

海洋环境中痕量活性磷分析技术的研究进展

袁东星* 梁 英

(厦门大学环境科学研究中心, 近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门, 361005)

摘 要 活性磷(正磷酸盐)是海洋浮游植物生长所必需的物质基础,在某些海域,它甚至成为初级生产力的限制因素。痕量活性磷分析是探索海洋,特别是寡营养海区生物地球化学过程的关键。本文综述了近年来海洋环境中痕量活性磷的分析技术。
关键词 活性磷,痕量分析,海洋。

活性磷(正磷酸盐)是海洋浮游植物生长所必需的物质基础,磷的生物可利用性直接影响全球的初级生产力水平。在某些海域,它甚至成为初级生产力的限制因素^[1-3]。磷在特定的海洋环境中还可能限制固氮作用,进而间接地影响海洋氮的收支^[4]。随着对磷的生物地球化学循环研究的深入,磷的分析测定方法成为海洋环境科学研究中的关键。磷钼蓝(PMB)分光光度法是海水中活性磷的经典测定方法^[5-6],检测限为 $324\text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[6]。而在一些寡营养盐海域,例如在中国南海、地中海、北太平洋和北大西洋等地,海洋浮游生物光合作用消耗大量无机磷酸盐,因此,海洋表层的活性磷浓度极低,通常在 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水平^[7-10],大西洋表层甚至低于 $1\text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[11],远远低于该方法的检测限。尽管海洋上层活性磷的浓度极低,但其动力学特征相当显著,是了解海洋,特别是寡营养海区生物地球化学过程所必须掌握的。磷及其它营养盐数据的匮乏,使海洋研究中其它数据的综合分析缺乏基础,困难重重。造成这种数据匮乏进而影响整个磷循环研究的主要原因,在于准确测定低浓度活性磷的技术限制。

近年来,国内外很多学者都致力于探索更灵敏的测定方法,这些方法主要通过富集磷钼蓝或磷酸根离子来改善方法的灵敏度,包括在经典磷钼蓝分光光度法测定基础上改进的方法、液液萃取法、固相萃取法、 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 共沉淀(MAGIC)法、长光程流通池法和鲁米诺化学发光法等。本文针对这些方法做一综述。

1 基于经典测定方法的改进法

活性磷经典的测定方法是磷钼蓝分光光度法,该方法 1962年由 Murphy和 Riley^[5]建立,反应如下:

$$\text{PO}_4^{3-} + 12\text{ MoO}_4^{2-} + 27\text{ H}^+ \longrightarrow \text{H}_3\text{PO}_4(\text{MoO}_3)_{12} + 12\text{ H}_2\text{O} \tag{1}$$
$$\text{H}_3\text{PO}_4(\text{MoO}_3)_{12} + \text{还原剂} \longrightarrow \text{PMB} \tag{2}$$

这个方法已经成为国内外测定海水中活性磷的标准测定方法。近年来改进方法相继出现。

1.1 还原剂的选择

选择合适的还原剂可适当提高测定速度和灵敏度。还原剂有二氯亚锡、1-氨基-2-萘酚-4-磺酸、亚硫酸钠、硫酸胍和抗坏血酸^[12]。研究表明,以酒石酸锑钾作为催化剂,抗坏血酸为还原剂时,磷钼蓝测定受硅的干扰少,且不受盐度的影响,磷钼蓝稳定时间长。目前采用的还原剂多为抗坏血酸。以抗坏血酸作为还原剂,用 5cm 比色池在 880nm 处测定时,检测限为 $324\text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[16]。

1.2 反应条件的进一步优化

选择优化的条件^[13]包括酸度, $[\text{H}]/[\text{Mo}]$ 比值等。当 pH 值介于 0.57—0.88 之间, $[\text{H}]/[\text{Mo}]$ 比值为 70 时,磷钼蓝的形成速率最快,显色稳定。

1.3 分析的自动化

早期活性磷的测定均为离线测定,自从 20 世纪 80 年代流动注射分析技术快速发展以后,实现了海水中活性磷的在线测定。典型的报道来自 Johnson^[14]和 Worsfold^[15],检测范围在 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 级别。

* 通讯联系人。E-mail: yuands@xmu.edu.cn

类似的方法为商品化仪器所融合, 例如 Autoanalyzer3型营养盐自动分析仪, 成为德国 Bran+ Luebbe 公司的畅销产品.

上述方法在原理上并没有脱离磷钼蓝的直接检测, 因而对灵敏度无太大的改善, 仍然不能满足痕量分析的需要. 诚然, 商品化的专用仪器在模块集成、流路设计和检测器自身的信噪比等方面, 可以做到最优.

2 液液萃取法

可采用有机溶剂萃取磷钼蓝^[16]以达到富集的目的. 萃取溶剂主要有戊醇、苯、丁醇、丁二醇、正己醇、氯仿和醋酸丁酯等^[12]. 其中用正己醇萃取磷钼蓝的方法, 已被列入海洋监测规范^[6], 该方法的测定下限为 $68\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 检测限为 $45\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$.

这种方法在 20 世纪 80 年代之前一度成为热点. 但鉴于液液萃取自身的缺点, 如需要大量有机溶剂甚至有毒有机溶剂、耗时费力等, 使该法至今并未被广泛采用.

3 固相萃取法

较之液液萃取, 固相萃取具有富集倍数高、溶剂消耗少及可以方便地在线萃取等优点, 因此, 从 20 世纪 80 年代中后期开始, 研究者纷纷将研究目光投向固相萃取方法. 代表性的研究有: (1) 利用交联葡聚糖凝胶吸附磷钼蓝, 直接用固相分光法测定^[17]; (2) 采用醋酸纤维膜吸附磷钼蓝, 用二甲亚砷溶解吸附了磷钼蓝的醋酸纤维膜, 以分光法测定^[18]; (3) 阴离子交换树脂富集水样中的活性磷, 用氯化钾溶液洗脱, 与钼酸盐溶液反应后, 被还原剂二氯亚锡还原成磷钼蓝后测定^[19]; (4) 苯乙烯-交联苯乙炔富集磷钼蓝, 氢氧化钠溶液洗脱, 分光法检测^[20]; (5) C18 预富集柱吸附磷钼蓝和十六烷基三甲基溴化铵的缔合物, 硫酸乙醇溶液洗脱, 分光法测定^[21].

上述方法大部分的分析对象为淡水样品, 并未真正应用于海水样中低浓度活性磷的分析. C18 预富集柱吸附磷钼蓝缔合物的方法^[21]则针对海水样品而开发, 具有检测限低 ($1.7\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 回收率高 (大于 96%) 的优点, 已试用于寡营养盐海区水样中活性磷测定.

4 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 共沉淀 (MAGIC) 法^[22]

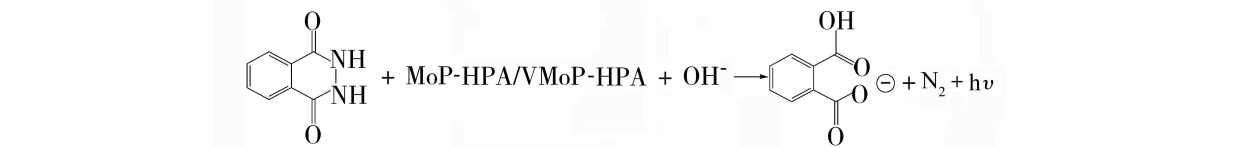
目前, 只有 MAGIC 法大范围成功地运用于海水中低浓度活性磷的分析. MAGIC 法利用海水中的 Mg^{2+} 与 OH^- 生成 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 沉淀时会共沉淀 PO_4^{3-} 的特性富集 PO_4^{3-} , 富集了 PO_4^{3-} 的 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 沉淀被适量盐酸溶液溶解后, 采用磷钼蓝分光光度法测定. 该方法的特点包括: 灵敏度高, 测定下限可达 $5\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 富集倍数高达 100 倍; 所用仪器简单, 仅需低速离心机和可见分光光度计即可完成测定. 然而, 该方法也存在着分析耗时长, 测定一个活性磷浓度低于 $20\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的海水样, 需要数小时. 鉴于该法的灵敏度高、精密度好, 目前成为海洋工作者广泛采用与认可的一种方法^[11, 23-24].

5 长光程流通池法

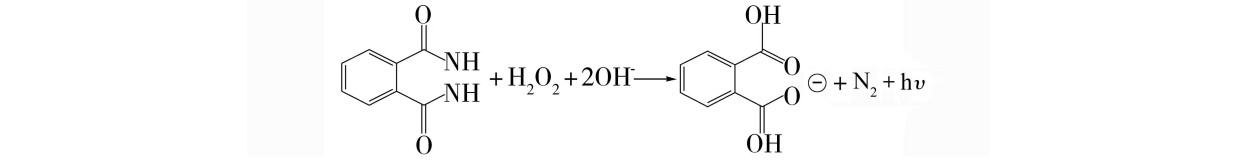
由朗伯 比尔定律可知, 吸光度与吸光物质的浓度及比色池的厚度成正比, 基于此, 科学家们通过增加光程来改善磷钼蓝法的灵敏度. O m azagonzalez 等^[25]利用 0.6m 的长光程测定活性磷, 检测限为 $1\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; Zhang 等^[26]采用 1m 长的波导纤维作为流通池测定海水样中的磷酸盐, 检测限为 $0.5\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$. 增加光程在一定程度上可以增加试样的检测信号但试剂空白的吸光度也同比例增加, 因此理论上增加光程并不提高信噪比. 如 Zhang 所报道的方法中, 试剂空白的吸光度为 0.2, 相当于 $200\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的活性磷所产生的吸光度; 而要在 $200\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的信号之上分辨 $0.5\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的信号, 并非易事. 因此, 增加光程只能在试剂空白极低的前提下有限地改善灵敏度. 该法尚未被广泛应用.

6 化学发光法

利用鲁米诺化学发光法测定水样中的活性磷的报道见表 1. 该法所基于的反应类型可分为两类^[27-28], 一是氧化性磷钼杂多酸或磷钨杂多酸与鲁米诺发生化学发光反应:



另一类是在过氧化物酶的存在下，由磷酸盐和其它物质反应产生的过氧化氢与鲁米诺发生化学发光反应:



式中，M oP-H P A为磷钼杂多酸， V M oP-H P A 为磷钼钒杂多酸。

表 1 鲁米诺化学发光法测定水样中的活性磷

Table 1 Chemiluminescence methods for the determination of orthophosphate in natural waters

反应类型	反应相	分析试样	测定范围 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	测定下限 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	测样频率 /个 $\cdot\text{h}^{-1}$	参考文献
VM oP-H P A- μmol	固相	河水、黑海水	0.002—0.055	0.002	2	[29]
VM oP-H P A- μmol	固相	自来水	0.16—16.1	0.06	11	[30]
M oP-H P A- μmol	液相	河水	0.001—0.105 0.53—2.11	0.001	180	[31]
H_2O_2 - μmol	液相	河水	0.096—32	0.096	30	[32]
H_2O_2 - μmol	液相	河水	0.01—30	0.01	20	[33]

从表 1 可见，该法较多地应用于淡水样品的测定，检测限可达 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 级。应用于海水样测定的报道非常少，仅 Zui 等^[29]测定了一个黑海水样，浓度为 $1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。该法的缺点是受干扰大，海水中的 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 会严重干扰测定。鲁米诺化学发光测定海水样中痕量活性磷方法的发展，首要问题是消除共存离子的干扰。

7 各种方法的比较和研究展望

表 2 比较了目前海水样品中痕量活性磷检测方法的主要优缺点。

表 2 海水样中痕量活性磷检测方法比较

Table 2 Comparison of analytical techniques for orthophosphates in seawater

方法	空白 (A)	10nmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 信噪比	方法的优缺点	参考文献
液液萃取法	0.078	1.03	灵敏度低、试剂空白值高、液液萃取的缺点全具有	[16]
固液萃取法	0.026	3.79	灵敏度高、试剂空白值低，适合开发成在线方法	[21]
MAGIE 法	0.0387	1.98	灵敏度高、精密度高、被广泛采用与认可；但费时耗力、无法实现自动化	[22]
鲁米诺化学发光法	—	—	灵敏度高；但 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 干扰严重，不适合海水的测定	[29]
长光程流通池	0.2	1.08	无需富集、在线；但成本高、试剂空白值高	[26]

值得指出的是，除了长光程流通池法外，本文所介绍的其它方法均为离线方法。海洋环境研究的发展趋势是现场获取数据，以避免长途运输和长期存储带来的样品沾污和变质等问题。显然离线分析方法不能胜任船上的现场测定。流动注射分析因其易于实现自动化、分析过程受污染少而被船上实验室广泛采用。基于此的低含量活性磷的在线检测将大受欢迎。

由于海洋现场操作的特殊性，贵重精密仪器不可能抵抗海上的风浪和高盐氛围。分光光度计是迄今为止应用得最好最可靠的海上分析仪器，一直为海洋研究者所青睐。因此，磷钼蓝法将在相当长的时期内仍被广泛采用，基于该法的检测技术，尤其是富集后的检测，仍是发展方向。

低浓度活性磷的数据将揭示众多海洋生物地球化学信息，对了解寡营养盐海区生态系统的物质循环和生物地球化学特性至关重要。目前全球上层海洋的营养盐数据奇缺，急需操作简单、灵敏稳定可靠的分析方法，以开展长时间大范围的调查研究；发展和优化更为灵敏快速的低浓度活性磷分析方法尚需更大努力。

参 考 文 献

[1] Smith SV, Phosphorus Versus Nitrogen Limitation in the Marine Environment *Limnol. Oceanogr.*, 1984, **29**: 1149—1160

[2] Kirm M D, Kress N, Brenner S, Phosphorus Limitation of Primary Productivity in the Eastern Mediterranean Sea *Limnol. Oceanogr.*, 1991, **36**: 424—432

[3] Young S L, Seki T, Muka i T et al., Limiting Nutrients of Phytoplankton Community in Hiroshima Bay, Japan *Wat. Res.*, 1996, **30**: 1490—1494

[4] Sanudo-Wilhelmy S A, Kustka A B, Gobler C J et al., Phosphorus Limitation of Nitrogen Fixation by *Trichodesmium* in the Central Atlantic Ocean *Nature*, 2001, **411**: 66—69

[5] Murphy J, Riley J P, A Modified Single Solution Method for the Determination of Phosphate in Natural Waters *Anal. Chim. Acta*, 1962, **27**: 31—36

[6] 国家海洋局. 海洋监测规范. 北京：海洋出版社，1991, **179**, 277—281

[7] Yurling L C, Houngr-Yung C, Karl D M et al., Nitrogen Modulates Phytoplankton Growth in Spring in the South China Sea *Continental Shelf Research*, 2004, **24**: 527—541

[8] Yilmaz A, Tugrul S, The Effect of Cold and Warm-Core Eddies on the Distribution and Stoichiometry of Dissolved Nutrients in the Northeastern Mediterranean *J. Mar. Syst.*, 1998, **16**: 253—268

[9] Karl D M, Tien G, Temporal Variability in Dissolved Phosphorus Concentrations in the Subtropical North Pacific Ocean *Mar. Chem.*, 1997, **56**: 77—96

[10] Cavender-Bares K K, Karl D M, Chisholm S W, Nutrient Gradients in the Western North Atlantic Ocean: Relationship to Microbial Community Structure and Comparison to Patterns in the Pacific Ocean. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 2001, **48**: 2373—2395

[11] Wu J F, Sunda W, Boyle E A et al., Phosphate Depletion in the Western North Atlantic Ocean *Science*, 2000, **289**: 759—762

[12] Mckelvie I D, Peat D M W, Worsfold P J, Techniques for the Quantification and Speciation of Phosphorus in Natural Waters *Analytical Proceedings Including Analytical Communications*, 1995, **32**: 437—445

[13] Drummond L, Mather W, Determination of Phosphorus in Aqueous Solution Via Formation of the Phosphomolybdenum Blue Complex: Re-Examination of Optimum Conditions for the Analysis of Phosphate *Anal. Chim. Acta*, 1995, **302**: 69—74

[14] Johnson K S, Petty R L, Determination of Phosphate in Seawater by Flow Injection Analysis With Injection of Reagent *Anal. Chem.*, 1982, **54**: 1185—1187

[15] Worsfold P, J Clinch J R, Casey H, Spectrophotometric Field Monitor for Water-Quality Parameters—the Determination of Phosphate *Anal. Chim. Acta*, 1987, **197**: 43—50

[16] Shoji M., Toshiaki W., Kyoji T., Solvent Extraction-Spectrophotometric Determination of Phosphate with Molybdate and Malachite Green in River Water and Sea Water *Talanta*, 1984, **31**: 235—240

[17] Yoshinura K, Ishii M, Taniguchi T, Microdetermination of Phosphate in Water by Gel-Phase Colorimetry with Molybdenum Blue *Anal. Chem.*, 1986, **58**: 591—594

[18] Taguchi S, Ito Oka E, Masuyama K et al., Application of Organic Solvent-Soluble Membrane Filters in the Preconcentration and Determination of Trace Elements—Spectrophotometric Determination of Phosphorus as Phosphomolybdenum Blue *Talanta*, 1985, **32**: 391—394

[19] Freeman P R, Mckelvie I D, Hart B T et al., Flow-Injection for the Determination of Low Levels of Phosphorus in Natural Waters *Anal. Chim. Acta*, 1990, **234**: 409—416

[20] Heckemann H J, Highly Sensitive Flow Analysis Determination of Orthophosphate Using Solid Phase Enrichment of Phosphomolybdenum Blue without Need for Organic Solvents in Elution *Anal. Chim. Acta*, 2000, **410**: 177—184

[21] 梁英, 袁东星, 林庆梅, 固相萃取-分光光度法测定海水中痕量活性磷酸盐. 分析化学, 2005, **33** (8) : 1053—1057

[22] Karl D M, Tien G, MAGE: A Sensitive and Precise Method for Measuring Dissolved Phosphorus in Aquatic Environments *Limnol. Oceanogr.*, 1992, **37**: 105—116

[23] Benitez-Nelson C R, Karl D M, Phosphorus Cycling in the North Pacific Subtropical Gyre Using Cosmogenic P-32 and P-33 *Limnol.*

Oceanogr., 2002, **47**: 762—770

[24] Fuller N J, West N J, Marie D et al., Dynamics of Community Structure and Phosphate Status of Picocyanobacterial Populations in the Gulf of Aqaba, Red Sea. *Limnol. Oceanogr.*, 2005, **50**: 363—375

[25] Ormazgonzalez F I, Statham P J. Determination of Dissolved Inorganic Phosphorus in Natural Waters at Nanomolar Concentrations using a Long-Capillary cell Detector. *Anal. Chim. Acta*, 1991, **244**: 63—70

[26] Zhang JZ, Chi J. Automated Analysis of Nanomolar Concentrations of Phosphate in Natural Waters with Liquid Waveguide. *Environ. Sci. Technol.*, 2002, **36**: 1048—1053

[27] Dodeigne C, Thunus L, Lejeune. Chemiluminescence as Diagnostic Tool: A Review. *Talanta*, 2000, **51**: 415—439

[28] Morais IP A, Tóth IV, Rangel A O S S. An Overview on Flow Methods for the Chemiluminescence Determination of Phosphorus. *Talanta*, 2005, **66**: 341—347

[29] Zuo O V, Birks JW. Trace Analysis of Phosphorus in Water by Sorption Preconcentration and Luminescent Chemiluminescence. *Anal. Chem.*, 2000, **72**: 1699—1703

[30] Morais IP A, Mió M, Manera M et al., Flow-through Solid-phase Based Optical Sensor for the Multisyringe Flow Injection Trace Determination of Orthophosphate in Waters with Chemiluminescence Detection. *Anal. Chim. Acta*, 2004, **506**: 17—24

[31] Yaqoob M, Nahi A, Worsfold P J. Determination of Nanomolar Concentrations of Phosphate in Freshwaters Using Flow Injection with Luminescent Chemiluminescence Detection. *Anal. Chim. Acta*, 2004, **510**: 213—218

[32] Nakamura H, Hasegawa M, Nomura Y et al., Development of a Highly Sensitive Chemiluminescence Flow-Injection Analysis Sensor for Phosphate Ion Detection Using Maltose Phosphorylase. *J. Biotechnol.*, 1999, **75**: 127—133

[33] Nakamura H, Tanaka H, Hasegawa M et al., An Automatic Flow-Injection Analysis System for Determining Phosphate Ion in River Water Using Pyruvate Oxidase G (from *Aerococcus Viridans*). *Talanta*, 1999, **50**: 799—807

A REVIEW ON TRACE ANALYSIS OF ORTHOPHOSPHATE IN OCEAN ENVIRONMENTS

YUAN Dong-xing LIANG Ying

(State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Environmental Science Research Center, Xiamen University, Xiamen, 361005, China)

ABSTRACT

Phosphorus is an essential nutrient element for phytoplankton in ocean environments, and sometimes a limiting factor for the primary productivity. To study the biogeochemical cycle of phosphorus, it is very important to accurately determine the concentration of orthophosphates in the surface of oceans, especially oligotrophic open-oceans. A review on the trace analytical techniques for orthophosphate in ocean environments is presented in this paper.

Keywords orthophosphate; trace analysis; seawater