

# $N_2O$ 产生法测定土壤无机态氮 $^{15}N$ 丰度\*

曹亚澄 钟明 龚华 陆国兴

(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)

**摘要** 用化学方法分别将土壤中微量的铵、硝酸盐和亚硝酸盐转化为  $N_2O$  气体, 然后用带自动预浓缩装置的同位素比值质谱仪测定  $N_2O$  中的  $^{15}N$  丰度。  $N_2O$  中的  $^{15}N$  丰度测量值完全符合铵、硝酸盐和亚硝酸盐的  $^{15}N$  参考值。方法快速、简单和准确, 不受空气氮的污染。特别是方法的检测限很低, 每批次样品中只需含 5 ~ 20  $\mu g N$ 。它将有助于土壤氮素的矿化作用、硝化作用和反硝化作用的研究。

**关键词** 铵; 硝酸盐; 亚硝酸盐;  $N_2O$ ;  $^{15}N$  丰度; 质谱分析

**中图分类号** S158.3 **文献标识码** A

稳定同位素示踪技术是现代土壤学研究中的一项主要技术。 $^{15}N$  稳定同位素作为一种示踪剂, 广泛应用于土壤氮素的研究。在进行土壤氮素转化的  $^{15}N$  示踪研究时, 测定土壤提取液中无机态的  $NH_4^+$ 、 $NO_3^-$  和  $NO_2^-$  的  $^{15}N$  丰度是很重要的。用通常的方法分析时, 土壤提取液中的  $NH_4^+$  被  $MgO$  蒸馏或扩散成  $NH_3$ , 再接收浓缩成铵盐, 在质谱分析氮同位素比值前用列敦伯尔格法 (Rittenberg) 或用杜马法 (Dumas) 将其转化为  $N_2$  [1]。对于硝酸盐应加入达氏合金还原剂, 在碱性蒸馏条件下将提取液中的硝酸盐还原成铵盐。而亚硝酸盐中的  $^{15}N$  含量通常由测定含  $NO_2^-$  的和被氨基磺酸去除  $NO_2^-$  之间的差值得到。这些方法既费时, 又易受大气氮的污染而产生同位素稀释作用, 以及常会引起样品间的交叉污染。用差减法来测定  $NO_2^-$  的含量和  $^{15}N$  的丰度往往是不精确的。更关键的是普通质谱计需要 1 ~ 1.5 mg 氮量所产生的氮气才能进行  $^{15}N$  丰度的测定。对一般土壤提取液而言, 要提取出 mg 级氮量的  $NH_4^+$ 、 $NO_3^-$  和  $NO_2^-$  (特别对于  $NO_3^-$  和  $NO_2^-$ ) 是很困难的, 因此很多这方面的研究项目均由于这样的原因而无法开展。

我们在一些学者的方法 [2-3] 基础上进行了测试条件的优化, 建立了一种以产生  $N_2O$  的方法, 用带预浓缩装置 (Pre-Concentration device, PreCon) 的连续流同位素比值质谱计 (CF-IRMS) 测定土壤提取液中的微量铵、硝酸盐和亚硝酸盐的  $^{15}N$  丰度。我们

试验了各种形态氮的最低氮用量, 以及不同反应条件对  $N_2O$  产率的影响, 明确了最适宜的方法条件; 又以不同氮量和不同  $^{15}N$  丰度的样品试验了方法对  $^{15}N$  丰度测定的精密性; 并测定了精确配制的不同形态氮的系列  $^{15}N$  溶液, 检验了方法测定  $^{15}N$  丰度的准确性。

## 1 方法原理

方法是将三种形态氮 (铵态氮、硝态氮和亚硝态氮) 转化成  $N_2O$  气体为基础。

### 1.1 铵态氮 ( $NH_4^+-N$ )

在真空条件下, 用碱性次溴酸钠处理含铵样品, 绝大部分铵将被氧化成氮气, 而  $N_2O$  则是氧化过程中的一种副产品。产生的  $N_2O$  反应被  $Cu^{2+}$  催化, 并与 pH 有关。产生的  $N_2O$  的最佳条件是用稀硫酸, 内含  $0.5 \text{ mmol L}^{-1} CuSO_4$  的溶液吸收蒸汽蒸馏出液中的  $NH_3$ ; 增加  $NaOBr$  的碱度, 使  $NaOH$  的浓度为  $10 \text{ mol L}^{-1}$ 。

### 1.2 硝态氮 ( $NO_3^- -N$ )

在硝酸盐被还原以前, 必须用氨基磺酸去除土壤提取液中所含的亚硝酸盐。在 pH 为 4.7 时,  $NO_3^-$  被镀铜镉粒还原成  $NO_2^-$  和  $NH_2OH$ , 然后  $NO_2^-$  再与  $NH_2OH$  反应生成  $N_2O$ , 在 2 h 以后达到最高浓度。 $N_2O$  的产率随每次样品中被还原的  $NO_3^-$  量增加而增

\* 中国科学院南京土壤研究所所长基金(2007年)项目资助

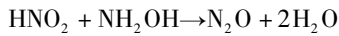
作者简介: 曹亚澄(1943—), 男, 高级实验师, 长期从事土壤与生物和气体样品的氮、碳和氧稳定性同位素的质谱分析。E-mail: yccao@issas.ac.cn

收稿日期: 2012-04-16; 收到修改稿日期: 2012-10-15

加。铵和其他氮源的氮均不影响硝态氮中的<sup>15</sup>N丰度的测定。

### 1.3 亚硝态氮(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>N)

亚硝酸盐和羟胺(Hydroxylamine, NH<sub>2</sub>OH)反应生成N<sub>2</sub>O,其反应式为:



此反应取决于pH。溶液的pH低于4时反应速率迅速增加,反应的时间应在16h以上。由于在酸性条件下是通过一种不对称的中间产物(N-亚硝基羟胺)而形成N<sub>2</sub>O的。所以每次羟胺的用量也必须维持在10 μmol以上。N<sub>2</sub>O的产生量大约是理论产率的1/2。

从同位素分配角度看,形成的N<sub>2</sub>O中两个氮原子分别来自于亚硝酸盐和羟胺分子,而羟胺为<sup>15</sup>N自然丰度物质。因此,测得的N<sub>2</sub>O的<sup>15</sup>N丰度不是亚硝酸盐的<sup>15</sup>N丰度,它必须经公式换算才能得到。假定羟胺的<sup>15</sup>N自然丰度值为0.365 atom%,则公式为:

$$^{15}\text{N atom\%}(\text{NO}_2^- \text{中}) = 2 \times ^{15}\text{N atom\%}(\text{N}_2\text{O中}) - 0.365 \text{ atom\%}$$

## 2 仪器与方法

### 2.1 主要仪器

赛默-菲尼根(Thermo Finnigan)仪器公司生产的带全自动预浓缩装置PreCon的MAT-253质谱计,它是以连续流进样方式的同位素质谱,配备一个由6个法拉第杯组成的多离子接收系统。仪器的系统控制、数据采集和数据评价均由ISODAT NT计算机软件完成。

在测定N<sub>2</sub>O中的氮同位素比值时,接收杯Cup2、Cup3和Cup4上分别接收到m/z 44 [<sup>14</sup>N<sup>14</sup>N<sup>16</sup>O]<sup>+</sup>、m/z 45 [<sup>14</sup>N<sup>15</sup>N<sup>16</sup>O]<sup>+</sup>和m/z 46 [<sup>14</sup>N<sup>14</sup>N<sup>18</sup>O]<sup>+</sup>的离子流,然后根据m/z 45和m/z 44的比值计算出N<sub>2</sub>O中<sup>15</sup>N的δ值或<sup>15</sup>N atom%<sup>[4-6]</sup>。

### 2.2 参比气体

为了获得准确的结果,在进行N<sub>2</sub>O中氮同位素质谱测定时需要高纯的N<sub>2</sub>O气体作为参比气体。经日本SHOKO有限公司的N<sub>2</sub>O标准气体校准,该N<sub>2</sub>O参比气体的δ<sup>15</sup>N<sub>Air</sub>‰值为6.579 ± 0.030 (Air系空气氮)。

测定时,每隔30s连续3次向质谱计的离子源内送入N<sub>2</sub>O参比气体,2号峰为标准样品峰。在235s左右出现样品的N<sub>2</sub>O峰。根据2号工作标准

N<sub>2</sub>O峰,可得出样品中N<sub>2</sub>O相对于工作标准N<sub>2</sub>O的δ<sup>15</sup>N值。然后根据工作标准N<sub>2</sub>O标定值,即可将样品气体中N<sub>2</sub>O的氮同位素比值校正成δ<sup>15</sup>N<sub>Air</sub>‰。在测定富集<sup>15</sup>N的N<sub>2</sub>O气体样品时,根据δ<sup>15</sup>N值也可获得<sup>15</sup>N atom%值,即该N<sub>2</sub>O样品气体中的<sup>15</sup>N富集度<sup>[7]</sup>。

### 2.3 溶液制备

**2.3.1 系列<sup>15</sup>N溶液的配制** 配制不同形态氮的<sup>15</sup>N系列溶液是为了检验制样和测量方法的可靠性和重现性。配制<sup>15</sup>N系列标准溶液最好的方法是用99 atom%的富集<sup>15</sup>N物质,按照所需的<sup>15</sup>N丰度与0.01 atom%的贫化<sup>15</sup>N物质混合。我们则选用的是上海化工研究院生产的<sup>15</sup>N富集物质与同质的<sup>15</sup>N自然丰度物质按一定比例混合而制得系列<sup>15</sup>N参比溶液。

**铵态氮溶液:** 选用上海化工研究院生产和定值的<sup>15</sup>N丰度为5.6 atom%的硫酸铵,并用<sup>15</sup>N自然丰度的硫酸铵来做稀释剂,配制成4个丰度值的系列<sup>15</sup>N参比溶液。称取47.17 mg <sup>15</sup>N丰度为5.6 atom%的硫酸铵,溶解于100 ml水中,并加入一定量的CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O,使其浓度为0.5 mmol L<sup>-1</sup>,配成每ml含100 μg N的铵1号溶液;称取117.9 mg A.R级的硫酸铵,溶解于250 ml水中并加入一定量的CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O,使其浓度为0.5 mmol L<sup>-1</sup>,配成<sup>15</sup>N自然丰度的每ml含100 μg N的铵2号溶液;分别吸取铵1号溶液20 ml和2.5 ml于两个100 ml容量瓶中,以铵2号溶液定容至刻度,制备成<sup>15</sup>N丰度分别为1.4 atom%和0.6 atom%的每ml含100 μg N的铵态氮的系列<sup>15</sup>N参比溶液;对每一种<sup>15</sup>N丰度的溶液,分别吸取0.1、0.2、0.5和1 ml溶液进入反应瓶中制样,换算成每次进样量分别为10、20、50和100 μg N。

**硝态氮溶液:** 选用上海化工研究院生产和定值的<sup>15</sup>N丰度为5.24 atom%的硝酸钾,并用<sup>15</sup>N自然丰度的硝酸钾做稀释剂,配制成4个丰度值的系列<sup>15</sup>N参比溶液。称取90.3 mg <sup>15</sup>N丰度为5.24 atom%的硝酸钾,溶解于250 ml 2 mol L<sup>-1</sup> KCl溶液中,配成每ml含50 μg N的硝1号溶液;称取90.3 mg AR级的硝酸钾,溶解于250 ml 2 mol L<sup>-1</sup> KCl溶液中,配成每ml含50 μg N的<sup>15</sup>N自然丰度的硝2号溶液;分别吸取硝1号溶液23.3 ml和2.75 ml于两个100 ml容量瓶中,用硝2号溶液定容至刻度,制备成<sup>15</sup>N丰度分别为1.5 atom%和0.5 atom%的每ml含50 μg N的硝态氮系列<sup>15</sup>N

参比溶液;对硝 1 号、硝 2 号和另外 2 个 $^{15}N$  硝态氮溶液,分别吸取 0.02、0.1、0.2、0.5 和 1 ml 溶液进入样品反应瓶中,换算成每次进样量分别为 1、5、10、25 和 50  $\mu g N$ 。

**亚硝态氮溶液:** 选用上海化工研究院生产和定值的 $^{15}N$  丰度为 5.12 atom% 的亚硝酸钾,并用 $^{15}N$  自然丰度的亚硝酸钾做稀释剂,配制成 4 个 $^{15}N$  丰度值的系列参比溶液。称取 60.8 mg  $^{15}N$  丰度为 5.12 atom% 的亚硝酸钾,溶解于 100 ml 2 mol  $L^{-1}$  KCl 溶液中,再将此溶液稀释 100 倍,配制成每 ml 含 1  $\mu g N$  的亚硝酸盐 1 号溶液;称取 60.8 mg AR 级的亚硝酸钾,溶解于 100 ml 2 mol  $L^{-1}$  KCl 溶液中,再将此溶液稀释 100 倍,配成每 ml 含 1  $\mu g N$  的 $^{15}N$  自然丰度的亚硝酸盐 2 号溶液;分别吸取亚硝酸盐 1 号溶液 23.85 ml 和 2.82 ml 于两个 100 ml 容量瓶中,用亚硝酸盐 2 号溶液定容至刻度,制备成 $^{15}N$  丰度分别为 1.5 atom% 和 0.5 atom% 的每 ml 含 1  $\mu g N$  的亚硝态氮 $^{15}N$  参比溶液;对亚硝酸盐 1 号、亚硝酸盐 2 号和另外 2 个 $^{15}N$  丰度的参比溶液,分别吸取 0.1、0.2、0.5 和 1 ml 溶液进入样品反应瓶中,换算成每次进样量分别为 0.1、0.2、0.5 和 1  $\mu g N$ 。

**2.3.2 土壤提取液的制备** 除了用单一形态氮的溶液为样品试验方法的可行性外,我们还特地制备了实际的土壤提取液样品。

**土壤培养:** 选用两种来自江西的不同利用方式的土壤样品,分别为旱地土壤(1 号样品)和森林土壤(2 号样品)。称取 60 g 研磨过筛后的土壤样品置于 250 ml 三角瓶中,以每 kg 土施入 50 mg N 的量加入 $^{15}N$  丰度为 21.19 atom% 标记 $^{15}N$  的硫酸铵,在田间持水量 50% 和 25 $^{\circ}C$  温度下好气培养 2.5 d。每种土壤重复 3 次。

**溶液提取:** 以土液质量比 1:10 的比例,加入 600 ml 2 mol  $L^{-1}$  KCl 溶液进行提取。塞紧瓶塞,置于振荡器上振荡 1 h 然后过滤。滤液贮存在冰箱中保存,待分析。

## 2.4 $N_2O$ 气体样品的制备

采用不同的化学反应途径,分别将不同形态的氮转化为  $N_2O$  气体供质谱分析。

**2.4.1 铵态氮 试剂。** 吸收液: 0.01 mol  $L^{-1}$  硫酸溶液,其中含 0.5 mmol  $L^{-1}$  的  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ;  $MgO$ : 预先经 600~700 $^{\circ}C$  灼烧;碱性次溴酸钠: 10 mol  $L^{-1}$  氢氧化钠的次溴酸钠溶液。

**操作步骤:** 吸取 20~25 ml 的土壤提取液,置于半微量的蒸汽蒸馏器中,加入 0.2 g  $MgO$  后立即

进行蒸汽蒸馏。用 5 ml 0.01 mol  $L^{-1}$  的硫酸溶液吸收,蒸汽蒸馏 5 min,然后将馏出液浓缩至 2~3 ml;将少部分浓缩的馏出液转移至 18.5 ml 的反应瓶中,于 90 $^{\circ}C$  下继续浓缩至干。同时也吸取一定量的 $^{15}N$  系列参比溶液,置于反应瓶中,并于 90 $^{\circ}C$  下浓缩至干;盖紧瓶盖,抽真空,注入一定量的惰性气体;加入 1 ml 10 mol  $L^{-1}$  NaOH 的次溴酸钠溶液,摇匀;抽取一定量的气体样品,注入 100 ml 的样品瓶中,用带预浓缩装置的同位素质谱计测定  $N_2O$  气体中 $^{15}N$  atom%。

**2.4.2 硝态氮 试剂。** 0.2 mol  $L^{-1}$  氨基磺酸溶液; 1 mol  $L^{-1}$  醋酸钠 - 1 mol  $L^{-1}$  醋酸溶液, pH4.7; 镀铜的镉粒还原剂

**操作步骤:** 预先在一个三角瓶中,注入 20~25 ml 2 mol  $L^{-1}$  KCl 土壤提取液,加入 2.5 ml 0.2 mol  $L^{-1}$  氨基磺酸,瓶子加盖,振荡 5 min,使所含的  $NO_2^-$  全部转化成  $N_2$ ; 在一个 50 ml 反应瓶中,加入 50 mg 镀铜镉粒还原剂和 5 ml 1 mol  $L^{-1}$  醋酸钠 - 1 mol  $L^{-1}$  醋酸的缓冲液,瓶子加盖;在真空系统上抽真空,立即注入一定量的惰性气体;向反应瓶中注入 20~25 ml 除去  $NO_2^-$  的土壤提取液或一定量的 $^{15}N$  系列硝态氮参比溶液;将反应瓶放入气温摇床中,以 120 r  $min^{-1}$  振荡 2 h;抽取一定量的反应瓶顶空中的气体样品注入 100 ml 样品瓶中,用带预浓缩装置的同位素质谱计测定  $N_2O$  气体中 $^{15}N$  atom%。

**2.4.3 亚硝态氮 试剂。** 1 mol  $L^{-1}$  HCl 溶液; 0.04 mol  $L^{-1}$  盐酸羟胺( $NH_2OH \cdot HCl$ ) 溶液。

**操作步骤:** 吸取 20 ml 土壤提取液或一定量的 $^{15}N$  系列亚硝态氮参比溶液,置于 50 ml 反应瓶中,塞紧瓶塞;在真空系统上抽真空,并注入一定量的惰性气体;再向反应瓶中注入 1 ml 1 mol  $L^{-1}$  HCl 溶液和 0.5 ml 0.04 mol  $L^{-1}$   $NH_2OH \cdot HCl$  溶液;放入气温(27 $^{\circ}C$ ) 摇床中于 120 r  $min^{-1}$  下振荡 16 h;抽取一定量的反应瓶顶空中的气体样品注入 100 ml 样品瓶中,用带预浓缩装置的连续流同位素质谱计测定  $N_2O$  的 $^{15}N$  atom%。

## 3 结果与讨论

### 3.1 在铵态氮氧化过程中影响 $N_2O$ 产率的因素

Laughlin 等报道过在  $NH_4^+$  被 NaOBr 氧化过程中  $Cu^{2+}$  能催化  $N_2O$  的形成。在玻璃反应瓶顶空中的

$N_2O$ 浓度,当没有  $Cu^{2+}$  存在时,平均值为  $78 \mu l L^{-1}$ ,而在有  $Cu^{2+}$  时,为  $596 \mu l L^{-1}$ 。 $Cu^{2+}$  浓度小于  $0.5 mmol L^{-1}$ 时, $N_2O$ 的产率没有增加。同时也指出,产生的  $N_2O$  反应还取决于  $NaOBr$  的碱度。在 Hauek<sup>[8]</sup> 介绍的用碱性次溴酸钠氧化  $NH_4^+$  的标准方法中, $NaOBr$  的碱度在  $5 mol L^{-1}$  时只产生 1%~3% 的  $N_2O$ 。我们的试验证实了这点(表 1),提高  $NaOBr$  的碱度将增加  $N_2O$  的产率。酸吸收液中含有  $0.5 mmol L^{-1} Cu^{2+}$ , $NaOBr$  的碱度为  $10 mol L^{-1}$ ,在这样的反应条件下将有 25% 的  $NH_4^+$  转化成  $N_2O$ 。

### 3.2 测定铵态氮中<sup>15</sup>N 的准确度和精密度

在不同  $NH_4^+$  量和不同丰度样品上测得的<sup>15</sup>N 丰度的测定精密度由表 2 表示。在所有试验样品上均获得了较好( $CV < 1\%$ ) 的精密度。对于  $N 10 \mu g$  次<sup>-1</sup> 的样品,测量精度稍差些,在两个<sup>15</sup>N 丰度上均有这样的结果。从结果的准确性来看,无论在何种

<sup>15</sup>N 丰度上,含氮量等于或超过  $20 \mu g$  次<sup>-1</sup> 时,均能获得与参比值一致的结果。至于测量值和参比值之间<sup>15</sup>N 丰度的微小差异,是由配制时的误差所造成的。多次重复测定 4 种不同含氮量和 3 个不同丰度系列参比样品,其目的主要是检验这种以产生  $N_2O$  的方式测定  $NH_4^+-N$  的<sup>15</sup>N 丰度的测量方法的准确性和精密度。

表 1 次溴酸钠的碱度对  $N_2O$  产率的影响

Table 1 Effects of alkalinity of  $NaOBr$  on  $N_2O$  production rate ( $\mu l L^{-1}$ )

$NH_4^+$ ( $N, \mu g time^{-1}$ )	NaOBr 碱度 Alkalinity of NaOBr	
	$5.0 mol L^{-1}$	$10.0 mol L^{-1}$
10	6.9	21.5
20	12.4	37.0
50	87.6	—
100	196.7	—

表 2 以  $N_2O$  测定  $NH_4^+-N$  中<sup>15</sup>N 丰度的准确度和精密度

Table 2 Accuracy and precision of the determination of <sup>15</sup>N abundance of  $NH_4^+-N$  by  $N_2O$  produced

$NH_4^+-N$ ( $N, \mu g time^{-1}$ )	参比值 Reference value ( <sup>15</sup> N, atom%)	N <sub>2</sub> O 中的 <sup>15</sup> N atom% <sup>15</sup> N atom% in N <sub>2</sub> O				平均值 Average value ( <sup>15</sup> N, atom%)	CV (%)
		测量值 Measurement value ( <sup>15</sup> N, atom%)					
10	0.6	0.590	0.591	0.597	0.593	0.593	0.5
20		0.594	0.591	0.597	0.597	0.595	0.5
50		0.596	0.597	0.597	0.596	0.597	0.1
100		0.596	0.598	0.597	0.598	0.597	0.1
10	1.4	1.29	1.28	1.27	1.29	1.28	0.1
20		1.34	1.33	1.34	1.33	1.34	0.1
50		1.36	1.36	1.36	1.37	1.36	0.1
100		1.36	1.37	1.36	1.37	1.37	0.1
10	5.6	5.58	5.56	5.51	5.50	5.54	0.7
20		5.56	5.57	5.56	5.58	5.57	0.2
50		5.58	5.59	5.58	5.57	5.58	0.1
100		5.58	5.58	5.58	5.59	5.58	0.1

### 3.3 在硝态氮还原过程中影响 $N_2O$ 产率的因素

在 pH4.7 时, $NO_3^-$  能还原成  $NO_2^-$  和  $NH_2OH$ ,最后形成  $N_2O$ ,在 2 h 后达到最大浓度。在 pH 8~9 时,不能发生镀铜镉粒的还原反应,所以也不能产生  $N_2O$ 。我们的试验证实了在硝态氮的还原过程中

只要存在少量的镀铜镉粒,这个反应就能完全地进行(表 3)。此外,对反应瓶中加入的顺序也影响到  $N_2O$  的产率(表 4)。采用先将镀铜镉粒加入到 pH4.7 的缓冲溶液中,然后再加入含  $NO_3^-$  的溶液方法,可使  $N_2O$  的产率增高 1 倍。

表3 Cd-Cu 粒加入量对 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的 N<sub>2</sub>O 产率的影响Table 3 Effects of amount of copperized cadmium added on production of N<sub>2</sub>O from NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

Cd-Cu 加入量 Cd-Cu additional amounts (mg time <sup>-1</sup> )	N <sub>2</sub> O 浓度 Concentration of N <sub>2</sub> O produced (μl L <sup>-1</sup> )
25	104.9
50	113.7
100	127.4
200	139.3

表4 两种加液顺序对 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的 N<sub>2</sub>O 产率的影响Table 4 Effects of sequence of the addition of two reagents on production of N<sub>2</sub>O from NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (N, μg time <sup>-1</sup> )	顺序(1) Sequence (1) (μl L <sup>-1</sup> )	顺序(2) Sequence (2) (μl L <sup>-1</sup> )
10	10.5	23.1
20	39.1	75.7
50	113.7	249.3
100	244.4	481.4

3.4 测定硝态氮中<sup>15</sup>N 的准确度和精密度

反应瓶顶空中 N<sub>2</sub>O 的产率随每次试验中被还原的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 量增加而增加。在每次试验含 N 10 μg 以上时, N<sub>2</sub>O 中<sup>15</sup>N 的丰度与被还原的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 量无关(表 5)。此外从表 5 中也可看到,每次所用的氮量超过 10 μg 后,无论是低丰度还是高丰度的样品其<sup>15</sup>N atom% 的重复测量值均很接近(CV < 1.0%)。

注:顺序(1) Cd-Cu 粒加入含 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 溶液中,抽真空后再入 pH4.7 的缓冲液;顺序(2) Cd-Cu 粒加入 pH4.7 的缓冲液中,抽真空后再加入含 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的溶液 Notes: Sequence (1): add Cd-Cu pellets into NO<sub>3</sub><sup>-</sup> solution, vacuumize the container, and then add pH 4.7 buffer solution; Sequence (2): add Cd-Cu pellets into pH 4.7 buffer solution, vacuumize the container, and then add NO<sub>3</sub><sup>-</sup> solution

3.5 测定亚硝态氮中<sup>15</sup>N 的准确度和精密度表 6 列示了不同 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 氮量与不同<sup>15</sup>N 丰度时的表5 以 N<sub>2</sub>O 测定 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 中<sup>15</sup>N 丰度的准确度和精密度Table 5 Accuracy and precision of the determination of <sup>15</sup>N abundance of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N by N<sub>2</sub>O produced

NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (N, μg time <sup>-1</sup> )	参比值 Reference value ( <sup>15</sup> N, atom%)	N <sub>2</sub> O 中的 <sup>15</sup> N atom%		平均值 Average value ( <sup>15</sup> N, atom%)	CV (%)	
		测量值 Measurement value ( <sup>15</sup> N, atom%)	<sup>15</sup> N atom% in N <sub>2</sub> O			
25	0.366	0.372	0.374	0.373	0.3	
1	0.5	0.473	0.476	0.486	1.5	
5		0.507	0.501	0.501	0.7	
10		0.501	0.502	0.501	0.2	
25		0.506	0.505	0.505	0.2	
50		0.507	0.507	0.508	0.507	0.2
1	1.5	0.748	0.865	0.798	7.5	
5		1.41	1.41	1.41	0.1	
10		1.46	1.46	1.47	1.46	0.7
25		1.48	1.49	1.48	1.48	0.7
50		1.48	1.49	1.49	1.49	0.7
1	5.24	2.49	2.41	3.06	14.0	
5		4.95	4.88	4.96	4.93	0.9
10		5.01	5.02	5.03	5.02	0.2
25		5.12	5.09	5.14	5.12	0.5
50		5.15	5.18	5.18	5.17	0.3

表 6 以  $N_2O$  测定  $NO_2^- - N$  中  $^{15}N$  丰度的准确度和精密度Table 6 Accuracy and precision of the determination of  $^{15}N$  abundance of  $NO_2^- - N$  by  $N_2O$  produced

$NO_2^- - N$ (N, $\mu g \text{ time}^{-1}$ )	$NO_2^- - N$ 中的 $^{15}N$ atom%					
	$^{15}N$ atom% in $NO_2^- - N$					
	参比值 Reference value ( $^{15}N$ , atom%)	计算值 <sup>1)</sup> Calculating value ( $^{15}N$ , atom%)		平均值 Average value ( $^{15}N$ , atom%)		CV (%)
0.2	0.365	0.365	0.366	0.365	0.365	0.3
0.1	0.5	0.467	0.467	0.470	0.468	0.2
0.2		0.480	0.476	0.481	0.479	0.5
0.5		0.495	0.493	0.490	0.493	0.5
1.0	1.5	0.494	0.491	0.499	0.495	0.8
0.1		1.31	1.33	1.34	1.32	0.8
0.2		1.37	1.38	1.37	1.37	0.7
0.5		1.45	1.46	1.46	1.46	0.7
1.0	5.12	1.49	1.51	1.50	1.50	0.7
0.1		4.24	4.26	4.25	4.25	0.2
0.2		4.61	4.65	4.63	4.63	0.3
0.5		4.92	4.92	4.96	4.93	0.5
1.0		5.04	5.06	5.05	5.05	0.2

1) 由  $N_2O$  中的  $^{15}N$  丰度测量值 根据公式计算出的  $^{15}N$  atom% Based on the measured value of  $^{15}N$  abundance of  $N_2O$ , calculate  $^{15}N$  atom% in line with the equation

测量准确度和精密度。在含氮量低于  $0.5 \mu g \text{ 次}^{-1}$  时,测量值均低于参比值。含氮量越低,偏离越大,这与使用的亚硝态氮量太少有关。据报道,对低丰度  $^{15}N$  样品,  $NO_2^-$  的含量至少在  $0.5 \mu mol \text{ 次}^{-1}$  (约含 N  $7 \mu g$ ) 以上时,才能获得可接受精度的结果。在高丰度  $^{15}N$  时,每次样品的  $NO_2^-$  含量也必须大于  $0.25 \mu mol$ ,即至少含 N  $3.5 \mu g$ 。在我们的方法试验中,样品的最高含  $NO_2^-$  氮量设在  $1 \mu g$ ,仅有  $0.08 \mu mol$  左右的  $NO_2^-$  量。从表 6 的结果也可

看到,由于亚硝态氮与羟胺的作用是单一的反应,所以在 4 种  $^{15}N$  丰度的样品和 4 种不同  $NO_2^-$  量的处理上均得到了精密度很好的  $^{15}N$  丰度计算结果,同时也说明方法对亚硝态氮的检测灵敏度很高。

### 3.6 测定土壤提取液中 3 种不同形态氮的结果

对两种不同利用方式的土壤,经培养和提取过的溶液中的三种形态氮的含量和  $^{15}N$  丰度进行了测定,结果列于表 7。结果表明,由于土壤利用方式不

表 7 两种土壤提取液中三种形态氮的含量及  $^{15}N$  丰度Table 7 Content and  $^{15}N$  abundance of the three forms of nitrogen in extractions of the two soils

土壤类型 Soil type		$NH_4^+ - N$		$NO_3^- - N$		$NO_2^- - N$			
		含量	$^{15}N$ 丰度	含量 <sup>1)</sup>	$^{15}N$ 丰度	$^{15}N$ 丰度			
		Content (N $\mu g \text{ ml}^{-1}$ )	$^{15}N$ abundance ( $^{15}N$ , atom%)	Content (N $\mu g \text{ ml}^{-1}$ )	$^{15}N$ abundance ( $^{15}N$ , atom%)	$^{15}N$ abundance ( $^{15}N$ , atom%)			
一号土壤 Soil-1	1-1	5.56	8.83	8.99	0.72	7.85	7.95	0.947	0.895
	1-2	5.85	8.88	8.72	0.73	8.28	8.27	0.898	0.907
	1-3	5.50	9.16	9.51	0.82	8.50	8.51	1.136	1.098
二号土壤 Soil-2	2-1	10.6	6.11	6.18	0.22	1.28	1.24	0.407	0.407
	2-2	11.0	6.33	6.25	0.24	1.32	1.32	0.400	0.397
	2-3	10.9	6.58	6.57	0.23	1.34	1.33	0.390	0.389

1) 其含量包括了  $NO_2^- - N$  的量 This content include the content of  $NO_2^- - N$

同,它们所含有的  $NH_4^+-N$  和  $NO_3^- -N$ ,无论在含量上还是在培养后的 $^{15}N$  丰度上均有明显的差别,特别在  $NO_3^- -N$  的 $^{15}N$  丰度上差异更大。亚硝态氮中的 $^{15}N$  丰度也有不同。结果显示出每种土壤经培养后的三个重复间存在着一定的差值,这是土壤培养过程中带来的差异。从三种形态氮的 $^{15}N$  丰度的平行测定值可以看出,由  $N_2O$  质谱测量的重现性很好,完全能满足研究工作的需要。

## 4 结 论

由于可用带预浓缩装置的同位素比值质谱计测定大气浓度下  $N_2O$  中的 $^{15}N$  丰度,才有可能建立测定土壤中微量铵、硝酸盐和亚硝酸盐的 $^{15}N$  丰度的方法。方法的基础是通过化学处理分别将土壤提取液中的三种形态氮均转化为  $N_2O$  气体。这样既消除了样品间的交叉污染问题,又消除了空气氮对样品的稀释。方法简单、快速、准确且灵敏度高。经过方法试验证明,在采用本方法测定 $^{15}N$  丰度时,铵态氮的最低检测限为每次含  $20 \mu g N$  左右;硝态氮每次含  $5 \mu g N$  左右;亚硝态氮为每次含  $0.5 \mu g N$  左右。

特别对土壤中  $NO_2^-$  中的 $^{15}N$  含量,本方法是直接测定得到的,而不是由差减法计算出来的。由于  $NO_2^-$  的浓度要较  $NO_3^-$  低数个量级,所以差减法本身就具有缺陷,并给研究结果带来严重的误差。本方法的建立将有助于同时测量土壤氮素的矿化作用、硝化作用和  $NO_3^-$  还原作用速率的研究。

## 参 考 文 献

- [1] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 1999: 156—157. Lu R K. Analytical methods for soil and agricultural chemistry (In Chinese). Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 1999: 156—157
- [2] Laughlin R J, Stevens R J, Zhuo S. Determining nitrogen-15 in ammonium by producing nitrous oxide. Soil Science Society of America Journal, 1997, 61: 462—465
- [3] Stevens R J, Laughlin R J. Determining nitrogen-15 in nitrite or nitrate by producing nitrous oxide. Soil Science Society of America Journal, 1994, 58: 1108—1116
- [4] 曹亚澄, 孙国庆, 韩勇, 等. 大气浓度下  $N_2O$ 、 $CH_4$  和  $CO_2$  中氮、碳和氧稳定同位素比值的质谱测定. 土壤学报, 2008, 45(2): 249—258. Cao Y C, Sun G Q, Han Y, et al. Determination of nitrogen, carbon and oxygen stable isotope ratios in  $N_2O$ ,  $CH_4$  and  $CO_2$  at natural abundance levels by mass spectrometer (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2008, 45(2): 249—258
- [5] Roeckmann T, Kaiser J, Brenninkmeijer C A M, et al. Gas chromatography/isotope-ratio mass spectrometry method for high-precision position dependent  $^{15}N$  and  $^{18}O$  measurements of atmospheric nitrous oxide. Rapid Commun Mass Spectrom, 2003, 17: 1897—1908
- [6] Roeckmann T, Kaiser J, Brenninkmeijer C A M, The isotopic fingerprint of the pre-industrial and anthropogenic  $N_2O$  source. Atmos Chem Phys, 2003, 3: 315—323
- [7] Stevens R J, Laughlin R J, Atkins G J, et al. Automated determination of nitrogen-15-labeled dinitrogen and nitrous oxide by mass spectrometry. Soil Science Society of America Journal, 1993, 57: 981—988
- [8] Hauck R D. Nitrogen isotope ratio analysis // Page A L, et al. Methods of soil analysis. Part 2. 2nd ed. Madison, WI: Agron Monogr 9. ASA and SSSA, 1982: 735—779

## DETERMINING $^{15}N$ ABUNDANCE IN AMMONIUM, NITRATE AND NITRITE IN SOIL BY MEASURING NITROUS OXIDE PRODUCED

Cao Yacheng Zhong Ming Gong Hua Lu Guoxing

(State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

**Abstract** A new method was designed for direct determination of  $^{15}N$  abundance of  $NH_4^+$ ,  $NO_3^-$  and  $NO_2^-$  in soils with mass spectrometry. The principle of this method was based on analysis and quantification of  $^{15}N$  abundance of the  $N_2O$  produced from  $NH_4^+$ ,  $NO_3^-$  and  $NO_2^-$  through transformation reactions catalyzed with their respective specific chemical reagents separately. The measured values of  $^{15}N$  abundance of the  $N_2O$  tally well with their respective reference values in  $NH_4^+$ ,  $NO_3^-$  and  $NO_2^-$ . The method was characterized by quickness, simpleness and freedom from contamination of atmospheric nitrogen. Especially this method has a very low detection limit, and  $5 \sim 20 \mu g N$  in the sample is adequate for detection. Therefore, it will be of a great help to study on mineralization, nitrification and denitrification of nitrogen in soils.

**Key words** Ammonium; Nitrate; Nitrite;  $N_2O$ ;  $^{15}N$  abundance; Mass spectrometry

(责任编辑: 汪枞生)