

微扩散法测定铵态氮、硝态氮的 ^{15}N 稳定同位素研究综述^①

温 腾^{1,2,3}, 曹亚澄¹, 张珮仪¹, 张金波^{1,2,3*}

(1 南京师范大学地理科学学院, 南京 210023; 2 江苏省物质循环与污染控制重点实验室, 南京 210023;

3 江苏省地理信息资源开发与利用协同创新中心, 南京 210023)

摘 要:微扩散法是测定氮转化过程中铵态氮、硝态氮的 ^{15}N 稳定同位素的重要方法。自 20 世纪 50 年代 Conway 提出微扩散法的基本原理后, 随着分析技术的迅速发展, 微扩散法与质谱仪测定技术相结合, 被广泛应用在环境、生态和农业领域中土壤、水体等样品的测定。虽然微扩散法与传统蒸馏法相比优点明显, 但其测定结果的准确性、精密性仍受氮回收量、同位素分馏、外源性和内源性的杂质氮污染等因素的影响。如何优化扩散体系, 提高测定的准确度是当前微扩散法应用的关注重点。本文综述了影响微扩散法的多种因素, 并总结了优化微扩散体系的方法, 以期推动微扩散法在我国氮素转化研究中的应用。

关键词:微扩散; 铵态氮; 硝态氮; ^{15}N

中图分类号:S151.9; S154

稳定同位素示踪技术是当前环境、生态和农业各领域研究中的一项重要技术。 ^{15}N 稳定同位素作为一种示踪剂, 已被广泛应用于陆地和水生态系统的氮转化研究^[1-2]。无机态氮作为氮转化过程的重要形态, 其 ^{15}N 丰度的测定(特别是 NH_4^+ 和 NO_3^-)尤其重要^[3]。目前通用的无机氮测定方法是杜马法(Dumas): 首先从固体或液体样品中提取出 NH_4^+ 和 NO_3^- 后, 在与元素分析仪联用的质谱仪(EA-IRMS)上经过一系列燃烧、氧化和还原过程, 将其转化为 N_2 , 最后纯化后的 N_2 经质谱测定其 ^{15}N 丰度^[4]。如何有效、快速、定量地从样品中提取 NH_4^+ 和 NO_3^- 是杜马法的关键步骤。传统常用的方法是蒸馏法(Kjeldahl distillation), 但该方法需专门的设备和熟练的操作人员, 操作过程费时费力, 对样品的氮量要求较高, 而且蒸馏过程中易发生样品间的交叉污染^[5]。近年来, 一种通过微扩散(micro-diffusion)的方法提取样品中的 NH_4^+ 和 NO_3^- 被国外学者广泛采用。与蒸馏法相比, 该法操作明显简化, 样品制备步骤简单, 样品间不易交叉污染, 对氮量要求较低, 不但适用于自然丰度的样品测试, 也适合测定高 ^{15}N 丰度的示踪样品^[5-7], 还能避免高温蒸馏过程中引起的有机氮分解和同位素分馏。在国外,

微扩散法已逐渐替代了传统的蒸馏法, 但在国内该法在 ^{15}N 稳定同位素样品测定上的应用仍很有限。本文将着重围绕微扩散法的基本原理、影响微扩散法测定结果的主要因素、优化微扩散法的方法及其在 ^{15}N 稳定同位素示踪和氮转化研究中的应用前景几方面分别介绍。

1 微扩散法的基本原理

早在 1939 年, Conway 和 Cooke^[8-9]就提出了应用微扩散的方法可定量测定血液、尿液等样品中的有机氮含量, 并在 1957 年进一步总结阐述了微扩散法的原理、主要步骤和注意事项。随后, Brooks 等^[5]及 MacKown 和 Van Sanford^[10]首次将微扩散法应用在土壤样品的 ^{15}N 稳定同位素测定上。在 1990—2010 年期间, 学者们对该方法做了一系列的改进, 不但进一步简化其操作步骤、缩短操作时间, 而且提高了测定结果的准确度和精密性, 同时拓宽了该方法的使用范围, 提出了适合不同类型样品(高丰度或自然丰度样品, 土壤、植株或海水样品, 甚至富含有机氮的样品)的微扩散方法体系^[11-14]。

微扩散法是在一个较小体积的密闭反应容器内

基金项目: 国家自然科学基金项目(41501254)、江苏省高校自然科学研究面上项目(15KJB210002)和江苏高校优势学科建设工程项目(164320H116)资助。

* 通讯作者(zhangjinbo@njnu.edu.cn)

作者简介: 温腾(1980—), 女, 福建莆田人, 博士, 实验师, 主要从事稳定同位素技术与土壤氮转化研究。E-mail: wenteng@njnu.edu.cn

(通常为200~600 ml),加入一定量的样品(10~400 ml)后,通过添加 MgO 、 NaOH 等碱性试剂,调节样品溶液的 pH 为弱碱性,使 NH_4^+ 转化为 NH_3 ,并在其挥发释放过程中,被含弱酸性吸收液(硼酸、稀硫酸、 KHSO_4 等)的玻璃纤维或滤纸(5~20 mm)所吸收的过程^[4-5, 9, 14]。整个扩散过程所需的时间视具体样品和扩散条件而定,可从若干小时到10天不等。扩散可在常温下(20~25℃)静置进行,也可通过加热或震荡的方法加速扩散过程。对于 NH_4^+ ,可在样品中直接加入 MgO 等碱性试剂;对于 NO_3^- ,则需要加入戴氏合金(Devarda's alloy)将其还原为 NH_4^+ ,再进行扩散。扩散完成后,将滤纸片小心取出,在无氮的环境中干燥后,放入锡杯中包好,通过 EA-IRMS 测定滤纸的 ^{15}N 稳定同位素比值,即为样品的 ^{15}N 稳定同位素比值。

2 微扩散法的主要影响因素

与传统的蒸馏法相比,微扩散法优点明显,但要实现对不同类型(土壤、水体等)、浓度、丰度的样品中 ^{15}N 稳定同位素比值的准确测定,需在几个方面进一步探讨和改进:如何提高样品中的氮回收率,减少扩散过程中的同位素分馏?如何降低扩散过程中杂质氮的污染,并选择合适的方法校正?如何优化扩散体系,缩短扩散所需时间?

2.1 氮回收量和同位素分馏

在微扩散过程中, NH_4^+ 在碱性溶液中释放出 NH_3 ,较轻的 ^{14}N 往往会先于 ^{15}N 挥发出来,因此在样品中的氮量无法完全回收的情况下,其产生的同位素分馏效应会造成测定值低于实际值。早期有研究指出样品中的氮量应尽量完全回收,以减少同位素分馏造成的误差^[15]。事实上,要实现氮量的100%回收非常困难。微扩散过程是在密闭容器中进行,加入碱性试剂后的放热效应,会在瓶壁和瓶盖处出现冷凝小水珠,这些小水珠会和滤纸片竞争吸收 NH_3 ,降低氮的回收量^[7]。那么,氮量回收不完全引起的同位素分馏是否一定对测定结果有显著影响呢?Jensen^[16]发现,随着培养时间的延长,样品中的氮的回收量会显著升高,但样品的 ^{15}N 丰度并无明显变化;Stark和Hart^[14]在比较悬挂法和扩散包法时发现,同样培养条件下悬挂法的氮回收量显著低于扩散包法,但校正后两种方法得到的 ^{15}N atom% 值无明显差异;Sigman等^[17]在用扩散法测定海水中硝酸盐的 $\delta^{15}\text{N}$ 值时也发现,氮量回收不完全引起同位素分馏的误差可忽略不计。扩散过程中的同位素分馏,并不一定是氮回收量不完全所致,扩散距离长短、扩散速度快慢等因素,

也会产生同位素分馏。因此,在仅需测定样品 ^{15}N 丰度的情况下,100%的氮回收量并非必要。当然,过低的氮回收量引起的同位素分馏产生的误差的确不可小觑,Holmes等^[21]运用扩散法测定大体积、低氮量的海水样品中 NH_4^+ 的 $\delta^{15}\text{N}$ 值时,发现培养时间长、样品体积变化都会显著影响 $\delta^{15}\text{N}$ 值,加长培养时间或减少样品体积,都可以提高样品中的氮回收量,减小测定值和理论值的差距,因此低氮量的样品在扩散过程中应尽量提高其氮回收量,减少同位素分馏效应。此外,测定样品中总无机氮的丰度时,如果样品中 NH_4^+ 和 NO_3^- 的 ^{15}N 丰度相差较大,由于在扩散体系中 NH_4^+ 是先于 NO_3^- 释放出来,这种情况下氮量回收不完全是会引起严重的测定误差^[18]。

对微扩散法的实际操作略加改进,可以有效提高样品中的氮回收量。由于在一定范围内氮回收量和扩散时间呈正比,延长扩散培养时间可有效提高氮回收率^[7, 14, 16]。选择对 NH_3 吸收能力较强的酸性试剂,或增加滤纸上的酸的用量或浓度,也可以有效提高氮回收率。常见的吸收剂有稀硫酸、 KHSO_4 和硼酸,同等体积下(10 μl),2.5 mol/L的 KHSO_4 能吸附350 $\mu\text{g N}$,而5 mol/L的 H_2SO_4 最多可吸附1400 $\mu\text{g N}$ ^[5]。使用水或盐溶液提取植株、土壤等固体样品的无机氮时,含 K^+ 的盐溶液较水溶液更能增加氮回收量,这是因为水提液会在滤纸上积累过多水分,水珠的回滴会损失部分氮^[16]。减少 NH_3 的泄漏也可提高氮回收量,由于 NH_4^+ 释放为 NH_3 的过程极为迅速,加入 MgO 等碱性试剂后应迅速盖紧瓶盖以减少氮的损失;戴氏合金将 NO_3^- 还原为 NH_4^+ 的过程产生的 H_2 会增加瓶内气压造成部分 NH_3 泄漏损失,使得 NO_3^- 的氮回收量往往低于 NH_4^+ ^[7]。目前常见的微扩散体系有悬挂法和扩散包法,扩散包法因加液量大、密封良好、震荡并倒置培养,可减少漏气、其他吸收源竞争、水分过饱和等造成的氮损失,因此氮回收量高于悬挂法^[14]。对于低氮浓度的样品,除延长培养时间、加大体积量、使用扩散包法等,也可以通过人为增加样品中的含氮量,来提高氮的回收率^[11]。

2.2 杂质氮的干扰和校正方法的选择

除了氮的回收量和同位素分馏效应外,外源或内源性的杂质氮干扰也会影响微扩散法测定结果的准确性。外源性的杂质氮主要来自于扩散过程使用的试剂(KCl 、水、戴氏合金、 MgO 等)、扩散器具(滤纸、瓶子等)和大气环境中的微量 NH_3 ;内源性的杂质氮主要是样品中的可溶性有机氮(DON)^[5-6, 14, 17, 19]。因此,在操作上减少或避免杂质氮的干扰,并采用合适的方法校正测定结果,有助于提高微扩散法的准确度。

和精密度。

微扩散法使用水或 KCl 等溶液提取样品中的无机氮,添加 MgO 等碱性试剂调节样品的 pH,对于 NO_3^- 还需加入戴氏合金将其转化为 NH_4^+ 。但诸多研究表明,KCl、戴氏合金和 MgO 中都存在不同含量的杂质氮。Jensen^[16]在 50 ml 2 mol/L 的 KCl 溶液中检出 8 μg 的氮,张英利等^[20]在多个批次不同品牌的 KCl 试剂中检出 1.7 ~ 49.1 mg/kg 的氮,这些氮多以 NH_4^+ 或 NO_3^- 的形态存在,对扩散法的测定结果有直接影响;戴氏合金也含有一定量的杂质氮,Stark 和 Hart^[14]在不同厂家不同批次的 0.4 g 合金中检出 3 ~ 24 μg N, Sigman 等^[17]发现虽然不同品牌不同批次合金的含氮量差异大,但其 $\delta^{15}\text{N}$ 值较稳定,对两个品牌合金的多次测定结果为 $-7.5\text{‰} \sim -6\text{‰}$;此外,配制溶液的蒸馏水,加入的 MgO 粉末也可能含有微量的氮。因此,为减少试剂中杂质氮的干扰,应尽量使用优级纯的试剂和不含氮的蒸馏水(如:超纯水),对于 KCl、合金和 MgO 等试剂的用量应根据样品的具体情况进行优化,并尽量使用同一厂家同一批次,研磨过筛成较细的粉末(过 300 目筛)以保证其均一性,对于 KCl 和 MgO 可通过高温灼烧(450 ~ 600 $^{\circ}\text{C}$)减少杂质氮,但戴氏合金若高温加热反而降低其还原性^[17, 21]。

微扩散法使用酸化的滤纸吸收样品中释放的 NH_3 ,玻璃纤维滤纸(glass-fiber filter)和纤维素滤纸(cellulose filter)是常用的两类滤纸,但玻纤滤纸因燃烧后易在氧化管中熔化累积,已渐渐被纤维素滤纸取代^[18]。为减少杂质氮的干扰,滤纸一般是无灰级的定量滤纸,但仍有微量的 NH_4^+ 和 NO_3^- 残留,两张直径 7 mm 的 Whatman no. 2 纤维素滤纸上可检出约 0.16 μg N。通过石英水水洗后高温烘干的方法,可除去滤纸上的杂质氮^[7, 14]。

与蒸馏法相比,为减少样品间的交叉污染,微扩散法通常使用一次性的容器。如果不能使用一次性容器,则需彻底清洗以防止器皿上残留氮对样品的污染。通常玻璃类的器皿,建议使用 0.2 mol/L H_2SO_4 浸泡过夜后,自来水反复冲洗、蒸馏水润洗后烘干;塑料类和不锈钢类器皿建议使用 0.05 mol/L 新鲜配制的 KOH 浸泡过夜后,水洗烘干;为混匀扩散体系而加入的玻璃珠也需事先经过酸洗;取用滤纸的镊子,每次夹取前需依次浸入 0.1 mol/L H_2SO_4 和超纯水并干燥后方可使用^[6, 19]。微扩散的操作应在无水乙醇擦拭过的干净铝箔纸上进行,并使用洁净的一次性手套。

大气环境中也含有极微量的 NH_3 ,可能干扰样品

的测定。因此,整个微扩散操作过程应尽量在无 NH_3 的环境下进行。在滤纸上滴加酸性溶液后,应减少其暴露在大气中的时间,尽快转入扩散培养瓶中^[4]。已吸收了样品所释放的 NH_3 的滤纸片,应在无 NH_3 的环境下干燥(盛有浓硫酸的真空干燥器或冷冻干燥)后再包样。

内源性杂质氮的主要来源是样品中的可溶性有机氮(如:葡萄糖胺、氨基酸等)。在高 pH、较高温度下进行长时间扩散培养,样品中可溶性有机氮会降解为 NH_3 ,直接干扰测定^[17]。Mulvaney 和 Khan^[22]在不同扩散培养时间对有机氮含量较高的土壤取样发现,随着培养时间的延长,样品的 ^{15}N 丰度先升高,渐趋向平稳后又逐渐下降,推测是样品中的可溶性有机氮降解为 NH_3 稀释了样品的实际丰度。Holmes 等^[21]发现扩散培养温度过高($\geq 50^{\circ}\text{C}$)会促进样品中的 DON 分解, Sigman 等^[17]还发现加入过多的 MgO 或戴氏合金,也会促进 DON 分解。因此,对于有机氮含量较高的样品,应优化扩散体系, MgO、戴氏合金用量适度,并尽量在室温下培养,样品体积也不宜过多以缩短完成扩散所需的时间,还可增加提取液中的盐浓度(如:4 mol/L KCl)或增加酸的用量或浓度来加速扩散^[17, 22]。此外,样品中的 DON 可通过离子交换树脂去除;对于仅测定 NO_3^- 的样品,可通过加入茚三酮将氨基氮转化为 NH_3 ,也可加入一定量 MgO 后,在 65°C 下预培养一段时间以除去样品中的有机氮^[17]。

对于需要同时测定 NH_4^+ 和 NO_3^- 的 ^{15}N 值的样品,建议尽量将样品分成两份,分别测定其 NH_4^+ 和 NO_3^- 的 ^{15}N 值^[16]。如果需用同一份样品顺序测定,即先加入 MgO 扩散培养后取出滤纸片测定 NH_4^+ 的 ^{15}N 值,再放入新的滤纸,并加入戴氏合金和 MgO 测定 NO_3^- 的 ^{15}N 值,需注意 NH_4^+ 残留对 NO_3^- 的测定干扰,应待 NH_4^+ 扩散完全后再换入新滤纸^[14]。

要准确测定样品中 ^{15}N 的丰度,除了在操作上尽量减少外源、内源杂质氮的干扰外,可通过设置空白对照,并选用合适的方法校正测定结果。空白对照一般为不添加样品的提取液,在相同条件下扩散培养,估测体系中的杂质氮量。一般选用公式(1)进行校正^[14, 23]:

$$E_s = \frac{E_m M_{s+b} - M_b E_b}{M_{s+b} - M_b} \quad (1)$$

式中: E_s 是校正后的样品 ^{15}N 丰度值; E_m 是实际测定的样品 ^{15}N 值; M_{s+b} 是包含了杂质氮量和样品实际氮量的总氮量;即空白对照氮量和样品氮量的总和; M_b 是空白对照的氮量; E_b 是空白对照的 ^{15}N 值,氮量的值可以是 μg ,也可以是质谱仪上的信号值(mV)

或 $n\text{A})^{[23-24]}$ 。针对该方法未能充分考虑同等培养时间空白对照中的氮回收率可能远低于样品,即 M_b 值不准确,甚至可能影响 E_b 值的准确性。Stark 和 Hart^[14] 提出了另一种校正方法(公式(2)):通过已知丰度和浓度的标准样品,在非扩散条件下的 ^{15}N 值和扩散条件下的 ^{15}N 值,来计算扩散体系中空白对照的氮量 M_b (公式(2)),即杂质氮量。

$$M_b = \frac{M_{\text{std}}(E_m - E_{\text{std}})}{(E_b - E_m)} \quad (2)$$

式中: M_{std} 是标准样品的已知含氮量; E_{std} 是通过将标准样品直接滴加在酸化滤纸上,测定得到的 ^{15}N 丰度,即非扩散条件下标样的 ^{15}N 丰度; E_m 是扩散条件下标样的 ^{15}N 丰度; E_b 是空白对照的 ^{15}N 值(假定为 $0.366\ 3\ \text{atom}\%$)。再将计算得到的空白氮量 M_b 代入公式(3),就得到校正后的样品 ^{15}N 丰度值 E_s 。

$$E_s = E_m + \frac{M_b(E_m - E_b)}{M_s} \quad (3)$$

式中: E_s 为校正后的样品的 ^{15}N 值; M_s 为未扩散培养前样品的含氮量。Stark 和 Hart^[14] 建议,原有的校正方法更适合氮量基本 100% 回收的扩散体系,而在氮量回收不完全的扩散体系中,使用第二种校正方法更为合适。此外,由于样品中氮的浓度和丰度可能存在较大的差异,Lory 和 Russelle^[7] 建议可配置一系列不同浓度、丰度的标准样品,绘制出标准曲线来校正样品的测定值,可进一步提高准确度。

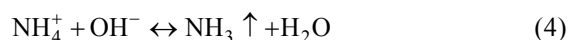
2.3 微扩散体系的优化

与蒸馏法相比,微扩散法简化了操作流程,也无需特定设备,但微扩散法周期较长,往往要在常温下培养 5~10 天,长时间的培养可能引起样品中可溶性有机氮分解,因此如何加快扩散过程、缩短扩散所需时间,一直是备受关注的问题。一般来说,影响扩散速度快慢的主要因素是样品体积和扩散容器的大小形状,其次培养温度、pH、溶液中的离子强度(如: K^+ 、 Na^+ 、 CO_3^{2-} 、 OH^-)和操作上的改进也会影响扩散速度^[7,9]。

早在 1957 年,Conway^[9]就指出样品的表面积和体积的比值是决定扩散速度快慢的关键。也就是说,同样体积的样品置于大容积的培养瓶中扩散速度最快;相同体积的培养瓶,直径大的瓶子扩散速度快;相同培养瓶中小体积样品扩散快。低氮浓度的样品(如:海水样品)往往需大体积量才能满足测定需要,由于大体积的样品需较长时间完成扩散,除使用更大体积的培养瓶提高扩散速度,还可以预浓缩提高样品中氮的浓度,但浓缩倍数不宜过高,因样品 pH 可能

随浓缩而降低,反而不利于扩散过程。Sigman 等^[17] 建议海水样品的浓缩体积应为初始体积的 15%~25%。

升高培养温度、提高样品溶液的 pH 或溶液中的离子强度也会加快扩散进程。Khan 等^[6]通过加热($45\sim 50^\circ\text{C}$)的方法实现在 1.5~5 h 内对 10~20 ml 含 4 mg N 土壤提取液的完全扩散回收,在 5~8.5 h 内对 50~100 ml 含 2 mg N 土壤提取液的扩散回收,扩散时间从至少 1 天以上缩短为 1~8 h。但他同时也指出,培养温度不宜过高,超过 50°C 后虽然扩散速度较之前有所提高,但氮回收率下降,超过 55°C 后不但氮回收率继续减少,扩散速度反而下降,这是因为高温产生的大量冷凝水可能竞争并降低酸吸收 NH_3 的能力。Sigman 等^[17]进一步指出,过高温度下样品内的可溶性有机氮易降解,会影响测定结果。不同样品的最适培养温度差异大,Mulvaney 等^[19]发现当温度超过 30°C ,土壤样品的可溶性有机氮易分解,因此应根据所测样品的自身特点筛选最适培养温度。微扩散法需要加入碱性介质(如: MgO 、 NaOH 、 Na_2CO_3)调节样品溶液的 pH,较高的 pH 不但可促进 NH_3 的释放扩散,还可促进 NO_3^- 转化为 NH_4^+ ^[7,17]。 MgO 因其碱性温和最为常用, NaOH 的碱性虽强于 MgO ,但易降解有机氮, Na_2CO_3 一般用于调节 pH 较低的样品溶液。加大碱性物质的用量可有效提高样品溶液 pH,但有研究发现,调节水体样品的 pH 至 9.7,土壤样品提取液的 pH 至 10.5 后,再升高 pH, NO_3^- 转化速度和 NH_3 扩散速度都没有明显变化^[17]。而且,加入过多的碱性物质可能带入较多杂质氮,反而影响测定结果。通过添加 KCl 、 K_2SO_4 等盐溶液也能提高样品溶液的离子强度,这些盐离子可通过水合作用结合水分子,降低其活性,推动(4)式向右进行,促进 NH_3 的释放^[9]。常用几种盐溶液的扩散速度大致为: $\text{水} < 1\ \text{mol/L}\ \text{KCl} = 0.5\ \text{mol/L}\ \text{K}_2\text{SO}_4 < 2\ \text{mol/L}\ \text{KCl} < 4\ \text{mol/L}\ \text{KCl}$ ^[19]。虽然提高样品溶液的盐浓度可加快扩散,但过高的盐浓度也会促进可溶性有机氮降解,而且 KCl 等试剂中也含有不可忽视的杂质氮量。一些其他盐溶液(如: K_2CO_3 和 $\text{K}_2\text{B}_2\text{O}_4$)虽能促进 NH_3 的释放,也会增加可溶性有机氮的干扰,使用前需反复评估^[25]。



此外,与静置培养相比,适度的摇床震荡或搅拌能促进扩散进程,还可以减少壁上的冷凝水附着,增加氮回收量。Lachouani 等^[26]采用 37°C 下摇培(100 r/min),将扩散所需时间从 5 天缩短为 3 天。但若采用悬挂滤纸法扩散培养时,应注意摇床速度不宜过高,否则溅起的样品溶液易污染滤纸片。由于 MgO 和戴氏合金

几乎不溶于水,在扩散体系中加入玻璃珠,可辅助混匀试剂促进扩散进程。还可在扩散体系放入两片滤纸片,增加吸收面积,来促进扩散、增加氮回收率^[18]。

综上所述,不难看出温度、pH 的升高, KCl、戴氏合金等试剂用量的增加是可以加快扩散反应进程,但也可带来外源或内源性的杂质氮干扰。因此,优化扩散体系不只单纯加快速度缩短时间,而是综合考虑扩散速度、试剂用量、杂质氮干扰三方面因素,并根据样品的特点选择最适合的扩散培养条件。值得指出的是,目前 MgO 和戴氏合金的用量通常为 0.2 ~ 0.4 g,对于大部分样品,这个添加量是过量的,由于 MgO 和戴氏合金中含有一定量的杂质氮,可根据样品类型酌情减少用量;不同温度条件下二者的添加量也有区别,温度高所需的用量相对少^[17];但对于一些有机氮含量高且成分复杂的样品,如:污水、排泄物等,由于样品中可能存在某些还原性有机物或金属螯合物,添加量可能不足, Mulvaney 和 Khan^[22]就发现需在 25℃ 下加入 1.5 g 戴氏合金,或在 45 ~ 50℃ 下加入 0.9 g 合金,才能完成对 4 mg 无机氮的扩散回收。

3 微扩散法的应用前景

在国外,目前微扩散法已基本取代蒸馏法,广泛用来提取土壤、水等样品中的 NH_4^+ 和 NO_3^- 并测定其 $\delta^{15}\text{N}$ 值或 ^{15}N 丰度。但在国内,微扩散法在无机氮 ^{15}N 稳定同位素上的应用并不多见,且主要集中在水体样品的测定上。肖化云和刘丛强^[27]结合离子交换色层法-微扩散法对地下水的 NO_3^- 的 $\delta^{15}\text{N}$ 值分析测定,发现在 50℃ 时扩散 10 天,氮回收率达 95% 以上,且不会引起氮同位素分馏;胡婧和刘卫国^[28]运用微扩散法测定了水体中的 NH_4^+ 的 $\delta^{15}\text{N}$ 值,发现 1.50 mg/L 的氯化铵溶液 400 ml,在室温下扩散 14 天,氮回收率 >95% 且不产生氮同位素分馏;并进一步将其用于研究水体中无机氮的污染来源^[29-31];孙建飞等^[32]将微扩散法应用于土壤 ^{15}N 示踪试验中 NH_4^+ 和 NO_3^- 的测定,提出适用于丰度和含氮量变化较大的示踪样品的微扩散体系;Zhang 等^[24]将微扩散法与其他方法相结合,提出了适用更小体积(5 ~ 10 ml)、更低 NH_4^+ 浓度(15 ~ 60 $\mu\text{mol/L}$)样品的 ^{15}N 测定方法。考虑到蒸馏法存在的局限性,推广微扩散法的应用,不但可简化操作,节约人、物力,更可提高测定结果的准确性和灵敏度。

近年来在无机氮的 ^{15}N 稳定同位素测定上,各种更灵敏的新方法不断被报道,例如:通过一系列化学

反应将无机氮(NH_4^+ 、 NO_3^- 、 NO_2^-)转化为 N_2O ,测定其 ^{15}N 丰度的化学转化法^[3, 33];利用不含 N_2O 还原酶的反硝化菌将 NO_3^- 转化为 N_2O 的反硝化法^[34-35];运用铬和叠氮钠将自然丰度样品中的 NO_3^- 转化为 N_2O 的化学法^[36-37]等等。这些方法基本通过将无机氮转化为 N_2O 气体,在与微量预浓缩装置联用的质谱仪上测定 N_2O 中的氮、氧同位素比值。虽然这些方法的灵敏度显著优于微扩散法,但样品的预处理往往较为繁琐,涉及微生物的培养和大量试剂的配制,有些反应还会生成剧毒的中间产物(如: HN_3),而且样品在质谱仪上的测定时间长(≥ 30 min),测定过程需不断添加液氮,成本较高;而微扩散法操作简单、安全,样品是在联用元素分析仪的质谱仪(EA-IRMS)上测定,所需测定时间短(≤ 10 min),测试成本较低,适合大批量样品测定。此外,微扩散法可与化学法或反硝化法相结合,发展出适合不同类型样品的更高灵敏度的测定方法:Zhang 等^[24]针对酸性森林土壤的 KCl 提取液中存在某些还原物质,难以用化学法(BrO^- 和 NH_2OH)将 NH_4^+ 还原为 N_2O 的问题,将土壤中的 NH_4^+ 首先用微扩散法释放出来,再用化学法将滤纸片上的 NH_3 转化为 N_2O ,测试灵敏度达 $\mu\text{mol/L}$ 级别;Lachouani 等^[26]用微扩散法将微量(≥ 12.4 $\mu\text{mol/L}$)的 NH_4^+ 从土壤中提取出来,再通过反硝化细菌或化学转化的方法将其转化为 N_2O 。由此可见,微扩散法作为一种已发展多年、较为成熟的无机氮的提取方法,不但适合于示踪培养试验中大批量样品的 ^{15}N 丰度测定,也可与新的方法结合,发展出适用自然丰度样品的更为灵敏的 $\delta^{15}\text{N}$ 值的测试方法,仍是一种极具应用潜力的方法。

4 结论

在铵态氮、硝态氮的 ^{15}N 稳定同位素测定上,微扩散法已逐渐替代传统蒸馏法,但其扩散过程受氮回收量、杂质氮等因素影响。100% 的氮回收率并非必要,但提高氮回收量可减少氮同位素分馏,采用扩散包法、适当延长培养时间、优化样品体积,选择合适的酸吸收剂和盐溶液可有效提高氮回收量。外源性(扩散试剂、器具和大气环境)和内源性(样品的 DON)的杂质氮会影响微扩散法的结果准确性,外源杂质氮可通过使用优级纯试剂、优化其用量、高温加热等方法,减少试剂中的杂质氮,并充分清洁各种器具以减少氮残留和交叉污染;内源杂质氮主要是样品中 DON 的降解,可通过对培养温度、培养时间、MgO 和戴氏合金用量的综合优化,或通过预处理去除

DON, 来减少干扰。此外, 选择合适的校正方法也有助于减少杂质氮对测定结果准确性的影响。最后, 扩散体系的优化不只是加快扩散速度、缩短培养时间, 而应综合考虑扩散速度、试剂用量、杂质氮干扰三方面, 根据样品的特点选择最合适的扩散培养条件。总而言之, 微扩散法较蒸馏法优点明显、前景广阔, 可广泛应用于无机氮 ^{15}N 稳定同位素的测定, 若与其他新方法相结合, 还会极大地提高测定方法的灵敏度和准确度。

参考文献:

- [1] 程谊, 蔡祖聪, 张金波. ^{15}N 同位素稀释法测定土壤氮素总转化速率研究进展[J]. 土壤, 2009, 41(2): 165–171
- [2] 兰婷, 韩勇, 唐昊治. 采用 ^{15}N 同位素稀释法研究不同层次土壤氮素总转化速率[J]. 土壤, 2011, 43(2): 153–160
- [3] 曹亚澄, 钟明, 龚华, 等. N_2O 产生法测定土壤无机态氮[J]. 土壤学报, 2013, 50(1): 113–119
- [4] Sebito M, Mayer B, Grably M, et al. The use of the ‘Ammonium Diffusion’ method for $\delta^{15}\text{N}\text{-NH}_4^+$ and $\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_3^-$ measurements: Comparison with other techniques[J]. Environmental Chemistry, 2004, 1(2): 99–103
- [5] Brooks P, Stark J M, McInteer B, et al. Diffusion method to prepare soil extracts for automated nitrogen-15 analysis[J]. Soil Science Society of America Journal, 1989, 53(6): 1 707–1 711
- [6] Khan S, Mulvaney R, Mulvaney C. Accelerated diffusion methods for inorganic-nitrogen analysis of soil extracts and water[J]. Soil Science Society of America Journal, 1997, 61(3): 936–942
- [7] Lory J, Russelle M. Evaluation of a diffusion method for preparing low-nitrogen samples for nitrogen-15 analysis[J]. Soil Science Society of America Journal, 1994, 58(5): 1 400–1 404
- [8] Conway E J, Cooke R. Ammonia formation in shed blood and a characteristic deaminase of the blood stream[J]. Nature, 1937, 139: 627
- [9] Conway E J. Microdiffusion analysis and volumetric error[M]. 4th ed. London: Crosby Lockwood and Son, 1957
- [10] MacKown C, Van Sanford D. Nitrogen allocation with altered sink demand in wheat[J]. Crop Science, 1988, 28(1): 133–136
- [11] Bradley R, Fyles J. Method to avoid isotope discrimination during the diffusion of NH_4^+ from ^{15}N -labelled soil extracts[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1996, 28(4): 695–697
- [12] Burke I C, O’Deen L A, Mosier A R, et al. Diffusion of soil extracts for nitrogen and nitrogen-15 analyses by automated combustion/mass spectrometry[J]. Soil Science Society of America Journal, 1990, 54(4): 1 190–1 192
- [13] Liu Y, Mulvaney R. Diffusion of Kjeldahl digests for automated nitrogen-15 analysis by the Rittenberg technique[J]. Soil Science Society of America Journal, 1992, 56(4): 1 151–1 154
- [14] Stark J M, Hart S C. Diffusion technique for preparing salt solutions, Kjeldahl digests, and persulfate digests for nitrogen-15 analysis[J]. Soil Science Society of America Journal, 1996, 60(6): 1 846–1 855
- [15] Kazungu J, Dehairs F, Goeyens L. Nutrients distribution patterns in Tudor estuary (Mombasa, Kenya) during rainy season[J]. Kenya Journal of Sciences Series B, 1989, 10: 47–61
- [16] Jensen E. Evaluation of automated analysis of ^{15}N and total N in plant material and soil[J]. Plant and Soil, 1991, 133(1): 83–92
- [17] Sigman D, Altabet M, Michener R, et al. Natural abundance-level measurement of the nitrogen isotopic composition of oceanic nitrate: An adaptation of the ammonia diffusion method[J]. Marine Chemistry, 1997, 57(3): 227–242
- [18] Khan S, Mulvaney R, Brooks P. Diffusion methods for automated nitrogen-15 analysis using acidified disks[J]. Soil Science Society of America Journal, 1998, 62(2): 406–412
- [19] Mulvaney R, Khan S, Stevens W, et al. Improved diffusion methods for determination of inorganic nitrogen in soil extracts and water[J]. Biology and Fertility of Soils, 1997, 24(4): 413–420
- [20] 张英利, 许安民, 尚浩博, 等. 氯化钾中杂质铵含量及对土壤铵态氮测定的影响[J]. 土壤通报, 2010(5): 1 134–1 137
- [21] Holmes R, McClelland J, Sigman D, et al. Measuring $^{15}\text{N}\text{-NH}_4^+$ in marine, estuarine and fresh waters: An adaptation of the ammonia diffusion method for samples with low ammonium concentrations[J]. Marine Chemistry, 1998, 60(3): 235–243
- [22] Mulvaney R, Khan S. Use of diffusion to determine inorganic nitrogen in a complex organic matrix[J]. Soil Science Society of America Journal, 1999, 63(1): 240–246
- [23] Kelley K, Ditsch D, Alley M. Diffusion and automated nitrogen-15 analysis of low-mass ammonium samples[J]. Soil Science Society of America Journal, 1991, 55(4): 1 016–1 020
- [24] Zhang S, Fang Y, Xi D. Adaptation of micro-diffusion method for the analysis of ^{15}N natural abundance of ammonium in samples with small volume[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2015, 29: 1–10
- [25] Bremner J, Shaw K. Determination of ammonia and nitrate in soil[J]. The Journal of Agricultural Science, 1955, 46(3): 320–328
- [26] Lachouani P, Frank A H, 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
- [27] 肖化云, 刘丛强. 水样硝酸盐氮同位素分析预处理方法探讨[J]. 岩矿测试, 2002, 21(2): 105–108
- [28] 胡婧, 刘卫国. 扩散法—EA-IRMS 测定天然水体铵态氮同位素实验条件研究[J]. 矿物岩石地球化学通报, 2010, 29(1): 31–37

- [29] 肖化云, 刘丛强. 氮同位素示踪贵州红枫湖河流季节性氮污染[J]. 地球与环境, 2004, 32(1): 71–75
- [30] 岳甫均, 李军, 刘小龙, 等. 利用氮同位素技术探讨天津地表水氮污染[J]. 生态学杂志, 2010, 29(7): 1 403–1 408
- [31] 王丽丽, 吴俊森, 王琦. 水体中硝酸盐氮同位素分析预处理方法研究现状[J]. 环境科学与管理, 2011, 36(9): 54–58
- [32] 孙建飞, 白娥, 戴巍巍, 等. ^{15}N 标记土壤连续培养过程中扩散法测定无机氮同位素方法改进[J]. 生态学杂志, 2014, 33(9): 2 574–2 580
- [33] Laughlin R, Stevens R, Zhuo S. Determining nitrogen-15 in ammonium by producing nitrous oxide[J]. Soil Science Society of America Journal, 1997, 61(2): 462–465
- [34] Mørkved P T, Dörsch P, Henriksen T M, et al. N_2O emissions and product ratios of nitrification and denitrification as affected by freezing and thawing[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2006, 38(12): 3 411–3 420
- [35] Sigman D, Casciotti K, Andreani M, et al. A bacterial method for the nitrogen isotopic analysis of nitrate in seawater and freshwater[J]. Analytical Chemistry, 2001, 73(17): 4 145–4 153
- [36] McIlvin M R, Altabet M A. Chemical conversion of nitrate and nitrite to nitrous oxide for nitrogen and oxygen isotopic analysis in freshwater and seawater[J]. Analytical Chemistry, 2005, 77(17): 5 589–5 595
- [37] 王曦, 曹亚澄, 韩勇, 等. 化学转化法测定水体中硝酸盐的氮氧同位素比值[J]. 土壤学报, 2015, 52(3): 558–566

On Progress in Use of Micro-diffusion Method in $\delta^{15}\text{N}\text{-NH}_4^+$ and $\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_3^-$ Measurements

WEN Teng^{1,2,3}, CAO Yacheng¹, ZHANG Peiyi¹, ZHANG Jinbo^{1,2,3*}

(1 School of Geography Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China; 2 Jiangsu Provincial Key Laboratory of Materials Cycling and Pollution Control, Nanjing 210023, China; 3 Jiangsu Center for Collaborative Innovation in Geographical Information Resource Development and Application, Nanjing 210023, China)

Abstract: Since Conway first outlined fundamental principles of micro-diffusion technique in 1957, it was then adapted to prepare samples for ^{15}N isotope measurements. Currently it has been widely developed for nitrogen isotope measurements on ammonium (NH_4^+) and nitrate (NO_3^-) in solid and aqueous samples. Compared with traditional distillation method, micro-diffusion technique is advocated because it eliminates cross contamination and requires less operator skill and time. However, the accuracy and sensitivity of this technique is still limited by some factors, including N recovery, isotopic fractionation and blank size. Another main limitation of micro-diffusion is that the results can't be obtained immediately because diffusion is typically performed for at least one to several days. Thus, how to improve the sensitivity and accuracy of this technique and accelerate the diffusion process have become key research focuses. In this paper, aiming to promote using micro-diffusion technique in research of soil nitrogen transformation, the primary principles and factors impacting this technique were briefly summarized and introduced.

Key words: Micro-diffusion; Ammonium; Nitrate; ^{15}N