

# 土壤中有有机酸比色法测定的研究

刘修才 莫淑勋

(中国科学院南京土壤研究所)

## 摘 要

对 Montgomery (1962) 比色法测定有机酸总量的方法作了若干改进。根据化学反应的平衡关系, 将欲测试的土壤提取液水浴蒸干脱水, 大大提高了有机酸的酯化程度, 也就提高了测定的准确度。由于提取液浓缩至干, 故测定一般可不受吸取的提取液体积和其中有机酸浓度高低的影响。结合温度、时间、pH 等条件试验得到了测定的最佳条件。乙酸和丁酸的回收率分别可达 99% 和 102%。几种有机肥料淹水培育 10 天用气相色谱测定的乙酸含量为本文提出的比色法测定总量的 86%。采用这一方法测定土壤有机酸的量, 可以在一定程度上反映有机物在土壤中腐解时产生有机酸的实际情况。

我国水稻土面积占世界四分之一, 不仅分布广而且类型多。在水稻生产中往往采用淹水和施用各种有机肥料的措施。在地形部位、土壤特性、排灌系统以及气候等因素的影响下, 稻田中水分的渗透, 更新, 地下水的补给有很大不同。水分不仅是那些冷浸田、锈水田的特征性低产原因, 也对一般稻田的土壤肥力和水稻生育产生种种直接或间接影响。有机物在稻田中的各种嫌气分解产物曾经是日本水稻土肥力研究中的一个活跃领域。日本稻田面积仅及我国十分之一, 可这方面的研究本世纪初就已开始, 五十至七十年代工作更为深入, 积累了大量资料。我国水稻土中这方面的问题引起过人们的注意, 但以往由于缺乏测试手段, 工作开展受到限制。为了推动这方面的研究, 我们对土壤有机酸总量测定的比色法进行了摸索, 现将所得结果整理如下。

## 一、土壤中有有机酸测定的意义及方法回顾

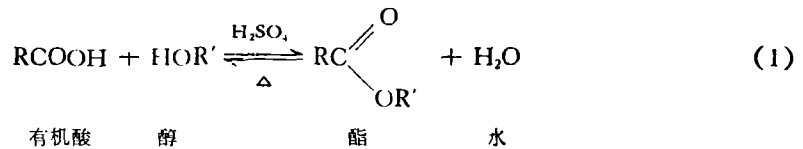
据日本<sup>[2,3]</sup>、英国<sup>[4]</sup>、印度<sup>[8]</sup>等国科学家研究, 渍水条件下大量有机物分解形成各种有机酸, 一般说来, 其中以挥发性的低级饱和脂肪酸如乙酸最多, 其次为丁酸、丙酸等。在排水不良或低温条件下, 尤其大量施用新鲜绿肥或未经腐熟的有机肥料时, 这些酸积累达到一定浓度, 就会对水稻产生毒害。除此以外, 一般植物在生长过程中其根系的分泌物, 包括有机酸或其他有机化合物, 不仅对土壤, 也对与其间作的作物产生影响。国外称之为 Allelopathy<sup>[5]</sup>。关于这方面的研究更是有着长远历史。Takijima<sup>[6]</sup> 在六十年代采用柱色谱分离鉴定土壤有机酸, 该法步骤繁多, 时间冗长。纸谱或薄板层析<sup>[1]</sup>一般只能半定量且不易掌握。随着仪器分析技术的进展, 国外广泛采用气相色谱或高效液相色谱等方法进行有机酸等有机化合物的分离鉴定。但目前我国色谱分析设备尚不普遍。Montgomery<sup>[7]</sup>

1962 年报道了测定废水及污泥水液中有机酸的比色法。该法虽不能提供个别有机酸的数量情况,但可用来测定土壤中有机酸产生的总量,对其毒害作物的程度作出一定的估计。根据 Montgomery 的试验,比色法测定挥发性有机酸比滴定法和蒸馏法更为便利和准确。印度 Govindasamy<sup>[8]</sup> 用此法研究了稻草在土壤中腐解产生的有机酸,得到的结果表明,施用 0.5% 的稻草于土壤,淹水分解,产生有机酸的量以 10 毫升土壤渗液计,5 天达 0.33 毫分子,15 天达高峰为 1.47 毫分子,随后下降。为了寻求一个一般化实验室均可应用的化学方法,我们也采用了 Montgomery 的比色法。该法的显色反应具有特征性,且操作简便,试剂易得,但经试验,直接吸取土液用该法测定不仅有机酸的回收率低而且误差大,为此我们就此法进行了摸索、改进。

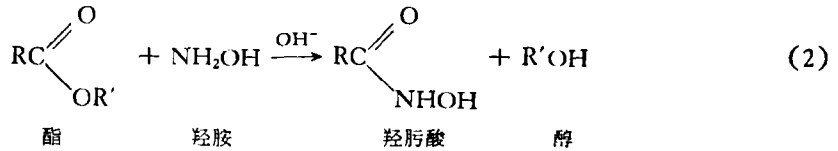
## 二、有机酸显色测定的原理

有机酸显色反应经历酯化、形成羟肟酸和形成铁络合物三个化学反应步骤<sup>[9]</sup>:

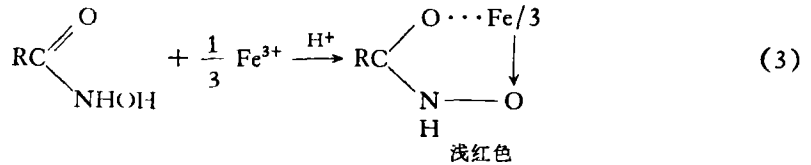
### 1. 酯化



### 2. 形成羟肟酸



### 3. 形成铁络合物



原法控制醇与样品水溶液的体积比为 2.5:1 进行酯化反应。从以上酯化反应式可以推导出平衡时的酯浓度:

$$k = \frac{[\text{酯}][\text{水}]}{[\text{酸}][\text{醇}]} = \frac{[\text{酯}][\text{水}]}{(\text{Co}_m - [\text{酯}]][\text{醇}]}$$

因而得到

$$[\text{酯}] = k \cdot \frac{[\text{醇}]}{[\text{水}] + k[\text{醇}]} \cdot \text{Co}_m = k' \cdot \text{Co}_m$$

此处  $k$  为酯化反应的平衡常数;  $\text{Co}_m$  为有机酸的起始浓度。而

$$k' = k \cdot \frac{[\text{醇}]}{[\text{水}] + k \cdot [\text{醇}]} \quad (4)$$

Montgomery 采用的醇水体积比为 2.5:1, 测得乙酸的  $k'$  为 0.69, 即乙酸的酯化度为 69%。(4)式表明,  $k'$  是[醇]·[水]和  $k$  的函数, 即

$$k' = f([醇] \cdot [水] \cdot k)$$

因此酯化反应时的醇水比以及有机酸酯化平衡常数  $k$  均影响有机酸的酯化度。

### 三、水分对有机酸酯化反应影响的研究

以上是从化学反应的平衡关系推导了水分对有机酸酯化的影响, 下面通过实验加以证实。

1. 不同量的水分对有机酸酯化的影响 在 0.01 毫当量乙酸的钠盐中加入不同量的水(0、1、2、3 毫升), 分别与 2.5 毫升酸性乙二醇混合, 在 80°C 水浴上酯化后显色测定, 得到的结果如图 1 所示。从图看出, 若以样品在无水情况下酯化测得的光密度为 100%, 则有 1 毫升水存在时光密度只有 66%, 水分更多光密度更低。结果符合上一节(4)式的函数关系。

2. 水分的存在对不同有机酸酯化的影响 同一浓度的不同有机酸在醇水体积比 2.5:1 时酯化, 则显色后得到的光密度不同。如 0.02N 的乙酸与 0.01N 的丁酸混合液测得的光密度为 0.365, 而 0.01N 乙酸与 0.02N 丁酸混合液测得的光密度却为 0.319, 二者相差达 14%。总浓度相同而光密度不同, 这样测出的

结果, 在样品之间失去了相互比较的意义。表 1 列出了几种低级饱和有机酸的显色情况, 从表看出, 丁酸样液经蒸干后再酯化, 光密度为相同浓度乙酸的 99%; 二羧酸、三羧酸约为等当量(以羧基为单位)乙酸的 67—84%, 比有水存在时明显提高。这是因为如上节(4)式所示, 在有水存在的情况下, 不同有机酸的不同酯化平衡常数  $k$  导致了  $k'$  的差异。

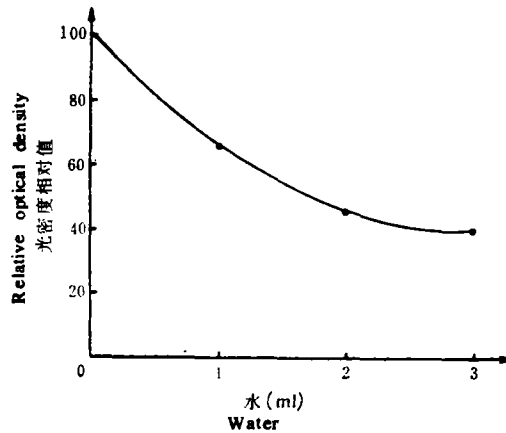


图 1 水分对有机酸酯化的影响

Fig. 1 The effect of water on the esterification of organic acids

表 1 有机酸的显色比较

Table 1 Comparison of the colour development of the organic acids

醇:水 Glycol:water	乙酸 Acetic acid	丁酸 Butyric acid	草酸 Oxalic acid	苹果酸 Malic acid	琥珀酸 Succinic acid	柠檬酸 Citric acid
2.5:1	100	81	38*	—	64*	17*
2.5:0	100	99	84	67	73	67

\* 引自 Montgomery。

当 $[水] \ll [醇]$ 时,  $k' = 1$ , 这时 $[酯] = Co_m$ 。理论上有机酸全部转化为酯。在这种情况下, 不同有机酸最终光密度的一些差异很可能是由于分子的结构不同, 使形成的铁络合物显色强度有了差异。土壤中有有机酸通常以乙、丁酸含量较高, 因此样品蒸干测得的有机酸总量准确度显著提高, 更接近于土壤实际情况。

#### 四、有关的测定条件试验

1. 酯化温度与时间 原法系将盛试液的试管放在沸水浴中保持 3 分钟进行酯化, 但沸水浴温度可以相差很大。我们用水浴控制 60℃、70℃、80℃、90℃ 四种温度, 酯化 8 分钟。所得结果如图 2 所示。在 80℃ 时, 酯化度最高, 70℃ 下酯化度只有 80℃ 时的 90%; 温度再高(90℃)可能产物有所分解。因此水浴温度控制在 80℃ 能得到较好的测定结果。

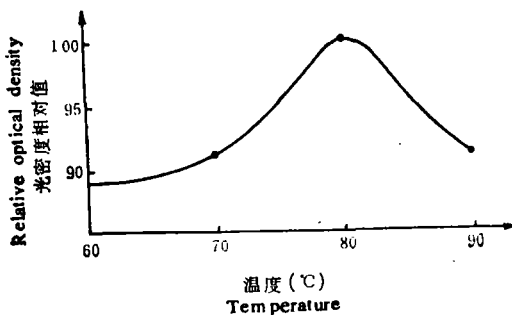


图 2 温度对酯化的影响

Fig. 2 Effect of temperature on the esterification

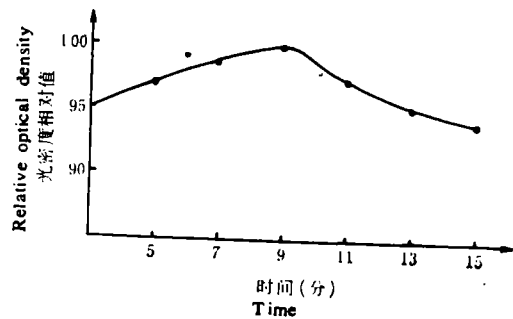


图 3 时间对酯化的影响

Fig. 3 Effect of time on the esterification

图 3 是 80℃ 时的酯化时间曲线。结果表明, 80℃ 水浴下保持 8—9 分钟酯化度最高。其他温度(60°、70°、90℃)的酯化时间曲线趋势与此相同, 不一一列出。

2. 显色的时间与温度 上节所列反应式(3)中形成的铁络合物具有一种特定的红色, 在 500nm 波长下消光率最高。图 4 为 22℃ 时显色反应的时间曲线。显色开始阶段呈极不稳定的鲜红色, 至 20 分钟时, 出现较为稳定的浅红色, 在以后半小时内光密度只下降 4%。若室温为 10℃, 显色稳定时间为半小时, 以后 1 小时内光密度下降一般不超过 2%。

3. pH 的影响 铁络合物的形成是在酸性条件下进行的。表 2 是按本文的操作程序测定的不同 pH 对显色反应的影响。加 11 毫升酸性  $FeCl_3$  溶液时, 试液 pH 为 2.22, 出现不正常的鲜红色, 最大吸收波长小于 500nm, 且有很高的空白值。pH 越低, 形成的颜色越稳定。但 pH 低于 1.6 时, 显色反应受抑制。

在酯化反应之前, 样品溶液蒸干去掉水分时, 应调节为碱性。若直接将土壤溶液蒸干, 有机酸挥发损失可达 9—23%。每毫升土壤溶液加 2—3 滴 0.2N NaOH 溶液, 蒸干过程中有机酸挥发损失极少。乙酸和丁酸(均为钠盐)的回收率分别为 99% 和 102%。

4. 最低检测量和灵敏度 本文提供的方法最低检测量(相当于空白标准偏差的 2

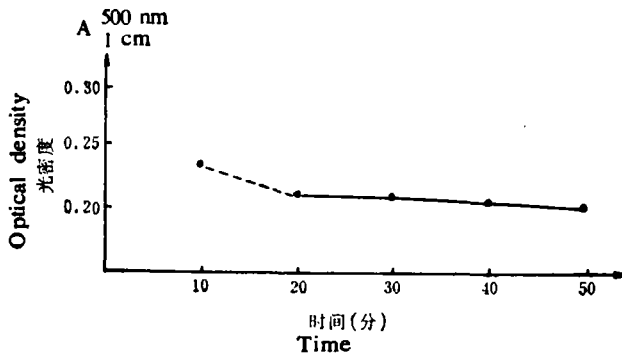


图 4 显色时间对测定结果的影响

(样品: 0.01 毫当量乙酸钠; 显色温度 22°C)

(Sample: 0.01m.e. Sodium Acetate,

Temperature of colour development 22°C)

Fig. 4. Effect of time of colour development on the results determined

表 2 pH 对显色反应的影响

Table 2 Effect of pH on the colour developing reaction

加入酸性 FeCl <sub>3</sub> (ml) Acidic FeCl <sub>3</sub> added	试液 pH pH of solution tested	光密度 Optical density	空白值* Blank value*	试液颜色 Colour of solution tested
10	2.60	沉淀	沉淀	棕色
11	2.22	0.480	0.225	鲜红色
12	1.65	0.290	0.062	浅红色

\* 以水为零。

倍)为 0.5 微当量乙酸(或 30 微克乙酸)。

桑格尔灵敏度  $S = 0.0876$  微克/平方厘米

## 五、测定步骤

### 1. 试剂配制

酸性乙二醇: 47 毫升乙二醇, 加入 3 毫升浓硫酸, 搅匀。现用现配。

10% 盐酸羟胺: 称取 10 克盐酸羟胺溶于 100 毫升水中。现用现配。

酸性 FeCl<sub>3</sub> 溶液: 称取 40 克 FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O 放入 1000 毫升烧杯中, 加入约 800 毫升蒸馏水, 加入 40 毫升浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 待溶液冷却后, 转移至 1000 毫升容量瓶中, 定容至刻度。

4.5N NaOH: 称取 90 克 NaOH, 溶于 500 毫升蒸馏水中。

### 2. 样品制备

淹水培育或田间水分饱和的土壤湿样(淹水时水层须倾去, 旱地土壤可加定量水提取), 迅速搅匀, 取若干(不一定称量)放入 50—100 毫升离心管离心(4000 转/分)10 分钟, 将上清液经滤纸过滤于三角瓶中。估计土壤中有机酸含量高低, 准确吸取一定量土壤滤液于 50 毫升烧杯中, 加 2—3 滴 0.2N NaOH 溶液, 在沸水浴上蒸干, 测定时若烧杯壁附有水汽, 应放入烘箱, 稍加热以烘去水汽。

### 3. 测定

在经过水浴蒸干含有有机酸(盐)的烧杯中,加入 2.5 毫升酸性乙二醇,搅动使盐溶解。放入 80℃ 水浴中加热 8 分钟,取出后立即放入冷水中冷却至室温,加入 10% 盐酸羟胺 1 毫升,4.5N NaOH 4 毫升,摇匀,用蒸馏水将其洗入 50 毫升容量瓶中,约 3 分钟后加入 12 毫升酸性 FeCl<sub>3</sub> 溶液,用蒸馏水定容至刻度,摇匀,打开瓶塞让气体逸出。室温在 20℃ 时约 20 分钟显色稳定。温度升高或降低,根据显色的稳定情况,显色时间应适当缩短或延长。然后在光电比色计上用兰绿色滤光片(波长 500nm)进行比色测定。

标准系列: 吸取 0.01N 乙酸或乙酸钠溶液 0、0.5、1、1.5、2、2.5 毫升,按上述步骤同时进行测定。

测定结果可用毫当量/100 毫升土液表示,也可通过测定土壤水分表示为毫当量/100 克土(烘干)。

## 六、方法应用举例

图 5 为几种未经腐解的有机肥料施入土壤(浙江金华红壤性水稻土)后,在 20—22℃ 下淹水培育过程中有机酸形成的动态情况。试验结果表明,有机物质在淹水土壤中腐解,在一定时间内产生有机酸。稻草产生的有机酸量较少,猪粪在一定时间内,有机酸可累积在毒害水平,但其高峰期维持时间不长。土壤中加入 0.34% 紫云英粉末,淹水培育第 5 天有机酸就达 1.26 毫当量/100 毫升土壤溶液,高峰期维持近 20 天。用气相色谱(上海产,103 型,不锈钢柱,担体为加了 1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 的 60—80 目 Chromosorb W [经酸洗,硅烷化]。固定液为 10% FFAP。氢焰检测器分离测定证明,加入 2.25% 新鲜紫云英于土壤

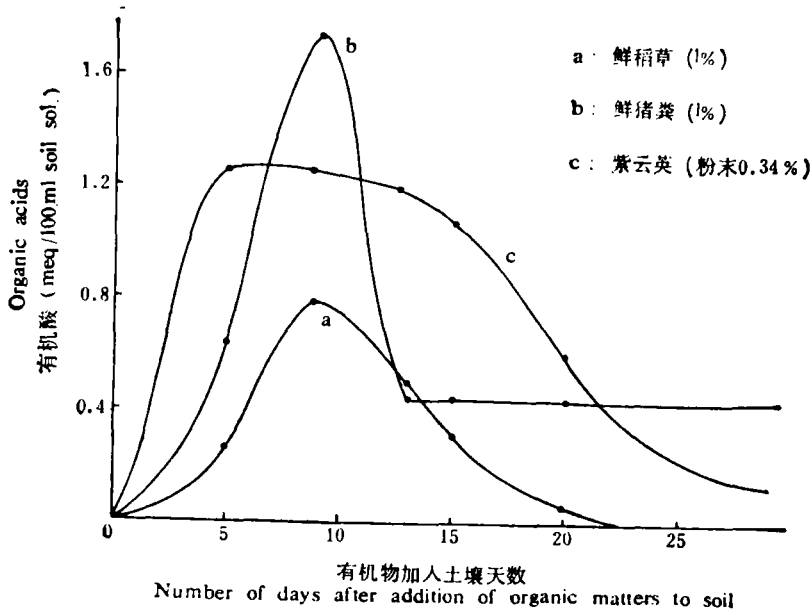


图 5 几种有机物在淹水土壤中产生的有机酸

Fig. 5 Amount of organic acids in the waterlogged soil with organic matters

中保持 15°C 淹水培育 10 天,产生的低级饱和脂肪酸以乙酸为主,其含量为 1.69 毫当量/100 毫升土液,为上述比色法测定总量的 86%。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] 华中农学院土壤教研组化学教研室, 1976: 用分配薄层层析测定土壤中挥发性有机酸。湖北农业科学, 第 12 期, 33 页。
- [ 2 ] 瀧嶋康夫、佐久间宏, 1961: 水田土壤中有機酸代謝と水稻生育阻害性に関する研究(第 7 報)レンゲ添加による有機酸の生成と生育阻害作用。日本土壤肥料誌, 32 卷 11 号, 559—564。
- [ 3 ] 藤井国博、小林達治、高橋英一, 1972: 植物遺体の分解過程にわける有機酸生成について土壤微生物の変動と土壤中の物質代謝に関する研究(第 3 報)。日本土壤肥料誌, 43(4): 127—131。
- [ 4 ] Lynch, J. M., Gunn, K. B and Panting, L. M., 1980: On the concentration of acetic acid in straw and soil. *Plant and Soil* 56 (1): 93—98.
- [ 5 ] Rice, E. L., 1974: Allelopathy. *Physiological ecology. A series of monographs, Texts and Treaties*
- [ 6 ] Takijima, Y., 1964: Studies on organic acids in paddy field soils with reference to their inhibitory effects on the growth of rice plants. Part I. growth inhibiting action of organic acids and absorption and decomposition of them by soils. *Soil Sci. Plant Nutr.* 10(5): 204.
- [ 7 ] Montgomery, H. A. C. et al., 1962: The rapid colorimetric determination of organic acids and their salts in sewage sludge liquor. *The Analyst*, 12: 949.
- [ 8 ] Govindasamy, R. et al., 1979: Inhibitory effect of rice straw incorporation in ill-drained (Annamalai clay) soil on rice. *J. Indian Soc. Soil Sci.* 27: 92.
- [ 9 ] Hill, U. F. 1946: Colorimetric determination of fatty acids and esters. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 18: 317.

## STUDIES ON THE COLORIMETRIC DETERMINATION OF ORGANIC ACIDS IN SOIL

Liu Xiucui and Mo Shuxun

(*Institute of Soil Science, Academia Sinica, Nanjing*)

### Summary

A modification is proposed for Montgomery's procedure of the colorimetric determination of organic acids in the soil extracts. According to the equilibrium relationship in the chemical reactions, the soil extracts are dried on a boiling water bath before the esterification proceeded. As the extract is concentrated, the determination is free from the influence of aliquot volume and the organic acid concentration of the extracts. The factors including temperature, time and pH which affect the reactions in the procedure were tested. The recovery rate of acetic acid and butyric acid were 99% and 102% respectively. Acetic acid of several organic manure incubated under waterlogged condition for 10 days determined by the gas chromatography was 86% of that determined by the procedure suggested by the authors. This indicates that the results obtained by the modified method can better reflect the actual organic acid content in soil.