

Gesamtphosphorgehalt in einer Wasserprobe

Der Gesamtphosphorgehalt (GP oder Totalphosphor TP) ist die Summe der Atome dieses Elements unabhängig von Kompartiment, Bindungsform und Verfügbarkeit für die Organismen. Er umfasst das verfügbare Phosphat, gelöste organische phosphathaltige Verbindungen, den gesamten in der Biomasse gebundene Phosphor und an suspendierte Partikel adsorbierten oder gebundenen Phosphor. Nur das gelöste, freie Ion nennt man (ortho)Phosphat oder aus technischen Gründen Soluble Reactive Phosphorus (SRP, vgl. Phosphatbestimmung).

Zur Messung des TP müssen alle gebundenen, gelösten und partikulären Phosphorverbindungen in SRP überführt werden. Das erfolgt mit Hilfe eines oxidativen Druckaufschlusses, bei dem alle P-haltigen Verbindungen in kleinste Bestandteile aufgebrochen und damit aller P als SRP freigesetzt werden. Neben diesem Aufschlussverfahren können auch UV-Aufschlüsse bzw. gekoppelte (oxidativ und UV) genutzt werden. Das entstandene SRP wird dann gemessen.

In vielen Gewässern (Seen, Ästuare) ist P der die Primärproduktion limitierende Faktor. Da jedoch P gerade zur Zeit des Phytoplanktonmonitorings (Frühjahr, Sommer) in der Biomasse gebunden und deshalb nur in Spuren als pflanzenverfügbares SRP zu messen ist, wird TP als Maß der P-Versorgung des Gewässers herangezogen.

1 Mikrowellenaufschlussverfahren

Material:

Mikrowelle
Mensur oder Pipetten (Pipettierhilfe)
Teflonaufschlussgefäße
graduiertes Reagenzglas
Erlenmeyerkolben
Photometer, Küvetten (OG) 50mm

Durchführung:

- Teflonaufschlussgefäß mit 10 ml gut geschüttelter Wasserprobe (Vollprobe) füllen,
- 1 ml basische Persulfatlösung hinzugeben,
- Aufschlussgefäß(e) mit Dichtungseinsatz und Deckel fest verschließen,
- In der Labormikrowelle LAVIS1000 **zweimal** im Programm 7 (1000 W, 2 min, 18 min Halten) aufschließen.
- Nach Aufschluss mindestens 5 min vor Öffnen und Entnahme warten (Achtung hoher Druck!), bei bereits warmen Gefäßen länger warten.
- Jede Probe in Reagenzglas überführen, mit ca. 1 ml entionisiertem Wasser spülen (zur Probe geben) und auf Raumtemperatur abkühlen lassen.
- Neutralisation der Probe mit Indikator 3-Nitrophenol (giftig):
 1. Zugabe von 3 Tropfen Indikatorlösung,
 2. einige Tropfen Ammoniaklösung (reizend, nicht unnötig offen stehen lassen, Abzug!) bis zur Gelbfärbung,
 3. Rücktitration zur farblosen Lösung mit 1N HCl.
- Neutralisierte Probe auf 15 oder 20 ml mit entionisiertem Wasser auffüllen.

- Trübungsblindwert (5 ml) entnehmen bei 885 nm ausnahmsweise in 1 cm Küvette (Umrechnen auf 5 cm Küvette mit x5) messen. Bei Referenzen und Proben ohne deutliche Eigenfärbung entfällt dieser Schritt.
- Orthophosphatbestimmung mit 0,15 ml Ascorbinsäurelösung und 0,3 ml Mischreagenz.

15 ml Probevolumen (wenn Trübungsblindwerte entnommen wurden)
 + 0,15 ml Ascorbinsäurelösung
 + 0,3 ml Mischreagenz

oder
 20 ml Probenvolumen (wenn die noch ganz verfügbar sind)
 + 0,2 ml Ascorbinsäurelösung
 + 0,4 ml Mischreagenz

- Messung nach 20 Minuten bei 20-25°C, sonst später.

Der Reagenzienblindwert kann von der SRP-Bestimmung übernommen werden.

Berechnung:

$$TP (\mu\text{mol l}^{-1}) = F_{PO_4} \cdot (E_{Probe} - E_{Trübung} - E_{RBW}) \cdot VK$$

F_{PO_4} = aus Phosphatbestimmung (Anstieg der Kalibriergeraden)
 E_{Probe} = Extinktion der Probe (bei 885 nm, 5 cm)
 $E_{Trübung}$ = Extinktion des Filtrats ohne Reagenzien (bei 885 nm, 5 cm)
 E_{RBW} = Extinktion des Reagenzienblindwerts (bei 885 nm, 5 cm)
 VK = 2 bei Volumenkorrektur von 10 auf 20 ml (Spülen und Neutralisieren)

2 Persulfataufschluss im Trockenschrank

Material:

Trockenschrank (90°C)
 Messur oder Pipetten (Pipettierhilfe)
 kleine PFA-Aufschlussgefäße
 graduiertes Reagenzglas
 Erlenmeyerkolben
 Photometer, Küvetten (OG) 50mm

Durchführung:

- Vollprobe ggf. einfrieren.
- Bei der Probennahme gut geschüttelte Wasserproben zu je 10 ml portioniert in PFA-Aufschlussgefäße abfüllen.
- 1 ml basisches Persulfat zugeben,
- verschließen, schütteln,
- im Trockenschrank bei 90°C für 24 h aufschließen.
- Probe in graduiertes Reagenzglas überführen, PFA-Gefäß mit 1 ml entionisiertem Wasser spülen, zur Probe geben.
- Neutralisation der Probe mit Indikator 3-Nitrophenol (giftig):

1. Zugabe von 3 Tropfen Indikatorlösung,
 2. einige Tropfen Ammoniaklösung (reizend, nicht unnötig offen stehen lassen, Abzug!) bis zur Gelbfärbung,
 3. Rücktitration zur farblosen Lösung mit 1N HCl.
- Neutralisierte Probe auf 15 oder 20 ml mit entionisiertem Wasser auffüllen.
 - Trübungsblindwert (5 ml) entnehmen bei 885 nm ausnahmsweise in 1 cm Küvette (Umrechnen auf 5 cm Küvette mit x5) messen. Bei Referenzen und Proben ohne deutliche Eigenfärbung entfällt dieser Schritt.
 - Orthophosphatbestimmung mit 0,15 ml Ascorbinsäurelösung und 0,3 ml Mischreagenz.

15 ml Probevolumen (wenn Trübungsblindwerte entnommen wurden)

+ 0,15 ml Ascorbinsäurelösung

+ 0,3 ml Mischreagenz

oder

20 ml Probenvolumen (wenn die noch ganz verfügbar sind)

+ 0,2 ml Ascorbinsäurelösung

+ 0,4 ml Mischreagenz

- Messung nach 20 Minuten bei 20-25°C, sonst später.

Der Reagenzienblindwert kann von der SRP-Bestimmung übernommen werden.

Berechnung:

$$TP (\mu\text{mol l}^{-1}) = F_{PO_4} \cdot (E_{Probe} - E_{Trübung} - E_{RBW}) \cdot VK$$

F_{PO_4} = aus Phosphatbestimmung (Anstieg der Kalibriergeraden)

E_{Probe} = Extinktion der Probe (bei 885 nm, 5 cm)

$E_{Trübung}$ = Extinktion des Filtrats ohne Reagenzien (bei 885 nm, 5 cm)

E_{RBW} = Extinktion des Reagenzienblindwerts (bei 885 nm, 5 cm)

VK = 2 bei Volumenkorrektur von 10 auf 20 ml (Spülen und Neutralisieren)

Vorschriften:

DIN 38405 D11-1

modifiziert nach: Hansen HP, Koroleff F (1999) Determination of total phosphor by alkaline persulfate oxidation. In: Grasshoff K, Ehrhardt M, Kremling K (eds). Methods of seawater analysis. Verlag Chemie, Weinheim, 3. Ed. 159-228

Qualitätssicherung:

- Täglich mindestens einmal eine Leerprobe (Blindwert) aufschließen und messen.
- Täglich mindestens einmal einen Referenzwert (10 μM Diphenylphosphat oder Glucose-6-Phosphat und 10 μM Phosphat) aufschließen und messen.
- Sollwert-Zielkarte anlegen. Zulässige Toleranz $\pm 15\%$ ¹ prüfen. Bei z. B. 10 μM Sollwert muss die Konzentration der Referenz zwischen 8,5 und 11,5 $\mu\text{mol l}^{-1}$ liegen.
- Bei Abweichungen

¹ Zielwerte vom LUNG MV übernommen.

1. neuer Aufschluss derselben Referenz,
 2. neue Referenz herstellen, aufschließen und messen,
 3. Reagenzien für die Phosphatmessung prüfen (10 μM Phosphat-Referenz),
 4. Kalibrierung prüfen und ggf. erneuern.
- Blindwert-Zielkarte anlegen. TP in der Leerprobe muss $< 0,22 \mu\text{mol l}^{-1}$ sein. Dieser Wert entspricht der aktuellen Bestimmungsgrenze (2009/10)². Bei Abweichungen
 1. neues entionisiertes Wasser verwenden,
 2. Reagenzien prüfen.
 - Mindestens jede 5. Probe in Duplikaten aufschließen. Spannweiten-Zielkarte anlegen.
 - Bestimmungsgrenze (BG) aus 10 Leerwerten (incl. Aufschlussprozedur) ermitteln.

3 Partikulärer Phosphor: Persulfataufschluss im Trockenschrank

Die Anteile des gelösten reaktiven Phosphors (SRP, entspricht ungefähr dem Phosphat) und des gelösten gebundenen Phosphors sind meistens recht gering. Dennoch soll für die Berechnung der Redfield-Ratios im Seston zu den POC und PN-Gehalten, die aus Filtrerrückständen gemessen werden, die passende Fraktion (PP, partikulärer Phosphor) ebenfalls an Seston auf Glasfaserfiltern bestimmt werden.

Durchführung:

- Je 3 GF6-Filter mit 20-60 ml Probe beladen, pro Probe 1 Blindfilter mit gleicher Menge Probenfiltrat herstellen.
- Filter können eingefroren (oder getrocknet) gelagert werden.
- Je 1 Filter in Zentrifugenröhrchen in 15 ml Reinstwasser legen und 1,5 ml Persulfatlösung zugeben,
- schütteln, locker verschließen,
- im 90°C Trockenschrank für 24 h aufschließen.
- Falls sich der Filter zersetzt und Fasern aufschwimmen, bei 3000 U/min 5-10 min zentrifugieren.
- Neutralisation der Probe:
 1. 2 ml 1N NaOH,
 2. ggf. mit Lackmuspapier den Zielbereich pH 2-8 überprüfen.
- Neutralisierte Probe auf 25 ml mit entionisiertem Wasser in graduiertem Reagenzglas auffüllen.

Chemikalien:

- Entionisiertes Wasser: Alle Molybänblauanachweise reagieren auf geringste Spuren Phosphat und Silikat. Deshalb gilt nur mit silikatfreien Ionenaustauschern hergestelltes Reinstwasser als P-frei. Wir beziehen es vom Kraftwerk Rostock ("Kraftwerkswasser").
- Oxisolv ®
- **basische Persulfatlösung: 25 g Kaliumperoxidisulfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ stickstoffarm), 15 g Borsäure und 7,5 g Natriumhydroxid unter Rühren in einem 500 ml mit ca. 400 ml unter Rühren lösen. Auf 500 ml auffüllen.**
- saure Persulfatlösung: 5 ml 4,5 M H_2SO_4 auf 100 ml mit Reinstwasser verdünnen. 5 g Kaliumperoxidisulfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ stickstoffarm) darin auflösen. Lichtgeschützt bei Raumtemperatur ca. 1 Woche haltbar. Wenn Persulfat ausgefallen ist, neu ansetzen.

² Diese Bestimmungsgrenze (BG) wird üblicherweise vom SRP-Nachweis übernommen. Für TP muss sie erneut bestimmt werden, da zahlreiche zusätzliche Arbeitsschritte (Aufschluss, Neutralisation, Verdünnung) weitere Fehlerquellen einführen. Damit ist die BG für TP höher bzw. die Toleranzgrenze für die Leerprobe größer (weniger streng) anzusetzen als für Phosphat.

- Referenzen: Diphenylphosphat, Glucose-6-Phosphat
- Molybdat-Reagenz: 100 g Ammoniummolybdat $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot\text{H}_2\text{O}$ in 1 l entionisiertem Wasser lösen. Die Lösung ist mehrere Monate haltbar.
- Antimon-Reagenz: 2,7 g Antimonyl-Kalium-Tartrat werden in 200ml 50%iger Schwefelsäure gelöst. Das Reagenz ist mehrere Monate haltbar.
- Misch-Reagenz: 12,5 ml Mo-Reagenz, 36,5 ml 50%ige Schwefelsäure und 1 ml Antimon- Reagenz werden gemischt. Nimmt das Misch-Reagenz eine blaue Farbe an, neu ansetzen.
- 50% ige Schwefelsäure (9 N = 4,5 M): Gleiche Volumina entionisiertes Wasser und konzentrierte Schwefelsäure vorsichtig unter Umrühren mischen (Abzug, Hitzeentwicklung! Gefäß ins Waschbecken oder in Auffangschale).
- **Ascorbinsäure-Reagenz: 8 g Ascorbinsäure in 100 ml Reinstwasser lösen. In dunkler Flasche aufbewahrt 1 bis 2 Wochen haltbar.**
- saure Ascorbinsäure-Reagenz: 10 g Ascorbinsäure in 50 ml Reinstwasser lösen. 50 ml 50%ige H_2SO_4 zugeben. In dunkler Flasche aufbewahrt 1 - 2 Wochen haltbar. Verfärbt sich leicht!!!
- Indikator: 0,3 g Nitrophenol in Ethanol oder 0,08 g in 100ml Reinstwasser lösen.
- Ammoniaklösung: konz. Ammoniaklösung 1:4 mit Reinstwasser verdünnen.
- 1N HCl