

文章编号:1000-8551(2013)01-0099-09

# 凯氏定氮的交叉污染对<sup>15</sup>N测定值的影响

高占锋 王红云 付才 黄志国 常志强

(河北省农林科学院遗传生理研究所,河北 石家庄 050051)

**摘要:**通过标记硫酸铵的对天然硫酸铵的交叉污染,研究K氏定氮仪冷凝器对NH<sub>3</sub>的吸附解吸附规律,并比较了不同表面积冷凝器的吸附解吸附规律。结果表明:K氏定氮仪对NH<sub>3</sub>的吸附量主要取决于冷凝器的表面积,表面积愈大吸附量愈高;吸附于冷凝器表面NH<sub>3</sub>的解吸附量和解吸附率随蒸馏次数的增加而逐渐减少,其中第1次的解吸附率最高,为36.88%~37.91%。

**关键词:**K氏定氮;交叉污染;吸附;解吸附

## CROSS-CONTAMINATION OF NITROGEN IN DISTILLATION UNIT

GAO Zhan-feng WANG Hong-yun FU Cai HUANG Zhi-guo CHANG Zhi-qiang

(Genetics and Physiology Institute, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang, Hebei 050051)

**Abstract:** The objective of this study paper was to investigate adsorption and desorption of NH<sub>3</sub> in condenser of distillation unit by cross-contamination between labeled ammonia sulphate and natural ammonia sulphate, and compare effect of surface area of condenser on the adsorption and desorption of NH<sub>3</sub>. Results showed that the adsorbed amount of NH<sub>3</sub> on the condenser mainly depended on increasing of its surface area and the desorption amount and ratio of NH<sub>3</sub> from condenser decreased as distilling times increased, the top desorption rate was 36.88%~37.91% at first distillation.

**Key words:** Kjeldahl method; Cross-contamination; Adsorption; Desorption

自1883年Johann Kjeldahl建立了基本的凯氏定氮法后,经过不断改进完善和发展,已成为国际上通用的测定氮含量的标准方法。该法操作简单,测定结果重现性好,已被广泛用于食品、谷物、土壤、饲料等样品的含氮量及蛋白质含量测定。各国研制的K氏定氮仪品种型号繁多,但都基于消解、蒸馏、滴定步骤<sup>[1]</sup>。

在<sup>15</sup>N同位素示踪研究中,凯氏定氮法在进行含氮量测定的同时,也完成了<sup>15</sup>N丰度的前处理过程,因此得到了广泛应用。现代的同位素质谱计为了便于实现自动化,大都以杜马斯法作为前处理方法,但由于该方法将样品中全部的氮素均首先氧化为NO<sub>x</sub>,再还原为N<sub>2</sub>进行同位素测定,不同形态的氮素不能分别测定,不能满足某些研究要求,另外测定成本也较高,因此凯氏定氮法仍显示出其特有的优势。但在实际工作中,凯氏定氮法作为前处理进行<sup>15</sup>N同位素测定存在

较大缺陷,即样品间存在交叉污染,也称“记忆效应”<sup>[2]</sup>,特别是样品间<sup>15</sup>N同位素丰度差异较大时,产生的测量误差较大。实际上<sup>15</sup>N分析误差的最大来源不是<sup>15</sup>N分析本身,而是样品的前处理过程<sup>[3]</sup>。

20世纪80年代前后,为了减少“记忆效应”,研究人员做了大量研究,提出了一些解决办法,但仍不能满足<sup>15</sup>N更为准确的测定要求,之后相关的研究较少,其方法主要是:1.采用吸附性较低的材料制作,如不锈钢材料<sup>[3,4]</sup>或银材料<sup>[5]</sup>,尽管效果较玻璃材料好,仍不能消除交叉污染,另外由于材料昂贵以及加工工艺等问题,尚未出现商品化的定氮仪,国内各科研单位所使用的仍然是玻璃材料的蒸馏管路;2.减小蒸馏管路的表面积<sup>[6]</sup>,但由于受冷凝效果的制约,作用有限;3.样品间采用乙醇、天然硫铵或热蒸汽加热净化<sup>[3,6]</sup>,由于这部分NH<sub>3</sub>的损失,导致全氮结果偏低,同时操作繁

收稿日期:2012-03-16 接受日期:2012-07-14

基金项目:河北省农林科学院“高层次人才创新工程”基金(2011055001)

作者简介:高占峰(1964-),男,河北安国人,博士,研究员,主要从事稳定同位素动物营养方面的研究。E-mail:gzhf1964@163.com

琐,效果也不理想;4.上述各种方法的组合应用。凯氏定氮的“记忆效应”实质是  $\text{NH}_3$  在定氮仪蒸馏管路的吸附与解吸附,因此解决“记忆效应”的关键是研究  $\text{NH}_3$  在蒸馏管路中的吸附解吸附变化规律,在此基础上进行技术改进更具科学性,但目前关于此方面的研究鲜见报导。本文根据玻璃表面的化学结构及  $\text{NH}_3$  的吸附解吸附基本原理,研究  $\text{NH}_3$  在蒸馏管路中的吸附解吸附变化规律,为减少或消除 K 氏定氮的交叉污染提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

K05 凯氏定氮仪,上海晟升自动化分析仪器有限公司;ZHT-03 质谱计,北京分析仪器厂;自制冷凝器。

40% 氢氧化钠:400g 氢氧化钠溶于 1000mL 无氨蒸馏水中;2% 硼酸:20g 硼酸溶于 1000mL 无氨蒸馏水中;混合指示剂:0.1% 的溴甲酚绿 95% 乙醇溶液 5 份与溶于 0.1% 的甲基红 95% 乙醇溶液 1 份混合而成;2% 硼酸吸收液:2% 硼酸与混合指示剂按体积 100:1 混合;0.05mol·L<sup>-1</sup> 盐酸:4.2mL 盐酸定容至 1000mL,无水碳酸钠标定;天然硫酸铵标准溶液:1mgN·mL<sup>-1</sup>,<sup>15</sup>N% = 0.366;标记硫酸铵标准溶液:1mgN·mL<sup>-1</sup>,<sup>15</sup>N% = 2.678;标记硫酸铵标准溶液:1mgN·mL<sup>-1</sup>,<sup>15</sup>N% = 5.272;次溴酸锂:称取氢氧化锂 90g,溶于 1000mL 蒸馏水中,加入 30mL 溴(密度 3.12g·mL<sup>-1</sup>),振荡使之完全反应,放置过夜后冷藏备用。所用试剂均为分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 蒸馏时间的确定 取 4mL 天然硫酸铵标准溶液(4mgN)于 K 氏管中,加入 20mL 10mol·L<sup>-1</sup> 的 NaOH 溶液,分别蒸馏 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、5、6、7 和 8min,计算回收率,绘制蒸馏时间与回收率曲线,确定适宜的蒸馏时间。

1.2.2 凝器吸附 N 量的测定 取 4mL 标记硫酸铵标

准溶液(4mgN)于 K 氏管中,加入 20mL 10mol·L<sup>-1</sup> 的 NaOH 溶液,按 1.2.1 确定的蒸馏时间,重复 10 次,使标记 N 吸附稳定。然后同样方法测定天然硫酸铵 10 次,馏出液滴定后,加入 1~2 滴 1N 的 HCl 溶液酸化,然后浓缩至 3~4mL,待测<sup>15</sup>N 丰度。根据天然硫酸铵<sup>15</sup>N 丰度的变化计算每次解吸附的 N 量。

1.2.3 <sup>15</sup>N 丰度的测定 将上述 K 氏定氮后的浓缩样品液 1mL(约 1mgN·mL<sup>-1</sup>)与 1mL 次溴酸锂溶液在真空 6.66 × 10<sup>-3</sup> Pa 下进行反应,使  $\text{NH}_4^+$ -N 转化为氮气,其化学反应如下:



产生的  $\text{N}_2$  在高真空条件下(2.67 × 10<sup>-5</sup> Pa)进入离子源电离,使  $\text{N}_2$  转化为  $\text{N}_2^+$ ,利用电压扫描,记录<sup>28</sup> $\text{N}_2^+$ (<sup>14</sup>N<sup>14</sup>N)、<sup>29</sup> $\text{N}_2^+$ (<sup>14</sup>N<sup>15</sup>N)、<sup>30</sup> $\text{N}_2^+$ (<sup>15</sup>N<sup>15</sup>N)离子峰强度。

样品<sup>15</sup>N atom% (≤5%)按下式计算:

$$R = \frac{^{28}\text{N}_2^+ / ^{29}\text{N}_2^+}{2 * R + 1} \times 100\%$$

样品<sup>15</sup>N atom% (>5%)按下式计算:

$$^{15}\text{N atom \%} = \frac{^{29}\text{N}_2^+ + 2 * ^{30}\text{N}_2^+}{2 * (^{28}\text{N}_2^+ + ^{29}\text{N}_2^+ + ^{30}\text{N}_2^+)} \times 100\%$$

### 1.3 统计分析

试验结果用 SAS 软件的协方差分析(ANOVA)分析进行显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 蒸馏时间的确定

取 4mL 天然硫酸铵标准溶液(4mgN)于 K 氏管中,加入 20mL 10mol·L<sup>-1</sup> 的 NaOH 溶液,馏速 20mL·min<sup>-1</sup>,2% 硼酸 10mL 吸收,分别蒸馏 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、5、6、7 和 8min,做平行,计算回收率,取平均值,做蒸馏时间与回收率曲线,结果如表 1,回收曲线图见图 1。

表 1 不同蒸馏时间的 N 素回收率

Table 1 Revory rate of N on different distillating time

蒸馏时间 distillating time (min)	0.0	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
回收率 recovery rate (%)	0.0	80.3	97.4	100.4	100.7	100.2	100.7	100.9	100.8	101.0	101.1	101.4

根据表 1 的数据及图 1 的蒸馏时间与回收率曲线可以看出,蒸馏 2.5min 基本回收完全,确定蒸馏时间

为 5min。

### 2.2 吸附对<sup>15</sup>N 丰度及吸附解吸附 N 量的影响

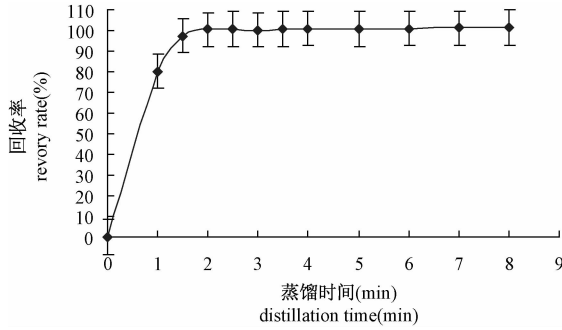


图1 蒸馏时间与回收率的关系

Fig. 1 Relation between distillation time and recovery rate

本试验研究不同<sup>15</sup>N 丰度(包括高丰度 5.272% 和 2.678% 对天然丰度 0.366% 的影响以及自然丰度对高丰度的影响)的吸附量变化及其对后续样品<sup>15</sup>N 结

果的影响。每个丰度连续测定 10 次,使同一样品 N 吸附和解吸附基本稳定,每次测定所用 N 量为 4mg。重复 6 次,根据<sup>15</sup>N 丰度计算吸附及解吸附 N 量。

2.2.1 NH<sub>3</sub> 吸附解吸附对<sup>15</sup>N 丰度的影响 表 2 的数据表明,在高丰度样品蒸馏后,对天然硫酸铵的<sup>15</sup>N 丰度影响较大,且随蒸馏次数的增加逐渐减小,尽管本试验连续蒸馏了 10 次,但仍不能完全消除交叉污染。<sup>15</sup>N 丰度为 2.678%,第 1 次蒸馏天然硫酸铵的<sup>15</sup>N 丰度为 0.473%,比标准值高 29.2%,第 10 次为 0.379%,较标准值仍高 3.4%;而<sup>15</sup>N 丰度为 5.272%,第 1 次和第 10 次天然硫酸铵的<sup>15</sup>N 丰度分别为 0.557% 和 0.379%,比标准值高 52.3% 和 3.6%。即高丰度使低丰度的测量结果偏高。

表 2 NH<sub>3</sub> 吸附解吸附对<sup>15</sup>N 丰度的影响Table 2 Effect of the absorption and desorption of NH<sub>3</sub> on<sup>15</sup>N abundance

蒸馏次数 distilling times	<sup>15</sup> N(2.678%→0.366%)		<sup>15</sup> N(5.272%→0.366%)	
	%	测定值/标准值 observed/standard	%	测定值/标准值 observed/standard
1	0.473 ± 0.010 <sup>Aa</sup>	1.292 ± 0.027 <sup>Aa</sup>	0.557 ± 0.025 <sup>Aa</sup>	1.523 ± 0.068 <sup>Aa</sup>
2	0.424 ± 0.005 <sup>bB</sup>	1.159 ± 0.013 <sup>bB</sup>	0.463 ± 0.007 <sup>ABa</sup>	1.265 ± 0.020 <sup>ABa</sup>
3	0.404 ± 0.007 <sup>cC</sup>	1.103 ± 0.019 <sup>cC</sup>	0.430 ± 0.004 <sup>ABCab</sup>	1.175 ± 0.012 <sup>ABCab</sup>
4	0.391 ± 0.008 <sup>dD</sup>	1.069 ± 0.021 <sup>dD</sup>	0.412 ± 0.008 <sup>ABCabc</sup>	1.125 ± 0.022 <sup>ABCabc</sup>
5	0.386 ± 0.006 <sup>eEdD</sup>	1.056 ± 0.017 <sup>eEdD</sup>	0.397 ± 0.006 <sup>BCbcd</sup>	1.086 ± 0.016 <sup>BCbcd</sup>
6	0.381 ± 0.004 <sup>Eef</sup>	1.040 ± 0.011 <sup>Eef</sup>	0.391 ± 0.005 <sup>BCbcd</sup>	1.067 ± 0.014 <sup>BCbcd</sup>
7	0.380 ± 0.003 <sup>Eef a</sup>	1.037 ± 0.008 <sup>Eef</sup>	0.385 ± 0.004 <sup>Cbcd</sup>	1.053 ± 0.012 <sup>Cbcd</sup>
8	0.377 ± 0.003 <sup>Eef</sup>	1.031 ± 0.008 <sup>Eef</sup>	0.382 ± 0.003 <sup>Ccd</sup>	1.045 ± 0.009 <sup>Ccd</sup>
9	0.380 ± 0.006 <sup>Ef</sup>	1.038 ± 0.017 <sup>Ef</sup>	0.381 ± 0.002 <sup>Cd</sup>	1.041 ± 0.006 <sup>Cd</sup>
10	0.379 ± 0.004 <sup>Ef</sup>	1.034 ± 0.010 <sup>Ef</sup>	0.379 ± 0.002 <sup>Cd</sup>	1.036 ± 0.005 <sup>Cd</sup>
蒸馏次数 distilling times	<sup>15</sup> N(0.366%→2.678%)		<sup>15</sup> N(0.366%→5.272%)	
	%	测定值/标准值 observed/standard	%	测定值/标准值 observed/standard
1	2.566 ± 0.028 <sup>Aa</sup>	0.958 ± 0.010 <sup>Aa</sup>	5.037 ± 0.042 <sup>Aa</sup>	0.955 ± 0.008 <sup>Aa</sup>
2	2.608 ± 0.027 <sup>Aab</sup>	0.974 ± 0.010 <sup>Aab</sup>	5.105 ± 0.042 <sup>Aa</sup>	0.968 ± 0.008 <sup>Aa</sup>
3	2.643 ± 0.010 <sup>Aab</sup>	0.986 ± 0.004 <sup>Aab</sup>	5.138 ± 0.061 <sup>Aa</sup>	0.975 ± 0.012 <sup>Aa</sup>
4	2.648 ± 0.011 <sup>Aab</sup>	0.988 ± 0.004 <sup>Aab</sup>	5.170 ± 0.026 <sup>Aab</sup>	0.981 ± 0.005 <sup>Aab</sup>
5	2.659 ± 0.011 <sup>Aab</sup>	0.992 ± 0.004 <sup>Aab</sup>	5.176 ± 0.045 <sup>Aabc</sup>	0.982 ± 0.009 <sup>Aabc</sup>
6	2.664 ± 0.007 <sup>Aab</sup>	0.995 ± 0.002 <sup>Aab</sup>	5.202 ± 0.021 <sup>ABe</sup>	0.987 ± 0.004 <sup>ABe</sup>
7	2.661 ± 0.013 <sup>Aab</sup>	0.993 ± 0.005 <sup>Aab</sup>	5.219 ± 0.023 <sup>ABbe</sup>	0.990 ± 0.004 <sup>ABbe</sup>
8	2.665 ± 0.017 <sup>Ab</sup>	0.995 ± 0.006 <sup>Ab</sup>	5.202 ± 0.032 <sup>BCcd</sup>	0.987 ± 0.006 <sup>BCcd</sup>
9	2.669 ± 0.008 <sup>Bc</sup>	0.996 ± 0.003 <sup>Bc</sup>	5.220 ± 0.027 <sup>Cd</sup>	0.990 ± 0.005 <sup>Cd</sup>
10	2.659 ± 0.026 <sup>Cd</sup>	0.993 ± 0.010 <sup>Cd</sup>	5.217 ± 0.022 <sup>De</sup>	0.990 ± 0.004 <sup>De</sup>

注: n = 6 肩标大写字母不同表示差异极显著(P > 0.01), 小写字母不同表示差异显著(P > 0.05)。下表均同

Note: n = 6, the different capital letters means significant at 1% level, lower case letters at 5% level. The same as below

用天然硫酸铵样品蒸馏后,<sup>15</sup>N 丰度为 2.678% 的标记硫酸铵第 1 次蒸馏后丰度为 2.566%, 比标准值低 4.2%, 第 10 次为 2.659%, 较标准值仍低 0.7%;<sup>15</sup>N 丰度为 5.272% 第 1 次和第 10 次蒸馏后的<sup>15</sup>N 丰度分别为 5.037% 和 5.217%, 比标准值低 4.5% 和

1.0%。即低丰度使高丰度的测量结果偏低, 但低丰度对高丰度影响较高丰度对低丰度影响的作用效果小, 图 2 直接揭示了这种变化规律。

上述结果表明: 样品间<sup>15</sup>N 丰度的差异越大, 其影响也越大, 但这种影响均随蒸馏次数的增加而逐渐减

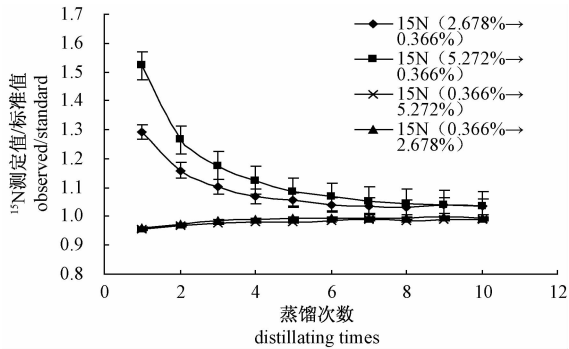


图2 NH<sub>3</sub>吸附解吸对<sup>15</sup>N丰度的影响

Fig.2 Effect of the absorption and desorption of NH<sub>3</sub> on <sup>15</sup>N abundance

小。由于目前同位素质谱计的测量精度一般在万分之一以上,因此,前处理过程,即K氏定氮的交叉污染是

准确测定试样<sup>15</sup>N丰度最重要的影响因素。同时测定样品时按<sup>15</sup>N丰度由低到高的次序进行测定可在一定程度降低交叉污染的相对影响。

2.2.2 吸附解吸N量的变化 本试验进行了10次连续蒸馏,所吸附的标记N绝大多数已解吸,因此可认为10次累计解吸量近似等于总的吸附量,本文解吸率定义为解吸量占总吸附量的百分比,结果如表3。

如表3所示,<sup>15</sup>N丰度为2.678%的总吸附量为543.11μg,占样品量4mg的13.58%,<sup>15</sup>N丰度为5.272%的总吸附量为422.42μg,占样品量4mg的10.56%。尽管不同<sup>15</sup>N丰度吸附的N总量有差异,但解吸量和解吸率的变化趋势相同(图3、图4),与其对<sup>15</sup>N丰度的变化也呈现相同的规律,即前期迅速下降,后期缓慢减少。

表3 吸附解吸N量的变化

Table 3 Variation of amount of absorption N and desorption N

蒸馏次数 distilling times	<sup>15</sup> N(2.678% → 0.366%)			<sup>15</sup> N(5.272% → 0.366%)		
	解吸N/总N量的比例 ratio of desorption N/ total N	解吸N量 amount of desorption N	解吸率 desorption rate	解吸N/总N量的比例 ratio of desorption N/ total N	解吸N量 amount of desorption N	解吸率 desorption rate
	%	μg	%	%	μg	%
1	4.62 ± 0.38 <sup>Aa</sup>	184.69 ± 16.85 <sup>A</sup>	34.31 ± 4.11 <sup>A</sup>	3.90 ± 0.51 <sup>A</sup>	156.09 ± 20.2 <sup>A</sup>	36.88 ± 2.73 <sup>A</sup>
2	2.51 ± 0.18 <sup>Bb</sup>	100.49 ± 7.95 <sup>Bb</sup>	18.65 ± 1.86 <sup>Bb</sup>	1.98 ± 0.15 <sup>Bb</sup>	79.21 ± 6.04 <sup>Bb</sup>	18.80 ± 1.48 <sup>Bb</sup>
3	1.63 ± 0.28 <sup>Cc</sup>	65.14 ± 12.03 <sup>Cc</sup>	11.94 ± 1.01 <sup>Cc</sup>	1.30 ± 0.09 <sup>Cc</sup>	52.10 ± 3.59 <sup>Cc</sup>	12.40 ± 1.38 <sup>Cc</sup>
4	1.09 ± 0.30 <sup>Dd</sup>	43.54 ± 13.30 <sup>Dd</sup>	7.90 ± 1.64 <sup>Dd</sup>	0.93 ± 0.17 <sup>Dd</sup>	37.21 ± 6.63 <sup>Dd</sup>	8.81 ± 1.49 <sup>Dd</sup>
5	0.88 ± 0.25 <sup>deDE</sup>	35.24 ± 10.89 <sup>deDE</sup>	6.53 ± 2.14 <sup>deDE</sup>	0.64 ± 0.12 <sup>eE</sup>	25.53 ± 4.82 <sup>eE</sup>	6.03 ± 0.9 <sup>eE</sup>
6	0.64 ± 0.15 <sup>eEF</sup>	25.55 ± 6.73 <sup>eEF</sup>	4.66 ± 0.79 <sup>eEF</sup>	0.50 ± 0.11 <sup>eEF</sup>	20.08 ± 4.25 <sup>eEF</sup>	4.74 ± 0.81 <sup>eEF</sup>
7	0.58 ± 0.11 <sup>eEF</sup>	23.36 ± 4.95 <sup>eEF</sup>	4.27 ± 0.47 <sup>eEF</sup>	0.40 ± 0.09 <sup>eF</sup>	15.87 ± 3.57 <sup>eF</sup>	3.75 ± 0.77 <sup>eF</sup>
8	0.48 ± 0.12 <sup>eEF</sup>	19.35 ± 5.22 <sup>eEF</sup>	3.52 ± 0.60 <sup>eEF</sup>	0.33 ± 0.07 <sup>eF</sup>	13.29 ± 2.59 <sup>eF</sup>	3.14 ± 0.49 <sup>eF</sup>
9	0.60 ± 0.25 <sup>eF</sup>	24.02 ± 10.98 <sup>eF</sup>	4.28 ± 1.48 <sup>eF</sup>	0.31 ± 0.05 <sup>fF</sup>	12.38 ± 1.89 <sup>fF</sup>	2.93 ± 0.39 <sup>fF</sup>
10	0.54 ± 0.15 <sup>eF</sup>	21.74 ± 6.64 <sup>eF</sup>	3.95 ± 0.84 <sup>eF</sup>	0.27 ± 0.04 <sup>fF</sup>	10.65 ± 1.48 <sup>fF</sup>	2.52 ± 0.31 <sup>fF</sup>
合计 total	13.58	543.11	100.00	10.56	422.42	100.00

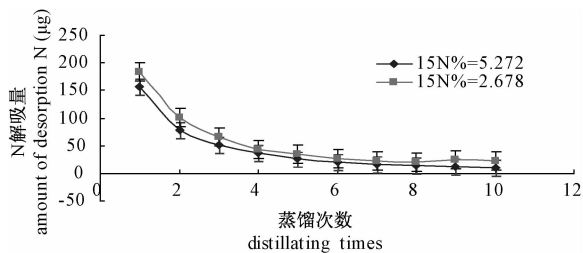


图3 不同蒸馏次数对解吸N量的影响

Fig.3 Effect of distilling times on amount of desorption N

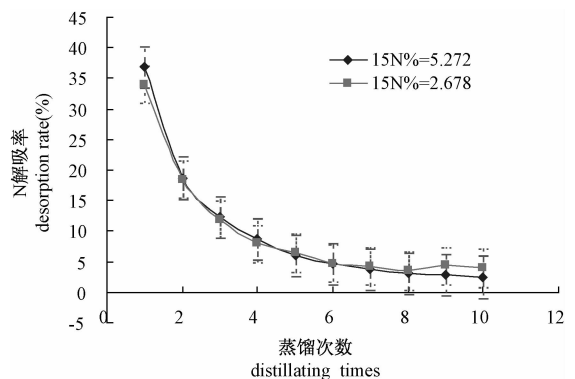


图4 不同蒸馏次数对N解吸率的影响

Fig.4 Effect of distilling times on rate of desorption N

2.2.3 解吸N/总氮的变化 解吸N是指上一样品吸附于K氏定氮仪中吸附的N素在下次蒸馏过程中解吸的部分,总氮是指下次蒸馏过程中样品N素总量,解吸N与总氮的比值反映解吸氮对下次蒸馏过程中样品N素总量的贡献,即反映下一样品受解吸氮的污

染程度,结果见表3;不同蒸馏次数对解吸N/总氮的影响关系如图5(数据见表3)。

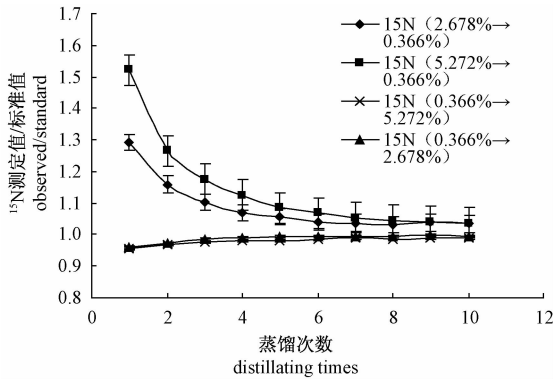


图 5 不同蒸馏次数对解吸 N/总 N 的影响

Fig. 5 Effect of different distillation times on ratio of desorption N/total N

结果表明,随着蒸馏次数的增加,解吸 N 与总氮的比值迅速降低,第一次蒸馏的影响最大,达到 3.90% ~ 4.62%,第 2 次为 1.98% ~ 2.51%,对于同位

素测定来说是非常大的交叉污染,特别是在两者<sup>15</sup>N 丰度差异较大时,污染程度将更严重。另外,即使蒸馏 10 次,其解吸 N/总氮仍在 0.27% 以上,提示 NH<sub>3</sub> 的吸附解吸附对交叉污染的影响很难短时间完全消除,进而影响<sup>15</sup>N 丰度的准确测定。

### 2.3 不同冷凝器对吸附解吸附 N 量及对天然硫酸铵<sup>15</sup>N 丰度的影响

为研究冷凝器对 NH<sub>3</sub> 吸附及解吸附的影响,本试验自制了 1 套冷凝器,与定氮仪原有冷凝器进行比较,其具体参数如表 4。考虑到冷凝器表面积对吸附的影响,粗略测定了 2 种冷凝器表面积,表面积比(原机/自制)约为 3.75。为研究自制冷凝器的吸附情况,采用<sup>15</sup>N 为 5.272% 的标记硫酸铵,与本文 1.2.1 相似的处理,并与原机冷凝器相同的处理结果进行对比,结果如表 5。

表 4 冷凝器参数

Table 4 Parameter of condenser

冷凝器 condenser	流出液 温度 of effluent (°C)	冷凝器 长度 condenser length (mm)	冷却管 圈数 perimeters of cooling tube (圈)	冷却管 外径 external dimameter of cooling tube	冷却管总长 total length of cooling tube (mm)	冷却管内径 Bore of cooling tube (mm)	冷却管 周长 Perimeter of cooling tube (mm)	冷凝管 表面积 surface area of cooling tube (mm <sup>2</sup> )
原机 initial	29	400	17.5	50.0	2748	7.5	23.6	64704
自制 self-manufacture	30	370	10.0	35.0	1099	5.0	15.7	17254
原机/自制面积比 areal ratio of initial /self-manufacture								3.75

表 5 不同冷凝器对 NH<sub>3</sub> 吸附解吸附的影响

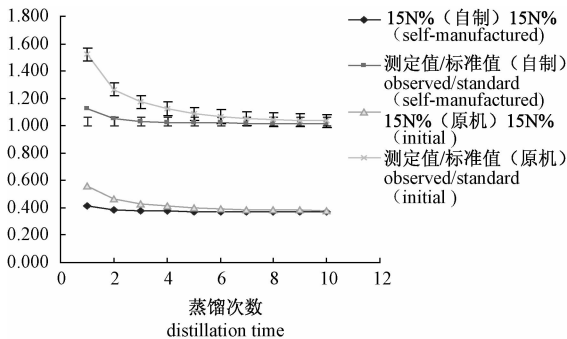
Table 5 Effect of condenser on absorption and desorption of NH<sub>3</sub>

蒸馏次数 distilling time	<sup>15</sup> N (%)	测定值/标准值 observed/standard	解吸 N/总 N ratio of desorption N/ total N (%)	解吸 N 量 amount of desorption N (μg)	解吸率 desorption rate (%)
自制冷凝器 ( <sup>15</sup> N 5.272% → 0.366%) self-manufactured condenser ( <sup>15</sup> N 5.272% → 0.366%)					
1	0.413 ± 0.002 <sup>Aa</sup>	1.127 ± 0.005 <sup>Aa</sup>	0.94 ± 0.005 <sup>Aa</sup>	37.76 ± 1.60 <sup>Aa</sup>	37.91 ± 1.99 <sup>Aa</sup>
2	0.385 ± 0.002 <sup>Bb</sup>	1.052 ± 0.006 <sup>Bb</sup>	0.38 ± 0.006 <sup>Bb</sup>	15.36 ± 1.92 <sup>Bb</sup>	15.40 ± 1.83 <sup>Bb</sup>
3	0.378 ± 0.002 <sup>Cc</sup>	1.033 ± 0.005 <sup>Cc</sup>	0.24 ± 0.005 <sup>Cc</sup>	9.62 ± 1.40 <sup>Cc</sup>	9.60 ± 0.78 <sup>Cc</sup>
4	0.376 ± 0.003 <sup>CDed</sup>	1.027 ± 0.008 <sup>CDed</sup>	0.19 ± 0.008 <sup>CDed CDed</sup>	7.78 ± 2.29 <sup>CDed</sup>	7.64 ± 1.75 <sup>CDed</sup>
5	0.373 ± 0.002 <sup>Dde</sup>	1.020 ± 0.004 <sup>CDde</sup>	0.15 ± 0.004 <sup>CDd</sup>	5.83 ± 1.29 <sup>CDd</sup>	5.75 ± 0.86 <sup>DEde</sup>
6	0.374 ± 0.001 <sup>Dde</sup>	1.021 ± 0.003 <sup>CDde</sup>	0.15 ± 0.003 <sup>CDd</sup>	5.97 ± 0.77 <sup>CDd</sup>	5.95 ± 0.26 <sup>DEd</sup>
7	0.373 ± 0.001 <sup>Dde</sup>	1.019 ± 0.003 <sup>Dde</sup>	0.14 ± 0.003 <sup>CDd</sup>	5.47 ± 0.88 <sup>CDd</sup>	5.47 ± 0.69 <sup>DEd</sup>
8	0.371 ± 0.001 <sup>De</sup>	1.014 ± 0.003 <sup>De</sup>	0.10 ± 0.003 <sup>De</sup>	4.07 ± 0.88 <sup>De</sup>	4.11 ± 1.03 <sup>DEe</sup>
9	0.372 ± 0.001 <sup>De</sup>	1.016 ± 0.002 <sup>De</sup>	0.11 ± 0.002 <sup>De</sup>	4.55 ± 0.66 <sup>De</sup>	4.54 ± 0.46 <sup>DE</sup>
10	0.371 ± 0.001 <sup>De</sup>	1.013 ± 0.002 <sup>De</sup>	0.09 ± 0.002 <sup>De</sup>	3.64 ± 0.68 <sup>De</sup>	3.63 ± 0.53 <sup>Ee</sup>
合计 total			2.50	100.05	100.00

续表 5

蒸馏次数 distilling time	$^{15}\text{N}$ (%)	测定值/标准值 observed/standard	解吸 N/总 N ratio of desorption N/ total N (%)	解吸 N 量 amount of desorption N ( $\mu\text{g}$ )	解吸率 desorption rate (%)
原机冷凝器 ( $^{15}\text{N}$ 5.272% $\rightarrow$ 0.366%) initial condenser ( $^{15}\text{N}$ 5.272% $\rightarrow$ 0.366%)					
1	0.557 $\pm$ 0.025 <sup>Aa</sup>	1.523 $\pm$ 0.068 <sup>Aa</sup>	3.90 $\pm$ 0.51 <sup>A</sup>	156.09 $\pm$ 20.2 <sup>A</sup>	36.88 $\pm$ 2.73 <sup>A</sup>
2	0.463 $\pm$ 0.007 <sup>ABa</sup>	1.265 $\pm$ 0.020 <sup>ABa</sup>	1.98 $\pm$ 0.15 <sup>Bb</sup>	79.21 $\pm$ 6.04 <sup>Bb</sup>	18.80 $\pm$ 1.48 <sup>Bb</sup>
3	0.430 $\pm$ 0.004 <sup>ABCab</sup>	1.175 $\pm$ 0.012 <sup>ABCab</sup>	1.30 $\pm$ 0.09 <sup>Cc</sup>	52.10 $\pm$ 3.59 <sup>Cc</sup>	12.40 $\pm$ 1.38 <sup>Cc</sup>
4	0.412 $\pm$ 0.008 <sup>ABCabc</sup>	1.125 $\pm$ 0.022 <sup>ABCabc</sup>	0.93 $\pm$ 0.17 <sup>Dd</sup>	37.21 $\pm$ 6.63 <sup>Dd</sup>	8.81 $\pm$ 1.49 <sup>Dd</sup>
5	0.397 $\pm$ 0.006 <sup>BCbed</sup>	1.086 $\pm$ 0.016 <sup>BCbed</sup>	0.64 $\pm$ 0.12 <sup>eE</sup>	25.53 $\pm$ 4.82 <sup>eE</sup>	6.03 $\pm$ 0.9 <sup>eE</sup>
6	0.391 $\pm$ 0.005 <sup>BCbed</sup>	1.067 $\pm$ 0.014 <sup>BCbed</sup>	0.50 $\pm$ 0.11 <sup>efEF</sup>	20.08 $\pm$ 4.25 <sup>efEF</sup>	4.74 $\pm$ 0.81 <sup>efEF</sup>
7	0.385 $\pm$ 0.004 <sup>Ched</sup>	1.053 $\pm$ 0.012 <sup>Ched</sup>	0.40 $\pm$ 0.09 <sup>ef</sup>	15.87 $\pm$ 3.57 <sup>ef</sup>	3.75 $\pm$ 0.77 <sup>ef</sup>
8	0.382 $\pm$ 0.003 <sup>Ced</sup>	1.045 $\pm$ 0.009 <sup>Ced</sup>	0.33 $\pm$ 0.07 <sup>ef</sup>	13.29 $\pm$ 2.59 <sup>ef</sup>	3.14 $\pm$ 0.49 <sup>ef</sup>
9	0.381 $\pm$ 0.002 <sup>Cd</sup>	1.041 $\pm$ 0.006 <sup>Cd</sup>	0.31 $\pm$ 0.05 <sup>fF</sup>	12.38 $\pm$ 1.89 <sup>fF</sup>	2.93 $\pm$ 0.39 <sup>fF</sup>
10	0.379 $\pm$ 0.002 <sup>Cd</sup>	1.036 $\pm$ 0.005 <sup>Cd</sup>	0.27 $\pm$ 0.04 <sup>fF</sup>	10.65 $\pm$ 1.48 <sup>fF</sup>	2.52 $\pm$ 0.31 <sup>fF</sup>
合计 total			10.56	422.42	100.00

表 5 的结果表明冷凝器的表面积对  $^{15}\text{N}$  丰度有较大影响,其变化趋势如图 6 所示。对于第一次蒸馏,原机冷凝器使天然硫酸铵的  $^{15}\text{N}$  丰度提高 52.3%,而自制冷凝器仅提高 12.7%,二者之比为 4.1:1,吸附总 N 量之比为 422.42:100.05 = 4.2:1,与冷凝器的表面积比 3.75:1 接近,提示吸附总 N 量主要取决于冷凝器的表面积,二者基本呈正比关系。

图 6 不同冷凝器解吸 N 对天然硫酸铵  $^{15}\text{N}$  丰度的影响Fig. 6 Effect of desorption N of different condenser on  $^{15}\text{N}$  abundance of natural ammonium sulfate

根据所测  $^{15}\text{N}$  丰度计算解吸 N/总 N、解吸 N 量和解吸率,计算结果及图 7、图 8 提示相同蒸馏次数解吸 N/总 N、解吸 N 量均随冷凝器的表面积而降低,与其对  $^{15}\text{N}$  丰度的影响呈现近似的规律,但解吸率所受影响很小,因此,减少冷凝器的表面积可降低吸附量,但对解吸率的影响较小,推测解吸率可能主要与冷凝器的材料有关,因为二者皆为高硼玻璃,材料性质相近。另外,虽然通过减少冷凝器的表面积可降低各指标,但本试验蒸馏 10 次仍不能完全或基本消除交叉污染。因此通过减少冷凝器的表面积降低交叉污染存在

较大的局限性,提示在减少冷凝器表面积的基础上,再经过涂覆惰性膜,减少其有效吸附面积是大幅度降低样品间交叉污染的重要途径。惰性膜应具有对  $\text{NH}_3$  极低的吸附性,在玻璃表面具有良好的附着性和稳定性,惟如此,才能从根本上降低 K 氏定氮仪的交叉污染。

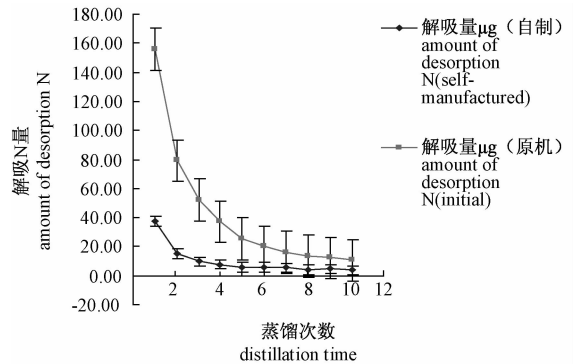


图 7 不同冷凝器对解吸 N 量的影响

Fig. 7 Effect of different condenser on amount of desorption N

### 3 讨论

在  $^{15}\text{N}$  分析中, K 氏定氮作为前处理具有操作简单,测定结果重现性好的特点,因此广泛用于食品、谷物、土壤、饲料等样品含氮量的测定。但样品间的交叉污染一直是制约准确测定  $^{15}\text{N}$  丰度的关键因素。由于方法本身的特点,一直未发现较好的解决方法。

为了减少交叉污染, Martin 和 Ross<sup>[7]</sup> 采用镀银汽液分离器和不锈钢冷凝器,  $\text{NH}_3$  的吸附量低于 0.1%, 与玻璃材料相比较大地降低了交叉污染,但尚未从根本上解决,特别是对于  $^{15}\text{N}$  丰度差异较大的样品,仍然

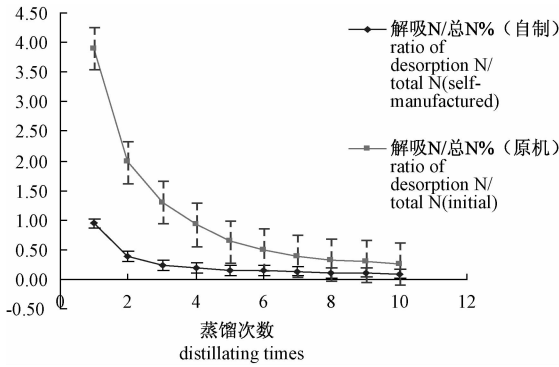


图8 不同冷凝器对解吸N/总N和解吸率的影响

Fig. 8 Effect of different condenser on ratio of desorption N/total N and on desorptionrate

会造成较大的误差;也有人采用双蒸馏法<sup>[2,8]</sup>,即每个消化样品分成2等分,连续蒸馏,蒸馏第1等分测定含氮量,第2等分浓缩后测定<sup>15</sup>N丰度,可消除交叉污染。在本试验中,交叉污染随蒸馏次数是逐渐降低的过程,仅通过1~2次的连续蒸馏不能消除交叉污染,与上述结果不一致,推测可能与每次蒸馏总氮量及<sup>15</sup>N丰度有关,上述研究的氮量为1~1.2mg,而本试验为4mg,造成吸附与解吸附量增加。在实际的测量中,样品总氮量是未知的,一批样品的氮量会存在变化,因此,双蒸馏法仍可能存在较大的交叉污染。也有样品间用95%乙醇蒸馏一次<sup>[1,4,9]</sup>以降低交叉污染的报导,本试验室先前对该方法进行了研究,与用天然硫酸铵蒸馏1次的效果相近,同Reeder<sup>[6]</sup>等的研究结果一致。Buresh等<sup>[3]</sup>建议样品间进行蒸汽吹除冷凝器90s,可大大减少交叉污染,由于乙醇或天然硫酸铵净化或蒸汽吹除(排空冷凝水)损失了解吸附的氮素,产生全氮结果偏低的问题,同时乙醇对测定<sup>15</sup>N产生干扰,因此,样品需要蒸干除去乙醇<sup>[6]</sup>。

交叉污染来自于两方面,一是蒸馏管路冷凝液的非吸附性残留,其次是蒸馏管路对NH<sub>3</sub>的吸附与解吸附。从本试验回收率的测定结果分析,对于4mg的N量,蒸馏2.5min,回收率已达100%,与蒸馏8min相近,蒸馏5min已满足要求,表明蒸馏管路冷凝液的残留很低,残留不是主要原因;而且在本研究中,标记硫酸铵蒸馏后在下一样品中的解吸量占样品总N的3.90%~4.62%,假如解吸氮是蒸馏管路冷凝液的残留,则回收率应低于96.1%,而本试验的回收率可达100%,从而进一步反证了蒸馏管路冷凝液的非吸附性残留不是交叉污染的主要原因,而是蒸馏管路对NH<sub>3</sub>的吸附与解吸附,Reeder等<sup>[6]</sup>也认为交叉污染主要是由样品间NH<sub>3</sub>的吸附解吸附所产生。

K氏定氮仪的蒸馏系统主要是玻璃材料,由于其化学组成与结构的特点,具有一定的吸附能力<sup>[10]</sup>。对于新的K氏定氮仪,其表面主要为Na<sup>+</sup>,经过蒸馏后,Na<sup>+</sup>为H<sup>+</sup>交换,使玻璃表面形成OH。示意图如图6。

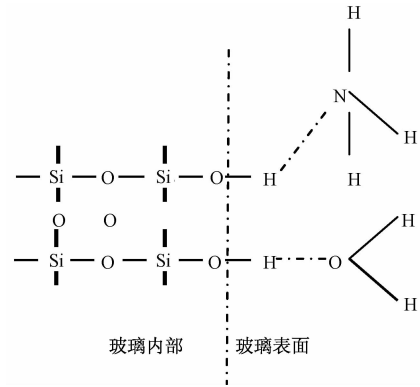
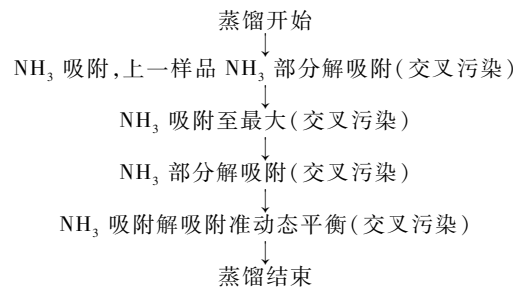


图9 玻璃表面吸附解吸附示意图

Fig. 9 Cartogram of the absorption and desorption on glass surface

在正常测定过程中,NH<sub>3</sub>随蒸气馏出被吸收,并在蒸馏管路中进行吸附与解吸附,在此过程中,部分NH<sub>3</sub>溶于水并电离,即:NH<sub>3</sub>+H<sub>2</sub>O→NH<sub>4</sub><sup>+</sup>+OH<sup>-</sup>。形成的部分NH<sub>4</sub><sup>+</sup>或水中的H<sup>+</sup>也可与吸附于玻璃表面的NH<sub>4</sub><sup>+</sup>或H<sup>+</sup>交换,造成交叉污染。

在一个完整的样品测试过程中,根据本研究的回收曲线,随着蒸馏过程的进行,NH<sub>3</sub>的浓度呈现快速升高、最大、逐渐降低的过程,推测应是如下吸附解吸附过程:



在此过程中,每一样品完成一个重复,如果每个样品的氮量一致(严格的说是N原子数一致),蒸馏结束后,蒸馏管路吸附的氮量也应一致,只是吸附的NH<sub>3</sub>在样品间进行了部分交换,因此,该吸附与解吸附贯穿于整个蒸馏过程,对于含氮量的测定影响较小,但会严重影响<sup>15</sup>N丰度<sup>[6]</sup>,因此进行同位素研究的K氏定氮仪具有更高的要求。本研究的回收率结果和标记硫酸铵与天然硫酸铵<sup>15</sup>N丰度的相互影响证实了该结论。因此如何降低玻璃管路的吸附能力,是降低样品间交叉污染的关键。

玻璃表面实质上是粗糙不平、有裂缝、有台阶的,

这些影响着其表面物理性质,玻璃的亚表层面、表面羟基对表面吸附、化学吸附起决定性作用<sup>[10]</sup>。玻璃表面吸附包括物理吸附、化学吸附和介于两者间的氢键吸附。根据  $\text{NH}_3$  的化学组成和结构,其吸附主要是通过氢键吸附。 $\text{NH}_3$  分子的 N 与 H 既可与玻璃表面 H 或 O 形成氢键,还可与  $\text{H}_2\text{O}$  在玻璃表面形成一层或多层吸附,甚至近百层<sup>[11]</sup>,形成以氢键为纽带的网状结构,外层对内层形成保护作用,造成解吸缓慢,这可能是吸附难于彻底去除的根本原因。本研究室在以前的大量分析中发现,当蒸馏管路彻底清洗后,进行天然硫酸铵的测定,其<sup>15</sup>N 丰度接近 0.366%,而进行高丰度测定一段时间后,尽管通过空蒸和连续进行多次天然硫酸铵净化后,其<sup>15</sup>N 丰度仍在 0.370% ~ 0.372% 之间。

根据 Langmuir 和 BET 方程<sup>[11]</sup>,吸附量与吸附剂的种类、数量及吸附质的分压、吸附热、凝聚热、吸附分子层数和温度有关。因此降低吸附剂吸附的主要方法是减压、加热、减少接触面积以及选用低吸附性材料,显然抽真空不适用于 K 氏定氮仪, Buresh<sup>[3]</sup> 以及 Saffigna 和 Waring<sup>[4]</sup> 采用样品间放空冷凝水,蒸汽吹除冷凝器 90 ~ 120s 属于加热方式。减少接触面积可采用抛光、适当减小管路尺寸,由于 K 氏定氮仪的管路工作在内表面,且形状复杂,因此,抛光不具可操作性,只能通过减小管路尺寸。在 K 氏定氮仪的蒸馏管路中,从凯氏瓶到蒸汽冷凝段之前, $\text{NH}_3$  处于气态,蒸馏过程中温度处于 100℃,尽管蒸馏器及气路表面积较大,但相对于冷凝器其有效吸附表面积可能较小,由此推断,这部分管路的吸附量相对较低, $\text{NH}_3$  吸附应主要发生在冷凝器中。因此在保证冷凝效果的条件下降低冷凝器尺寸可减少其表面积,进而降低吸附量,减少样品间的交叉污染。本研究结果表明,交叉污染主要来源于冷凝器的吸附,并与其表面积近似呈正比,与 Reeder<sup>[6]</sup> 等的结论相近。在材料选择方面,目前选用的低吸附性材料主要是不锈钢和银<sup>[3-5]</sup>,从总的研究结果看,较玻璃的吸附性小,也可作为降低交叉污染的方法之一。

降低吸附质( $\text{NH}_3$ )吸附的主要方法是降低吸附质的浓度,即  $\text{NH}_3$  的浓度。对于已知含量的样品,可通过稀释降低  $\text{NH}_3$  的浓度,但在很多情况下,样品含氮量是未知的,难以通过稀释准确控制其含氮量范围。

本研究中,不同冷凝器尽管 N 吸附总量差异较大,但解吸率的变化规律相近,相邻样品间的交叉污染最大,即本试验中第一次蒸馏的天然硫酸铵解吸率最大,为 36.88% ~ 37.91%,因此减少冷凝器的总吸附量,即减小冷凝器的吸附表面积是降低交叉污染的关键。

可通过减小冷凝器的物理表面积,即减小尺寸,但本方法需在保证冷凝效果的前提下进行,作用有限。减小冷凝器的有效吸附表面积,如覆惰性膜,可极大地减少有效吸附表面积,应是解决交叉污染的根本途径,但就目前的研究,尚未发现适宜的材料和工艺。另外可能的方法是采用其它物理手段,使吸附的  $\text{NH}_3$  快速解吸,并能够在测定一个样品的时间内完全解吸。

尽管多种方法或方法间组合可降低交叉污染,但研究尚不系统。以上分析表明,由于玻璃材料固有的物理化学特性,降低交叉污染极其有限,从加工性、可操作性、经济性和适用性考虑,蒸馏管路覆惰性膜和物理手段快速解吸将是未来发展的方向。采用金属管路代替玻璃管路,并在仪器设计中尽量降低冷凝器及连接管路的表面积是目前较好的解决方法。基于目前的技术水平,解决交叉污染的根本途径是测定<sup>15</sup>N 的样品不经 K 氏定氮仪,可对“双蒸馏法”进行改进,即第 1 等分进行 K 氏定氮,第 2 等分直接中和过量的硫酸、浓缩,待测<sup>15</sup>N,但该方法操作繁琐,也不适用于土壤氨态氮和硝态氮的同时测定。就目前本实验室的研究,中和过量的硫酸产生大量的无机盐,浓缩较困难、耗时,建立简便、快速的浓缩方法将是关键。

## 4 结论

K 氏定氮仪对  $\text{NH}_3$  的吸附量主要取决于冷凝器的表面积,表面积愈大吸附量愈高;吸附于冷凝器  $\text{NH}_3$  的解吸量和解吸率随蒸馏次数的增加而逐渐减少。采用具有极低吸附性能的新材料和新工艺制作汽液分离器和冷凝器,将是解决交叉污染的最佳途径。在实际应用中,测定样品时按<sup>15</sup>N 丰度由低到高的次序进行并在不同丰度样品间蒸馏 3 ~ 5 次天然硫酸铵可在一定程度降低交叉污染的影响。

致谢:本研究的标准样品由上海化工研究院提供,并得到了杜晓宁教授的大力支持,在此一并表示感谢。

## 参考文献:

- [1] Bremner JM. Isotope-Ratio Analysis of Nitrogen in Nitrogen-15 Trace Investigation[M]. In Black CA, ed. Methods of Soil Analysis. Madison. Wis.: American Society of Agronomy, 1965
- [2] 彭运生. 质谱法准确测定植物和土壤中同位素<sup>15</sup>N[J]. 质谱学报, 1987, 8(4): 19 - 25
- [3] Buresh B J, Austin E R., Craswell E T. . Analytical Methods in <sup>15</sup>N Research[J]. Fertilizer Research, 1982, 3: 37 - 62
- [4] Saffigna P C. Waring S A. Prevention of <sup>15</sup>N Cross-Contamination during Steam Distillation and Potentiometric Titration of <sup>15</sup>N-Labeled



- Samples[J]. Analytica Chimica Acta, 1977, 89:203 - 207
- [ 5 ] Newman A C D. The Distillation of Ammonia for Isotopic Analysis [J]. Chemical Industry, 1966, 3:115 - 116
- [ 6 ] Reeder A J D, Deen W A O Porter, L K, Lober R W. A Comparison of Cross-Contamination in Distillation Units Used in Total Nitrogen and Nitrogen - 15 Analyses [J]. Soil Science Society of America Journal, 1980, 44(6):1262 - 1267
- [ 7 ] Martin A E, Ross D J. Significance of Errors in <sup>15</sup>N Measurements in Soil-Plant Research [J]. Trans 9th International Congress of Soil Science, 1968, 3: 521 - 529
- [ 8 ] Pruden G, Powlson D S, Jenkinson D S. The Measurement of <sup>15</sup>N in Soil and Plant Material [J]. Fertilizer Research, 1985, 6:205 - 218
- [ 9 ] Hauck R D. Isotope-Ratio Analysis in Investigation Using Stable Nitrogen Traces, In Methods of Soil Analysis [M]. Madison, Wis: American Society of Agronomy, 1982
- [10] 王承遇, 陶 瑛. 玻璃的表面结构和性质 [J]. 硅酸盐通报, 1982, 01:24 - 34
- [11] 王承遇, 陶 瑛. 玻璃表面处理技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004, 109 - 120



## 欢迎订阅《大豆科学》

《大豆科学》是由黑龙江省农业科学院主管主办的大豆专业领域学术性期刊,也是被国内外多家重要数据库和文摘收录源收录的重点核心期刊。主要刊登有关大豆遗传育种、品种资源、生理生态、耕作栽培、植物保护、营养肥料、生物技术、食品加工、药用功能及工业用途等方面的学术论文、科研报告、研究简报、国内外研究述评、学术活动简讯和新品种介绍等。

《大豆科学》主要面向从事大豆科学研究的科技工作者,大专院校师生、各级农业技术推广部门的技术人员及科技种田的农民。

国内外公开发行,双月刊,16开本,每期180页。国内每期订价:10.00元,全年60.00元,邮发代号:14-95。国外每期订价:10.00美元(包括邮资),全年60美元。国外由中国国际图书贸易总公司发行,北京399信箱。国外代号:Q5587。

地 址:哈尔滨市南岗区学府路368号《大豆科学》编辑部。

邮 编:150086

电 话:0451-86668735

E-mail: dadoukx@sina.com ddkexue@126.com