

矿物源腐植酸肥料中可溶性腐植酸快速检测方法研究

张馨予, 陈芳, 郝晓莉*, 卜庆状, 李丽娜

(辽宁省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 采用分光光度法检测矿物源腐植酸肥料中可溶性腐植酸含量, 讨论在检测过程中样品的称取质量、离心条件、重铬酸钾浓度以及氧化时间对检测结果的影响。进行了方法验证, 计算出方法检出限为 4.27%, 相对标准偏差为 2.1% ~ 11.6%, 加标回收率为 95% ~ 106%。

关键词: 腐植酸; 可溶性; 快速检测

腐植酸是脂肪族和芳香族有机高分子化合物的非均相混合物, 含有丰富的含氧官能团。具有土壤改良和生态环境优化方面的性能。同时, 它也能够为植物提供良好的生长环境。在农业生产上起到增产、增收, 改善农产品品质等作用^[1-3]。可溶性腐植酸是衡量腐植酸肥料和腐植酸盐产品应用性能的主要质量指标^[4-6]。目前对可溶性腐植酸测定的方法主要有重量法、容量法等^[6-16], 本文采用分光光度法测定有机碳含量进而对可溶性腐植酸碳含量^[17]进行测定, 并探讨了影响可溶性腐植酸含量测定的几个因素。

1 材料与方法

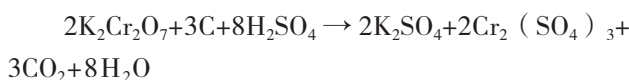
1.1 仪器与试剂

UV-2550 紫外可见分光光度计 (日本岛津)、JE502 分析天平、TDL-40B 离心机 (安亭科学)、硫酸、重铬酸钾、苯甲酸钠 (化学试剂均采用分析纯)。

1.2 实验原理

用蒸馏水提取含矿物源腐植酸样品中的可溶性腐植酸, 得到的提取液在酸性条件下沉淀, 分离去除非腐植酸的可溶性物质。在高温和强酸条件下, 腐植酸中的有机碳成分被过量的重铬酸钾溶液和硫酸溶液氧化, 使 $K_2Cr_2O_7$ 中的 Cr^{6+} 被还原成 Cr^{3+} , 而 Cr^{3+} 含量与腐植酸中有机碳含量呈正相关, 在某一波长处测定吸光度, 按照 Cr^{3+} 的含量计算有

机碳的含量。过程化学反应原理如下:



1.3 实验步骤

1.3.1 校准曲线的绘制

苯甲酸钠标准溶液的配制: 称取 105℃ 烘干 2 h 的苯甲酸钠 ($C_6H_5CO_2Na$, 分析纯) 8.5714 g (准确至 0.1 mg), 加水溶解后用水定容到 1 L。

分别用移液管移取苯甲酸钠标准溶液 [$c(C) = 5.000 \text{ g/L}$] 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL 至 50 mL 玻璃试管中, 然后加入 2.5、2.0、1.5、0.5、0 mL 水补至 2.5 mL, 相应碳含量分别为 0、2.5、5.0、7.5、10.0、12.5 mg。向试管中准确加入 5 mL 重铬酸钾溶液 [$c(1/6 K_2Cr_2O_7) = 1 \text{ mol/L}$], 然后沿管壁缓慢加入 8 mL 硫酸, 避免溅出, 轻轻摇匀。将试管置于 $(100 \pm 2)^\circ\text{C}$ 恒温箱中, 加热氧化 90 min 后将试管取出, 放入冷水中冷却至室温, 将试管内液体全部转移至 50 mL 容量瓶中, 定容、摇匀。在 590 nm 波长处测定吸光度值, 以测定的吸光度值对有机碳含量绘制校准曲线。

1.3.2 试样提取

称取 1 g 样品于 300 mL 锥形瓶中, 加入 70 mL 蒸馏水, 沸水浴中加热, 冷却后离心分离, 将离心后的上清液转移至 250 mL 容量瓶中, 用水分多次洗涤锥形瓶中残渣至离心管中, 对沉淀物进行洗涤离心, 至可溶物萃取率大于 98% (固液体积比 = 1:10, 洗涤两次, 每次洗涤要将沉淀物摇匀), 合并上清液于 250 mL 容量瓶中, 加水定容, 备用。吸取容量瓶中试样 10 mL (样品碳含量大于 30%, 可根据样品碳含量适当减少吸取量), 用 $pH=0$ ^[18]

收稿日期: 2020-05-13; 录用日期: 2020-06-23

基金项目: 辽宁省科学事业公益研究基金项目“可溶性腐植酸含量快速检测新技术研究”(GY20180017)。

作者简介: 张馨予 (1984-), 女, 辽宁抚顺人, 助理研究员, 硕士, 研究方向为农产品质量安全。E-mail: zxyym19840417@163.com。

通讯作者: 郝晓莉, E-mail: xiao-li-hao@163.com。

的硫酸溶液 4 mL 酸化后离心, 离心后的沉淀再用 pH=1^[18] 的硫酸溶液洗涤, 保留沉淀物。

1.3.3 试样测定

根据 1.3.1 的操作步骤依次向 1.3.2 操作步骤提取出的沉淀物内准确加入 5 mL 重铬酸钾溶液 [$c(1/6 K_2Cr_2O_7) = 1 \text{ mol/L}$], 然后沿管壁缓慢加入 8 mL 硫酸, 避免溅出, 轻轻摇匀。将试管置于 $(100 \pm 2)^\circ\text{C}$ 恒温箱中, 加热氧化 90 min 后将试管取出, 放入冷水中冷却至室温, 将试管内液体全部转移至 50 mL 容量瓶中, 定容、摇匀。最后取定容液进行吸光度测定。同时做空白实验。

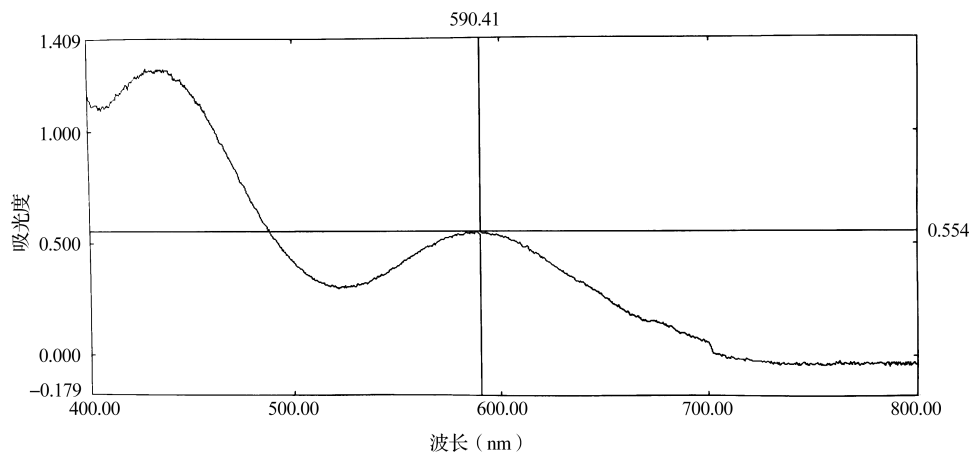


图 1 最大吸收波长扫描

2.2 称样量的确定

本实验考察了 0.5、1.0、2.0、5.0 g 取样量的提取情况。取样量为 0.5 g 时, 由于取样量过小, 样品代表性较差; 取样量为 2.0 g 时, 根据实验方案进行验证, 腐植酸含量较高的样品吸光度超出曲线范围较大; 取样量为 5.0 g 时, 部分样品不能完全提取。因此本实验选择样品取样量为 1.0 g。结果见表 1。

表 1 不同取样量可溶性腐植酸碳含量 (%)

名称及编号	来源	取样量 (g)			
		0.5	1.0	2.0	5.0
腐植酸钾 (1)	辽宁	29.98	29.83	29.72	27.49
腐植酸钾 (2)	山东	30.16	30.28	30.24	29.21
腐植酸钠 (1)	山东	29.53	29.64	29.59	27.88
腐植酸钠 (2)	山西	29.82	29.79	29.74	28.01
含腐植酸有机肥	宁夏	8.36	8.53	8.66	8.58
含腐植酸复合肥	辽宁	5.23	5.28	5.26	5.29
平均碳含量		22.18	22.22	22.20	21.08

2 结果与分析

2.1 吸收波长的确定

苯甲酸钠标准溶液被过量的重铬酸钾溶液和硫酸溶液氧化后, 对其进行 400 ~ 800 nm 波长扫描, 结果见图 1。可以看出 434 和 590 nm 处为吸光度峰值。其中 434 nm 处是重铬酸钾溶液的 Cr^{6+} 吸光度值^[19], 590 nm 处是苯甲酸钠溶液中有机碳与重铬酸钾发生氧化反应后生成的 Cr^{3+} 的吸光度值^[19], 因此测试波长选择 590 nm。

2.3 离心条件

实验选取同一种样品, 在不同离心时间下进行提取, 测定样品含量, 离心 10 min 与离心 20、30 min 的分离情况基本相同, 已经满足分离条件, 因此选择离心时间为 10 min。结果见表 2。

表 2 不同离心时间可溶性腐植酸碳含量

离心时间 (min)	10	20	30
碳含量 (%)	22.88	22.84	22.93

本实验在样品沉淀过程中对玻璃离心管和塑料离心管进行了考察, 在用塑料离心管进行绘制曲线的过程中发现曲线无法成线性, 可能由于氧化过程中加入硫酸且在烘箱中以 100°C 加热 90 min, 塑料离心管中的物质有溶出, 因此实验采用玻璃离心管。

根据参考文献^[7, 13], 用玻璃离心管离心选择 3000 ~ 4000 r/min 的转速, 实验过程选取了 3000、3500、4000 r/min 进行考察, 发现 3000 r/min 与 3500、4000 r/min 的分离情况基本相同, 已经满足分离条件, 因此选择离心转速为 3000 r/min。结果见表 3。

表 3 不同离心速度可溶性腐植酸碳含量

离心转速 (r/min)	3000	3500	4000
碳含量 (%)	22.74	22.70	22.75

2.4 重铬酸钾浓度的选择

实验选取了 0.4、0.8、1.0 mol/L 重铬酸钾溶液浓度进行考察,在移取相同体积的重铬酸钾溶液条件下,0.4 mol/L 重铬酸钾溶液只能将标准曲线中含量为 2.5、5.0 mg 的有机碳完全氧化,不能完全氧化 7.5、10.0、12.5 mg 的有机碳。0.8 mol/L 重铬酸钾溶液可与含量为 2.5、5.0、7.5、10.0 mg 的有机碳发生完全氧化反应,不能完全氧化 12.5 mg 的有机碳。因此重铬酸钾溶液的浓度定为 1.0 mol/L。结果见图 2。

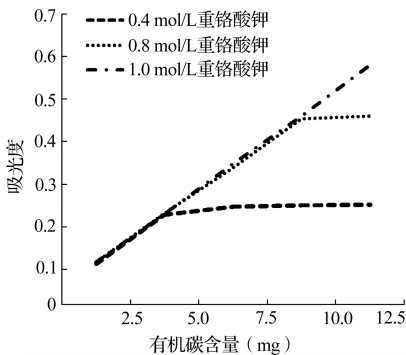


图 2 不同浓度重铬酸钾反应曲线

2.5 氧化时间

实验选取 30、60、90、120 min 为氧化时间进行考察,从不同氧化时间校准曲线对比可看出,30 min 氧化时间校准曲线,在 7.5、10.0、12.5 mg 的有机碳未能反应完全,不能作为本实验氧化时间;60 min 氧化时间校准曲线,12.5 mg 的有机碳未能反应完全,不能作为本实验氧化时间;90 和 120 min 的氧化时间校准曲线,校准曲线各点都已反应完全,两条校准曲线的相关系数 r 分别为 0.9995 和 0.9998,线性范围较好,选择 90 min 作为校准曲线的氧化时间。结果见图 3。

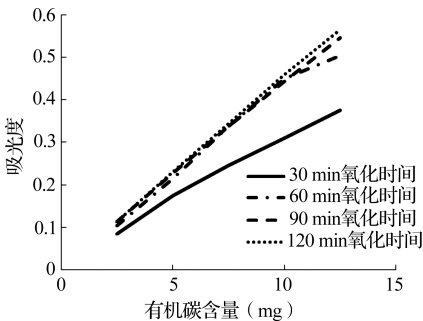


图 3 不同氧化时间的校准曲线

3 方法验证

3.1 校准曲线

按照 1.3.1 校准曲线的操作步骤,绘制和校准曲线如图 4 所示,校准曲线为 $y=0.0463x-0.0004$,相关系数为 0.99995,符合实验要求。

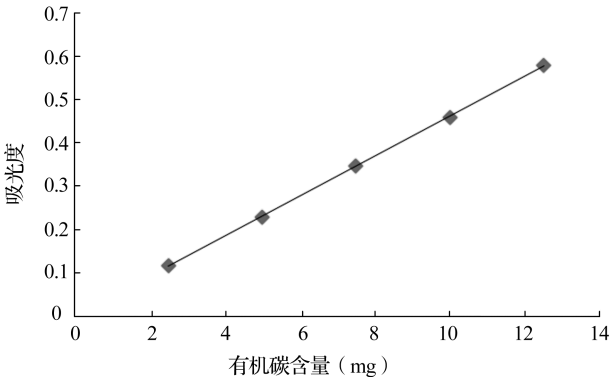


图 4 有机碳校准曲线

3.2 方法检出限

按照 1.3.3 试样测定的操作步骤,做了 7 个空白实验,以 $MDL=3.143 \times S^{[20]}$ (MDL 为方法检出限, S 为标准偏差) 计算出 MDL 。结果如表 4 所示, MDL 为 4.27%。

表 4 方法检出限

测定次数	吸光度	测定值 (%)
1	0.025	23.69
2	0.024	22.75
3	0.022	21.03
4	0.025	23.87
5	0.022	21.11
6	0.024	22.85
7	0.026	24.58
标准偏差	—	1.36
方法检出限	—	4.27

3.3 精密度

按照 1.3.3 试样测定的操作步骤,做了 18 个实验,分别配制 3 个不同浓度的含量 1 样品、含量 2 样品及含量 3 样品,做 6 次平行实验得到精密度,结果如表 5 所示,3 个不同含量样品的相对标准偏差分别是 11.6%、8.3%、2.1%。

表 5 精密度

测定次数	含量 1 样品		含量 2 样品		含量 3 样品	
	吸光度值	测定值 (mg)	吸光度值	测定值 (mg)	吸光度值	测定值 (mg)
1	0.033	0.17	0.053	0.60	0.116	1.97
2	0.033	0.17	0.049	0.52	0.118	2.01
3	0.035	0.22	0.047	0.47	0.114	1.92
4	0.034	0.19	0.049	0.52	0.114	1.92
5	0.034	0.19	0.051	0.56	0.118	2.01
6	0.035	0.22	0.049	0.52	0.115	1.94
平均值	—	0.19	—	0.53	—	1.96
标准偏差 (%)	0.022		0.044		0.042	
相对标准偏差 (%)	11.6		8.3		2.1	

3.4 回收率

按照 1.3.3 试样测定的操作步骤，依旧做了 18 个实验，分别在样品中加入一定量标准溶液，并

配制成 3 个不同浓度、各 6 个样品，结果如表 6 所示，3 个不同加标含量样品的加标回收率分别是 90%、106%、102%。

表 6 回收率

测定次数	含量 1 样品		含量 2 样品		含量 3 样品	
	吸光度值	测定值 (mg)	吸光度值	测定值 (mg)	吸光度值	测定值 (mg)
1	0.192	0.23	0.204	0.50	0.272	2.06
2	0.188	0.14	0.204	0.50	0.274	2.11
3	0.190	0.18	0.203	0.48	0.270	2.02
4	0.190	0.18	0.207	0.57	0.268	1.97
5	0.188	0.14	0.205	0.53	0.270	2.02
6	0.191	0.21	0.207	0.57	0.273	2.09
平均值	—	0.18	—	0.53	—	2.04
加标量 (mg)	0.2		0.5		2	
回收率 (%)	90		106		102	

3.5 数据比对

将本方法与国标 GB/T 35107-2017 法进行比对，测定可溶性腐植酸碳含量，从两种方法数据结果看，两组数据基本相同，说明本实验方法数据可靠，但相对国标法测定数值较高，分析其原因，可能是离心分离较过滤分离损失更小，且仪器分析的灵敏度更高，人为干预因素降低造成的，结果见表 7。

表 7 不同方法测定可溶性腐植酸碳含量 (%)

方法	可溶性腐植酸碳含量					
本实验法	29.83	30.28	29.64	29.79	8.53	5.28
国标法	29.76	30.19	29.65	29.74	8.54	5.21

4 小结

本方法改进了国标方法中的分离方法，采用离心法代替过滤法，从而缩短提取分离的时间。与重

量法和容量法相比，本方法因具备校准曲线和加标的质量控制手段，以及依靠仪器测试避免人为主观误差，从而具有更高的精密性和准确性。对于批量样品的测定在保证准确度的情况下大大提高了工作效率。

参考文献：

[1] 杜容容, 刘利, 边思梦, 等. 腐植酸仪器分析方法研究进展 [J]. 应用化工, 2018, 47 (12): 2505-2513.

[2] 王丽. 腐植酸在植物保护领域的应用探讨 [J]. 中国农业信息, 2016 (12): 120, 132.

[3] 杨雪贞, 王贺鹏, 康锁倩, 等. 腐植酸在农业领域的应用成果分析 [J]. 腐植酸, 2012 (1): 49-65.

[4] 邹德乙. 腐植酸的概念与腐植酸分类问题的探讨 [J]. 腐植酸, 2011 (4): 44-48.

[5] 马志军. 对腐植酸在肥料应用中检测方法的几点意见 [J]. 腐植酸, 2004 (4): 11-12.

[6] GB/T 35107-2017, 矿物源腐植酸肥料中可溶性腐植酸含量的测定 [S].

- [7] 李爽. 不同来源腐植酸提取条件优化及其生物活性研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2016. 1-46.
- [8] 彭丽, 刘洁玲, 杨志山. 臭氧处理饮用水腐植酸效果的光谱检测比较研究 [J]. 绿色科技, 2013 (3): 131-133.
- [9] 贾启高, 杨建军, 吴修刚, 等. 阳离子褐煤中腐植酸及阳离子含量测定方法 [J]. 山东化工, 2011, 40 (7): 42-45.
- [10] 冯苍旭, 刘军, 张磊, 等. 水中腐植酸现场快速检测方法实验研究 [J]. 中国地质, 2010, 37 (3): 831-834.
- [11] 沈月. 水溶肥料中腐植酸含量测定的研究 [J]. 腐植酸, 2017 (6): 28-31.
- [12] 郝晓莉, 张馨予, 韩静, 等. 矿物源腐植酸肥料中可溶性腐植酸的测定方法研究 [J]. 辽宁农业科学, 2015 (3): 23-26.
- [13] NY/T 1971-2010, 水溶肥料 腐植酸含量的测定 [S].
- [14] HG/T 3276-2012, 腐植酸铵肥料分析方法 [S].
- [15] HG/T 3278-2018, 腐植酸钠 [S].
- [16] DB51/T 842-2008, 肥料中腐植酸含量的测定 重铬酸钾氧化法 [S].
- [17] 邹德乙, 郭书利, 张征, 等. 腐植酸、黄腐酸碳系数和检测方法存在的问题及改进意见 [J]. 腐植酸, 2013 (4): 54-56.
- [18] 郭书利, 邹德乙, 张美丽, 等. 风化煤、褐煤、泥炭腐植酸原料中提取腐植酸方法的改进 [J]. 腐植酸, 2013 (3): 6-11.
- [19] 田云飞, 安俊芳, 陶士敏. 重铬酸钾氧化-分光光度法测定土壤有机碳含量的研究 [J]. 现代化工, 2020, 40 (4): 231-235.
- [20] HJ 168-2010, 环境监测分析方法标准制修订技术导则 [S].

Study on the rapid detection method of soluble humic acid in mineral humic acid fertilizer

ZHANG Xin-yu, CHEN Fang, HAO Xiao-li*, BU Qing-zhuang, LI Li-na (Institute of Agricultural Quality Standards and Testing Technology, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang Liaoning 110161)

Abstract: The content of soluble humic acid in mineral humic acid fertilizer was determined by spectrophotometry. The influence of sample weight, centrifugation conditions, concentration of potassium dichromate and oxidation time on the test results were discussed. The detection limit of the method is calculated as 4.27%, and the relative standard deviation is 2.1% ~ 11.6%. The recovery rate of standard material is 95% ~ 106%.

Key words: humic acid; soluble; rapid detection