

ICS 13.080.30  
B10

# 团体标准

T/NAIA XXXX—2020

## 土壤磷酸酶活性的测定 (磷酸苯二钠比色法)

2020-XX-XX 发布

2020-XX-XX 实施

宁夏化学分析测试协会 发布

## 前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》规定编写。

本标准由宁夏昊标检测服务研究院（有限公司）提出。

本标准由宁夏化学分析测试协会归口。

本标准起草单位：宁夏昊标检测服务研究院（有限公司）、宁夏大学、宁夏农林科学院荒漠所、宁夏化学分析测试协会。

本标准主要起草人：白玲、王京、张亮亮、徐欢、卜姣姣、杨仪、季波、张小飞、刘娜娜。

本标准于2020年XX月XX日首次发布。

# 土壤磷酸酶活性的测定

(磷酸苯二钠比色法)

## 1 范围

本标准规定了土壤磷酸酶的测定方法（磷酸苯二钠比色法）。

本标准适用于各类土壤磷酸酶的测定（磷酸苯二钠比色法）。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的应用文件，仅注日期的版本适用于本文件，凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 601 化学试剂 标准滴定溶液的制备

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

NY/T 1121.1 土壤检测 第一部分：土壤样品的采集、处理和贮存

## 3 原理

本方法以磷酸苯二钠为基质，在磷酸酶的作用下，**基质水解生成酚**，使其与氯代二溴对苯醌亚胺试剂反应生成蓝色，颜色深度与**酚含量**呈正相关，用比色法测定游离的酚含量来表示磷酸酶的活性。

## 4 试剂和溶液

除非另有说明外，本方法均使用符合国家标准和分析纯试剂，分析用水为 GB/T 6682 规定的三级水。

4.1 甲苯 ( $C_7H_8$ )。

4.2 冰醋酸 ( $C_2H_4O_2$ )。

4.3 无水醋酸钠 ( $C_2H_3O_2Na$ )。

4.4 柠檬酸 ( $C_6H_8O_7$ )。

4.5 磷酸氢二钠 ( $Na_2HPO_4$ )。

4.6 四硼酸钠 ( $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ )。

4.7 氢氧化钠 ( $NaOH$ )。

4.8 硫酸铝 ( $Al_2(SO_4)_3$ )。

4.9 磷酸苯二钠 ( $C_6H_5Na_2PO_4$ )。

4.10 苯酚 (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O)。

4.11 氯代二溴对苯醌亚胺 (C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>ClNO)。

#### 4.12 缓冲液

##### 4.12.1 醋酸盐缓冲液 (pH 5.0)

醋酸溶液 (0.2 mol/L): 准确移取 11.55 mL 冰醋酸用水溶解定容至 1 L。

醋酸钠溶液 (0.2 mol/L): 称取 16.4 g (精确至 0.01 g) 无水醋酸钠用水溶解定容至 1 L。

准确移取 14.80 mL 醋酸溶液 (0.2 mol/L) 和 35.20 mL 醋酸钠溶液 (0.2 mol/L) 用水定容至 1 L。

##### 4.12.2 柠檬酸盐缓冲液 (pH 7.0)

柠檬酸溶液 (0.1 mol/L): 称取 19.2 g (精确至 0.01 g) 柠檬酸, 用水溶解定容至 1 L。

磷酸氢二钠溶液 (0.2 mol/L): 称取 53.63 g (精确至 0.01 g) 七水合磷酸氢二钠或 71.70 g 十二水合磷酸氢二钠, 用水溶解定容至 1 L。

准确移取 6.40 mL 0.1 mol/L 柠檬酸溶液加 43.60 mL 0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液, 用水定容至 100 mL。

##### 4.12.3 硼酸盐缓冲液 (pH 9.6)

硼砂溶液 (0.05 mol/L): 称取 19.05 g (精确至 0.01 g) 四硼酸钠, 用水溶解定容至 1 L。

氢氧化钠溶液 (0.2 mol/L): 称取 8 g (精确至 0.01 g) 氢氧化钠, 用水溶解定容至 1 L。

准确量取 50 mL 硼砂溶液 (0.05 mol/L) 加 23 mL 氢氧化钠溶液 (0.2 mol/L) 用水定容至 200 mL。

#### 4.13 磷酸苯二钠溶液 (5 g/L)

称取 5 g (精确至 0.01 g) 磷酸苯二钠, 用醋酸盐缓冲液 (4.12.1) 或柠檬酸盐缓冲液 (4.12.2) 或硼酸盐缓冲液 (4.12.3) 溶解定容至 1 L。

#### 4.14 氯代二溴对苯醌亚胺试剂

称取 0.125 g (精确至 0.0001 g) 氯代二溴对苯醌亚胺, 用 10 mL 96 % 乙醇溶解, 贮于棕色瓶中, 放冰箱 4℃ 冷藏保存。溶液颜色未变褐色之前均可使用。

#### 4.15 硫酸铝溶液 (3 g/L)

称取 3 g (精确至 0.01 g) 硫酸铝, 用水溶解定容至 1 L。

#### 4.16 酚标准溶液 (1 mg/mL)

##### 4.16.1 酚储备液

准确称取 1 g (精确至 0.0001 g) 苯酚 (4.10) 溶于水中, 定容至 1 L, 存于棕色瓶中。

##### 4.16.2 酚工作液 (0.01 mg/ml)

准确移取 10.00 mL 酚储备液 (4.16.1), 用水定容至 1 L。

### 5 仪器设备

5.1 电子天平: 感量 0.0001g 和 0.01g。

5.2 恒温培养箱 (37 °C ± 1 °C)。

### 5.3 分光光度计（660 nm）。

## 6 分析步骤

准确称取 5 g（精确至 0.0001 g）土样（如含量高可适当减少称样量）置于 100 mL 具塞三角瓶中，加入 2.5 mL 甲苯（4.1），轻摇 15 min 后，加入 20 mL 5 g/L 磷酸苯二钠溶液（4.13），仔细摇匀后放入恒温培养箱，37℃±1℃ 下培养 24 h 后取出，在培养液加入 100 mL 3 g/L 硫酸铝溶液（4.15）摇匀，并过滤。准确吸取 3.00 mL 滤液于 50 mL 容量瓶中，按绘制标准曲线方法显色，呈现蓝色，于分光光度计 660 nm 处比色。

标准曲线绘制：准确吸取 0.00、1.00、3.00、5.00、7.00、9.00、11.00、13.00 mL 酚工作液（4.16.2），置于 50 mL 容量瓶中，每瓶加入 5 mL 缓冲液（4.12）和 4 滴氯代二溴对苯醌亚胺试剂（4.14），显色后用水稀释定容至刻度，配成浓度为 0.0、0.2、0.6、1.0、1.4、1.8、2.2、2.6 μg/mL 的一组标准浓度。30 min 后，于分光光度计上 660 nm 处比色。以显色液中酚浓度为横坐标，吸光值为纵坐标，绘制标准曲线。

注：①每个样品应该做一个无基质对照，以等体积的水代替基质，其他操作与样品实验相同，以排除土样中原有的氨对实验结果的影响。

②整个实验设置一个无土对照，不加土样，其他操作与样品实验相同，以检验试剂纯度和基质自身分解。

③如果样品吸光值超过标曲的最大值，则应该增加分取倍数或减少培养的土样。

## 7、结果计算

磷酸酶活性以 24 h，1 g 风干土壤可水解生成酚的量（mg）表示，按式（1）计算：

$$X = \frac{(C_1 - C_2) \times V \times N}{m \times f \times 1000} \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中：

X —— 样品中磷酸酶的含量，单位为毫克每克每 24 小时（mg/g·24 h）；

C<sub>1</sub> —— 样品加基质吸光值由标准曲线求得的酚含量，单位为微克每毫升（μg/mL）；

C<sub>2</sub> —— 样品未加基质吸光值由标准曲线求得的酚含量，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V —— 显色液定容体积，单位为微升（μL）；

N —— 为分取倍数=浸出液体积（mL）/ 吸取滤液体积（mL）；

M —— 表示新鲜土壤质量，单位为克（g）；

f —— 表示风干土壤占新鲜土壤的比例。

结果保留三位有效数字。

## 8 精密度

在重复条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。