

正交试验优化分光光度法测定森林土壤有机质

辜忠春, 李光荣, 李军章, 杜业云, 王 宵

(湖北省林业科学研究院 国家林业局林产品质量检验检测中心(武汉), 湖北 武汉 430075)

摘要: 为实现快速准确测定森林土壤有机质, 以土壤标准物质为试验对象, 在外加热条件下, 以重铬酸钾氧化土壤有机质, 铬(VI)被还原为铬(III), 用分光光度计测定铬(III)吸光度, 与标准系列比较定量即可得出有机质质量分数。基于正交试验, 考察不同消解温度、消解时间、硫酸用量等消解条件对测定结果的影响。结果表明: 消解温度为 135 °C, 消解时间为 60 min, 硫酸用量为 6 mL 为样品消解的最佳参数, 测定有机质质量分数在标准认定值范围内, 相对标准偏差($n=6$)为 1.3%, 相对误差为 -0.6%, 加标回收率为 95.2%~98.6%, 方法检出限 $L_{MD}=0.5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 与现行林业行业标准方法的测定结果进行比较, 经 t 检验, 无显著性差异。该方法可以满足批量森林土壤有机质的测定要求。表 7 参 11

关键词: 森林土壤学; 有机质; 正交试验; 分光光度法

中图分类号: S714.5

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2017)02-0239-05

Organic matter in forest soils determined with spectrophotometry and optimized by orthogonal testing

GU Zhongchun, LI Guangrong, LI Junzhang, DU Yeyun, WANG Xiao

(Wuhan Forest Products Quality Inspection Center of State Forestry Administration, Hubei Academy of Forestry, Wuhan 430075, Hubei, China)

Abstract: To rapidly and accurately measure organic matter in forest soils, organic matter from standard soil material was oxidized by potassium dichromate with external heating conditions, Cr (IV) was reduced to Cr (III), absorbance of Cr (III) was determined by spectrophotometry, and the rate of organic matter was quantified by comparison with a standard curve. Orthogonal testing with digestion temperature, digestion time, and sulfuric acid amount, was utilized and the effects on the determination results were investigated. Results showed that for organic matter digestion in soils, the optimal digestion temperature was 135 °C, the digestion time was 60 min, and the amount of sulfuric acid was 6 mL. The determined mass fractions of organic matter in the soil were in agreement with the certified ones with a relative standard deviation (RSD) ($n = 6$) of 1.3%, a relative error of -0.6%, a recovery rate range of 95.2%~98.6%, and a method detection limit (MDL) of $0.5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. Based on the t test, all results determined with this novel method were not significantly different from the standard forestry method. This investigation method was simple, accurate, and could meet the requirements for extensive application when determining organic matter in forest soils. [Ch, 7 tab. 11 ref.]

Key words: forest soil science; organic matter; orthogonal experiment; spectrophotometry

有机质是森林土壤的重要组成成分, 其含量水平是衡量土壤肥力的重要指标之一, 对土壤物理、化学和生物学性质有着深刻的影响, 对重金属、农药等各种有机、无机污染物有固定作用, 是全球碳平衡过程中非常重要的碳库^[1]。土壤有机质测定方法主要有干烧法、核磁共振法、近红外光谱法、稀释热比

收稿日期: 2016-04-01; 修回日期: 2016-04-28

基金项目: 湖北省质量技术监督局地方标准项目(2014348-53)

作者简介: 辜忠春, 高级工程师, 从事林业分析测试研究。E-mail: nzx800@163.com

色法和容量法等。干烧法的测定结果虽然比较准确,但工序繁琐,需要特殊的仪器设备,很费时间,普通实验室无法采用该法^[2]。稀释热比色法受土壤类型和环境温度影响较大,准确度低,应用受到限制^[3]。核磁共振法和近红外光谱法可以对有机质的种类、成分等进行定性和定量分析,也需特殊的仪器设备^[4-5],成本昂贵。容量法为国家行业标准法^[6-7],操作简单,被广泛采用,但该法也有一些不足之处:①存在安全隐患,在170~190℃的高温油浴消解样品过程中,导热油会分解挥发一些有害气体,有损实验员的健康,同时剧烈沸腾的高温消解液可能溅出伤人;②批量检测时,若土质类型不同则沸腾时间难以同时达到标准所规定的5 min,从而影响测定结果,有试验表明土样消解沸腾4~5 min,沸腾5~6 min之间,测定结果均值存在显著性差异^[8];③消解管外壁的油污不易清洗;④滴定法测定效率不高,不适应现代林业检测技术的批量快速要求。分光光度法测定土壤有机质的影响因素有:消解温度、消解时间、硫酸用量及重铬酸钾溶液用量。消解温度直接影响有机质的氧化率,消解温度低,有机质氧化反应不完全,致使结果偏低;温度过高时,可能促使重铬酸钾自我分解,导致测定值偏高。同理,消解时间过短,氧化不完全,致使结果偏低,消解时间过长,重铬酸钾会自我分解,会使结果偏高。硫酸在该反应体系中提供酸性环境,以保证有机质氧化完全,硫酸用量不足氧化不完全,结果偏低,用量过多,造成浪费。本研究以标准土样为实验对象,采用正交试验,确定消解时间、消解温度、硫酸用量及重铬酸钾溶液用量等实验技术参数,并对该方法进行验证,从而建立分光光度法测森林土壤中有有机质含量的测定方法。

1 材料与方 法

1.1 材料、仪器及主要试剂

标准土壤样品 GBW 07458(土壤有效态成分分析标准物质-黑龙江黑土,中国地质科学院地球物理地球化学勘查研究所):有机质质量分数认定值范围为 $(34.5 \pm 1.3) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$;实验室留存森林土壤样品3个(代表有机质质量分数低、中、高)。

电子天平(精度0.1 mg),721可见分光光度计,电热恒温干燥箱,具塞玻璃消解管(具有100 mL刻度线),油浴消化装置,常用实验玻璃器皿。

葡萄糖、重铬酸钾、硫酸等均为分析纯。重铬酸钾溶液, $\rho(\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7)=90.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$:称取90.00 g重铬酸钾,加蒸馏水溶解,移于1 L容量瓶中,定容。葡萄糖标准溶液, $\rho(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6)=13.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$:准确称13.000 0 g葡萄糖(98~100℃烘2 h),加蒸馏水溶解,无损地移于1 L容量瓶中,加入2 mL硫酸,定容。

1.2 方 法

1.2.1 方法原理 分光光度法:在外加热条件下,土壤样品中的有机质被过量重铬酸钾-硫酸溶液氧化,重铬酸钾中的铬(VI)被还原为铬(III),铬(III)质量分数与样品中有机质的质量分数成正比,用分光光度计于585 nm波长处测定铬(III)吸光度^[9-10]。在一定范围内,吸光度与样品中有机质的质量分数成正比,与标准系列比较定量求得有机质质量分数。反应方程式为 $2\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + 8\text{H}_2\text{SO}_4 + 3\text{C} \rightarrow 2\text{K}_2\text{SO}_4 + 2\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3 + 3\text{CO}_2 \uparrow + 8\text{H}_2\text{O}$ 。

1.2.2 土壤有机质测定 分别采用容量法和分光光度法进行测定。容量法:按照LY/T 1237-1999《森林土壤有机质的测定及碳氮比的计算》进行测定^[6]。分光光度法:根据有机质质量分数范围,准确称取过100目筛的风干土样0.100 0~0.500 0 g(有机质高于 $50 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 的土样称0.1 g,有机质为 $20\sim 30 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 的土样称0.3 g,有机质低于 $20 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 的土样称0.5 g)于100 mL消解管底部,加入 $90.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 重铬酸钾溶液7.0 mL,沿消解管内壁缓缓加入6 mL硫酸,放入已预先加热至135℃的电热恒温干燥箱中,于 $(135 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ 保温60 min后取出,冷却,加蒸馏水定容,加塞摇匀,用中速定量滤纸过滤。滤液用分光光度计于波长585 nm处,用10 mm比色皿,测量吸光度。同时做标准曲线,即分别准确吸取0.00, 0.50, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00 mL葡萄糖标准溶液于具塞消解玻璃管中,其对应有机碳质量分别为0.00, 2.60, 5.20, 10.4, 15.6, 20.8和26.0 mg。其他过程同土样测定,同时进行空白试验及土样含水率测定。分光光度法结果计算公式: $x = [(G - G_0 - a) / (f \times m \times k)] \times 1.724$ 。其中: x 为土壤样品中有机质质量分数, $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$; G 为土壤样品溶液吸光度; G_0 为空白试验溶液吸光度; a 为校准曲线的截距; f 为校准曲线的斜率, mg^{-1} ; m 为土壤样品称取量,g; k 为风干土壤样品质量换算成烘干土样质量的水分换算系

数；1.724 为将有机碳换算有机质的系数。

1.3 数据统计

重复测定 6 次·样品⁻¹，各平行数据以 Grubbs 检验法剔除异常值，其算术平均值为测定结果。分光光度法与容量法^[6]的测定数据根据 Excel 2007 软件用 *t* 检验法检验 2 种方法的显著性差异。

2 结果与分析

2.1 消解溶液颜色稳定性试验

将 1 个标准土样和 1 个土壤样品按分光光度法消解后，放置 1~24 h 测定滤液吸光度(表 1)，考查在该溶液体系中铬(Ⅲ)颜色稳定性。由表 1 可见：在 24 h 内测定的吸光度差异很小(≤ 0.003)，表明在此期间内铬(Ⅲ)颜色稳定性好。

表 1 颜色稳定性试验

Table 1 Color stability test

<i>t</i> /h	吸光度		<i>t</i> /h	吸光度	
	标准溶液	土壤样品溶液		标准溶液	土壤样品溶液
1	0.202	0.108	8	0.201	0.107
3	0.202	0.109	24	0.200	0.106
5	0.201	0.108			

2.2 实验技术参数的选择

外加热重铬酸钾氧化-分光光度法测定森林土壤有机质的主要影响因素有：重铬酸钾用量、消解温度、消解时间和硫酸用量。

本方法需用过量的重铬酸钾氧化有机质。根据文献[6-7]要求：“在滴定时样品消耗硫酸亚铁量不小于空白用量的 1/3”，即重铬酸钾所需总量为参与氧化反应的重铬酸钾的 1.5 倍以上。采用单因素多水平实验法，选用 90.00 g·L⁻¹ 重铬酸钾溶液 5.0, 6.0, 7.0 mL 分别进行测定，依据反应方程式，以称量 0.1 g 计，其测定上限分别为 317, 380, 443 mg·g⁻¹。中国森林土壤有机质含量范围很广，低者只有 10~20 mg·g⁻¹，高者如东北的黑土有机质可达 400 mg·g⁻¹，因此 443 mg·g⁻¹ 的测定结果能够满足中国森林土壤有机质的测定上限要求，故将 90.00 g·L⁻¹ 重铬酸钾溶液用量选定为 7.0 mL。

其余影响因素，消解温度、消解时间和硫酸用量采用 3 因素 3 水平 $L_9(3^4)$ 正交试验，通过对标准土样 GBW07458 进行有机质测定，重复测定 6 次·实验组合⁻¹，得其测量值的算术平均值 \bar{x} ，将 \bar{x} 与标准土样的认定值($\mu=34.5$ mg·g⁻¹) 比对分析，以结果的绝对误差 ($|\bar{x}-\mu|$) 作为响应值进行数据分析， $|\bar{x}-\mu|$ 数值越小即越接近认定值，以确定消解样品的最佳实验技术参数(消解时间、消解温度、硫酸的用量)。正交试验结果和极差分析见表 2。由极差分析结果可知：各因素影响由大到小的顺序是： B (消解时间) $>C$ (硫酸用量) $>A$ (消解温度)，实验参数优化组合为：A2B3C2，即消解温度 135 °C，消解时间 60 min，硫酸用量 6 mL。方差分析结果表明，各因素对测定结果均无显著性影响(表 3)。

表 2 正交试验结果及极差分析

Table 2 Results of orthogonal test and range analysis

实验号	因素与水平			$ \bar{x}-\mu $ (mg·g ⁻¹)	实验号	因素与水平			$ \bar{x}-\mu $ (mg·g ⁻¹)
	A 消解温度/°C	B 消解时间/min	C 硫酸用量/mL			A 消解温度/°C	B 消解时间/min	C 硫酸用量/mL	
1	125	40	5	2.2	8	145	50	5	1.9
2	125	50	6	1.0	9	145	60	6	0.2
3	125	60	7	0.7	k_1	1.300	0.967	1.433	
4	135	40	6	0.1	k_2	0.567	1.433	0.433	
5	135	50	7	1.4	k_3	0.900	0.367	0.900	
6	135	60	5	0.2	R	0.733	1.067	1.000	
7	145	40	7	0.6					

2.3 验证实验

由于优选的实验技术参数组合不在正交表的上述9组试验中,故还需进行验证试验(表4)。结果表明:6次重复测定结果均在标准土样的认定值(34.5 ± 1.3) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 范围内,平均值对标准土样认定值的相对误差 -0.6% ,相对标准偏差 1.3% ,加标回收率为 $95.2\% \sim 98.6\%$ 。 t 检验结果表明, $t=1.067$,故 $t <$

$t_{(0.05,5)}=2.571$,即与 μ 之间无显著性差异,可见采用优化组合的分光光度法,没有引起系统误差。

2.4 标准工作曲线、检出限

以确定的参数优化组合最佳实验参数实验条件下测定标准系列,以葡萄糖标准溶液的有机碳质量为横坐标,以对应的0质量浓度校正吸光度为纵坐标,绘制校准工作曲线。结果表明:有机碳质量浓度在 $0 \sim 260.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与溶液吸光度呈良好线性关系,标准工作曲线回归方程: $y=0.019x+0.001$,相关系数 $r=0.9997$ 。重复7次空白实验,将各测定结果换算为有机质的质量分数,分别计算7次平行测定的标准偏差,参照文献[11]中的公式

检出限 $L_{MD}=t_{(n-1,0.99)} \times S$ 计算方法检出限 L_{MD} (即能够被检出并在被分析物质量分数大于0时能以99%置信度报告的最低质量分数), $L_{MD}=0.5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (按样品称量 0.5 g 计算),可见该方法检出限较低,测定上限为 $443 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (以样品称量 0.1 g 计算),能满足森林土壤有机质的检测要求,因而具有广泛的应用范围。

2.5 样品测定

为进一步考察优选的实验方法的适用范围,检验其可靠性,分别选取代表有机质质量分数较低(砂质土,样品编号 L_1),有机质质量分数中等(黄壤,样品编号 L_5),有机质质量分数较高(棕壤,样品编号 L_9)的实验室留存森林土样各1个进行测试,以标准土样GBW07458为质控样,分别以本法和容量法^[6]同时测定有机质,各方法重复6次·样品 $^{-1}$,结果的平均值 \bar{x} ,相对标准偏差 R_{SD} 见表5。

对 L_1 样品的2种方法测定结果用Excel 2007软件进行数据分析。方差齐性检验结果见表6, F 检验的单尾 $P=0.43 > 0.05$,表明2种方法测定值的精密度无显著性差异。 t 检验结果(表7)双尾 $P=0.20 > 0.05$,表明2种方法的测定结果无显著性差异。依照此法, L_5 和 L_9 质控样的 t 检验的双尾 P 值分别为 $0.10, 0.11, 0.43$ (表格略),均大于 0.05 ,表明采用新方法后,没有引起系统误差。由此可见:分光光度法对有机质质量分数从低到高的土壤样品测定具有较好的精密度和准确度。

3 结论与讨论

应用外加热重铬酸钾氧化-分光光度法测定森林土壤有机质,通过正交优化试验,确定实验技术参数。所需设备简单,仅为实验室常用的分光光度计等,无需特殊设备,操作过程简便、快捷。通过与行标容量法比对测定,测定结果经 t 检验无显著性差异,标准土样验证实验的准确度和精密度较为满意,同时检出限低,测定范围广。本研究以标准土样为实验对象进行正交试验,测定结果与标准土样的认定值相比有高有低,因而不便于以测定的有机质质量分数直接进行数据分析,而以测定结果的绝对误差

表3 方差分析结果

因素	偏差平方和	自由度	F	$F_{0.05(2,2)}$	P	显著性
A	0.809	2	1.209	19.00	>0.05	不显著
B	1.716	2	2.565	19.00	>0.05	不显著
C	1.502	2	2.245	19.00	>0.05	不显著
误差	0.67	2				

表4 标准土壤样品的优化组合验证测定结果

重复次数	$x/$ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	$R/$ $\%$	$\bar{x}/$ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	$s(x)$	相对标准 偏差/ $\%$	相对误 差/ $\%$	t	$t_{(0.05,5)}$
1	34.1	96.2	34.3	0.459	1.3	-0.6	1.067	2.571
2	34.8	98.1						
3	34.4	95.2						
4	33.7	98.6						
5	34.1	96.3						
6	34.9	96.9						

表5 容量法与分光光度法实验结果($n=6$)

样品名称	容量法		分光光度法	
	$\bar{x}/$ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	$R_{SD}/$ $\%$	$x/$ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	$R_{SD}/$ $\%$
L_1	8.2	2.6	8.0	2.5
L_5	27.0	4.2	28.2	3.0
L_9	82.1	1.9	83.6	1.5
质控样	34.1	1.4	34.3	1.3

表 6 L₁ 样品有机质测定结果 *F* 检验(双样本方差分析)Table 6 *F* test for the determination of organic matter in the L₁ sample (equal variances assumed)

项目	平均值/(mg·g ⁻¹)	方差	观测值	自由度	<i>F</i> 值	<i>P</i> (<i>T</i> ≤ <i>t</i>) 单尾	<i>F</i> 单尾临界
容量法	8.2	0.046 7	6	5	1.166 7	0.434 9	5.050 3
分光光度法	8.0	0.040 0	6	5			

表 7 L₁ 样品有机质测定结果 *t* 检验(双样本等方差假设)Table 7 *t* test for the determination of organic matter in the L₁ sample (equal variances assumed)

项目	平均值/ (mg·g ⁻¹)	方差	观测值	合并方差	假设平 均差	自由度	<i>t</i> 值	<i>P</i> (<i>T</i> ≤ <i>t</i>) 单尾	<i>t</i> 单尾临 界	<i>P</i> (<i>T</i> ≤ <i>t</i>) 双尾	<i>t</i> 双尾临 界
容量法	8.2	0.046 7	6	0.043 3	0	10	1.386 8	0.097 8	1.812 5	0.195 7	2.228 1
分光光度法	8.0										

($|\bar{x}-\mu|$)作响应值进行数据分析是可行的, $|\bar{x}-\mu|$ 数值越小(即越接近认定值)为优。分光光度法会受到土壤中二价铁和氯离子等因素干扰, 除去这些干扰的方法与容量法中去干扰的方法相同^[6]。

4 参考文献

- [1] 张涛, 李永夫, 姜培坤, 等. 土地利用变化影响土壤碳库特征与土壤呼吸研究综述[J]. 浙江农林大学学报, 2013, **30**(3): 428 - 437.
ZHANG Tao, LI Yongfu, JIANG Peikun, *et al.* Research progresses in the effect of land-use change on soil carbon pools and soil respiration [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 2013, **30**(3): 428 - 437.
- [2] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- [3] 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, 1982.
- [4] 王俊美, 欧阳捷, 尚倩, 等. 土壤有机质研究中的核磁共振技术[J]. 波谱学杂志, 2008, **25**(2): 287 - 293.
WANG Junmei, OUYAN Jie, SHANG Qian, *et al.* Application of the NMR techniques in studies on organic matters in soil [J]. *Chin J Magn Reson*, 2008, **25**(2): 287 - 293.
- [5] 杨苗, 左月明, 杨萍果. 基于小波变换的近红外光谱预测土壤有机质[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2010, **30**(2): 154 - 158.
YANG Miao, ZUO Yueming, YANG Pingguo. Prediction of soil organic matter with near-infrared spectroscopy treated by wavelet transformation [J]. *J Shanxi Agric Univ*, 2010, **30**(2): 154 - 158.
- [6] 国家林业局. LY/T 1237-1999 森林土壤有机质的测定及碳氮比的计算[S]. 北京: 中国标准出版社, 1999.
- [7] 中华人民共和国农业部. NY/T 1121.6-2006 土壤检测 第 6 部分: 土壤有机质的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [8] 辜忠春, 李光荣, 杜业云, 等. 外加热重铬酸钾氧化-容量法测定森林土壤有机质影响因素探讨[J]. 湖北林业科技, 2014, **43**(2): 24 - 26.
GU Zhongchun, LI Guangrong, DU Yeyun, *et al.* Investigation on parameters affecting organic matter determination in forest soil by potassium dichromate heating oxidation-volumetric method [J]. *J Hubei For Sci Technol*, 2014, **43**(2): 24 - 26.
- [9] 王屹, 李哲民. 重铬酸钾用量对硫铬氧化法测定土壤有机碳的影响[J]. 环境保护与循环经济, 2011, **31**(6): 57 - 58.
WANG Yi, LI Zheming. Effect of potassium dichromate dosage on sulfur chromium oxidation determination of soil organic carbon [J]. *Environ Prot Circ Econ*, 2011, **31**(6): 57 - 58.
- [10] 胡小明, 潘自红. 分光光度法测定土壤有机质的含量[J]. 应用化工, 2012, **41**(4): 709.
HU Xiaoming, PAN Zihong. Spectrophotometric determination of organic matter in soil [J]. *Appl Chem Ind*, 2012, **41**(4): 709.
- [11] 中华人民共和国环境保护部. HJ 168-2010 环境监测分析方法标准制订技术导则[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2011.