

过硫酸钾氧化法测定溶解性有机氮含量和 ^{15}N 丰度方法研究^①

党琦¹, 于涌杰¹, 程 谊¹, 张金波^{2*}

(1 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008; 2 南京师范大学地理科学学院, 南京 210046)

摘 要: 本研究比较了鲁如坤法、国标法、Doyle 法 3 种基于过硫酸钾氧化法测定可溶性有机氮的前处理方法, 使用开氏蒸馏和同位素质谱法分别测定不同方法处理后样品的全氮和 ^{15}N 回收率, 以比较获得最优的前处理方法。结果表明, Doyle 法测得的标准溶液全氮和 ^{15}N 回收率均高于鲁如坤法、国标法。因此, 本研究推荐使用过硫酸钾氧化法测定可溶性有机氮含量和 ^{15}N 丰度时, 氧化剂的前处理方法为高压 120℃, 消煮时间 1 h, 氧化剂 50 g/L $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, 16.8 g/L NaOH, 30 g/L H_3BO_4 , 浸提液与氧化剂比例为 1:1。

关键词: 过硫酸钾氧化; 可溶性有机氮; ^{15}N ; 前处理方法; 土壤

中图分类号: S132

可溶性有机氮(DON)是溶解性总氮的重要组成部分, 在陆地生态系统和生物地球化学循环中占有非常重要的地位^[1-3]。DON 是有机质从陆地系统迁移到地表水循环系统的关键^[4], 它的流失是陆地生态系统氮损耗的重要途径^[5-6]。因此, 测定土壤溶液或水体中的全氮含量, 对认识氮素迁移、转化过程、以及评价其生态环境效应具有重要意义^[2]。

目前, 测定溶液中全氮含量的方法主要有过硫酸钾氧化法、高温催化氧化法、紫外氧化法等^[7-8]。过硫酸钾氧化法因方便、廉价、适合批量分析等特点被广泛使用。其方法原理是在 60℃ 以上的碱性水溶液中, 过硫酸钾与水反应生成硫酸钾和原子态氧, 而原子态氧在 120℃ ~ 124℃ 条件下, 可使样品中的氮元素转化为硝酸盐, 从而检测出全氮含量^[9]。

碱性过硫酸钾的配制是影响消解过程的重要环节^[10], 过硫酸钾氧化法中存在多种氧化剂的配置方法, 其中氧化剂配置的组分与比例、消解温度及时间的差异均会在不同程度上影响可溶性有机氮测定结果的准确性。目前, 缺少对各种方法测定结果的比较, 影响了土壤溶解性有机氮研究结果的准确性和不同研究结果间的可比较性。土壤的氮同位素组成记录了氮循环影响因子的综合作用, 是陆地生态系统氮循环的重要特征^[11-12]。然而, 土壤提取液中可溶性有机氮的 ^{15}N 丰度测定一直是 ^{15}N 同位素示踪试验

中的一个难题, 准确测定提取液中可溶性有机氮的 ^{15}N 丰度是深入研究溶解性有机氮在土壤氮循环过程中所处地位的关键^[13-15], 而样品前处理方法也直接关系到可溶性有机氮 ^{15}N 丰度测定的准确性。

本研究通过比较鲁如坤法^[16]、国标法^[17]、Doyle 法^[18] 3 种常用的基于过硫酸钾氧化法测定溶液有机氮的前处理方法, 结合开氏蒸馏和同位素质谱法, 分析了不同处理条件下测定的全氮和 ^{15}N 回收率, 从而寻找最优的前处理方法。

1 材料与方法

1.1 实验方法原理

1.1.1 过硫酸钾氧化法的基本原理 本研究采取 3 种基于过硫酸钾氧化法测定可溶性有机氮的前处理方法测定可溶性有机氮。过硫酸钾氧化法原理是: 过硫酸钾在 60℃ 以上的碱性水溶液中, 与水反应生成硫酸钾和原子态氧, 在 120℃ ~ 124℃ 条件下, 原子态氧可使水样中含氮化合物的氮元素转化为硝酸盐, 从而检测出全氮含量^[9]。

1.1.2 三种前处理方法 本研究选择 3 种常用的前处理方法进行分析比较, 分别为: 鲁如坤法^[16]: 配制 20 g/L $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 、3 g/L NaOH 的氧化剂溶液; 浸提液与氧化剂比例为 1:1; 消煮条件为高压 120℃, 0.5 h。

①基金项目: 国家自然科学基金项目(41222005, 41101209)资助。

* 通讯作者(zhangjinbo@njnu.edu.cn)

作者简介: 党琦(1983—), 女, 湖北襄阳人, 学士, 主要从事土壤氮素循环方面研究。E-mail: qdang@issas.ac.cn

国标法^[17]：配制 40 g/L K₂S₂O₈、15 g/L NaOH 氧化剂溶液；浸提液与氧化剂比例为 1：1；消煮条件为高压 120℃，0.5 h。

Doyle 法^[18] 配制 50 g/L K₂S₂O₈、16.8 g/L NaOH、30 g/L H₃BO₄ 氧化剂溶液；浸提液与氧化剂比例为 1：1；消煮条件为高压 120℃，1 h。

前处理中所用试剂 K₂S₂O₈ 为德国 Fluka 进口产品，NaOH 和 H₃BO₄ 均为南京化学试剂有限公司生产。高压灭菌锅型号 G154TW(Zealway)。

1.2 样品配制及测定

1.2.1 ¹⁵N 标记的有机氮标准溶液的配制及测定 以 ¹⁵N 标记的甘氨酸(¹⁵N 丰度 99.12%)、赖氨酸(¹⁵N 丰度 99.21%)、脯氨酸(¹⁵N 丰度 99.15%)、尿素(自然丰度)等 4 种有机氮分别配置有机氮浓度 N 5 mg/L 和 NO₃⁻-N 浓度 N 40 mg/L 的标准溶液。分别经过 3 种方法前处理后，用开氏蒸馏-滴定法测定全氮和有机氮浓度，滴定液酸化、浓缩为固体后，使用同位素质谱法进行 ¹⁵N 丰度的测定。

1.2.2 新鲜土壤浸提液全氮测定 2010 年 8 月，分别采集内蒙古草地、辽宁蒙古栎林、黑龙江白桦林、黑龙江阔叶红松林、吉林阔叶红松林、江苏麦地、江苏水稻等 7 份土壤样品。每一份土壤样品称取相当于 30 g 干土重的鲜土，3 次重复后，加入 2 mol/L KCl 溶液，液土比 5：1 提取^[16]。将浸提液分为 3 组，分别采用 3 种方法进行前处理后，用开氏蒸馏-滴定法测定浸提液中的全氮含量。

1.2.3 不同浓度尿素标准溶液的配制及全氮测定 选择普通尿素配制有机氮浓度梯度分别为 N 5、10、20、30、40 和 50 mg/L 标准溶液。在前两个试验的基础上，选取最优的前处理方法(本研究选用 Doyle 法)，使用

该方法进行前处理后，用开氏蒸馏-滴定法测定溶液中全氮的含量，检验该方法的检测范围。

2 结果与讨论

2.1 三种前处理方法测定标准溶液中全氮含量和 ¹⁵N 丰度的比较

对 ¹⁵N 标记的有机氮标准溶液分别使用 3 种不同方法进行前处理，并使用开氏蒸馏法测定溶液有机氮含量，使用同位素质谱法测定 ¹⁵N 丰度，进而计算总氮和 ¹⁵N 的回收率。结果如表 1 所示，对于不同的标准溶液，鲁如坤法处理得到的总氮和 ¹⁵N 回收率的平均值分别为 87%~95% 和 83%~92%；国标法处理得到的总氮和 ¹⁵N 回收率的平均值为 77%~94% 和 83%~88%；而 Doyle 法则分别高达 97%~105% 和 93%~99%，显著高于鲁如坤法和国标法(*P*<0.05)，但是鲁如坤法和国标法之间差异不明显(表 1)。从回收率来看，Doyle 法要优于鲁如坤法和国标法。

2.2 三种前处理方法测定土壤浸提液中全氮含量的比较

对 7 份新鲜土壤样品进行浸提后，分别使用 3 种方式的前处理，用开氏蒸馏法测定浸提液的全氮含量。对不同地区、不同植被类型土壤提取液中溶解性全氮的测量结果显示，利用国标法测定的土壤浸提液样品中溶解性有机氮的含量普遍略高于鲁如坤法处理得到的样品结果，但两者结果差异并不显著；而除黑龙江阔叶红松林土壤浸提液样品外，利用 Doyle 法测定的土壤提取液全氮含量均显著高于鲁如坤法和国标法(*P*<0.05)(表 2)，这与标准溶液中全氮含量和 ¹⁵N 回收率的测定结果相似。

表 1 三种方法测定不同有机物标准溶液总氮和 ¹⁵N 回收率(%)
Table 1 Recoveries of TDN and ¹⁵N from prepared solutions by three methods of persulfate oxidation

方法	甘氨酸		赖氨酸		脯氨酸		尿素	
	总氮	¹⁵ N	总氮	¹⁵ N	总氮	¹⁵ N	总氮	¹⁵ N
鲁如坤法	91 ± 4 b	84 ± 6 b	91 ± 2 b	83 ± 1 b	95 ± 1 a	92 ± 2 a	87 ± 3 b	—
国标法	94 ± 4 b	88 ± 2 b	86 ± 3 b	83 ± 4 b	85 ± 2 b	83 ± 2 b	77 ± 8 b	—
Doyle 法	102 ± 2 a	99 ± 1 a	97 ± 1 a	93 ± 1 a	98 ± 2 a	94 ± 2 a	105 ± 6 a	—

注：同列小写字母不同表示方法间差异达到 *P*<0.05 显著水平，下表同。

表 2 三种方法测定不同土壤提取溶液总氮含量(mg/kg)
Table 2 TDN from soil extracts by three methods of persulfate oxidation

方法	内蒙古草地	辽宁蒙古栎林	黑龙江白桦林	黑龙江阔叶红松林	吉林阔叶红松林	江苏麦地	江苏水稻
鲁如坤法	47.1 ± 7.0 b	55.5 ± 8.0 b	119.0 ± 7.0 b	86.3 ± 11.3 a	137.7 ± 3.7 b	70.0 ± 7.2 b	119.0 ± 7.4 b
国标法	55.1 ± 4.5 b	59.3 ± 4.3 b	127.4 ± 7.3 b	95.2 ± 1.4 a	143.3 ± 1.6 b	78.9 ± 3.2 b	123.7 ± 3.5 b
Doyle 法	69.5 ± 5.7 a	86.3 ± 11.9 a	154.9 ± 15.6 a	91.5 ± 9.0 a	157.3 ± 7.7 a	90.5 ± 8.1 a	138.1 ± 3.2 a

2.3 Doyle 法测定溶液有机氮的有效范围

为了进一步检验 Doyle 法的有效测试范围,使用 Doyle 法对不同浓度梯度($\text{N } 5 \sim 50 \text{ mg/L}$)的标准溶液进行前处理,测定其中的全氮含量,并计算回收率。结果显示,总氮回收率的高低与溶液有机氮浓度的大小存在密切关系(图 1)。当溶液有机氮浓度在 $\text{N } 5 \sim 30 \text{ mg/L}$ 时,Doyle 法的总氮回收率平均值在 100% 左右;但是,当溶液有机氮浓度 $\geq \text{N } 40 \text{ mg/L}$ 时,回收率则有了显著降低(降至 90% 以下)。这一结果表明,利用 Doyle 法的前处理方式对可溶性有机氮浓度测定时,较高的溶液有机氮浓度($\geq \text{N } 40 \text{ mg/L}$)可能会在一定程度上影响所测得的全氮回收率。

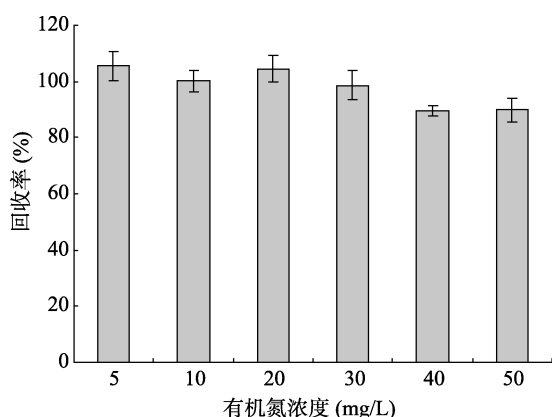


图 1 使用 Doyle 法测定溶液有机氮浓度时回收率与有机氮浓度的关系

Fig. 1 Recoveries of TDN from prepared solutions with different N concentrations by Doyle method of persulfate oxidation

3 结论

本文通过对 3 种基于过硫酸钾氧化法测定可溶性有机氮的前处理方法进行比较,发现 Doyle 法^[18]测得的标准溶液全氮和 ^{15}N 回收率及土壤浸提液全氮含量均最高。因此,在使用过硫酸钾氧化法测定土壤浸提液或水体全氮含量时,以氧化剂配制为 $50 \text{ g/L K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 、 16.8 g/L NaOH 、 $30 \text{ g/L H}_3\text{BO}_4$, 浸提液与氧化剂比例 1 : 1, 高压 120°C , 消煮时间为 1 h 为优。

参考文献：

[1] Chapin FS, Matson PA, Mooney H. Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology[M]. New York: Springer, 2002

[2] Dempster DN, Jones DL, Murphy DV. Clay and biochar amendments decreased inorganic but not dissolved organic nitrogen leaching in soil[J]. Soil Research, 2012, 50(3): 216–221

[3] Tiemann LK, Billings SA. Tracking C and N flows through microbial biomass with increased soil moisture

variability[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2012, 49: 11–22

[4] Gomi T, Sidle RC, Richardson JS. Understanding processes and downstream linkages of headwater systems[J]. Bioscience, 2002, 52: 905–916

[5] Perakis SS, Hedin LO. Nitrogen loss from unpolluted South American forests mainly via dissolved organic compounds[J]. Nature, 2002, 415: 416–419

[6] Vitousek PM, Hättenschwiler S, Olander L, Allison S. Nitrogen and nature[J]. Ambio, 2002, 31: 97–101

[7] Graeber D, Gelbrecht J, Kronvang B, Gücker B, Pusch MT, Zwirnmann E. Technical note: Comparison between a direct and the standard indirect method for dissolved organic nitrogen determination in freshwater environments with high dissolved inorganic nitrogen concentrations[J]. Biogeosciences, 2012, 9: 4 873–4 884

[8] Hood NR, Umana NH, Insellbacher E, Oswald LP, Wanek W. Alternative methods for measuring inorganic, organic, and total dissolved nitrogen in soil[J]. Soil Science Society of America Journal, 2010, 74(3): 1 018–1 027

[9] 章萍. 水中总氮测定相关问题的实验探讨[J]. 能源环境保护, 2011, 26(3): 26–29

[10] 谢丽章, 郭梁钻, 吴燕琴. 碱性过硫酸钾测定水中总氮的实验条件探讨[J]. 环境, 2009(S1): 17–18

[11] 姚凡云, 朱彪, 杜恩在. ^{15}N 自然丰度法在陆地生态系统氮循环研究中的作用[J]. 植物生态学报, 2012, 36(4): 346–352

[12] Xu YQ, He JC, Cheng WX, Xing XR, Li LH. Natural ^{15}N abundance in soils and plants in relation to N cycling in a rangeland in Inner Mongolia[J]. Journal of Plant Ecology, 2010, 3: 201–207

[13] Lachouani P, Frank AH, Wanek W. A suite of sensitive chemical methods to determine the $\delta^{15}\text{N}$ of ammonium, nitrate and total dissolved N in soil extracts[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2010, 24(24): 3 615–3 623

[14] Ros GH, Temminghoff EJM, Groenigen JWV. Isotopic analysis of dissolved organic nitrogen in soils[J]. Analytical Chemistry, 2010, 82(18): 7 814–7 820

[15] Mayor JR, Schuur EAG, Mack MC, Hollingsworth TN, Bååth E. Nitrogen isotope patterns in alaskan black spruce reflect organic nitrogen sources and the activity of ectomycorrhizal fungi[J]. Ecosystems, 2012, 15(5): 819–831

[16] 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: 128–129

[17] 国家环境保护局. 水质 总氮的测定 碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法(GB/T 11894–1189) [S]. 北京: 中国标准出版社, 1989

[18] Doyle A, Weintraub MN, Schimel JP. Persulfate digestion and simultaneous colorimetric analysis of carbon and nitrogen in soil extracts[J]. Soil Science Society of America Journal, 2004, 68: 669–676

Persulfate Digestion Method for Analyzing Dissolved Organic Nitrogen Concentration and ^{15}N Excess in Soils Extracts

DANG Qi¹, YU Yong-jie¹, CHENG Yi¹, ZHANG Jin-bo^{2*}

(1 *State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture (Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences), Nanjing 210008, China*; 2 *School of Geography Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China*)

Abstract: In the study three methods of persulfate digestion for dissolved organic nitrogen (DON) analysis were compared. The recoveries were calculated by using kjeldahl method for the total dissolved nitrogen (TDN) and isotope ratio mass spectrometry (IRMS) for ^{15}N . The results showed that the Doyle methods obtained higher recovery. Therefore the pre-treatment method of analysis of DON was recommend at the condition of the volume ratio of oxidizing reagent (50 g/L $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, 16.8 g/L NaOH, 30 g/L H_3BO_4) to extracts was 1 : 1 and the digest is performed at temperature 120°C for one hour.

Key words: Persulfate digestion, Dissolved organic nitrogen, ^{15}N , Pre-treatment, Soil