

УДК 546.185:543.062:543.4

ТВЕРДОФАЗНО-СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ І ТЕСТ-ВИЗНАЧЕННЯ МІКРОКІЛЬКОСТЕЙ ФОСФАТУ В МОРСЬКИХ ВОДАХ, МОРСЬКИХ СОЛЯХ ТА СИРОВАТЦІ КРОВІ

О.А. Запорожець, доктор хімічних наук

Л.С. Зінько, кандидат хімічних наук

Г.С. Сумарокова, аспірантка*

Ю.С. Прокапало, студентка магістратури

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Сорбційними та спектроскопічними методами досліджено взаємодію відновленої молібдистибієвофосфатної гетерополікислоти з адсорбованим на поверхні мезопоруватого силікагелю цетилтриметиламонію бромідом (ЦТМАБ-СГ). Показано, що ізотерма сорбції гетерополікислоти із 0,3 М розчину сульфатної кислоти належить до H_2 -типу, а адсорбційна рівновага встановлюється впродовж 2 хв. На цій основі розроблено методики твердофазно-спектроскопічного визначення ортофосфату в морській воді та сироватці крові з межею виявлення відповідно 0,063 і 0,450 мг/л. Запропоновано кольорові шкали для напівкількісного візуального тест-контролю вмісту ортофосфату в цих об'єктах в інтервалі концентрацій відповідно 0,03–0,8 і 0,6–1,9 мг/л.

Вступ. Фосфор відноситься до елементів, концентрація яких у природних водах визначає їх трофічний статус [1], а показники його вмісту в сироватці крові можуть вказувати на наявність певних захворювань [2–6]. Так, порушення метаболізму сполук фосфору в організмі людини викликає гіпофосфатемію [5,6] або хронічну ниркову недостатність [2], що у важких випадках супроводжується кальцифікацією серцевого клапану та серцево-судинними захворюваннями [3,4].

При перевищенні середнього вмісту фосфату (0,11 мг/л) у природних водах спостерігається явище евтрофікації, яке призводить до погіршення якості води та

зменшення вмісту розчиненого у ній кисню, що має негативні наслідки для водної екосистеми [7, 8]. Тому контроль вмісту фосфату в таких об'єктах, як поверхневі води та біологічні рідини, є актуальним завданням екоаналітичної і клінічної хімії.

Найбільш чутливі й експресні проточно-інжекційні [9, 10] та хроматографічні [11] методи кількісного визначення фосфатів в водах є малодоступними для більшості санітарних лабораторій через високу вартість реагентів та обладнання. З діагностичною метою вміст фосфату в сироватці крові [2–6] оцінюють спектрофотометричними [12, 13] та амперометричними [14, 15] методами з використанням фермента-

*Науковий керівник – професор О.А. Запорожець.



тивних реакцій. Основним недоліком їх є відносно висока вартість ферментів, низька стабільність реагентів, та необхідність жорсткого контролю температури.

В останні роки показано, що комбіновані сорбційно-спектроскопічні методи в ряді випадків за чутливістю не поступаються найсучаснішим інструментальним методам [16, 17], але є більш економічними і доступними. Відомо [17–20], що найчастіше для визначення фосфату як аналітичну форму використовують відновлені гетерополікислоти (ГПК). Їхнє сорбційне вилучення та концентрування здійснюють із застосуванням пінополіуретанів [16] або органо-мінеральних іонообмінників на основі модифікованого кремнезему [17]. Останні є більш ефективними з огляду на ліпші кінетичні та стійкісні характеристики, а також відсутність власного поглинання матриці у видимій частині спектру. При поєднанні операцій сорбційного концентрування з детектуванням сигналу безпосередньо у фазі концентрації методами твердофазної спектrophотометрії (ТСФ) та спектроскопії дифузного відбиття (СДВ) вдається значно поліпшити метрологічні характеристики методик [17, 18, 20]. Раніше нами було запропоновано методики сорбційно-спектrophотометричного (МВ= 5,8 мкг/л) і візуального тест-визначення фосфату у прісних водах з використанням адсорбційно модифікованого тетрадециламоній нітратом силікагелю (ТДАН-СГ) [18]. Втім виявилось, що розроблені методики мають обмежене застосування у випадку складних високо-мінералізованих матриць, зокрема морської води [21] та сироватки крові. При ємності сорбенту за ТДАН, що складає 12,5% від ємності, необхідної для утворення мономолекулярного шару, спостерігається суттєва десорбція силікату при контакті з кислим розчином реагенту [18]. Це, в свою чергу, призводить до зростання «фонового» поглинання твер-

дофазного реагенту і відповідного зниження сутливості та відтворюваності методики.

Метою даної роботи була розробка методик сорбційно-спектроскопічного та візуального тест-визначення (ВТ) фосфату у формі відновленої молібдистібієво-фосфатної гетерополікислоти (ГПКred) в об'єктах зі складною неорганічною і органічною матрицями із застосуванням органо-мінерального аніонообмінника на основі адсорбційно модифікованого четвертинною амонійною сіллю (ЧАС) силікагелю з вищою порівняно із ТДАН-СГ ємністю. Як модифікатор було обрано відносно коротколанцюговий ЧАС – цетилтриметиламонію бромід (ЦТМАБ).

Матеріали та методика досліджень. У роботі використовували препарати KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, х.ч.), ЦТМАБ (ч.д.а., $\geq 98\%$), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (ч.д.а.), $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ (ч.д.а.), NaHCO_3 (ч.д.а.), Na_2SO_4 (ч.д.а.), KCl (ч.д.а.), KBr (ч.д.а.), $\text{MgC}_{12} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (ч.д.а.), $\text{CaC}_{12} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (ч.д.а.), NaCl (х.ч.), H_2SO_4 (95–98%, ч.д.а.), бичачий сироватковий альбумін (Sigma-Aldrich, 98%), аскорбінову кислоту (фарм) вітчизняного виробництва. Реактиви та дистильовану воду використовували без додаткової очистки, точну концентрацію H_2SO_4 встановлювали титриметрично [22]. Як розчинники використовували гексан (ч.д.а.) та хлороформ (ч.д.а.), як сорбенти – силікагель Merck 60 ($S=490 \text{ м}^2/\text{г}$, $d=6 \text{ нм}$) та аеросил Силлард П ($S_{\text{пов}}=300 \text{ м}^2/\text{г}$, Калуш, Україна).

Адсорбцію проводили за статичних умов з використанням магнітної мішалки ММ-5. Сорбенти висушували у сушильній шафі (тип 2В-151). Відділення осаду або твердої фази від рідини проводили з використанням центрифуги ОПн-ЗУХЛ4.2. Зважування проводили на електронних аналітичних терезах Kern ABS 80-4. Спектри твердих зразків та розчинів реєстрували за допомогою спектrophотоме-

трів UNICO 2800 UV/VIS та UV-2401PC UV-Vis (Shimadzu). Спектри дифузного відбиття сухих сорбентів реєстрували проти MgO із застосуванням спектрофотометра Specord M40 UV/VIS ("Carl Zeiss Jena", Німеччина).

Стандартний розчин з концентрацією фосфату 0,7021 мг/мл готували розчиненням наважки препарату $\text{KН}_2\text{PO}_4$ в дистильованій воді. Розчини фосфату з меншою концентрацією готували розбавленням стандартного розчину дистильованою водою. Для приготування молібденової суміші до мірної колби ємністю 500,0 мл вносили 4,700 г $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, додавали 100 мл H_2SO_4 (1:1), 0,0250 г $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$, доводили до мітки водою, перемішували та зберігали у поліетиленовому посуді [22]. Змішаний реактив готували безпосередньо перед проведенням експерименту. Для цього до 34 мл молібденової суміші додавали 16 мл розчину аскорбінової кислоти з концентрацією 16 мг/мл.

Отримання аналітичної форми здійснювали у такий спосіб. До мірних колб ємністю 25,0 мл вносили аліквотну частину розчину фосфату так, щоб у кінцевому об'ємі його концентрація становила 0,03–7,6 мг/л, додавали 5,0 мл змішаного реактиву, дистильовану воду до мітки. Розчини перемішували та витримували для розвитку забарвлення впродовж 5 хв [19].

Спектрофотометричний контроль вмісту фосфату в розчині здійснювали за власним світлопоглинанням ГПК_{red}. Градувальна залежність є лінійною в діапазоні концентрацій 0,05–2,8 мг/л (рівняння має вигляд:

$$A_{710} = (-0,002 \pm 0,002) + (0,172 \pm 0,002) \cdot C_{\text{PO}_4},$$

мг/л; $R^2 = 0,999$).

Силікагель SG 60 фірми Merck модифікували ЦТМАБ, як описано в [23]. Ємність сорбенту (ЦТМАБ-СГ) за модифікатором становила $a_{\text{ЦТМАБ}} = 50$ мкмоль/г.

Для дослідження сорбції ГПК_{red} розчини об'ємом 5–50 мл, що містять фосфат та всі необхідні для отримання аналітичної форми реагенти перемішували впродовж 1–15 хв у мірних стаканчиках ємністю 50 мл з наважками ЦТМАБ-СГ масою 0,050–0,125 г. Після седиментації сорбенти відокремлювали від розчинів декантацією, тричі промивали дистильованою водою порціями по 5 мл кожна.

Високу іонну силу в розчинах створювали, додаючи NaCl до розчину, що містить усі компоненти, необхідні для утворення ГПК_{red}. Для дослідження заважаючого впливу макрокомпонентів морської води в розчин додавали катіони у формі хлоридів або нітратів, аніони – у формі натрієвих або калієвих солей. Допустимим вважали такий вміст стороннього іона, при якому зміна аналітичного сигналу не перевищувала 10%.

Ступінь вилучення (Γ , %) відновленої ГПК_{red} сорбентом, ємність сорбенту за адсорбатом (a , моль/г) та коефіцієнт розподілу ГПК_{red} між рідкою та твердою фазами (D , л/г) розраховували за такими формулами:

$$\Gamma = (C - [C]) / C \cdot 100, \quad a = (C - [C]) \cdot V / m,$$

$$D = (\Gamma / (100 - \Gamma)) \cdot V / m,$$

де C та $[C]$ – вихідна та рівноважна концентрації ГПК_{red} у водних розчинах (моль/л), V – об'єм розчину (л), що перебував у контакті з адсорбентом масою m (г).

Для визначення коефіцієнту розподілу ГПК_{red} в системі «водний розчин ГПК_{red} – ЦТМАБ-СГ» готували розчини об'ємом 7,0–100 мл, що містили по 0,10 мкмоль фосфату, та перемішували їх магнітною мішалкою впродовж 15 хв з наважками сорбентів масою 0,050 г. Розчин відокремлювали від сорбенту центрифугуванням впродовж 5 хв при 3000 об/хв. Рівноважну концентрацію ГПК_{red} визначали за градувальним графіком.

Світлопоглинання сорбентів вимірювали в тонкому шарі ($l = 0,1$ см) через 3 хв після заповнення кювети сорбентом. Як зразок



порівняння використовували суспензію немодифікованого силікагелю Merck 60. Аналітичний відгук (ΔA) розраховували за методом гетерохроматичної екстраполяції ($\Delta A = A_{710} - A_{1000}$, де A_{710} та A_{1000} – оптичні густини сорбентів в максимумі спектра поглинання та при 1000 нм). Значення ΔA не змінюється впродовж 8 год.

Для реєстрації спектрів дифузного відбиття використовували попередньо висушені при 40°C впродовж 60 хв зразки сорбентів.

Обрахунок координат кольоровості a та b у системі CIELAB, світлоти ΔL , насиченості кольору ΔS , загальної кольорової відмінності ΔE та відтінку кольору ΔT здійснювали на основі спектрів поглинання оброблених розчинами ГПК_{red} наважок ЦТМАБ-СГ [24].

Приготування кольорової тест-шкали для ВТ розчиненого фосфату в морських водах. До серії розчинів, що містили 0,03–0,8 мг/л фосфату, додавали необхідні реагенти, як описано вище, та витримували 5 хв для встановлення рівноваги реакції утворення ГПК_{red}. Наважки ЦТМАБ-СГ масою 0,125 г перемішували з розчинами ГПК_{red} за оптимальних умов вилучення та відокремлювали від розчинів декантуванням. Спектри поглинання сорбентів з іммобілізованою ГПК_{red} реєстрували у тонкому шарі та обробляли їх у системі CIELAB [24, 25]. Для висушених зразків отриманий з використанням методу СДВ аналітичний відгук був сталим понад два місяці.

Для приготування розчину морської солі зразки солі розтирали у фарфоровій ступці, висушували при 90°C до сталої маси і знову розтирали. Розчини морської солі готували шляхом розчинення розрахованої наважки сухої морської солі у 25,0 мл дистильованої води. У випадку наявності осаду розчин декантували. Для аналізу відбирали аліквотну частину розчину об'ємом 20,0 мл.

Для моделювання білкового складу сироватки

крові використовували сухий препарат альбуміну. Враховуючи 25-кратне розбавлення розчину зразка при пробопідготовці та середній вміст білків сироватки крові [26], у модельному розчині створювали концентрацію альбуміну 11,0 г/л. Модельний розчин готували на основі фізіологічного розчину Рінгера-Локка [27]. Концентрації металів у модельному розчині становили 0,11 ммоль/л ($MgCl_2$), 2,2 мкмоль/л ($CuSO_4$), 2,8 мкмоль/л ($FeCl_3$).

Приготування кольорової тест-шкали для ВТ визначення розчиненого фосфату у модельних зразках сироватки крові. Для приготування зразків кольорової тест-шкали готували серію розчинів об'ємом 25,0 мл, що містять 11,0 г/л альбуміну та 0,4–3,0 мг/л фосфату. Відокремлення білку здійснювали обробкою сульфосаліциловою кислотою згідно [28] з наступним перемішуванням отриманого центрифугату з аеросилом марки Силлард П впродовж 5 хв. Осад відокремлювали центрифугуванням впродовж 5 хв при 3000 об/хв. Аліквоту отриманого розчину об'ємом 10,00 мл переносили до мірної колби ємністю 25,0 мл, додавали необхідні реагенти, як описано вище, та витримували 5 хв для встановлення рівноваги реакції утворення ГПК_{red}. Наважки ЦТМАБ-СГ масою 0,125 г перемішували з розчинами ГПК_{red} за оптимальних умов вилучення та відокремлювали від розчинів декантуванням. Спектри поглинання отриманих зразків обробляли в системі CIELAB [24].

Результати дослідження та їх обговорення. Для сорбційно-спектроскопічного визначення ортофосфат-іонів у досліджуваних об'єктах як аналітичну форму обрано відновлену змішану молібдотибієвофосфатну гетерополікислоту $H_6PSbMo_{11}O_{40}$ [20] з огляду на відносно високу швидкість її утворення за кімнатної температури [29] та більшу гідрофобність, що згідно [20] сприяє її ефективнішому вилученню модифікованим ЧАС силікагелем. Відновлену

молібдистибієвофосфатну гетерополікислоту отримували в розчині за раніше встановлених оптимальних умов [18].

З метою запобігання руйнуванню матриці модифікованого сорбенту в кислому середовищі та для більш щільного екранування поверхні силікагелю як модифікатор було обрано цетилтриметиламоній бромід, алкільні ланцюги в молекулі якого є коротшими, порівняно із ланцюгами в молекулі ТДАН. Ємність сорбенту за модифікатором становила 50 мкмоль/г, що у 2 рази більше порівняно із ємністю за модифікатором для раніше розробленого ТДАН-СГ.

З рис.1 видно, що за оптимальних умов утворення ГПК_{red} у розчині сорбційна рівновага в системі, як і у випадку використання ТДАН-СГ [18], встановлюється досить швидко. Надалі сорбцію ГПК_{red} з водного розчину ЦТМАБ-СГ проводили впродовж 5 хв. Ізотерма адсорбції ГПК_{red} на ЦТМАБ-СГ (рис. 2) має Н2-форму [30] і в інтервалі концентрацій 21–67 мкмоль/л формально лінеаризується у координатах Ленгмюра з

коефіцієнтом кореляції 0,998 та максимальною ємністю за ГПК_{red} 7,4 мкмоль/г. Значення константи сорбції ($K=5 \cdot 10^4$ л/моль) майже у 20 разів нижче аналогічної константи для ТДАН-СГ ($K=93 \cdot 10^4$ л/моль [18]), що вказує на суттєво меншу спорідненість ГПК_{red} до поверхні ЦТМАБ-СГ. На рис. 3 видно, що спектр поглинання іммобілізованої ГПК_{red} на ЦТМАБ-СГ співпадає з її спектром у розчині (смуги поглинання при 710 та 880 нм). Відсутність гіпсохромного зсуву максимуму в спектрі іммобілізованої ГПК, який у випадку ТДАН-СГ був обумовлений поляризацією її хромофорної системи під дією полярних груп кремнеземної матриці [18], може вказувати на відмінність природи взаємодії на межі розділу «розчин ГПК_{red} – модифікований силікагель» у випадку застосування ЦТМАБ і ТДАН. Враховуючи ці факти, а також суттєву (близько 50%) десорбцію ЦТМАБ з поверхні сорбенту за оптимальної кислотності, можна припустити, що ГПК вилучається у формі іонного асоціату (ЦТМАБ⁺)₃ГПК_{red}³⁻, який утворюється у

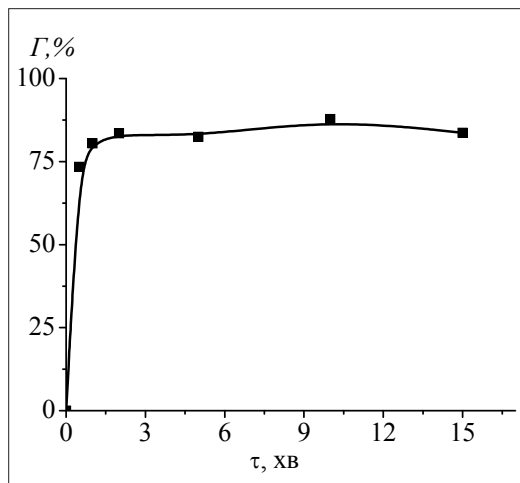


Рис. 1. Сорбція ГПК_{red} на ЦТМАБ-СГ залежно від часу перемішування суспензії.

$C(PO_4^{3-})=0,65$ мг/л, $[H^+]/[Mo]=68$, $C(Mo(VI))=7,2$ ммоль/л, $C_{ACK}=5,9$ ммоль/л, $C_{sb}=20,4$ мкмоль/л, $V/m=267$ мл/г, $a_{ЦТМАБ}=50$ мкмоль/г, $\lambda=710$ нм, $l=1,0$ см

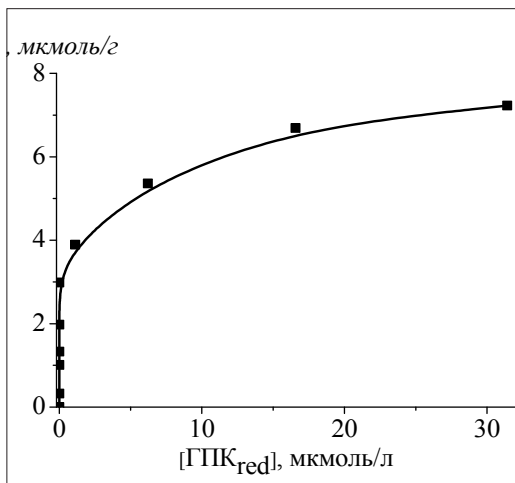


Рис. 2. Ізотерма сорбції ГПК_{red} на ЦТМАБ-СГ.

$[H^+]/[Mo]=68$, $C(Mo(VI))=7,2$ ммоль/л, $C_{ACK}=5,9$ ммоль/л, $C_{sb}=70$ мкмоль/л, $V/m=200$ мл/г, $a_{ЦТМАБ}=50$ мкмоль/г, $T=291 \pm 1^\circ K$

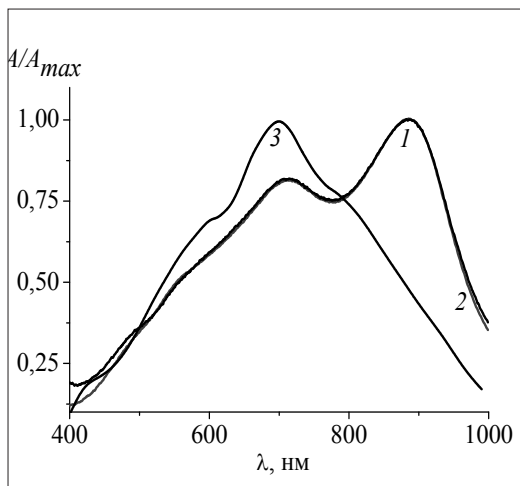


Рис. 3. Нормовані спектри поглинання відновленої ГПК_{red} у водному розчині (1), іммобілізованої на ЦТМАБ-СГ (2) та ТДАН-СГ (3). $C(PO_4^{3-})=0,38$ мг/г, $[H^+]/[Mo]=68$, $C(Mo(VI))=7,2$ ммоль/л, $C_{ACK}=5,9$ ммоль/л, $C_{sb}=20,4$ мкмоль/л, $a_{TDAN}=25$ мкмоль/г, $a_{CTMAБ}=50$ мкмоль/г, l , см: 1,0 (1), 0,1(2,3) см

розчині при з десорбованим ЧАС. При такому механізмі сорбції варто сподіватись на менший вплив іонної сили порівняно із іонообмінною сорбцією. Крім цього, за таких умов не спостерігається вимивання силікату з поверхні модифікованого сорбенту, що підтверджується відсутністю забарвлення ЦТМАБ-СГ після його перемішування з кислим розчином молібдату.

Збільшення концентрації фосфату у розчині супроводжується зростанням світлопоглинання сорбентів з іммобілізованою ГПК_{red}, що покладено в основу розробки методик твердофазно-спектрометричного та візуального тест-визначення фосфату. Результати дослідження ступеня вилучення ГПК_{red} залежно від співвідношення об'єму розчину аналіту до маси наважки сорбенту наведено на рис. 4. Видно, що величина сорбції не зменшується до $V/m=650$ мл/г. Як і у випадку ТДАН-СГ [18, 20], максимальний коефіцієнт розподілу аналіту за цих умов дорівнює 31,9 л/г.

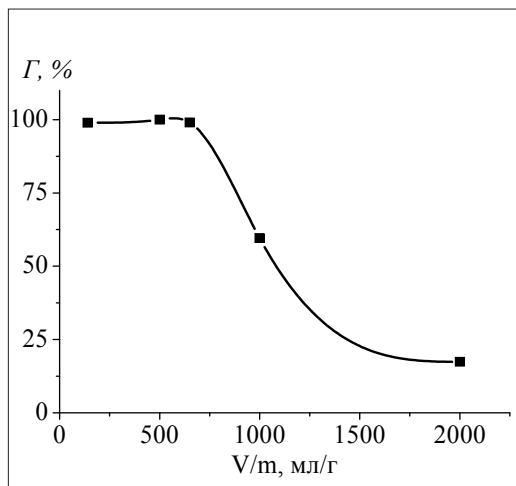


Рис. 4. Ступінь вилучення ГПК_{red} з водного розчину на ЧАС-СГ залежно від співвідношення V/m .

$v_{GPKred}=0,10$ мкмоль, $[H^+]/[Mo]=68$, $C(Mo(VI))=7,2$ ммоль/л, $C_{ACK}=5,9$ ммоль/л, $C_{sb}=20,4$ мкмоль/л, $a_{CTMAБ}=50$ мкмоль/г, $T=289\pm 1^\circ K$

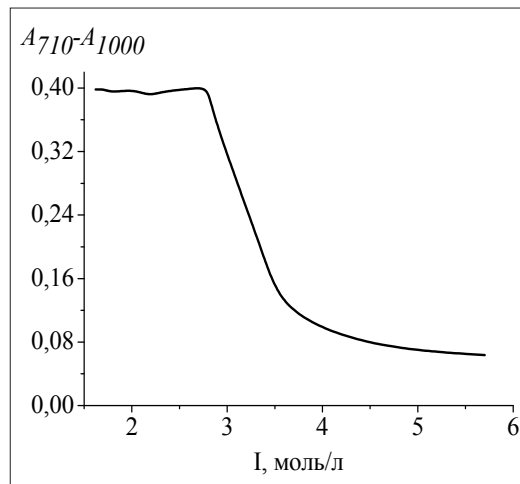


Рис. 5. Світлопоглинання оброблених розчинами ГПК_{red} сорбентів залежно від іонної сили розчину. $C(PO_4^{3-})=0,78$ мг/л, $[H^+]/[Mo]=68$, $C(Mo(VI))=7,2$ ммоль/л, $C_{ACK}=5,9$ ммоль/л, $C_{sb}=20,4$ мкмоль/л, $a_{CTMAБ}=50$ мкмоль/г, $V/m=200$ мл/г, $l=0,1$ см

Заважаючий вплив макро- та мікрокомпонентів морських вод. Відомо, що середнє значення іонної сили у морських водах із солоністю 35‰ дорівнює 0,71 моль/л

Таблиця 1. Вплив сторонніх іонів на результати визначення 0,76 мг/л ортофосфату ТСФ методом

| Іон | Концентрація у морській воді, г/л [31] | Допустимий вміст іону, С _г /л |
|--------------------------------|--|--|
| Na ⁺ | 10,3 | 64,4 |
| K ⁺ | 0,4 | 0,78 |
| Ca ²⁺ | 0,4 | 0,8 |
| Mg ²⁺ | 1,3 | 0,48 |
| Cl ⁻ | 17,5 | 99,4 |
| HCO ₃ ⁻ | 0,14 | 0,61 |
| SO ₄ ²⁻ | 2,8 | 1,92 |
| Br ⁻ | 0,07 | 0,07 |
| F ⁻ | 0,001 | 0,008 |
| H ₃ BO ₃ | 0,027 | 1,98 |

[31]. З рис. 5 видно, що за іонної сили < 2,8 моль/л похибка ТСФ визначення фосфату не перевищує 10%. Подальше збільшення вмісту електролітів в розчині супроводжується різким зменшенням аналітичного відгуку, що обумовлено зменшенням ступеня перетворення в розчині ортофосфату в ГПК_{ред} і ГПК_{ред} – в іонний асоціат. Враховуючи те, що значення іонної сили в розчині, який містить аліквоту морської води та усі реактиви, необхідні для утворення ГПК_{ред}, становить 2,3 моль/л, ТСФ методика може бути запропонована для визначення фосфату у водах з високим сольовим фоном.

Відомо [18], що визначенню 0,38 мг/л фосфату не заважають (мг/л): NO₂⁻ (≤0,2), I⁻ (≤3,8), K⁺ (≤780), Mg²⁺ (≤480), Ca²⁺ (≤800), NH₄⁺ (≤18), Co²⁺ (≤0,06), Cu²⁺ (≤0,64), Mn²⁺ (≤0,55), Fe³⁺ (≤17), SO₄²⁻ (≤1920) та NO₃⁻ (≤1240), HCO₃²⁻ (≤610), As(V) (≤1,5), Si(IV) (≤28) (у присутності 0,1 моль/л тартрату). Дослідження впливу сполук кремнію, броміду, а також бору та флуориду, що містяться у морській воді, показало, що визначенню 0,76 мг/л фосфату не заважають ≤72 мг/л броміду, ≤14 мг/л силіцію, а також ≤1980 мг/л H₃BO₃ та ≤7,6 мг/л флуориду. Отримані результати (табл. 1) свідчать про придатність ТСФ методики для визначення фосфату в морській воді.

Таблиця 2. Параметри ГГ (AB=(a±Δa)+(b±Δb)·C, мг/л) для визначення ортофосфату ТСФ та СДВ методами. AB(ТСФ)=A₇₁₀-A₁₀₀₀-ΔA_{хол}, AB(СДВ)=A₇₁₁-A_{хол}, l=0,1 см. n=6, P=0,95. Для зразків сироватки крові С(альбумін)=11 г/л

| Зразок | Метод детектування | (a±Δa) | b±Δb | R ² | Діапазон ГГ, мг/л | МВ, мг/л |
|-----------------|--------------------|--------------|-----------|----------------|-------------------|----------|
| Морські води | ТСФ | 0,01±0,01 | 0,48±0,02 | 0,988 | 0,03-0,8 | 0,063 |
| | СДВ | -0,001±0,008 | 0,61±0,02 | 0,996 | 0,03-0,8 | 0,039 |
| Сироватка крові | ТСФ | -0,05±0,03 | 0,20±0,02 | 0,962 | 0,8-3,0 | 0,450 |
| | СДВ | -0,01±0,03 | 0,25±0,02 | 0,974 | 0,4-3,0 | 0,360 |

Для побудови градувального графіка (ГГ) для визначення фосфату в зразках солоних вод використовували розчини, що містять фосфату, змішаний реактив та дистильовану воду. За оптимальних умов ГГ для ТСФ та СДВ детектування є лінійними у діапазоні 0,03–0,8 мг/л фосфату. Метрологічні характеристики методик та розраховані за 3 σ -критерієм межі виявлення (МВ) наведено в табл. 2. Видно, що при пробопідготовці розбавлення морської води не повинно перевищувати 1,5 рази [21].

Візуальне тест-визначення розчиненого фосфату в модельній морській воді. З метою визначення кроку кольорової тест-шкали використовували отримані з використання методу ТСФ спектри серії сорбентів з іммобілізованою ГПК_{red} [24, 25]. Як крок шкали обирали такі концентрації фосфату, для яких загальна кольорова відмінність (ΔE) дорівнювала 10 одиниць [25], а саме: 0,03; 0,24; 0,35; 0,52; 0,78 мг/л.

Придатність розробленої кольорової тест-шкали для визначення фосфату в морських водах перевіряли методом «введено-знайдено» із застосуванням зразків штучної морської води [31]. Оскільки середній вміст фосфату в морських водах коливається в межах 0,09–0,28 мг/л [32], готували зразки з концентраціями фосфату 0,10 та 0,38 мг/л та проводили їх кризь усі етапи аналізу. Результати візуального тест-визначення фосфату у зразках штучної морської води, отримані із залученням 5 незалежних експертів, становили 0,14 і 0,35 мг/л у першій і другій пробах відповідно. Отже, розроблена кольорова шкала є придатною для напівкількісного візуального тест-контролю фосфату у водах з високим сольовим фоном, зокрема акваріумних вод. Розроблений тест-метод майже вдвічі чутливіший (0,03 мг/л) за комерційно доступні вітчизняні аналоги ТМ «Ptero», (Україна, Луцьк) та ТМ «AQUAYER» (Україна, Харків), і не посту-

Таблиця 3. Результати оцінки правильності ТСФ методики визначення ортофосфату з ТСФ та СДВ* детектуванням на зразках морської солі, модельних розчинах сироватки крові та зразку сироватки бичачої крові в умовах збіжності (I) (n=3) та проміжної прецизійності (II) (n=8), P=0,95

| Зразок (торгова марка) | Вміст ортофосфату, мг/л чи мкг/г** | | |
|---|------------------------------------|-------------------|------|
| | Введено | Знайдено | sg |
| Натуральна сіль для ванн «Наталі-ефект» (Гармонія) | – | < 1,7 (I)** | 0,31 |
| Натуральна сіль для ванн з Чорного моря (Lucky Day) | – | 3 \pm 1 (I)** | 0,18 |
| Сіль морська натуральна харчова, помел 0 (Премія) | – | 2 \pm 1 (I)** | 0,27 |
| | – | 2 \pm 2 (I)* | 0,45 |
| Модельний розчин сироватки | 0,37 | 0,29 \pm 0,04 | 0,05 |
| | 0,8 | 0,8 \pm 0,2 | 0,09 |
| | 1,1 | 1,3 \pm 0,5 | 0,13 |
| | 1,9 | 1,8 \pm 0,4 | 0,07 |
| Сироватка бичачої крові | – | 209 \pm 28 (I) | 0,05 |
| | – | 199 \pm 28 (II) | 0,16 |
| | – | 190 \pm 47 (I)* | 0,09 |

Наважка солі m=0,8926 \pm 0,0005 г. Вміст компонентів у модельному розчині сироватки: 11,0 г/л (альбумін), 0,11 мМ (Mg), 2,2 мкМ (Cu(II)), 2,8 мкМ (Fe(III))

пається за чутливістю тест-наборам іноземного виробництва ТМ «NYOSAquatics» (Німеччина) і ТМ «Red Sea» (Ізраїль). Вартість аналізу з використанням розробленої тест-системи є нижчою, щонайменше у два рази.

Визначення розчиненого фосфату у морській солі. Для аналізу було обрано продажні препарати морської солі різних торгових марок (табл. 3). Жодний з виробників не надав відомостей щодо вмісту мікроелементів у продукції. Водночас відомо [31], що співвідношення концентрацій неорганічних солей в морській воді є відносно сталим. Вміст хлоридів у фільтрованій океанічній воді складає 19,37‰, що відповідає солоності 35,00‰ [33]. При цьому масова частка хлоридів у сухій морській солі становить 55,5%. Наважку солі відбирали таким чином, щоб концентрація хлоридів в отриманому розчині відповідала хлорності морської води [33]. Враховуючи усі дані, розраховували необхідну наважку висушеної морської солі та отримували аналітичну форму згідно розробленої процедури.

Результати визначення фосфату наведено у табл. 3. Видно, що для морської солі марки «Наталі-ефект» вміст фосфату знаходився нижче межі виявлення розробленої методики. Оцінку метрологічних характеристик методики визначенні

фосфату в морських солях здійснювали на прикладі зразків солі марки «Премія» за умов реєстрації аналітичного відгуку ТСФ та СДВ методами. Результати оцінки випадкової похибки методики за умов збіжності (табл. 3) свідчать про те, що на відміну від методу СДВ, відтворюваність ТСФ методики не перевищує 30%. Отже, ця методика може бути запропонована для напівкількісної оцінки вмісту ортофосфату в морській солі.

Співставлення ТСФ методики із відомими за чутливістю та селективністю (табл. 4) показує, що запропонована методика є дещо менш чутливою, проте більш селективною щодо багатьох металів і неметалів, зокрема силікату, що є особливо важливим при аналізі поверхневих вод. Отримані результати свідчать про придатність розробленої ТСФ методики для визначення фосфату на рівні його середнього вмісту в морській воді [32], а також у водах, які можуть бути забруднені сполуками фосфору.

Визначення фосфату в сироватці крові. Пряме визначення фосфату в присутності білку на рівні, що відповідає його вмісту у сироватці крові, є неможливим через значний заважаючий вплив білку. При застосуванні сульфосаліцилової кислоти [38] не досягається повного відділення білку [39]. Для відокремлення його залишків вико-

Таблиця 4. Співставлення деяких метрологічних характеристик розробленої ТСФ та відомих СФ методик визначення ортофосфату в морських водах

| Методика | МВ, мкг/л | Заважають визначенню, мкг/л | | | | | Література |
|--------------------------|-----------|-----------------------------|---------|-----------------------|--------|--------|-------------|
| | | Cu(II) | Fe(III) | As(V) | Si(IV) | V(V) | |
| СФ | 5,2 | >0,012 | >0,016 | >1,7·10 ⁻³ | >0,013 | >0,015 | [34] |
| СФ-ПІА | 10,4 | – | – | – | >0,024 | – | [35] |
| | 4,9 | – | – | – | >0,004 | – | [36] |
| ТСФ | 63 | >1,6 | >5,4 | >1500 | >17,9 | – | Дана робота |
| ГДК у питній воді (ВООЗ) | – | 0,49 | 0,096 | 0,017 | – | – | [37] |

Примітка – «–» не вказано.



ристовували додаткову обробку аеросилом марки Силлард П центрифугату, отриманого після додавання сульфосаліцилової кислоти. Градувальну залежність будували на зразках, що моделювали білковий склад сироватки крові. Такі розчини, а також зразки бичачої сироватки крові, послідовно оброблені сульфосаліциловою кислотою та аеросилом, центрифугували при 3000 об/хв впродовж 7 та 5 хв відповідно. Світлопоглинання та СДВ твердих зразків реєстрували, як вказано вище.

У табл. 2 наведено параметри ГГ для визначення фосфату в сироватці крові, а також розраховані за 3 σ -критерієм межі виявлення. Робочий діапазон визначування за кольоровою тест-шкалою концентрацій фосфату дорівнює 0,6–1,9 мг/л.

Для оцінки правильності розроблених ТСФ методики визначення фосфату у модельних розчинах сироватки крові було використано метод «введено-знайдено» (див. табл. 3). Як видно з даних таблиці ТСФ методика характеризується задовільною ($\pm 10\%$) відтворюваністю та достатньою для визначення фосфату у сироватці крові людини (середній вміст становить 114 мг/л [25]) чутливістю.

Розроблені ТСФ та СДВ методики також було використано для визначення фосфату в зразку сироватки бичачої крові. З метою зменшення стороннього впливу компонентів складної матриці зразок попередньо розбавляли у 125 разів. Концентрацію фосфату в сироватці крові знаходили за ГГ. Отримані результати не суперечать даним літератури щодо середнього вмісту фосфату у сироватці бичачої крові (0,17–0,25 г/л [39]). Отже, розроблені ТСФ та СДВ методики є придатни-

ми для надійного контролю вмісту фосфату у сироватці крові на рівні нижче та вище норми.

Співставлення розроблених ТСФ та ВТ методик із відомими спектрофотометричними та атомно-емісійними аналогами за основними метрологічними характеристиками свідчить, що запропонована ТСФ методика є в 2 рази чутливішою, порівняно із спектрофотометричною методикою, що базується на детектуванні «жовтої» молібдофосфатної ГПК [40], і у 10 разів чутливішою порівняно із атомно-емісійною [41]. При цьому середній час елементовизначення з урахуванням етапу пробопідготовки за запропонованою методикою не перевищує 25 хв, що майже в 7 разів менше, ніж при використанні АЕС методики [41]. Додатковими перевагами розроблених методик є простота виконання і відсутність потреби у високовартісному обладнанні та висококваліфікованому персоналі, що робить її використання економічно вигідним.

Висновки

Завдяки заміні довголанцюгової ТДАН на коротколанцюгову ЦТМАБ підвищується вибірковість сорбційно-спектроскопічної методики визначення фосфату в формі відновленої молібдосибієвофосфатної кислоти. Більшість катіонів та аніонів, присутніх у морських водах та високий сольовий фон не заважають визначенню.

Запропоновано кольорові тест-шкали для напівкількісної оцінки вмісту фосфату в морських водах та сироватці крові. Розроблені методики успішно апробовано при визначенні фосфату в штучній морській воді, морських солях та зразках сироватки крові.

Література

1. Schindler D.W. Hecky, R.E., Findlay, D.L., Stainton, M.P., Parker, B.R., Paterson, M.J., Beaty, K.G., Lyng, M., Kasian. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2008, 105(32), 11254–8.
2. Moe S T. Drüeke, J. Cunningham, W. Goodman, K. Martin, K. Olgaard, S. Ott, S. Sprague, N. Lameire, G. Eknoyan. Kidney Int. 2006, 69(1), 1945–53.

3. Hruska K., Suresh Mathew, Richard Lund, Yifu Fang, Toshifumi Sugatani. *Kidney Int Suppl.* 2011, 79(121). s9-s13.
4. Maher E.R., G. Young, Bernadette Smyth-Walsh, Sara Pugh, J.R. Curtis. *Lancet.* 1987, 330(8564), 875-877.
5. James P. Knochel. *Arch. Intern. Med.* 1977, 137, 203-220.
6. Thomas R. Gravelyn, Nathalie Brophy, Christine Siegert, Marc Peters-Golden. *Am. J. Med.* 1988, 84(5), 870-876.
7. Organization for Economic Cooperative Development (OECD). *Eutrophication of Water: Monitoring, Assessment and Control.* Organization for Economic Cooperative Development, Paris, 1982.
8. James V. Ward, Jack A. Stanford. *The ecology of regulated streams.* Plenum Press: New York, London, 1979, p. 398.
9. Protocols for the Joint Global Ocean Study (JGOFS) Core Measurements. IOC, Manual and guides, №29. UNESCO, 1994. – 83 p.
10. Amanda J. Lyddy-Meaney, Peter S Ellis, Paul J Worsfold, Edward C.V Butler, Ian D McKelvie. *Talanta.* 2002, 58, 1043-1053.
11. Oliver J. Lechtenfeld, Boris P. Koch, Walter Geibert, Kai-Uwe Ludwichowski, and Gerhard Kattner. *Anal. Chem.* 2011, 83, 8968-8974.
12. G. Berti, P. Fossati, G. Tarengi, C. Musitelli, G. V. Melzi d'Eril. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1988, 26, 399-404.
13. M Tedokon, K Suzuki, Y Kayamori, S Fujita, Y Katayama. *Clin. Chem.* 1992, 3(4), 512-515.
14. Hideaki Kinoshita, Daisuke Yoshida, Koujiro Mikib, Tosiaki Usui, Tokuji Ikeda. *Anal. Chim. Acta.* 1995, 303, 301-307.
15. Md. Aminur Rahman, Deog-Su Park, Seung-Cheol Chang, Calum J. McNeil, Yoon-Bo Shim. *Biosens. Bioelectron.* 2006, 21, 1116-1124.
16. T.V. Starova, A.B. Vishnikin, L.P. Tsyganiuk. *МОРНА*, 2007, 2(2), pp. 162-168 (in Russ.).
17. O.A. Zaporozhets, Julia P. Bas, Igor A. Kachan, Lionel S. Zinko, Valentyn I. Davydov. *Talanta.* 2012, 90, 85-90.
18. O. A. Zaporozhets, L. S. Zin'ko, and I. A. Kachan. *J. Anal. Chem.*, 2007, 62(12), 1146-1150.
19. Anders Sjösten, Sven Blomqvist. *Water Resour.* 1997, 31(7), 1818-1823.
20. Olga A. Zaporozhets, Igor A. Kachan, Lionel S. Zinko, Julia P. Bas, Valentyn I. Davydov. *Adsorpt. Sci. Technol.* 2011, 29(3), 319-330.
21. Wu, J., Sunda W., Boyle E. A., Karl, D. M. *Science.* 2000, 289(5480), 759-62.
22. Коростелев П.П. Приготовление растворов для химико-аналитических работ. М.: Издательство академии наук СССР, 1962. с. 311.
23. A.S.Paustovska, L.S. Zinko, O.A.Zaporozhets, V.V.Nakonechna, O.S.Pogrebnyak. *МОА*, 2015, 10(2), 53-60 (in Ukr.).
24. Wyzecki G. *Opt. Soc. Am.* 1974, 64, 896-897.
25. Бабко А. К., Пилипенко А. Т. Фотометрический анализ. Общие сведения и аппаратура. М.: Химия, 1968. с. 388.
26. Клиническая оценка лабораторных тестов. Пер. с англ. / Под ред. Н. У. Тица. Москва: Медицина, 1986. с. 480.
27. Wilbert M. Boek, Nesil Keleş, Kees Graamans, Egbert H. Huizing. *The Laryngoscope.* 1999, 109, 396-399.
28. B. Barutçuoğlu, Z. Parildar, I. Mutaf, S. Habif, O. Bayindir. *Clin. Lab. Haematol.* 2003, 25, 271-274.
29. Anders Sjösten, Sven Blomqvist. *Water Resour.* 1997, 31(7), 1818-1823.
30. Giles C.H., MacEvan T.H., Nakhwa S.N., Smith D. J. *Chem. Soc.* 1960, 10, 3973-3993.
31. Kester, Dana R., Iver W. Duedall, Donald N. Connors, Richardo M. Pytkowcz. *Limnol Oceanogr.* 1967, 12(1), 176-179.
32. Senjie Lin, Richard Wayne Litaker, William G. Sunda. *J. Phycol.* 2016, 52(1), 10-36.
33. N. P. Fofonoff. *J. Geophys. Res.* 1985, 90(C2), 3332-3342.
34. J. Murphy, J. P. Riley. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.* 1958, 37, 9-14.
35. Y. Udnan, I.D. McKelvie, M.R. Grace, J. Jakmunee, K. Grudpan. *Talanta.* 2005, 66, 461-466.
36. François-Eric Legiret, Vincent J. Sieben, E. Malcolm S. Woodward, Samer K. Abi Kaed Bey, Matthew C. Mowlem, Douglas P. Connelly, Eric P. Achterberg. *Talanta.* 2013, 116, 382-387.
37. В.А. Копілевич, Л.В. Войтенко, С.Д. Мельничук, М.Д. Мельничук. *Хімія навколишнього середовища.* Київ: Фенікс, 2004. с. 408.



38. Richard W. Hubbard, Jeffery G. Chambers, Albert Sanchez, Robert Slocum, Patrick Lee. J. Chromatogr. 1988, 431, 163-169.
39. Lyle D. Miller, Charles O. Thoen, Kenneth J. Throlson, Elmer M. Himes, Ronald L. Morgan. J. Vet. Diagn. Invest. 1989, 1, 219-222.
40. M. A. Muñoz, M Balón, C Fernandez. Clin. Chem. 1983, 29(2), 372-374.
41. E. V. Polyakova, O. V. Shuvaeva. J. Anal. Chem. 2005, 60(10), 937-941.

SUMMARY

O. Zaporozhets, L. Zinko, G. Sumarokova, Ju. Prokhalo. Trace analysis of phosphate content in marine waters, sea salts, serum using solid-phase spectrophotometry and visual test technique// Biological Resources and Nature Managment. – 2016. – 8, №1–2. – P.144–55.

The interaction between reduced molybdo-antimonophosphoric heteropoly acid and cetyltrimethylammonium bromide adsorbed on to mesoporous silica (CTAB-SG) was studied using adsorption and spectroscopic techniques. It is shown that the adsorption of the heteropoly acid from 0,3 M sulfuric acid solution gives the isotherm of H2-type, the sorption equilibrium is reached in 2 min. Taking this into account, the methods for orthophosphate determination in marine waters and serum were developed. The limits of detection were 0,063 and 0,450 mg/L respectively. Color scales for semiquantitative visual test determination of orthophosphate in the range of 0,03-0,8 and 0,6-1,9 mg/L were proposed too.

АННОТАЦІЯ

Запорожець О.А., Зінко Л.С., Сумарокова Г.С., Прокапало Ю.С. Твердофазно-спектрофотометрическое и тест-определение микроколичеств фосфата в морских водах, морских солях и сыворотке крови //Биоресурсы и природопользование. – 2016. – 8, №1–2. – С.44–55.

Сорбционными и спектроскопическими методами исследовано взаимодействие восстановленной молибдодистибиевофосфатной гетерополиокислоты с адсорбированным на поверхности мезопористого силикагеля цетилтриметиламмония бромидом (ЦТМАБ-СГ). Показано, что изотерма сорбции гетерополиокислоты из 0,3 М раствора серной кислоты относится к H2-форме, а адсорбционное равновесие устанавливается на протяжении 2 мин. На этом основании разработаны методики твердофазно-спектрофотометрического определения ортофосфата в морской воде и сыворотке крови с пределами обнаружения соответственно 0,063 и 0,450 мг/л. Предложены цветные шкалы для полуколичественного визуального тест-контроля содержания ортофосфата в этих объектах в интервале концентраций соответственно 0,03–0,8 и 0,6–1,9 мг/л.