

测定土壤硝态氮的紫外分光光度法和镉柱还原法比较^①

涂 成^{1,2}, 黄 威^{1,2}, 陈安磊^{1*}, 宋 歌³, 陈春兰¹, 王 卫¹, 谢小立¹

(1 中国科学院亚热带农业生态研究所, 亚热带农业生态过程重点实验室, 长沙 410125;

2 中国科学院大学, 北京 100049; 3 中国科学院南京土壤研究所, 南京 210008)

摘 要: 使用改进的紫外分光光度法(校正因素法)和基于镉柱还原的流动注射分析法(镉柱还原法)测定了中国 10 种不同类型土壤的 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量, 分析了两种方法的差异性及其适用性。统计分析表明, 改进紫外分光光度法与镉柱还原法测定的结果具有极显著的相关性, 测定样品的准确度介于 89% ~ 104%, 具有可比性。在浓度适用上略有差异, 对 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量极低的土壤样品, 采用镉柱还原法可提高精确度; 对于 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量高的土样选用紫外法可提高测定精确度, 测定结果变异性低于镉柱还原法, 且紫外法测定值都要高于镉柱还原法。从仪器操作及校准角度来看, 紫外法测定操作过程简便, 影响因子较少, 对 $\text{NO}_3\text{-N}$ 批量快速测定更为适用。

关键词: 紫外分光光度法; 镉柱还原法; 流动注射分析仪; 土壤硝态氮

中图分类号: S151.9+5

硝态氮($\text{NO}_3\text{-N}$)不仅是植物生长发育直接吸收利用的速效性氮素形态之一^[1], 而且还是当今集约化农业生产过程中环境污染的重要形态之一。其含量在土壤、水体中的快速、准确测定不仅为环境评价提供依据, 还能有效地指导农业生产管理中的氮肥合理施用^[2-4]。因此, 其测定方法一直受到土壤学和环境科学研究领域的关注。

目前, 已有多种土壤 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量的测定方法, 常用的方法有还原蒸馏法、电极法、酚二磺酸比色法、镉柱法, 紫外分光光度法^[5-6], 其中酚二磺酸比色法、还原蒸馏法是土壤 $\text{NO}_3\text{-N}$ 测定的经典方法^[7]。酚二磺酸比色法具有测量范围较宽、显色稳定的优点, 但存在样品前处理复杂、人为操作导致的误差大等缺点; 还原蒸馏法操作复杂、繁琐, 也不适用于大批样品的测定。因此, 可对 $\text{NO}_3\text{-N}$ 大批量快速、直接测定的仪器方法发展较快。紫外分光光度法是近年来环境监测中广泛采用的方法, 与酚二磺酸比色法及还原蒸馏法这两种方法相比, 紫外分光光度法测定结果与经典方法极为接近, 且具有操作简单、快速的特点。而基于镉柱还原的流动注射法因其具有分析速度快、操作自动化等优点, 随着流动注射仪器的普及而使该方法也得到应用和推广。而在我国土壤类型多样的情

况下, 这两种仪器方法(紫外分光光度法和基于镉柱还原的流动注射法)测定结果的差异性及其可比较性还不甚清楚, 还需要进一步的对比分析。因此, 本研究采集了中国不同生物气候区域的 10 种类型土壤, 分别用紫外分光光度法和基于镉柱还原的流动注射法分析其 $\text{NO}_3\text{-N}$ 的含量, 并对两种方法进行比较, 以期弄清两者的差异性和适用性。

1 材料与方法

1.1 供试土样

从中国 10 个地区采集了 10 种土壤样品, 采样点概况及供试土壤的基本性质见表 1。土壤 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量介于 1 ~ 100 mg/kg 之间。由于受样品保存时间、水分含量、温度高低等因素的影响, 新鲜土壤不适合用作分析方法的比较研究材料, 本实验统一使用风干过 60 目筛的土样进行测定。

1.2 仪器

紫外可见分光光度计 (UV2450), 光程为 1 cm 的石英比色皿; 流动注射分析仪 (FIAstar 5000)。

1.3 测定方法

本文使用的测定方法为紫外分光光度法^[8-9]和基于镉柱还原的流动注射法。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31200339)、湖南省科技计划项目(2014NK3083)和公益性行业(农业)科研专项(201203030)资助。

* 通讯作者(alchen@isa.ac.cn)

作者简介: 涂成(1990—), 女, 湖北天门人, 硕士研究生, 主要从事农田环境研究。E-mail: 1060033527@qq.com

表 1 采样点概况及供试土壤的基本理化性状
Table 1 Descriptions of sampling sites and properties of the selected soils

土样编号	采样点	土壤类型	中国系统分类名称	利用类型	深度(cm)	pH	有机质 (g/kg)	全氮 (g/kg)
A	策勒	风沙土	干旱砂质新成土	绿洲农田	0~20	9.01	7.1	0.47
B	临泽	新积土	淤积人为新成土	水浇地	0~20	9.06	6.0	0.45
C	封丘	潮土	淡色潮湿雏形土	水浇地	0~20	8.62	14.6	0.91
D	鹰潭	红壤	富铝湿润富铁土	撂荒地	0~20	5.15	18.1	0.91
E	长武	黑垆土	堆垫干润均腐土	旱地	0~20	8.58	18.6	1.01
F	内蒙	暗栗钙土	筒育干润均腐土	草地	5~20	7.19	37.4	1.80
G	沈阳	潮棕壤	淡色潮湿雏形土	旱地	0~20	6.35	29.4	1.17
H	桃源	水稻土	筒育水耕人为土	水田	5~20	5.07	23.9	1.20
I	常熟	水稻土	潜育水耕人为土	水田	0~20	6.76	48.9	1.92
J	北京	褐土	冷凉湿润雏形土	森林	25~30	7.15	13.6	0.66

注：数据来源：中国科学院南京土壤研究所土壤分中心，中国土壤数据库，<http://www.soil.csdb.cn/>。

1.3.1 紫外分光光度法(以下简称为紫外法) 波长选择：Norman 等^[10]以及李西开^[11]都选用 210 nm 波长，在该波长工作范围为 N 0.05 ~ 1.5 mg/L，绝大多数无机盐类已无吸收，但本研究中 NO₃-N 变化范围比较大，宋歌等^[13]的研究表明该情况下选用 220 nm 测定 NO₃-N 比较合适，该波长下灵敏度虽有所降低，但工作范围却扩展为 N 0.1 ~ 3.0 mg/L。因此，本研究选用 220 nm 波长。

测定原理 NO₃在 220 nm 处有强吸收，在 275 nm 处无吸收。有机物质在该两波长处都有吸收，但在 220 nm 处的吸收要比 275 nm 处的大若干倍，设为 f 倍。如果同时测定待测液在 220 nm 和 275 nm 处的吸光度值 A_{220} 和 A_{275} ，将 A_{275} 乘以 f ，并从 A_{220} 中减去，即得 NO₃-N 在 220 nm 处的吸收值。这个 f 倍数可称为校正因数，故此法称为校正因数法。校正因数是由实验求得的，它主要取决于测试时选用的波长和有机质的性质。

操作步骤：称取 40.00 g 土样于 250 ml 聚乙烯瓶中，加入 100 ml 1 mol/L KCl 溶液，置于往复振荡机中，(25±1)°C 条件下以 150 r/min 速度振荡 1 h，悬液静置 3 ~ 5 min 后，将上清液用慢速定量滤纸过滤于塑料瓶中待测。同时，向聚乙烯瓶中仅加入浸提液重复上述步骤作为空白，待测液应在当天测定完毕。加标回收实验中，在浸提前将适量的标液加入，然后加浸提液振荡提取，以后步骤相同。

测定浸提液在 220 nm 和 275 nm 处吸光度 A_{220} 和 A_{275} 。按下式计算校正吸光度 A ：

$$A = A_{220} - fA_{275} \quad (1)$$

采用 Norman 等^[10,12]的方法去除浸提液中的 NO₃-N，再测定处理后的溶液在 220 nm 和 275 nm 处的吸光度，计算二者的比值，即为 f 。本方法参照

宋歌等^[13]在 9 种不同类型土壤上测定得到的 2.2 作为 f 值。建立 A 与 NO₃-N 浓度之间的相关曲线后，就可算出浸提液中 NO₃-N 浓度。本方法采用工作范围为 0.1 ~ 5.0 mg/L 和 0.005 ~ 0.8 mg/L NO₃-N 两套定标标准。

1.3.2 基于镉柱还原的流动注射法(以下简称为镉柱还原法) 仪器配置：NO₂/NO₃方法盒，540 nm 测量滤光片和 720 nm 参比滤光片，5000 3139 预装还原镉柱。

测定原理：包含亚硝酸盐/硝酸盐的样品与缓冲溶液混合后经过镉柱，样品中的硝酸根被镉还原剂还原为亚硝酸根，原有的和从硝酸根还原得到的亚硝酸根与酸性的氨基苯磺酰胺(磺胺)溶液生成偶氮化合物，与萘胺盐酸盐进一步反应形成红色含氮染料，在 540 nm 处进行测量。本方法所测试的氮为土壤浸出液中的硝酸盐和亚硝酸盐总和，但与硝酸盐量相比本研究样品中亚硝酸盐极低，可忽略不计。

操作步骤：样品前处理操作步骤同 1.3.1，滤液上流动注射仪测定。为提高样品 NO₃低浓度时的测定精度，本方法采用工作范围为 0.1 ~ 5.0 mg/L 和 0.005 ~ 0.8 mg/L NO₃-N 两套定标标准，样品圈分别为 40 μ l 和 400 μ l。在样圈变换过程中同时进行时间校正，防止读数波峰延迟。

1.4 统计方法

使用 SAS8.1 对测定结果进行统计分析，其中不同方法测定结果的比较使用单因素方差分析。

2 结果与讨论

2.1 方法的检出限和定量限比较

检出限是指产生一个能可靠地被检出的分析信

号所需要的某元素的最低浓度或含量,而定量限是指样品中被测物能被定量测定的最低值。对两种方法的校准曲线进行统计,所有校准曲线线性拟合的判定系数均高于 0.999 0。根据 MacDougall 等方法^[14]和国际纯粹与应用化学联合会(IUPAC)的规定,采用空白测量(不少于 20 次)平均值加 3 倍标准差作为方法的检出限,采用空白测量平均值加 10 倍标准差作为方法的定量限。本研究中采用工作范围为 0.1 ~ 5.0 mg/L 和 0.005 ~ 0.8 mg/L NO₃⁻-N 两套定标标准。紫外分光光度法低标定标准(0.005 ~ 0.8 mg/L)的检出限为 0.24 mg/kg,定量限为 0.55 mg/kg,而镉柱还原法的检出限为 0.18 mg/kg,定量限为 0.38 mg/kg;高标定标准(0.1 ~ 5.0 mg/L)中紫外分光光度法的检出限为 0.20 mg/kg,定量限的为 0.44 mg/kg,而镉柱还原法的检出限为 0.23 mg/kg,定量限为 0.55 mg/kg。可

见在低浓度时,镉柱还原法的精确度略高于紫外分光光度法,而高浓度测量时其精确度略低于紫外分光光度法。但镉柱还原法在定标标准改变时,需要调整流动注射仪的样品圈,如低浓度测定时,需要把样品圈分别从 40 μl 换成 400 μl,测高浓度时再换成 40 μl 的样品圈,而紫外法可直接测定,不需要改变仪器配置。

2.2 测定均值比较

表 2 中的数据为 12 批次重复测定所得平均值。H 样品 NO₃⁻-N 含量低于两种方法的检出限(0.18 和 0.24 mg/kg),因此该样品不纳入本研究方法的讨论。NO₃⁻-N 含量次低的 J 样品略高于检出限,镉柱还原法对该样品的测定体现出略高的测定值和小 CV 值,可见低浓度含量测定时,镉柱还原法的精确度略高于紫外分光光度法。

表 2 两种方法土壤硝态氮的测定结果(mg/kg)
Table 2 Comparison between the two methods in NO₃⁻-N determination

方法	项目	土样编号									
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
镉柱法	均值	8.12 b	4.33 b	32.23 b	5.14 b	9.68 b	3.18 b	46.11 a	0.01 b	11.82 a	0.51 a
	标准差	0.20	0.13	1.36	0.27	0.21	0.15	1.61	0.02	0.71	0.04
	CV (%)	2.5	3.1	4.2	5.2	2.2	4.6	3.5	138.4	6.0	7.8
紫外法	均值	10.13 a	5.74 a	33.96 a	5.44 a	10.66 a	3.43 a	46.93 a	0.10 a	12.22 a	0.47 a
	标准差	0.25	0.13	0.74	0.19	0.15	0.04	0.78	0.04	0.38	0.04
	CV (%)	2.5	2.3	2.3	3.5	1.4	1.1	1.7	40.5	3.1	8.7

注：同列数据小写字母不同表示两种方法测定差异达到 $P<0.05$ 显著水平。

两种方法对每种土样都进行了 12 批次测定,结果表明两种方法的重现性较好,各自平行测定值差异不显著。从两种测定结果的变异系数来看,两种方法的精确度都较高,但在高含量 NO₃⁻-N 测定时紫外法的精确度较高,以往研究也得到类似的结果^[3,10-11]。

两种测定方法的结果有显著差异,但有机质含量对测定结果干扰在两种方法差异性比较上并不一致,如北京褐土(J)有机质含量较低,而沈阳的潮棕壤(G)和常熟的水稻土(I)有机质含量较高,但两种方法未出现显著性差异,而其余土壤的测定结果表现出紫外法与镉柱还原法有显著差异性($P<0.05$)。宋歌等^[13]利用紫外法和镀铜镉还原-重氮化偶合比色法测得不同土壤 NO₃⁻-N 的结果也出现了显著性差异($P<0.05$),陕红等^[15]研究也发现分析方法可显著影响土壤中 NO₃⁻-N 的测定值。本研究表明,测定方法间存在显著差异的土样均为紫外法测定结果高于镉柱还原法,这与陕红等^[15]利用 3 种土壤进行 NO₃⁻-N 测定方法比较的结果是一致的。两种方法测定结果出现差异可能与紫外法

f 值的取值大小有关。每一种土壤的校正因数 f 值取决于测试时选用的波长和有机质的性质。宋歌等^[13]研究表明,紫外法与镀铜镉还原-重氮化偶合比色法相比较时, f 值取值为 2.2,比取值为 2.0 的测定结果差异更小,但仍有个别土壤出现差异。因此, f 取何值时能够尽可能使全部类型的土壤测定的结果更为可信,且与经典方法无差异,这值得我们进一步研究分析。

2.3 两种分析方法准确度比较

表 4 结果表明,镉柱还原法测得回收率的范围是 91% ~ 104%,紫外法测得的回收率范围是 89% ~ 97% (除样品 H 外),两种方法的回收率都达到了技术标准的实验要求^[16]。对于 NO₃⁻ 含量次低的样品 J,镉柱还原法测定的精确度更高些(表 2),而回收试验也表明镉柱还原法测定的准确度高于紫外法,可见从准确度角度考虑,镉柱还原法更适合低 NO₃⁻ 含量的测定。刘建坤等^[17]总结紫外分光光度法和镉柱还原法测水中 NO₃⁻-N 时表明,紫外分光光度法的 LLD(检出下限)

远高于镉柱还原法, 同样说明低浓度 NO_3^- -N 的测定适宜选用镉柱还原法。对于高 NO_3^- 含量的土样测定, 无论是重复测定结果还是加标回收试验结果, 都表现

出紫外法的变异系数远小于镉柱还原法, 说明前者对 NO_3^- 含量较高的样品(本研究中 $>3 \text{ mg/kg}$)测定精确度更好。

表 3 两种测定方法的硝态氮回收率($n = 6$)
Table 3 Recoveries of the two soil NO_3^- -N determination methods

方法	项目	土样编号									
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
镉柱法	回收率 (%)	96	92	94	91	104	94	96	93	92	94
	CV (%)	2.5	3.1	4.2	5.2	2.2	4.6	3.5	140.7	6.0	7.5
紫外法	回收率 (%)	97	94	94	91	96	96	94	84	91	89
	CV (%)	2.5	2.4	2.2	3.4	1.4	2.6	1.5	41.6	3.1	8.9

另外, 镉柱还原法尽管使用了自动化的流动注射分析仪避免了人为操作误差, 具有分析速度快、操作自动化等优点, 但受镉柱还原率、时间校正等因子影响, 在仪器校准等方面要求高于紫外法, 可能会出现重复性和稳定性较差的现象。叶祥盛等^[18]对镉柱还原法与酚二磺酸比色法比较发现镉柱还原法精密度不如酚二磺酸比色法, 但两者准确度相同。

2.4 两种分析方法的相关性及适用性分析

镉柱还原法与紫外法测定结果的相关性分析表明, 两种方法测定值之间极显著相关($y = 1.018x + 0.5812$, $R^2 = 0.998$, $P < 0.01$, $n = 12$), 因此这两种方法之间具有可比性。宋歌等^[13]对 4 种方法测定的 NO_3^- -N 结果进行比较发现, 紫外分光光度法与酚二磺酸比色法等 3 种经典方法完全可以进行对比。叶祥盛等^[17]研究表明, 基于镉柱还原的流动注射分析法与酚二磺酸比色法相关性极显著, 两种方法测定的结果相差很小。这说明紫外法和镉柱还原法测定的结果是可信的。

从仪器操作和校准上, 镉柱还原法较紫外法更为复杂, 其耗材如镉柱等成本高, 也易形成污染。紫外法测定所需要的仪器便宜, 低 NO_3^- -N 浓度测定结果与镉柱还原法相比并没有显著差异, 而高浓度测定时优势明显(精密度、稳定性及精确度较高), 操作简便, 在自动进样装置配合下紫外法的适用范围可能更广。

3 结论

针对不同土壤类型进行的 NO_3^- -N 测定方法对比, 结合加标回收试验的结果来看, 紫外分光光度法(校正因数法)与镉柱还原法的测定结果具有较高可比性, 两种方法的精确度和准确度均能满足实验测定要求。在浓度适用性上看来, 低 NO_3^- 含量土样采用镉柱还原法可提高测定精确度, 对于高 NO_3^- 含量的土样测定选用紫外法可提高测定精确度。

两种测试分析方法所测定的值有一定的差异, 在如何消除测定值的差异性上, 需要深入研究如何消除干扰因子、选择合理 f 值, 继而减小两种方法的测定差异性, 提高方法的适用性。

参考文献:

- [1] 朱兆良, 文启孝. 中国土壤氮素[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1994: 1-303
- [2] 陈新平, 李志宏, 王兴仁, 张福锁. 土壤、植株快速测试推荐施肥技术体系的建立与应用[J]. 土壤肥料, 1999(2): 6-10
- [3] 叶优良, 李生秀. 石灰性土壤起始 NO_3^- -N 对土壤供氮能力测定方法的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2002, 8(3): 310-317
- [4] 李志宏, 刘宏斌, 张福锁. 土壤硝态氮速测箱(N-kit)在小麦追肥中的应用研究[J]. 土壤通报, 2006, 37(1): 99-102
- [5] 中国土壤学会农业化学专业委员会. 农业化学常规分析法[M]. 北京: 科学出版社, 1989: 91-93
- [6] 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, 1999: 156-162
- [7] 鲍士旦. 土壤农化分析. 3 版[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 49-50
- [8] 刘光崧. 土壤理化分析与剖面描述[M]. 北京: 中国标准出版社, 1996: 35-38
- [9] 中国科学院南京土壤研究所. 土壤理化分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1978: 87-90
- [10] Norman RJ, Edberg JC, Stucki JW. Determination of nitrate in soil extracts by dual-wavelength ultraviolet spectrophotometry[J]. Soil Science Society of America Journal, 1985, 49(5): 1182-1185
- [11] 李西开. 紫外分光光度法测定硝酸盐[J]. 土壤学进展, 1983(6): 44-56
- [12] Norman RJ, Stucki JW. The determination of nitrate and nitrite in soil extracts by ultraviolet spectrophotometry[J]. Soil Science Society of America Journal, 1981, 45(2): 347-353
- [13] 宋歌, 孙波, 教剑英. 测定土壤硝态氮的紫外分光光度法与其他方法的比较[J]. 土壤学报, 2007, 44(2): 288-293

- [14] American Chemical Society. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry[J]. *Analytical Chemistry*, 1980, 52(14): 2 242–2 249
- [15] 陕红, 张庆忠, 张晓娟, 韩瑞芸, 封朝晖. 保存、分析方法等因素对土壤中硝态氮测定的影响[J]. *分析测试学报*, 2013, 32(12): 1 466–1 471
- [16] 中华人民共和国环境保护部. 土壤环境监测技术规范 (HJ/T 166-2004) [S]. 北京: 标准出版社, 2004
- [17] 刘建坤, 朱家平, 郑荣华. 水中硝酸根测定标准方法比较[J]. *中国卫生检验杂志*, 2009, 19(6): 1 412–1 413
- [18] 叶祥盛, 赵竹青. 流动注射法与国标法测定土壤硝态氮含量的比较[J]. *湖北农业科学*, 2011, 50(4): 698–699, 707

Comparison Between Ultraviolet Spectrophotometry and Cadmium Reduction Method in Determination of Soil Nitrate-N

TU Cheng^{1,2}, HUAGN Wei^{1,2}, CHEN An-lei^{1*}, SONG Ge³, CHEN Chun-lan¹, WANG Wei¹, XIE Xie-li¹

(1 *Key Laboratory of Agro-ecological Processes in Subtropical Region, Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, China*; 2 *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*; 3 *Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China*)

Abstract: The modified UV spectrophotometry and cadmium reduction method (flow injection analysis) are two main methods applied to rapid analysis of NO_3^- -N. To explore the difference and application in the measurement of NO_3^- -N by the two methods, 10 soil samples from different regions of China were determined by the two methods. Results showed that significant correlations existed between NO_3^- -N contents determined by the two methods, the precision of the two methods ranged from 89% to 104%. There are difference in methods application depend on the content range, for low content of NO_3^- -N, cadmium reduction method was better than UV spectrophotometry in accuracy, but for high content of NO_3^- -N, UV spectrophotometry was better with higher precision and lower variability, and the measured value using UV spectrophotometry method were higher than that using cadmium reduction method. UV spectrophotometry was more suitable for rapid analysis of large batches of soil samples for its simple operation and less interference factors.

Key words: UV spectrophotometry; Cadmium reduction method; Flow injection analysis; NO_3^- -N