

土壤总磷/有机磷/无机磷含量测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注 意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

土壤总磷包括有机磷和无机磷，其中无机磷能够直接被植物利用。土壤有机磷经过矿化分解而转化为无机磷。同时测定土壤总磷、有机磷和无机磷，可以全面反映土壤磷营养状况。

测定原理：

利用钼蓝法定磷。取一份土样，通过浸提法测定土壤无机磷含量；另外取一份土样，经高温灼烧后，土壤有机磷转化为无机磷，测得土壤总磷含量；总磷含量减去无机磷含量，即可计算出有机磷含量。

自备仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、台式离心机、可调式水浴锅，分析天平、可调式移液器、550℃高温电炉、蒸馏水、100 目筛子（可更小）。

试剂组成和配制：

试剂一：液体×1 瓶，4℃保存。临用前用蒸馏水稀释 10 倍后再用。

试剂二：液体×1 瓶，4℃保存。

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃避光保存。临用前配制，加入 8mL 蒸馏水，充分溶解后加入 4mL 试剂二，混匀。

标准品：液体×1 支，20 μmol/L 无机磷标准品，4℃保存。

土壤不同形态磷提取：

- 1. 无机磷：**称取通过 100 目筛子的风干土样 0.01g，转移到 1mL 离心管，加入 1mL 试剂一，震荡混匀，然后置于 45℃水浴 1h，8000g，25℃离心 10min，取上清液一，用于无机磷含量测定。
- 2. 总磷提取：**取通过 100 目筛子的风干土样，550℃灼烧 1h，冷却后称取约 0.01g，转移到 1 mL 离心管，加入 1mL 试剂一，震荡混匀，然后置于 45℃水浴 1h，8000g，25℃离心 10min，取上清液二，用于总磷含量测定。

测定步骤：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min，调节波长到 660 nm，蒸馏水调零。
2. 打开水浴锅，调节温度到 40℃。
3. **空白管：**取 EP 管，依次加入 100μL 蒸馏水，100μL 试剂三，混匀后置于 40℃水浴保温 10min，室温冷却 10 min 后于 660 nm 测定吸光度，记为 A 空白管。
4. **标准管：**取 EP 管，依次加入 10μL 标准液，90μL 蒸馏水，100μL 试剂三，混匀后置于 40℃水浴保温 10min，室温冷却 10 min 后于 660 nm 测定吸光度，记为 A 标准管。
5. **测定管：**取 EP 管，依次加入 10μL 上清液一或者上清液二，90μL 蒸馏水，100μL 试剂三，混匀后置于 40℃水浴保温 10min，室温冷却 10 min 后于 660 nm 测定吸光度，记为 A 测定管。

注意：空白管和标准管只需测定一次。

土壤磷含量计算：**a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下**

$$\begin{aligned} 1. \text{土壤无机磷含量} (\mu\text{mol/g 干重}) &= [C \text{ 标准液} \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白})] \times V \text{ 总} \div W \\ &= 0.02 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W \end{aligned}$$

C 标准液：20 μmol/L； W：土壤样品质量，g； V 总：上清液一总体积，1 mL=0.001 L。

$$\begin{aligned} 2. \text{土壤总磷含量} (\mu\text{mol/g 干重}) &= [C \text{ 标准液} \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白})] \times V \text{ 总} \div W \\ &= 0.02 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W \end{aligned}$$

C 标准液：20 μmol/L； W：土壤样品质量，g； V 总：上清液二总体积，1 mL=0.001 L。

$$3. \text{土壤有机磷} (\mu\text{mol/g 干重}) = \text{土壤总磷} - \text{土壤无机磷}$$

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下

$$\begin{aligned} 1. \text{土壤无机磷含量} (\mu\text{mol/g 干重}) &= [C \text{ 标准液} \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白})] \times V \text{ 总} \div W \\ &= 0.02 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W \end{aligned}$$

C 标准液：20 μmol/L； W：土壤样品质量，g； V 总：上清液一总体积，1 mL=0.001 L。

$$\begin{aligned} 2. \text{土壤总磷含量} (\mu\text{mol/g 干重}) &= [C \text{ 标准液} \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白})] \times V \text{ 总} \div W \\ &= 0.02 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W \end{aligned}$$

C 标准液：20 μmol/L； W：土壤样品质量，g； V 总：上清液二总体积，1 mL=0.001 L。

$$3. \text{土壤有机磷} (\mu\text{mol/g 干重}) = \text{土壤总磷} - \text{土壤无机磷}$$

注意事项：

试剂三配制过程中，可能会产生黑色固体，其不影响结果，注意吸取时不要将黑色固体吸入。