефициент на корелация $0,99994$:

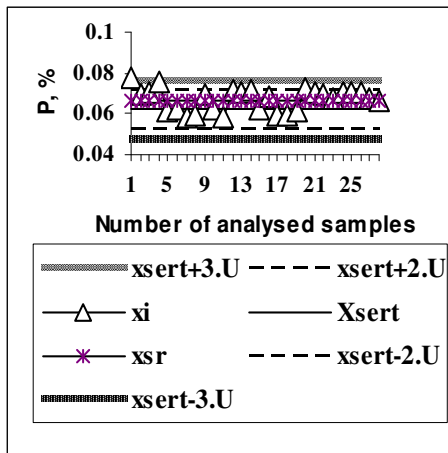
$$C (\text{mg/dm}^3 \text{ P}) = 12,98 A$$

Валидиране на метода за определяне на общо съдържание на P с приложение на микровълнови процедури

При създаване на нови методи, при тяхното модифициране или при приложението им за нови обекти на анализ е задължително методът да бъде валидиран, което потвърждава неговата надеждност. Валидирането има

за цел определяне на аналитичните характеристики на даден метод – чувствителност, селективност, повтаряемост, възпроизводимост, правилност (аналитичен добив или отклонение) граница на откриване и неопределеност (несигурност) [12]. Неопределеността е комбинирана, когато включва отделните източници на вариация; тя е разширена, когато се оценява с фактор на покритие $\kappa = 2$ ($P = 95\%$ статистическа вероятност) или с $\kappa = 3$ ($P = 99,7\%$ статистическа вероятност) [13]. Когато се определя комбинираната неопределеност обикновено се съставя бюджет на неопределеността – приносите на отделните етапи от анализа. Валидирането включва и проверка (верифициране) на калибрирането на аналитичния инструмент.

Калибрирането беше верифицирано чрез анализ на почвен материал CRM NIST 2709, прилагайки микровълнова процедура за разлагане с контрол на мощността. Представената на фиг. 1 графична зависимост показва, че резултатите от анализите са близки до сертифицираното общо съдържание на P и в обхвата на границите с фактор на покритие $\kappa = 3$ ($P=99,7\%$). Избраната за анализирание почва CRM NIST 2709 има матричен състав, подобен на този на обичайно изследваните почви.



Фиг. 1. Резултати от анализ на CRM NIST 2709 x_i със средна стойност $x_{sr} = 0,067\% P$, сравнени със сертифицираната стойност $x_{sert} = 0,062\% P$, с граници $x_{sert} \pm 3U$ и $x_{sert} \pm 2U$ при неопределеност на сертифицираната стойност $U = 0,005\% P$

За определяне на границата на откриване на предложения метод (MDL) е анализиран CRM речен седимент BCR 684 с общо

фосфорно съдържание $0,1373\% P$. MDL е изчислена по формулата :

$$MDL = t_f S_b + 3S_s$$

където:

t_f – коефициент на Стюдънт при статистическа вероятност $P = 0,95$ и степени на свобода $f = n-1$; n – брой на паралелните определения; S_b – средноквадратично стандартно отклонение на празна проба, S_s – средноквадратично стандартно отклонение на пробата. MDL е оценена на $0,006\% P$ при $n = 7$.

За оценяване на комбинираната неопределеност на предложения метод е направен бюджет на неопределеността

(Таблица 2), включващ средноквадратичните неопределености на етапите от анализа: претегляне на пробите, разреждане на разтворите за измерване, вътрешнолабораторна повтаряемост (измерване от един и същи изпълнител на един и същи спектрофотометър) и вътрешнолабораторна възпроизводимост (измерване от различни изпълнители на различни спектрофотометри). Първите два елемента зависят от точността на взнатата и мерителните съдове. За оценяване на относителната разширена неопределеност $U\%$ е приложен $\kappa = 2$, което означава, че истинската стойност на резултатите от измерванията е разположена вътре между границите на неопределеността с вероятност 95% :

$$U\% = 2 u_c = 10,0$$

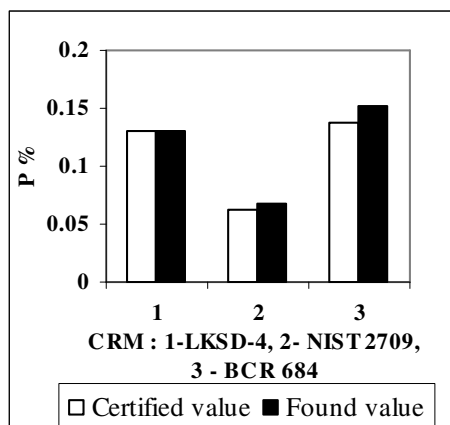
За установяване на ефективността на екстракция на P от почвите и седиментите и определяне на точността на предложения метод са избрани и анализирани три CRM – почва NIST 2709 със сертифицирано съдържание $P = 0,062\%$, речен седимент BCR 684 със сертифицирано съдържание $P = 0,1373\%$ и езерен седимент LKSD – 4 със сертифицирано съдържание $P = 0,1300\%$. Почвеният материал е анализиран с прилагане на двете микровълнови процедури за екстракция на P и са получени много близки резултати ($0,066$ и $0,067\% P$). Разлагането на седиментите е извършено с контрол на температурата на микровълновата система. Тази процедура е универсална, тъй като нагряването на пробите не зависи от броя на пробите, респективно съдовете и техния обем. Сравнението на получените резултати за P със сертифицираните стойности е показано на фиг. 2, от която се вижда, че те са много близки. Средният

аналитичен добив за трите материала е 107 %, а средното относително стандартно отклонение е $RSD = 4,7 \%$.

В заключение може да се потвърди, че предложеният метод за определяне на Р в почви и седименти с микровълново разлагане е ефективен, тъй като се намалява драстично времето за разлагане, полученият екстракт служи за определяне на тежките метали, улеснява се корекцията за влиянието на желязо.

Таблица 2. Бюджет на относителната комбинирана средноквадратична неопределеност $u_c \%$

Елементи на u_c	Стойност %	Формула за изчисление
u_m от претегляне на пробата	0,21	
u_v от разреждане на разтвора	0,138	
u_r от повтораемост	2,5	$u_r = s_r / \sqrt{n}$
u_R от възпроизводимост	2,0	$u_R = s_R / \sqrt{n}$
u_c	5,0	$u_c = \sqrt{(u_m^2 + u_v^2 + u_r^2 + u_R^2)}$



Фиг. 2. Сравнение на сертифицираните стойности и получените резултати за съдържание на Р

ЛИТЕРАТУРА

1. Busman, L., J. Lamb, G. Randall, G. Rehm and M. Schmitt. *The nature of phosphorus in soils*, University of Minnesota Extension Service, FO-6795-GO, 1998.
2. Randall, G., D. Milla, G. Rehm, L. Busman, J. Lamb and M. Schmitt. *Phosphorus transport to a availability in surface waters*, University of Minnesota Extension Service, FO-6796-GO, 1998.
3. Worsfold, P.J., L. J. Gimbert, Utra Mankasingh, O.N. Omaka, G. Hanrahan, P.C.F.C. Gardolinski, P. M. Haygarth, B.L. Turner, M. J. Keith-Roach and I.D. McKelvie. *Talanta*, **66**(2), (2005), pp. 273-293.
4. Pierzynski G.M., Editor. *Methods of phosphorus analysis for soils, sediments, residuals and waters*, Southern Cooperative Series Bulletin No 396, 2000, ISBN: 1-58161-396-2
5. *COST 832 Minutes of the Technical Committee meeting of WG-1*, Gembloux Belgium, 23-24 October 1998, pp.1-25.
6. DIN 38414 *Bestimmung von Phosphor in Schlamm und Sedimenten*.
7. EN 13346 *Characterization of sludges - Determination of trace elements and phosphorus-Aqua regia extraction methods*.
8. ISO 10381 *Soil quality – Sampling*.
9. ISO 11464 *Soil quality – Pretreatment of samples for physico-chemical analysis*.
10. ISO 11465 *Soil quality – Determination of dry matter and water content on a mass basis Gravimetric method*.
11. Hein H., H. Müller and I. Witte. *Water and Environmental Analysis with the UV/VIS Spectrometer Lambda 2*, 2nd ed., Perkin-Elmer GmbH, Überlingen, p. 112.
12. *A guide to the expression of uncertainty in measurement*, ISO, Geneva, 1993.
13. *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, EURACHEM, 1999.

Представена за печат на 09.10.2007 г.