

高雅丽, 刘金山, 官利兰, 等. 稀盐溶液-孔雀绿法测定土壤速效磷的条件选择[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(2): 40-46.

稀盐溶液-孔雀绿法测定土壤速效磷的条件选择

高雅丽^{1†}, 刘金山^{1,2†}, 官利兰¹, 张新明¹

(1 华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642; 2 国家林业局 中南林业调查规划设计院, 湖南 长沙 410014)

摘要:【目的】探讨用孔雀绿比色法测定 KCl 稀盐溶液浸提磷的适宜条件。【方法】利用标准溶液和不同利用方式的土样, 比较不同浸提和显色条件对稀盐溶液-孔雀绿法灵敏度和精密度的影响。【结果和结论】浸提适宜条件如下: 土水比为 1 g 土: 20 mL 水, 震荡时间为 0.5 h, 浸提剂(氯化钾)浓度为 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 显色体系中各溶质适宜的最终浓度为: H_2SO_4 $0.48 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、钼酸铵 $0.024 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、孔雀绿质量浓度为 $0.06 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。缔合物最大吸收波长为 620 nm, $\rho(\text{P})$ 在 $0 \sim 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内符合比耳定律, 线性回归方程为 $A = 3.8943C + 0.001$ ($R^2 = 0.999^{**}$, A 为 $D_{620 \text{ nm}}$, C 为磷质量浓度), $\rho(\text{P})$ 检出限为 $0.002 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。测定结果的准确度和精密度均较高, 因此本法适宜于氯化钾稀盐溶液浸提液中磷的测定。

关键词: 土壤; 速效磷; 稀盐溶液; 孔雀绿比色法

中图分类号: S151.9

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2014)02-0040-07

Selection of conditions for determining soil available phosphorus by dilute salt solution-malachite green method

GAO Yali^{1†}, LIU Jinshan^{1,2†}, GUAN Lilan¹, ZHANG Xinming¹

(1 College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Central South Forest Inventory and Planning Institute of State Forestry Administration; Changsha 410014, China)

Abstract: 【Objective】The method of available phosphorus characterized by phosphorus extracted in KCl dilute-salt solution was studied. 【Method】By using standard solution and soil samples from different land use patterns, influences of different conditions during extracting and color-developing stages on the precision and accuracy of dilute-salt solution-malachite green method were studied. 【Result and conclusion】The optimum conditions for extraction were as follows: 1 g soil: 20 mL water for soil-water ratio, 0.5 h for oscillation, and $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for concentration of KCl extracting solution; The optimum final concentrations of reagents for the color-developing system were as follows: H_2SO_4 $0.48 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $0.024 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, malachite green $0.06 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. The association complex had a maximum absorption wavelength at 620 nm, and Beer's law was obeyed in the P range of $0 \sim 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ with the linear regression equation being $A = 3.8943C + 0.001$ ($R^2 = 0.999^{**}$) and P detection limit being $0.002 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and the method had high accuracy and precision as well. Thus the method is appropriate to determine phosphorus amount in KCl extracting solution.

Key words: soil; available phosphorus; dilute salt solution; malachite green spectrophotometry

收稿日期: 2013-02-21 优先出版时间: 2014-01-06

优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20140106.1550.002.html>

作者简介: 高雅丽(1984—), 女, 硕士, E-mail: gaoyali2008@163.com; 刘金山(1986—), 男, 硕士, E-mail: xiaoshanzi00@126.com; †: 对本文贡献相同; 通信作者: 张新明(1965—), 男, 副教授, 博士, E-mail: xzmzhang@scau.edu.cn

基金项目: 广东省科技计划项目(2012A020100004, 2010B020310006)

<http://xuebao.scau.edu.cn>

了解土壤中速效磷的供应状况,对于施肥有着直接的指导意义.在土壤速效磷的测定方法中,化学方法是最普遍的,其中以 Bray-I, Mehlich-I 和 Olsen 法以及后来提出的 Mehlich-3 法最常用^[1].在我国土壤养分研究工作中,各地常用 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaHCO}_3$ 提取中性及石灰性土壤有效磷,用 $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{HCl} - 0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NH_4F 提取酸性土壤有效磷^[2-3].

水或稀盐溶液(如 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$) 提取的磷具有与土壤溶液中的磷大致相当的特点^[4],而且水或 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$ 溶液不仅可以提取磷,还可以提取其他元素如氮、钾、钠、镁等.张新明等^[5]曾使用 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KCl}$ 溶液进行了磷酸盐在水稻土中的等温吸附试验,并结合盆栽试验确立了广东省玄武岩母质发育水稻土的“磷临界平衡浓度”.那么能否用 KCl 稀盐溶液作为土壤速效磷的通用提取方法值得研究.

溶液中磷的测定,一般都用钼蓝法.通常由于磷在土壤中具有很强的固定作用,钼蓝法对水或 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$ 的土壤提取液并不灵敏.孔雀绿法是一种比较简便的测定低浓度磷的方法,原理是磷钼酸盐在较低 pH 下与孔雀绿形成绿色的离子缔合物,络合物的结构为(孔雀绿)₃[$\text{PO}_4(\text{Mo}_3\text{O}_9)_4$]. 比色波长为 610 或 630 nm^[6-8],检出限为 $0.002 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 它的灵敏度是钼蓝法的 3 倍多^[9],且测定需样量小.因此 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$ 溶液等低提取能力提取剂的土壤提取液的测定适宜用孔雀绿法^[7-9].

$0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KCl}$ 溶液也是一种提取能力较弱的提取剂,适用于养分含量较高的土壤或者检出限较低的分析.本研究采用 KCl 稀盐溶液提取、孔雀绿比色法对不同利用方式土样中的速效磷进行测定,并在此基础上对提取及测定条件进行了选择和优化.

1 材料与方法

1.1 土样采集

在 3 种利用方式的地块上采集 18 个土样.采样深度 0~20 cm,随机采样后将土壤混匀,用四分法取 1 kg 左右,风干后研磨并分别过 2、1 mm 筛,装袋备用.土样基础性质见表 1.有机质用重铬酸钾-硫酸消化法,速效钾用中性醋酸铵-火焰光度法,碱解氮用碱解扩散法,速效磷采用 Bray I 法, pH 采用电位测定法.

数据统计分析采用 Excel 2003 及 DPS 8.01 统计软件^[10].

表 1 供试土壤肥力指标

Tab. 1 Fertility indices of soil samples tested

样品 编号	采样点	$w(\text{有机质})/$ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	pH	$w/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$		
				碱解 N	速效 K	速效 P
1	菜地	19.99	6.99	74.81	74.91	44.36
2	菜地	22.35	5.64	99.23	56.71	98.63
3	菜地	23.12	6.38	97.65	81.09	147.42
4	水田	21.73	5.04	129.94	173.77	328.99
5	水田	27.01	4.97	98.44	18.50	29.60
6	水田	18.01	5.58	91.35	27.45	53.18
7	水田	20.86	5.38	78.75	19.29	78.72
8	水田	26.74	5.30	179.55	43.60	21.16
9	水田	18.96	5.43	82.69	55.01	55.18
10	水田	13.59	5.43	61.43	33.50	21.16
11	水田	32.31	5.14	138.60	85.74	47.43
12	水田	20.42	5.31	80.33	17.27	16.68
13	水田	19.24	5.43	99.23	32.83	52.76
14	水田	19.03	5.44	75.60	29.70	58.04
15	水田	23.92	5.10	107.89	37.18	5.89
16	水田	24.88	4.69	187.43	39.25	35.61
17	旱地	20.79	6.39	82.69	40.65	56.88
18	旱地	23.61	5.01	124.43	27.44	90.62

1.2 主要仪器和试剂

往复振荡机、UV-754 分光光度计.

试剂 I: $4.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$ 、 $0.20 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 钼酸铵和 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 酒石酸锑钾溶液.

浓 H_2SO_4 217 mL 缓慢地倒入 600 mL 水中,搅拌,冷却. $17.66 \text{ g}(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和 $0.500 \text{ g} \text{KSbC}_4\text{H}_4\text{O}_7 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ 溶解于约 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 的 300 mL 水中,冷却.然后将 H_2SO_4 溶液缓缓倒入另一溶液中,稀释定容至 1 L,贮于聚乙烯试剂瓶中.

试剂 II: $7.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 聚乙烯醇(Polyvinyl alcohol, PVA, 乳化剂)和 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 孔雀绿溶液.

7.5 g PVA 溶解于约 800 mL 水中,缓缓加热并不停地搅拌,直至全部溶解,冷却.然后将 1.000 g 孔雀绿溶解于此溶液中,稀释定容至 1 L.

1.3 光密度测定方法

称取过 1 mm 筛的风干土样 2.500 g ,置于 250 mL 振荡瓶或三角瓶中,准确加入 50 mL $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KCl}$ 溶液,加塞,在 $(25 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ 下振荡 0.5 h 后,用无磷干滤纸过滤.

量取滤液 8~40 mL 置于 50 mL 容量瓶中,加入 2 滴 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 酒石酸锑钾,然后加入“试剂 I”6.00 mL,

摇匀,放置约 10 min 后,再加入“试剂Ⅱ”3.00 mL,摇匀后定容,30 min 后测定 620 nm 处光密度($D_{620\text{ nm}}$)。

2 结果与分析

2.1 分光光度法相关条件的探索

2.1.1 络合物吸收光谱 设置 1 组磷标准系列浓度,以试剂空白作为对照,在不同波长下比色。

表 2 不同波长下工作曲线的参数

Tab. 2 Parameters of working curve with different waves

项目	600 nm	605 nm	610 nm	615 nm	620 nm	625 nm	630 nm	635 nm	640 nm	645 nm	650 nm
斜率	3.306 4	3.702 9	3.742 1	3.887 9	3.894 3	3.862 9	3.772 9	3.621 4	3.578 6	3.550 7	3.449 3
相关系数	0.999 2	0.998 7	0.994 9	0.999 4	0.999 3	0.999 2	0.998 6	0.998 7	0.998 9	0.998 8	0.998 9

2.1.2 显色条件的选择 1) 聚乙烯醇(PVA)用量的影响:在 50 mL 容量瓶中加入 0.5 mL 质量浓度为 $7.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PVA 溶液,显色液微浑浊,而加入 3.0~6.0 mL 则吸光度恒定,且稳定时间长。从图 1 可以看出 PVA 不同用量对光密度无明显影响,故本试验选择加入的量为 4.5 mL,其在显色液中的最终质量浓度为 $0.45\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

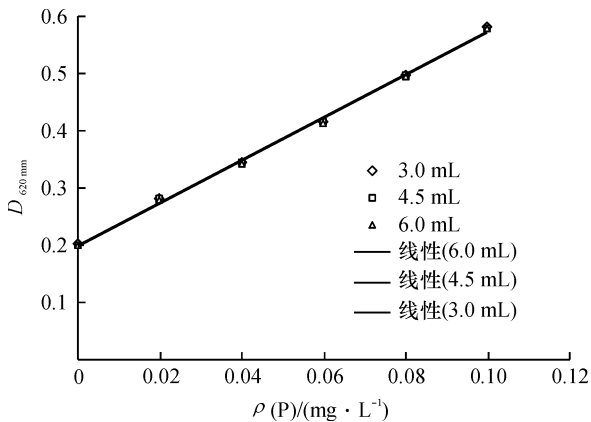


图 1 PVA 不同用量下的工作曲线

Fig. 1 Working curve with different doses of PVA

2) 孔雀绿用量的影响:试验发现,随着孔雀绿用量的增加,试剂空白相对于水的光密度均增加;孔雀绿相同用量条件下,络合物的光密度随磷标准溶液的质量浓度增加呈线性变化(图 2)。因孔雀绿是有色试剂,故加入的量应适宜,且加入过程中应保证操作的规范性,以减少试验误差。在 50 mL 容量瓶中加入 $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 孔雀绿溶液 3.00 mL, KCl 稀盐溶液光密度的大小和稳定性较理想。

2.1.3 提取剂用量对比色结果的影响 分别用 $0.02\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KCl 溶液和蒸馏水配制 $0.25\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷溶液,然后分别移取 40 mL 磷溶液到 50 mL 容量瓶中,按步骤加入试剂,显色 0.5 h 后比色。经多次试验表明,对于质量浓度为 $0.2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

从表 2 可以看出,波长在 615~625 nm 范围内,工作曲线的斜率较大,即相同质量浓度磷溶液的孔雀绿-磷钼杂多酸离子络合物在此波长范围内光密度较大,且相关系数在 0.999 2~0.999 4 之间,差别很小。低于或高于此波长范围,工作曲线的相关系数均降低。因此,615~625 nm 范围内的波长均是适宜的。本文选择 620 nm 为孔雀绿比色法的波长。

的磷钼酸络合物,加入 KCl 溶液和水二者的光密度的差值多在 ± 0.01 之内,两者的结果基本一致。因此在配制标准曲线时可以用蒸馏水代替 $0.02\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KCl 溶液,在保证试验精确度的前提下简化试验步骤。

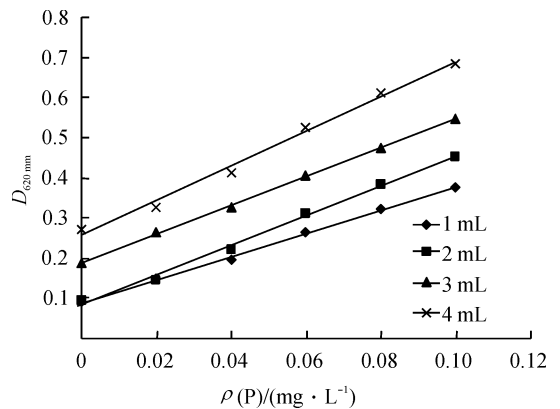


图 2 孔雀绿不同用量下的工作曲线

Fig. 2 Working curve with different doses of malachite green

2.1.4 工作曲线 配制标准曲线,发现 $\rho(P)$ 在 0~0.2 mg/L 范围内符合比耳定律,回归方程为 $A = 3.8943C + 0.001$,相关系数(r) = 0.999** ($n = 6$, A 为 $D_{620\text{ nm}}$, C 为磷的质量浓度)。摩尔吸光系数为 $1.21 \times 10^5\text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

2.2 提取条件的确定

2.2.1 土水比 为了探讨较为适宜的土水比,试验对比了土水比 [$m(\text{土})/\text{g}: V(\text{水})/\text{mL}$] 分别为 1:20 和 1:10 KCl (0.02 mol/L) 溶液时的结果及二者的相关性。

对比土水比 1:20 与 1:10 时的结果(表 3)可以发现,在 2 种条件下提取的速效磷量之间具有极显著的相关性,但 1:20 时提取的速效磷量明显高于 1:10,故土水比 1:20 为佳。

国内外关于土壤速效养分测定的常规分析方法中,土水比一般为 1:5 或 1:10,个别为 1.0:2.5 或

1:20^[2]. 对于大多数磷提取剂来说,土水比和土壤酸碱影响土壤磷提取效果,土壤 pH 高和较大的土水比均有可能降低磷的提取量^[11-12]. 土水比影响 CaCl₂

的提取效果,土水比减小,提取的 P 和 K 的数量增大,但不同土水比的提取数量间有较好的相关性^[13-14]. 本试验用 KCl 溶液提取也得到了相似的结果.

表3 不同土水比条件下测定的速效磷含量

Tab.3 Available P determined with different water-solution ratios

样品编号	不同土水比的速效磷 ¹⁾ /(mg·kg ⁻¹)		回归方程
	1:20	1:10	
2	2.94 ± 0.015 5	1.32 ± 0.035 8	Y = 1.083 4X + 1.180 0 r = 0.983 **, Y、X 分别为土水比为 1:20、1:10 的速效磷.
4	14.69 ± 0.269 7	12.63 ± 0.212 4	
5	0.18 ± 0.002 5	0.01 ± 0.000 8	
6	2.00 ± 0.067 7	0.52 ± 0.005 1	
7	2.46 ± 0.049 5	0.24 ± 0.007 2	
10	2.34 ± 0.107 2	0.19 ± 0.008 8	
11	0.26 ± 0.006 3	0.14 ± 0.005 6	
14	0.47 ± 0.006 3	0.12 ± 0.001 5	
18	4.65 ± 0.047 3	2.71 ± 0.023 5	

1) 土水比指 m(土)/g: V(水)/mL;表中数据为平均值 ± 标准误, n = 4.

2.2.2 提取时间 分别在震荡提取 0.5、1.5、6、24、48、72 h 后测定提取液的速效磷量,以寻找最佳振荡时间. 探讨液相磷与固相磷处于动态平衡所需的时间时,如果提取时间过短,少于平衡时间则速效磷不能完全被提取,使得结果小于实际情况;如果提取时间过长则影响试验进度,使得工作时间延长.

从表4可以看出,0.5 h 后从各土壤中提取的速效磷基本上都达到了平衡,0.5 h 后提取的磷量增加不显著. 有少量增加的原因可能是极少量缓效磷的释放,而这部分增加值可能不属于土壤速效磷的组成部分.

对不同振荡时间测得的速效磷含量进行回归分析,可以看出 0.5 h 的振荡时间与其他时间均有着很好的相关性,故选择振荡时间为 0.5 h.

2.2.3 KCl 溶液的浓度 分别用 0.01、0.02 和 0.03 mol·L⁻¹ KCl 溶液浸提 3 种土样,发现当 KCl 浓度在 0.01 ~ 0.03 mol·L⁻¹ 范围内时,从同一土样中提取的速效磷量基本相等,故选择浓度为 0.02 mol·L⁻¹ 的 KCl 溶液. 磷的吸附解吸曲线中多选用 0.01 mol·L⁻¹ CaCl₂ 溶液,根据离子数大概等同原则,用 0.02 mol·L⁻¹ KCl 溶液替代 0.01 mol·L⁻¹ CaCl₂ 溶液,经试验发现浓度为 0.02 mol·L⁻¹ 的 KCl 溶液适宜,这与张新明等^[5] 试验条件一致.

2.2.4 土壤粒度 任选几个不同利用方式的土壤样品,风干磨碎,分别过 2 和 1 mm 筛,探讨不同颗粒大小对提取结果的影响. 表 5 中,2 组数据 t 检验的双尾显著性概率(P) = 0.091 > 0.05,说明 2 种粒径

表4 不同提取时间下测定的结果

Tab.4 Analytical results with different extraction periods

样品编号	不同提取时间速效磷/(mg·kg ⁻¹)					
	0.5 h	1.5 h	6 h	24 h	48 h	72 h
1	4.94	5.03	5.14	5.25	4.82	5.77
2	2.72	2.84	3.19	2.81	2.87	2.82
3	10.79	10.85	11.03	10.01	11.19	11.17
4	18.84	19.58	19.78	19.79	19.71	19.31
5	0.23	0.15	0.25	0.29	0.27	0.19
6	2.43	2.46	2.51	2.68	2.63	2.71
7	0.80	0.92	0.81	0.80	0.61	0.81
8	0.36	0.34	0.35	0.35	0.37	0.36
9	0.51	0.53	0.56	0.58	0.63	0.61
10	0.41	0.40	0.41	0.40	0.42	0.42
11	0.42	0.42	0.44	0.44	0.45	0.45
12	0.37	0.38	0.38	0.37	0.39	0.39
13	0.65	0.64	0.66	0.64	0.66	0.66
14	0.42	0.45	0.44	0.47	0.42	0.53
15	0.29	0.30	0.33	0.27	0.34	0.31
16	0.44	0.43	0.45	0.48	0.45	0.49
17	2.15	2.18	2.23	2.21	2.47	2.56
18	5.63	5.72	5.65	5.44	5.70	5.57
平均值	2.91	2.98	3.03	2.96	3.02	3.06
相关系数 ¹⁾	0.999 9 ** 0.999 7 ** 0.998 2 ** 0.999 7 ** 0.999 2 **					

1) 与 0.5 h 平均值的相关系数,“**”表示在 0.01 水平极显著相关.

下的速效磷值没有显著差异,且二者相关系数为 1.0^{**} ($n=6$),说明2组数据呈极显著线性相关,故对于土样速效磷的提取,土样过2和1 mm筛均可。

表5 不同粒径对速效磷的影响

Tab. 5 Influences of different particle sizes on available phosphorus analysis

粒径/ mm	不同样品编号的速效磷/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)					P	相关 系数 ¹⁾
	2	4	5	6	18		
2	2.72	18.84	0.23	2.43	5.63	0.091	1.0^{**}
1	2.93	18.78	0.27	2.53	5.79		

1) “**”表示在0.01水平显著极相关。

2.3 试验的精密度和准确度及相关性分析

2.3.1 标准磷溶液的测定 按照孔雀绿比色方法的步骤,吸取磷标准溶液至25 mL容量瓶中,并按比例加入各种试剂进行缩合比色,溶液中最终的磷质量浓度分别为0.02、0.06和0.10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,测定并计算6次平行测定的误差大小,结果见表6。

表6 标准磷溶液中磷的测定结果

Tab. 6 Measured results of phosphorus in standard solution

样品编号	$\rho(\text{磷})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$		相对误差/%
	标准值	测定值	
1	0.02	0.0205	3.0
2	0.06	0.0608	1.7
3	0.10	0.1017	1.8

2.3.2 精密度 分别随机选取各种利用方式的土样各1个(编号分别为3、11和18),然后对每个土样

表8 土壤提取液对添加磷的回收率的影响

Tab. 8 Influences of soil extract on recovery rates of adding amounts phosphorus

样品 (编号)	提取液速效磷量/ μg			添加磷量/ μg	磷回收量/ μg			磷回收率/%			
	重复1	重复2	重复3		重复1	重复2	重复3	重复1	重复2	重复3	平均
菜园土(2)	0.51	0.53	0.53	3.00	3.02	3.07	2.98	100.7	102.3	99.3	100.8
水稻土(9)	0.71	0.67	0.68	3.00	2.94	2.91	2.97	98.0	97.0	99.0	98.0
旱地土(17)	0.53	0.50	0.53	3.00	2.97	2.95	3.01	99.0	98.3	100.3	99.2

2.3.5 与其他常用化学提取方法的相关性分析 由表9可见,各种测定方法之间均达极显著相关,表明KCl稀盐溶液提取易溶性磷的量与其他方法提取磷的量极显著相关,因此可以使用KCl稀盐溶液提取态磷表征土壤速效磷状况,再根据土壤速效磷含量、土壤和植株之间的相互反应制定磷素丰缺指标,用于指导平衡施肥。

进行7次平行测定,3个土样的精密度分别为0.733%、6.690%和1.550%。

2.3.3 速效磷测定的准确度 向50 mL容量瓶分别加入质量为1、3和5 μg 磷,用去离子水定容,进行回收率试验结果见表7。由表7可见,加入不同量的标准磷,都得到较好的回收率,且基本无差异,通过对相对标准差(RSD)的计算可知,磷含量越低,RSD越大,但都在试验允许的误差范围内,故该测定方法可靠。

表7 不同添加量测定的磷回收率

Tab. 7 The recovery rates of different adding amounts of phosphorus

重复	不同添加量测得磷量/ μg			磷回收率/%		
	1 μg	3 μg	5 μg	1 μg	3 μg	5 μg
1	1.01	3.04	4.99	101.0	101.3	99.8
2	1.03	3.02	5.11	103.0	100.7	102.2
3	1.04	3.07	5.04	104.0	102.3	100.8
4	1.01	2.98	5.09	101.0	99.3	101.8
5	0.97	3.03	5.08	97.0	101.0	101.6
平均值	1.01	3.03	5.06	101.2	100.9	101.2

2.3.4 土壤提取液的磷回收率 吸取一定体积的土壤提取液(水稻土吸取20 mL,其他土吸取5 mL)于50 mL容量瓶中,然后加入3.00 μg 磷,对各样品的磷回收率测定结果见表8。表8数据表明,加入土壤提取液后,磷的回收率在98%~101%之间,符合要求,说明土壤溶液对速效磷的测定无影响,故该方法适合土壤速效磷的测定。

表9 几种提取方法有效磷之间的相关性¹⁾

Tab. 9 Correlationship between available phosphorus concentrations with different extraction methods

提取方法	Olsen	Bray- I	Mehlich-3	KCl稀盐溶液
Olsen	1			
Bray- I	0.986 9**	1		
Mehlich-3	0.983 5**	0.995 0**	1	
KCl稀盐溶液	0.943 3**	0.939 0**	0.921 0**	1

1) “**”表示在0.01水平极显著相关。

3 讨论与结论

孔雀绿法与传统的钼蓝法相比,测定结果无明显差异,但灵敏度明显提高,检测限降低. 研究结果表明,磷钼杂多酸-孔雀绿显色体系的最大吸收波长为 620 nm,测定时选择在 615 ~ 630 nm 之间均可,摩尔吸光系数为 $1.21 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\rho(\text{P})$ 在 0 ~ 0.2 mg/L 范围内符合比耳定律,线性回归方程为 $A = 3.8943C + 0.001$ (C 为溶液中磷质量浓度, A 为 620 nm 处缔合物的光密度),相关性良好 ($r = 0.999^{**}$).

聚乙烯醇存在的条件下,孔雀绿-磷钼杂多酸离子缔合物最大吸收峰位于 635、645 及 590 nm 处,这可能与比色液不同酸度及试剂的生产厂家不同有关,经试验发现波长在 610 ~ 630 nm 之间光密度差异不显著,因此波长在此范围均可.

本试验所得摩尔吸光系数比其他报道 ($8.5 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)^[15] 偏大,可能是孔雀绿用量的差异所致. 在实际测定中由于个人习惯的差异,所加试剂也会稍有不同,因此需自行配制标准曲线而不能套用上述回归方程和摩尔吸光系数.

显色液中各溶质的最终浓度为: $0.48 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$, $0.024 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 钼酸铵, $0.06 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 酒石酸锑钾, 乳化剂为 $0.45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PVA, 孔雀绿为 $0.06 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. 由于加入试剂较多,在不影响试验结果的前提下为了方便操作,可用 $4.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ 、 $0.20 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 钼酸铵, $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 酒石酸锑钾配制试剂 I, 用 $7.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PVA 和 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 孔雀绿配制试剂 II. KCl 溶液和水溶液比色结果基本一致. 因此在配制标准曲线时可以用蒸馏水代替 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 溶液,在保证试验精确度的前提下简化试验步骤.

聚乙烯醇用量对显色反应的影响:聚乙烯醇保护胶存在下,碱性染料孔雀绿与磷钼酸形成稳定的缔合物. 聚乙烯醇对光密度无显著影响,但是由于缔合物具有疏水性,易凝聚沉淀致使光密度不稳定,故加入适量聚乙烯醇从而起到促溶增稳作用. 聚乙烯醇可使处于高黏度溶剂中的缔合物上苯环的弛豫过程受阻,从而使溶液颜色不容易褪去^[16].

孔雀绿用量对显色反应的影响:在磷钼二元杂多酸中引入具有强共轭效应的碱性染料大分子形成离子缔合物,可使经典的“钼黄”或“钼蓝”光度法灵敏度大为改观^[17]. 加入孔雀绿后光密度明显增加,该方法的灵敏度是钼蓝法的 3 倍多^[8]. 但是由于孔雀绿本身是有色溶剂,加入孔雀绿过多会导致空白光密度陡增,故加入的量应适宜.

提取剂用量对显色反应的影响:一般而言,配制标准曲线时也应加入相应的提取剂以与土壤提取液保持一致,消除由于提取剂影响产生的误差. 但经试验发现 KCl 溶液和水溶液比色结果基本一致,因此在配制标准曲线时可以用蒸馏水代替 0.02 mol/L 的 KCl 溶液,在保证试验精确度的前提下简化试验步骤.

在土水比 1:20、振荡时间为 0.5 h、提取剂 KCl 的浓度为 0.02 mol/L 的提取条件下, KCl 溶液提取土壤速效磷的准确度和精密度都较高. 提取结果与常规方法相关性显著. 本方法相对标准偏差在 1.0% ~ 2.0% ($n=6$),磷的回收率在 97.0% ~ 104% 之间,土壤提取液的磷回收率在 97.0% ~ 102.3% 之间,磷检出限为 0.002 mg/L . 其准确度和精密度均较高,因此是一种方便易行、准确可靠的分析方法,适合 KCl 溶液提取磷的测定,即适合稀盐溶液或水样中微量磷的分析^[6]. 且在配制标准曲线时可以用蒸馏水代替 0.02 mol/L 的 KCl 溶液.

需要注意的是孔雀绿具有高毒、高残留、致癌、致畸、致突变等副作用,在人体残留时间长,对人体的危害是积蓄式的,应用时应加以防护,即使用该方法需戴上橡胶手套,妥善回收废液并交有毒废液回收站处理.

参考文献:

- [1] 段秀泰. 土壤速效磷三种测定方法的比较[J]. 江苏农业科学, 1984(3): 35-37.
- [2] 中国土壤学会农业化学专业委员会. 土壤农业化学常规分析方法[M]. 北京: 科学出版社, 1983: 127-130.
- [3] 中国科学院南京土壤研究所. 土壤理化分析[M]. 上海: 上海科学技术出版, 1980: 208-210.
- [4] PAGE A L. Methods of soil analysis: Chemical and microbiological properties: Part 2[M]. 2nd Ed. Madison: Amer Society of Agronomy, 1983.
- [5] 张新明, 李华兴, 刘远金. 广东省主要母质发育水稻土对磷的吸附特性[J]. 应用生态学报, 2000, 11(4): 553-556.
- [6] 周志高, 熊礼明. 用孔雀绿法测定石灰性土壤水溶性磷[J]. 土壤通报, 1998, 29(5): 218-219.
- [7] OHNO T, ZIBILSKA L M. Determination of low concentrations of phosphorus in soil extracts using malachite green[J]. Soil Sci Soc Am J, 1991, 55(3): 892-895.
- [8] NOVOZAMSKY I, DVAN D, JVAN D L. Automated determination of trace amounts of phosphate in soil extracts using malachite green[J]. Commun Soil Sci Plant Anal, 1993, 24(9/10): 1065-1076.
- [9] MASSON P, MOREL C, MARTIN E, et al. Comparison

- of soluble P in soil water extracts determined by ion chromatography, colorimetric, and inductively coupled plasma techniques in ppb range [J]. *Commun Soil Sci Plant Anal*, 2001, 32(13/14): 2241-2253.
- [10] 唐启义, 冯明光. DPS 数据处理系统软件(版本号: 8.01, 著作权登记号: 2003SR1788) [M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [11] SIMONIS A D. Effect of pH and solvent/soil ratio on extraction of phosphorus from soils by various extracting solutions [J]. *Commun Soil Sci Plant Anal*, 1996, 27(5/6/7/8): 935-958.
- [12] CHAPMAN P J, EDWARDS A C, SHAND C A. The phosphorus composition of soil solutions and soil leachates: Influence of soil: solution ratio [J]. *Euro J Soil Sci*, 1997, 48(4): 703-710.
- [13] HYLANDER L D, SVENSSON H, SIMAN G. Different methods for determination of plant available soil phosphorus [J]. *Commun Soil Sci Plant Anal*, 1996, 27(5/6/7/8): 1501-1512.
- [14] VAN ERP P J, HOUBA V J G, BEUSICHEM M L V. One hundredth molar calcium chloride extraction procedure: Part I: A review of soil chemical, analytical, and plant nutritional aspects [J]. *Commun Soil Sci Plant Anal*, 1998, 29(11/12/13/14): 1603-1623.
- [15] 王永强, 刘泽菊. 磷钼杂多酸-孔雀绿分光光度法测定水中微量磷 [J]. *陕西化工*, 1999, 28(2): 34-37.
- [16] 张英, 韩权, 阎宏涛. 测定痕量磷的激光热透镜光谱法-钼蓝法与孔雀绿法的比较 [J]. *分析测试学报*, 2001, 20(5): 24-27.
- [17] 张红琴, 许生杰. 碱性染料杂多酸多元配合物显色反应的研究 [J]. *分析化学*, 1990, 18(8): 710-714.

【责任编辑 周志红】

(上接第 17 页)

- [3] LUO S J, KIM J H, JOHNSON W E, et al. Phylogeography and genetic ancestry of tigers (*Panthera tigris*) [J]. *PLoS Biol*, 2004, 2(12): 2275-2293.
- [4] 陈诗书, 汤雪明. 医学细胞与分子生物学 [M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1996.
- [5] WHITE D J, WOLFF J N, PIERSON M, et al. Revealing the hidden complexities of mtDNA inheritance [J]. *Mol Ecol*, 2008, 17(23): 4925-4942.
- [6] 郑涛. 云豹线粒体 DNA 全序列及中国 13 种猫科动物的系统发生关系分析 [D]. 芜湖: 安徽师范大学, 2006.
- [7] 张文平, 张志和, 沈富军, 等. 华南虎、东北虎、孟加拉虎的 D-loop 和 ND5 序列及其在系统进化分析中的应用 [J]. *四川动物*, 2005, 24(1): 22-26.
- [8] 韦鸥. 圈养华南虎线粒体基因 NADH 脱氢酶亚基 5 序列多态性研究 [D]. 成都: 四川大学, 2006.
- [9] 张方, 米志勇. 动物线粒体 DNA 的分子生物学研究进展 [J]. *生物工程进展*, 1998, 18(3): 25-31.
- [10] NEI M. *Molecular evolutionary genetics* [M]. New York: Columbia University Press, 1987.
- [11] WILSON A C, CARLSON S S, WHITE T J. *Biochemical evolution* [J]. *Annu Rev Biochem*, 1977, 46(1): 573-639.
- [12] BALL R M, FREEMAN S, JAMES F C, et al. Phylogeographic population structure of red-winged blackbirds assessed by mitochondrial DNA [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(5): 1558-1562.
- [13] CARR S M, BALLINGER S W, DERR J N, et al. Mitochondrial DNA analysis of hybridization between sympatric white-tailed deer and mule deer in west texas [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83(24): 9576-9580.
- [14] ASHLEY M V, MELNICK D J, WESTERN D. Conservation genetics of the black rhinoceros (*Diceros bicornis*): I: Evidence from the mitochondrial DNA of three populations [J]. *Conservation Biology*, 1990, 4(1): 71-77.
- [15] 吴平, 周开亚, 王亚明. 用 RFLP 和 PCR2RFLP 技术研究东北虎和华南虎线粒体 DNA 多态性 [J]. *生物多样性*, 1997, 5(3): 173-178.
- [16] KIMBALL R T, BRAUN E L, ZWARTJES P W. A molecular phylogeny of the pheasants and part-ridges suggests that these lineages are not monophyletic [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 1999, 11(1): 38-54.
- [17] 谭邦杰. 虎在中国的分布 [J]. *中国动物园年刊*, 1986(1985/1986): 165-170.

【责任编辑 柴 焰】