

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

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

C 标准液: 20 $\mu\text{mol/L}$; W: 土壤样品质量, g; V 总: 上清液一总体积, 1 mL=0.001 L。

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

C 标准液: 20 $\mu\text{mol/L}$; W: 土壤样品质量, g; V 总: 上清液二总体积, 1mL=0.001 L。

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

4.

b.使用 96 孔板测定的计算公式如下

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

C 标准液: 20 $\mu\text{mol/L}$; W: 土壤样品质量, g; V 总: 上清液一总体积, 1 mL=0.001 L。2. 土壤总磷含量

($\mu\text{mol/g}$ 干重) $=[\text{C 标准液} \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白})] \times \text{V 总} \div \text{W}$
 $=0.02 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{W}$

C 标准液: 20 $\mu\text{mol/L}$; W: 土壤样品质量, g; V 总: 上清液二总体积, 1mL=0.001 L。

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