

# AA3型连续流动分析仪与钒钼黄比色法测定玉米植株全磷含量之比较

刘云霞<sup>1</sup>, 温云杰<sup>1</sup>, 黄金莉<sup>2</sup>, 李桂花<sup>1</sup>, 柴晓<sup>1</sup>, 汪洪<sup>1\*</sup>

(1.中国农业科学院农业资源与农业区划研究所/耕地培育技术国家工程实验室/农业部植物营养与肥料重点实验室, 北京 100081; 2.中通科技发展有限公司, 北京 100088)

**摘要:**选择69个玉米秸秆和籽粒样品,经浓H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>消煮后,用连续流动分析仪与钒钼黄比色法分别测定消煮液中磷含量,对2种方法检测数据之间进行比较分析,探讨利用连续流动分析仪测定植株样品消煮液中磷含量的可行性。t检验表明:2种方法测定植株全磷含量相比无明显差异。测定结果之间呈显著线性相关关系,回归直线方程为 $Y(\text{连续流动分析仪-P})=0.927X(\text{钒钼黄比色法-P})-0.002$ ,相关系数 $r=0.985(n=69, P<0.01)$ 。连续流动分析仪测定加标回收率在99.3%~103.8%之间,对4个样品消煮液中磷浓度分别重复测定10次,相对标准偏差小于1.5%。连续流动分析仪分析速度快,消耗试剂少,推荐用于大批量玉米植株样品H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>消煮液中磷含量分析。

**关键词:**连续流动分析仪;钒钼黄比色法;植物全磷

中图分类号:X830.2

文献标志码:A

文章编号:2095-6819(2015)06-0577-06

doi: 10.13254/j.jare.2015.0030

## Determination Total Phosphour of Maize Plant Samples by Continuous Flow Analyzer in Comparison with Vanadium Molybdate Yellow Colorimetric Method

LIU Yun-xia<sup>1</sup>, WEN Yun-jie<sup>1</sup>, HUANG Jin-li<sup>2</sup>, LI Gui-hua<sup>1</sup>, CHAI Xiao<sup>1</sup>, WANG Hong<sup>1\*</sup>

(1.Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, National Engineering Laboratory for Improving Quality of Arable Land, Key Laboratory of Plant Nutrition and Fertilizer, Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China; 2.Bltech Limited, Beijing 100088, China)

**Abstract:** The vanadium molybdate yellow colorimetric method (VMYC method) is regarded as one of conventional methods for determining total phosphorus (P) in plants, but it is time consuming procedure. Continuous flow analyzer (CFA) is a fluid stream segmentation technique with air segments. It is used to measure P concentration based on the molybdate-antimony-ascorbic acid method of Murphy and Riley. Sixty nine of maize plant samples were selected and digested with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. P concentrations in the digests were determined by CFA and VMYC method, respectively. The t test found that there was no any significant difference of the plant P contents measured by the CFA and the VMYC method. A linear equation could best describe their relationship:  $Y(\text{CFA-P})=0.927X(\text{VMYC-P})-0.002$ . The Pearson's correlation coefficient was 0.985 with a significance level ( $n=69, P<0.01$ ). The CFA method for plant P measurement had a high precision with relative standard deviation (RSD) less than 1.5%. It is suggested that the CFA based on Murphy and Riley colorimetric detection can be used to determinate total plant P in the digests solutions with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The CFA method is labor saving and can handle large numbers of samples. The human error in mixing with other operations is reduced to a great extent.

**Keywords:** continuous flow analyzer (CFA); vanadium molybdate yellow colorimetric method (VMYC method); plant phosphorus

收稿日期:2015-01-29

基金项目:国家重点基础研究发展计划("973"计划)项目(2013CB127402);中央级公益性科研院所专项资金资助项目(IARRP-2014-39)

作者简介:刘云霞(1989—),女,山东聊城人,硕士研究生,主要从事土壤植物磷素营养与测试技术研究工作。E-mail: lyx071012@126.com

\*通信作者:汪洪 E-mail: wanhong01@caas.cn

磷素是植物必需营养元素之一,是植物体内核酸、核蛋白和磷脂等重要化合物的组成成分,在能量转换、呼吸和光合等代谢活动中起着重要作用,对提高植物抵御干旱、低温和盐碱等胁迫能力方面也发挥着十分重要的作用<sup>[1-2]</sup>。

植物体内磷主要以有机磷如核酸、磷脂、植素等的形态存在。植株样品中有机磷经干灰化或湿灰化分解转变为无机正磷酸盐。植株全磷测定消煮方法常用  $H_2SO_4-H_2O_2$  消煮分解样品制备待测液,待测液中磷酸盐用钒钼黄比色法和钼蓝比色法测定<sup>[3]</sup>。钒钼黄比色法基于的原理是一定浓度范围(1~20 mg P·L<sup>-1</sup>)内的磷酸盐与偏磷酸盐和钼酸盐在酸性条件下可形成黄色杂聚化合物——磷钼杂多酸,溶液黄色其深浅与磷含量呈正比;钒钼黄比色法广泛用于植物和有机肥料样品中磷的测定。钼蓝比色法原理是在一定酸度条件下,磷酸盐与钼酸络合形成的磷钼杂多酸  $Mo^{6+}$ ,被还原剂还原为  $Mo^{5+}$ ,生成一种叫做“钼蓝”物质<sup>[3-4]</sup>。

利用钼蓝比色法原理结合连续流动分析仪(Continuous Flow Analyzer, CFA),可用来测定样品中磷酸盐<sup>[5-8]</sup>。连续流动分析仪主要由自动进样器、蠕动泵、化学分析模块、比色计和数据处理系统组成<sup>[9]</sup>。按预先设定的取样程序,准确将样品取出,通过蠕动泵精确定量输送样品和试剂,按顺序定量注入到化学反应模块中,同时均匀注入空气气泡,将每一个样品分割。样品和试剂在化学分析模块中经过惰性玻璃圈上下旋转混合,经过透析器被过滤和稀释后,显色液体进入比色计中进行比色<sup>[9-11]</sup>。比色后检测器将信号传入电脑,最后通过软件进行数据处理,无需烦琐的手工比色过程,分析人员只需配制显色试剂、编辑测定程序、整理结果报告,将复杂的手工操作简化成仪器的自动化与批量检测,分析速度明显加快<sup>[6-7]</sup>。另外样品待测液在设定的一致条件(进样速度、显色时间、显色温度、清洗比)下反应,减小了人为操作误差<sup>[6-7, 12-13]</sup>。张英利等<sup>[14]</sup>利用连续流动分析仪测定硫酸-过氧化氢消解小麦样品中磷含量,加标回收率 98.5%~100.5%,相对标准偏差小于 2%。贝美容等<sup>[15]</sup>通过改进 AA3 型连续流动分析仪所附试剂配制方法,实现对橡胶叶片  $H_2SO_4-H_2O_2$  消煮液中的氮、磷、钾含量同时测定;他们计算假设用于配制标准溶液及各种试剂时间大约为 4 h,用于仪器预热及样品消煮液的稀释时间为 3 h,若每小时测定 50 个样品,13 h(相当于 1.5 d 时间)内可测定 300 个样品。连续流动分析仪方法明显快速高效、省力。但是连续流动分析仪带来测定自动化同时

也带来操作上不稳定性,利用连续流动分析仪测定玉米植株秸秆和籽粒全磷含量,与常规的钒钼黄比色法相比,是否存在差异,尚未见相关报道。

本文选择 69 个玉米秸秆和籽粒样品,利用  $H_2SO_4-H_2O_2$  消煮,消煮液中磷含量采用连续流动分析仪测定,与钒钼黄比色法测定结果相比较,探讨采用连续流动分析仪测定玉米植株全磷含量的可行性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样品

玉米茎秆和籽粒样品采自黑龙江省哈尔滨市民主乡,样品烘干后粉碎过 0.50 mm 筛。

### 1.2 样品消煮

参照文献<sup>[3]</sup>方法,称取 0.25 g(精确至 0.000 1 g)干燥样品,送入消煮管中,加入 5 mL 浓硫酸,摇动使硫酸与样品混匀,静置过夜,次日利用自动程序消解系统(AIM600, Aim Lab Automation Technologies Pty Ltd., Australia)加热,升温速度 5 °C·min<sup>-1</sup>,升温至 200 °C,保持 30 min,继续加热至 300 °C,瓶内硫酸开始冒白烟后 15 min 取下消煮管,稍冷却,滴加 30% 过氧化氢,不断摇动消煮管,继续加热 15~20 min,如瓶内溶液仍有黑色或棕黄色,则在消煮管稍冷后,再滴加过氧化氢,随后再加热,如此反复处理 3~5 次,直至瓶内溶液完全清亮无色为止。然后再加热 10 min,除去过量过氧化氢。消煮完毕后,定容至 100 mL。

### 1.3 消煮液中磷酸盐-钒钼黄比色法测定

#### 1.3.1 仪器

紫外可见分光光度计(UV2700, Shimadzu Scientific Instruments 公司)。

#### 1.3.2 操作

吸取消煮待测液 25 mL,置于 50 mL 容量瓶中,加 2,6-二硝基酚指示剂 2 滴,用 6 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 溶液中和至刚呈黄色,加入钒钼酸铵试剂 10.00 mL,用水定容。放置 15 min 后,在紫外可见分光光度计波长 450 nm 处比色。标准曲线:分别吸取 50 mg·L<sup>-1</sup> P 标准溶液配置 0、2、4、6、8、12 mg·L<sup>-1</sup> 浓度标准 P 溶液,按照上述条件进行测定。钒钼酸铵试剂配置:25.0 g 钒钼酸铵溶于 400 mL 去离子水中;1.25 g 偏钒酸铵溶于 300 mL 沸水中,冷却后加 250 mL 硫酸;将钼酸铵液缓缓注入偏钒酸铵液中,搅拌均匀,稀释至 1 L。

### 1.4 连续流动分析仪测定

#### 1.4.1 仪器

连续流动分析仪(Auto Analyzer 3 System, SEAL

Analytical GmbH公司),配置有MT8化学模块、操作软件AACE。其测定磷浓度的原理流路如图1所示。

## 1.4.2 操作步骤与分析

### 1.4.2.1 试剂配制

(1)钼酸铵:溶解6.2g钼酸铵、0.17g酒石酸锑,溶解稀释至1L,储存于棕色瓶中。(2)抗坏血酸:15g抗坏血酸溶于600mL去离子水,稀释至1L。溶液混匀,储存于棕色瓶中。(3)酸:14mL硫酸至600mL去离子水中。冷却至室温后稀释至1L,加入1g十二烷基硫酸钠并混合均匀。(4)酸盐:5g氯化钠溶于700mL去离子水,加入12mL硫酸,溶液混匀并稀释至1L,再加入1g十二烷基硫酸钠并混合均匀。(5)清洗液:5%硫酸。

### 1.4.2.2 测定参数设置

选择防酸进样针和高浓度进样管,设置进样速率 $60 \text{ 样} \cdot \text{h}^{-1}$ ,进样与清洗比为3.0:1,进样时间45s,清洗时间15s。仪器默认设置基线和漂移校正,自动基线参比为4%;比色滤光片波长为660nm,灯强度大于1000mV。

### 1.4.2.3 标准曲线制作

用磷酸二氢钾配制浓度 $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的P标准贮液,测定时配制0、2、4、6、8、10 $\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度标准P溶液,按照上述条件进行测定,仪器测定峰高与标准溶液P浓度之间进行线性回归,制作校准曲线如图2所示,相关系数 $r=0.9999$ 。

### 1.4.2.4 回收率测定

采用标准加入法,分别称取2份0.25g(精确至

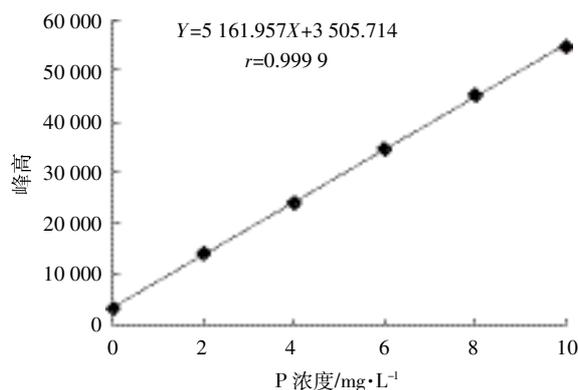


图2 连续流动分析仪测定磷的标准曲线

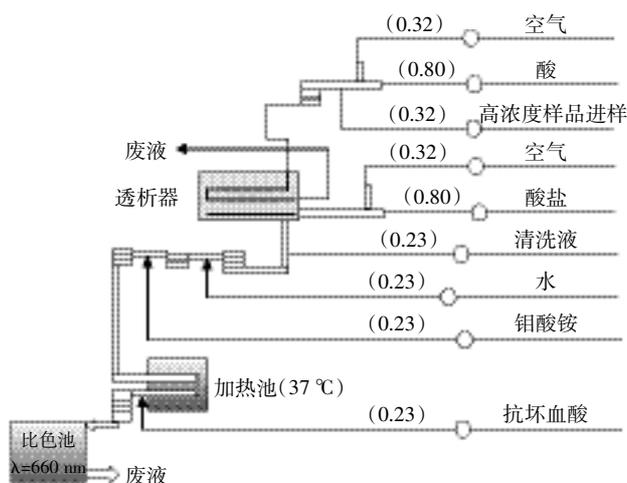
Figure 2 The standard curve for P concentration determination by continuous flow analyzer (CFA)

0.0001g)干燥植株样品,送入消煮管中,在其中一份加入已知磷浓度的磷酸二氢钾标准液,按照1.2设定条件进行消煮,利用连续流动分析仪测消煮液磷浓度,分别得到加标植株样品磷浓度和植株样品检测磷浓度,仪器测定的磷标准回收率=(加标植株样品磷测定值-植株样品磷测定值) $\times 100$ 。

## 1.5 统计分析

69个植株样品消煮液分别用连续流动分析仪和钒钼黄比色法测定,测定数据间差异显著性采用Excel软件中分析工具库t-检验,进行成对双样本均值分析;测定数据之间进行相关分析,利用直线方程进行回归,并统计分析相关系数的显著性。

连续流动分析仪测定植株磷含量重复性实验选择4个植株样品消煮液,每个消煮液重复测定10次。



图中括号里数据为溶液流速( $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ )

Data in parentheses are flow rates for auto analyzer 3 system ( $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ )

图1 连续流动分析仪MT8模块测定磷酸盐原理流路图

Figure 1 Flow scheme of P determination by MT8 module in continuous flow analyzer

测量值  $X_i$  的算术平均值为样品全磷估计值, 标准偏差用贝塞尔公式计算, 即:

$$S(x) = \left[ \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2 \right]^{1/2} \quad n=10$$

相对标准偏差(RSD)=标准偏差/计算结果算术平均值×100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 植株全磷含量

连续流动分析仪和钒钼黄比色法对开花期玉米秸秆全磷含量测定结果范围分别为 2.33~3.19  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  和 2.33~3.28  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 平均值分别为 2.76  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  和 2.84  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; 收获期玉米秸秆中全磷含量分别为 0.54~1.27  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  和 0.59~1.49  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 平均值分别为 0.89  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  和 0.96  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; 收获期玉米籽粒中全磷含量分别为 2.06~3.11  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  和 2.35~3.47  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 平均值分别为 2.40  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  和 2.71  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。收获期秸秆中全磷含量明显降低(图 3)。69 个样品 2 种方法的测定结果无显著差异,  $t$  检验的双尾  $P$  值小于 0.01(表 1)。

将连续流动分析仪和钒钼黄比色法对 69 个样品

表 1  $t$  检验—成对双样本均值分析玉米植株全磷含量测定结果  
Table 1 Paired samples  $t$ -test for the measured values of maize plant P contents by CFA and VMYC method

项目	连续流动分析仪	钒钼黄比色法
全磷含量平均值/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	2.01	2.17
方差	0.71	0.80
样品数	69	69
泊松相关系数		0.985
df		68
$t$ 值		8.35
$P(T \leq t)$ 双尾		0.00
$t$ 双尾临界		2.00

全磷含量测定结果进行相关性分析(图 4), 2 种方法测定结果呈极显著的线性相关关系, 相关系数  $r=0.985(n=69, P<0.01)$ 。2 种方法测定数据之间回归直线方程为  $Y(\text{连续流动分析仪}-P)=0.927X(\text{钒钼黄比色法}-P)-0.002$ 。线性方程斜率为 0.927, 表明连续流动分析仪测定的植株全磷含量略低于钒钼黄比色法。

### 2.2 连续流动分析仪测定结果准确度与精密度分析

用标准加入法进行回收率测定实验, 选择 2 份植

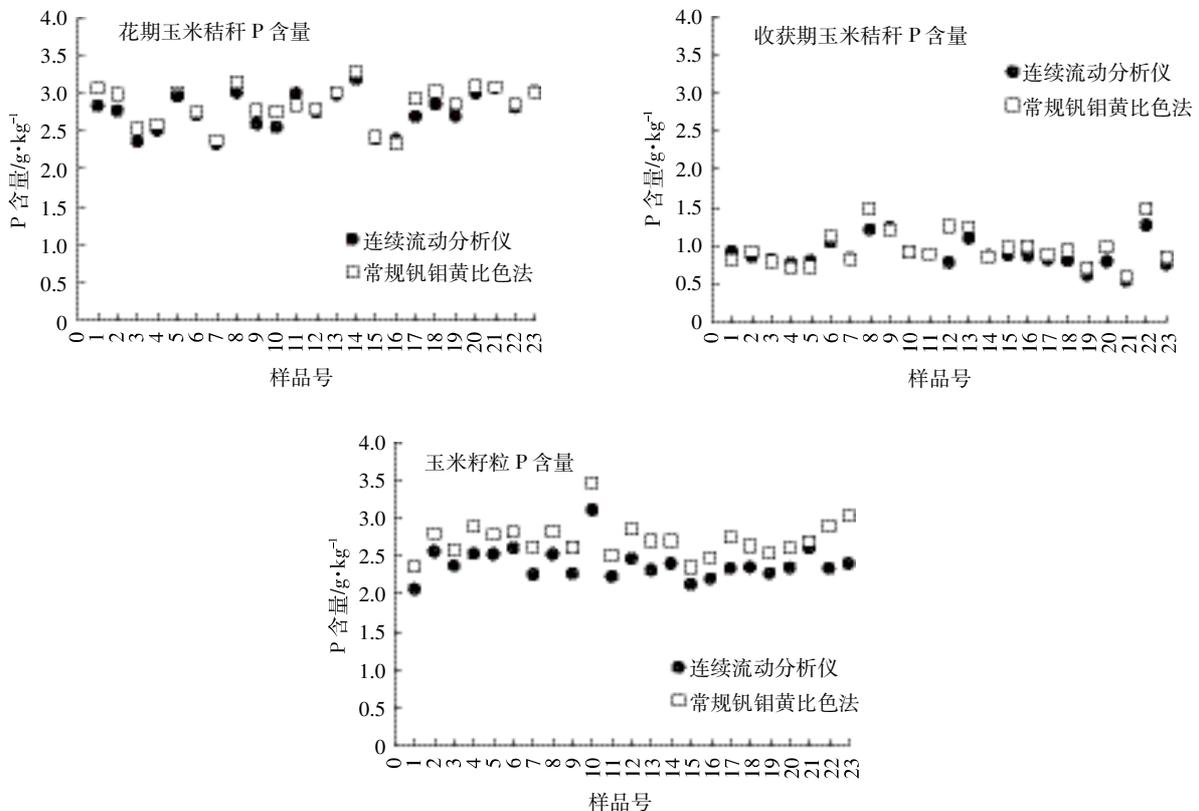


图 3 连续流动分析仪和钒钼黄比色法测定植株全磷含量结果比较

Figure 3 Comparison of total P contents in maize determined by CFA and VMYC method

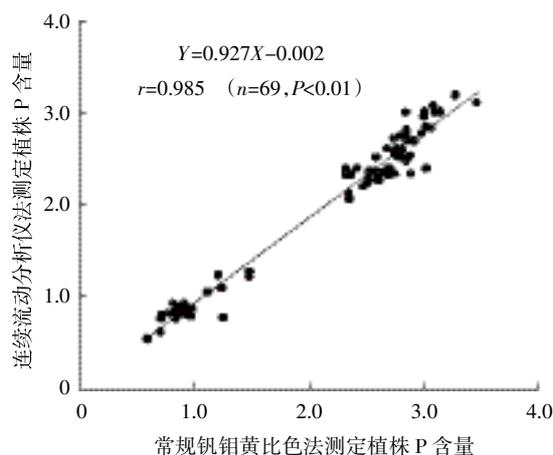


图4 连续流动分析仪和钒钼黄法测定玉米植株全磷含量结果间相关分析

Figure 4 Relationship between total P contents in maize plant determined by CFA and VMYC method

株样品,分别添加  $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  磷标准溶液,消煮后,利用连续流动分析仪分别测定3次。结果表明连续流动分析仪测定磷标准回收率为  $99.3\%\sim 103.8\%$ (表2)。

在相同测量条件下,利用连续流动分析仪对4个样品消煮液中磷含量分别进行了10次测量,测定结果重复性较好,相对偏差在  $0.66\%\sim 1.40\%$  范围内,均小于  $1.5\%$ (表3)。

### 3 结论

与常规钒钼黄比色法相比,连续流动分析仪测定

玉米植株中全磷含量无明显差异,可用回归直线方程为  $Y(\text{连续流动分析仪-P})=0.927X(\text{常规钒钼黄比色法-P})-0.002$  描述,相关系数  $r=0.985(n=69, P<0.01)$ 。连续流动分析仪分析植株样品磷含量的相对标准偏差小于  $1.5\%$ ,回收率在  $99.3\%\sim 103.8\%$  之间。连续流动分析仪法具有分析速度快、消耗试剂少等优点,适于大批量  $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$  消煮的植株样品中磷含量分析。

#### 参考文献:

[1] Marschner H. Mineral nutrition of higher plants (2nd Edition)[M]. London: Academic Press, 1995: 313-404.  
 [2] George T S, Fransson A M, Hammond J P, et al. Phosphorus nutrition: Rhizosphere processes, plant response and adaptations[M]// Bünenmann E K, Oberson A, Fossard E. Phosphorus in action: Biological processes in soil phosphorus cycling, Heidelberg: Springer, 2011: 245-271.  
 [3] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000: 312-314.  
 LU Ru-kun. Analytical methods for soil and agricultural chemistry[M]. Beijing: China Agricultural Sciencetech Press, 2000: 312-314. (in Chinese)  
 [4] Murphy J, Riley J P. A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1962, 27: 31-36.  
 [5] Blakemore L C, Searle P L, Day B K. Methods for chemical analysis of soils[R]. Lower Hutt, NZ Soil Bureau, 1987: 80.  
 [6] Zhang J Z, Fischer C J, Ortner P B. Optimization of performance and minimization of silicate interference in continuous flow phosphate analysis[J]. *Talanta*, 1999, 49(2): 293-304.  
 [7] Zhang J, Chi J. Automated analysis of nanomolar concentrations of phos-

表2 连续流动分析仪测定磷标准回收率结果

Table 2 Recovery rate of P added to plant samples determined by CFA

玉米样品 P 浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	加标 P 浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	检测 P 浓度值/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$			平均值/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	标准回收率/%
		1	2	3		
6.42	3.00	9.89	9.57	8.99	9.48	102.0
6.42	5.00	11.82	11.71	11.29	11.61	103.8
4.55	3.00	7.53	7.53	7.52	7.53	99.3
4.55	5.00	9.14	9.93	9.83	9.63	101.7

表3 连续流动分析仪对玉米植株消煮液中磷浓度的重复性测定结果

Table 3 Results of precision of P concentrations in maize plant digests determined by CFA

测定磷浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$										平均值/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	标准偏差	相对标准偏差/%
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
6.38	6.40	6.52	6.51	6.53	6.55	6.46	6.48	6.44	6.44	6.47	0.05	0.85
4.19	4.26	4.26	4.27	4.30	4.24	4.24	4.25	4.24	4.27	4.25	0.03	0.66
5.82	5.77	5.79	5.80	5.79	5.78	5.80	5.87	5.88	5.89	5.82	0.05	0.77
0.96	0.97	0.96	0.96	0.96	0.97	0.98	0.98	0.99	1.00	0.97	0.01	1.40

- phate in natural waters with liquid waveguide[J]. *Environmental Science & Technology*, 2002, 36: 1048–1053.
- [8] Motomizu S, Li Z H. Trace and ultratrace analysis methods for the determination of phosphorus by flow-injection techniques[J]. *Talanta*, 2005, 66(2): 332–340.
- [9] Estela J M, Cerdà V. Flow analysis techniques for phosphorus: An overview [J]. *Talanta*, 2005, 66(2): 307–331.
- [10] Aminot A, Kérrouel R, Coverly S. Nutrients in seawater using segmented flow analysis[M]// Wurl O. Practical guidelines for the analysis of seawater, Boca Raton, FL: CRC Press, Inc, 2009: 143–178.
- [11] Rulika J, Hansen E H. Flow injection analyses: I. New concept of fast continuous-flow analysis[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1975, 78: 145–157.
- [12] Varley J A. Automatic methods for the determination of nitrogen, phosphorus and potassium in plant material[J]. *Analyst*, 1966, 91: 119–126.
- [13] Twine J R, Williams C H. The determination of phosphorus in Kjeldahl digests of plant material by automatic analysis[J]. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 1971, 2(6): 485–489.
- [14] 张英利, 尚浩博, 马爱生, 等. 连续流动注射法测定土壤和植物中全磷[J]. 理化检验(化学分册), 2007, 43(8): 649–652.  
ZHANG Ying-li, SHANG Hao-bo, MA Ai-sheng, et al. Determination study of total nitrogen in soil and plant by continuous flow analytical system[J]. *Physical Testing and Chemical Analysis (Part B Chemical Analysis)*, 2007, 43(8): 649–652. (in Chinese)
- [15] 贝美容, 罗雪华, 杨红竹. AA3 型连续流动分析仪(CFA)同时测定橡胶叶全氮、全磷、全钾的方法研究[J]. 热带作物学报, 2011, 32(7): 1258–1264.  
BEI Mei-rong, LUO Xue-hua, YANG Hong-zhu. Simultaneous determination of nitrogen, phosphorus and potassium in rubber leaf samples by AA3 continuous flow analyzer (CFA)[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2011, 32(7): 1258–1264. (in Chinese)