

王 雪. AA3 型连续流动分析仪测定植株全氮的方法研究与优化[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(24): 215–219.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.48.041

AA3 型连续流动分析仪测定植株全氮的方法研究与优化

王 雪

(南京农业大学国家信息农业工程技术中心, 江苏南京 210095)

摘要:为探讨采用 AA3 型流动分析仪测定植株全氮的可行性和方法, 以水稻为研究对象进行测试。通过改变 AA3 型流动分析仪待测溶液中 H_2SO_4 浓度 ($\geq 5\%$ 硫酸待测液), 调节缓冲液中 NaOH 的量, 保持反应混合液的 pH 值为 13, 并检验测定结果的稳定性及准确性。结果表明, 调整 NaOH 用量后, 不同 H_2SO_4 用量下, 样品的检测标准曲线相关系数均在 0.9996 以上, 加标回收率在 95.40% ~ 104.2% 之间。通过调整 NaOH 用量, 可实现 AA3 型流动分析仪测定植物全氮的方法进一步完善, 从而达到测试准确的目的。

关键词:AA3 型流动分析仪; 植株全氮; 测试方法

中图分类号: S132 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)24-0215-05

氮素是植株生长不可缺少的大量营养元素, 其含量能够反映植物的生长状况, 对指导农业生产实践有着极其重要的意义^[1-2]。对于植物全氮的测定主要采用凯氏定氮法, 即用浓硫酸-催化剂对样品进行消煮分解, 使氮素转化为铵根离子, 然后对铵离子进行测定^[3]。目前消煮液中铵离子的定量分析主要有蒸馏滴定法和比色法^[4-5]。蒸馏滴定法一般采用人工手段, 向消煮液加入过量氢氧化钠并加热, 将铵离子蒸出并用硼酸液吸收, 再经过滴定得出铵离子浓度, 目前自动凯氏定氮仪可以实现自动消煮、蒸馏、滴定等过程。比色法包括铵离子与纳氏试剂反应生成黄色物质, 用分光光度计在 420 nm 波长下比色测定。比色法也包括次氯酸钠-水杨酸钠法, 铵离子与次氯酸钠和水杨酸钠在碱性条件下反应生成蓝绿色物质, 在波长 660 nm 处检测。

目前, 连续流动分析仪 (Continuous Flow Analyzer, 简称 CFA) 在分析实验室被大量使用, 并逐渐替代复杂的手工操作。关于 AA3 流动分析仪的研究也有报道, 温云杰等使用 AA3 流动分析仪测定小麦秸秆全氮含量, 并与自动凯氏定氮仪进行比较^[6]。武娟等利用 AA3 流动分析仪测量复混肥料中的氨态氮含量, 并对 AA3 流动分析仪法和国标法

进行了比较研究^[7]。以上都表明 2 种方法的测定结果没有显著差异, 且流动分析仪稳定性更高。贝美容等通过改进 AA3 型连续流动分析仪的试剂配制方法, 实现橡胶叶片 H_2SO_4 - H_2O_2 消煮样品中氮、磷、钾的同时测定^[8]。张英利等提出植物全氮和土壤 AA3 流动分析仪的测定方法, 并与蒸馏滴定法、FLAstar5000 方法进行比较, 结果表明, 利用 AA3 流动分析仪测量植株和土壤的全氮含量无显著差异^[9-10]。

AA3 流动分析仪在一定领域内被许多人员研究使用, 但在实际操作中, 不同测定方法的消煮过程中浓硫酸用量是不同的, 从而导致待测样品背景酸度不一致。但是 AA3 型连续流动分析仪测定植株全氮时所附试剂配制方法以 4% 的硫酸浓度为样品背景来保证反应 pH 值在 12.8 ~ 13.1 之间, 因此测定时根据不同的硫酸用量须要调整试剂配制以达到测定所需的 pH 值。张丽萍等针对 1% ~ 5% 的硫酸浓度对试剂进行调整, 来达到植物全氮的准确测定^[10], 但是对于高于 5% 硫酸浓度的待测液的研究并未报道, 因此本研究针对高于 5% 硫酸浓度待测液, 对所附试剂配制方法和管路进行调整改进, 对 AA3 型流动分析仪测定植物全氮的方法作进一步探索, 以达到准确测试的目的。

1 材料与方法

1.1 样品

供试样品为水稻分蘖期植株样品, 样品烘干后

收稿日期: 2020-07-27

基金项目: 国家重点研发计划 (编号: 2017YFD0201501); 中央高校基本科研业务费 (编号: KJSY201503)。

作者简介: 王 雪 (1979—), 女, 山东鱼台人, 硕士, 实验师, 研究方向为实验室测试与检验检测。E-mail: wangxue@njau.edu.cn。

粉碎,过 0.50 mm 筛。

1.2 样品消煮

称取 0.200 0 g 样品至消煮管中,每个样品称量 3 份,分别加入 5、8、10 mL 浓硫酸,摇动使硫酸与样品混匀,放入催化剂(硫酸钾和硒粉混合物),利用自动程序消解系统加热,升温速度 5 ℃/min,升温至 200 ℃,保持 30 min,继续加热至 360 ℃,保持 120 min。冷却至室温后用去离子水定容至 100 mL。

1.3 测定不同硫酸用量消煮液中的氮浓度

1.3.1 仪器及原理 连续流动分析仪主要由进样

器、蠕动泵、化学分析模块、检测器组成,采用片段连续流动分析技术,即将样品和试剂混合液被空气泡均匀分割成小片段,以降低液体的扩散及样品之间的带过污染^[11]。AA3 型流动分析仪测定全氮采用多功能 MT7 模块见图 1,图 1 中括号中数字单位为 mL/min。此模块包括透析器和加热池,样品和试剂通过蠕动泵被同时输送到 MT7 模块中,经过透析器过滤杂质并有一定的稀释,后依次与试剂反应,经过加热池加速反应,最终的化合物进入检测器,在特定波长下进行比色。

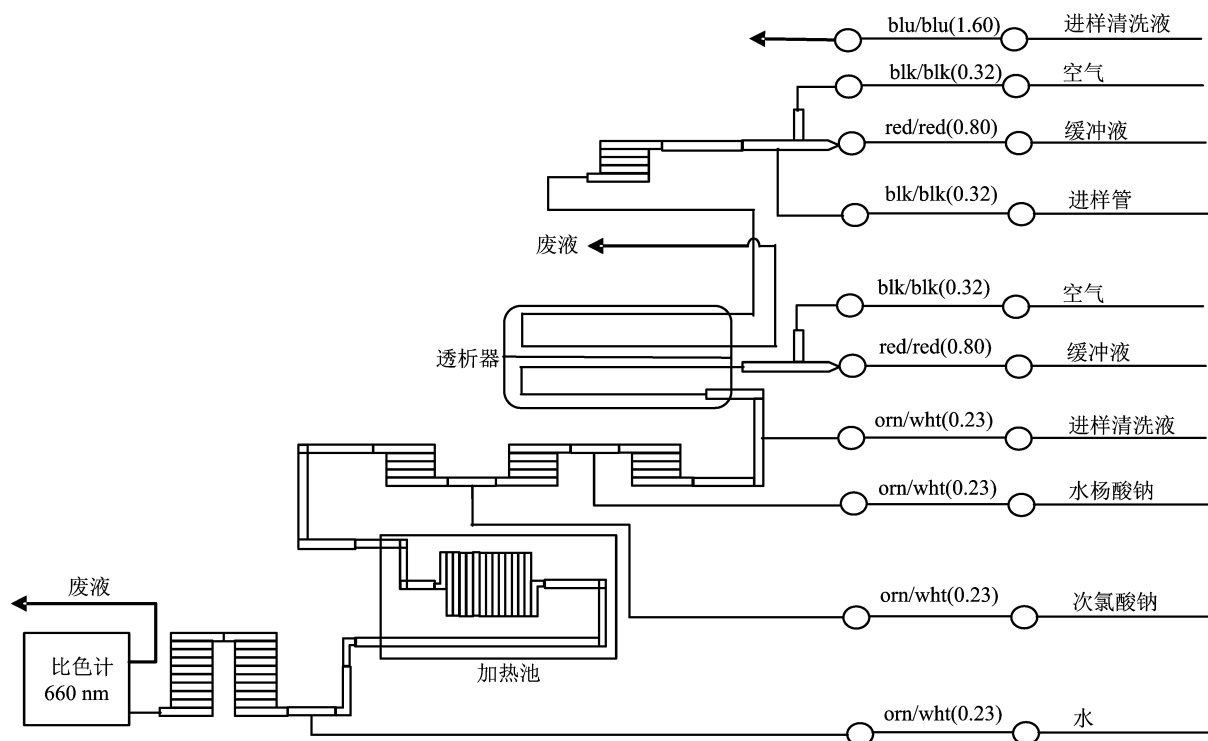


图1 AA3 流动分析仪 MT7 模块测定酸消解全氮管路

测定原理:在碱性条件下(pH 值 12.8 ~ 13.1),样品消煮液中的铵离子与水杨酸钠和次氯酸钠吸收反应生成蓝色化合物,在 660 nm 波长处测定,显色液体进入比色计中进行比色,测定峰高值,与标准曲线比较,计算得到氮浓度^[12]。

1.3.2 试剂配制 水杨酸钠溶液:称量 40 g 水杨酸钠溶于 600 mL 去离子水中,加入 1 g 硝普钠,定容至 1 000 mL。

次氯酸钠溶液:取 3 mL 有效氯含量为 5.25% 的次氯酸钠溶液于 60 mL 去离子水中,定容至 100 mL,现配现用。

缓冲溶液:分别溶解 35.8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、50 g 酒石酸钾钠及一定量 NaOH(根据待测液的硫

酸浓度确定)于 600 mL 去离子水中,定容至 1 000 mL,再加 2 mL 22% 的 Brij-35(非离子表面活性剂,起润滑管路作用)溶液混合均匀。

进样清洗液:与待测液浓度相同的硫酸溶液。以上所用试剂均为分析纯。

标准储备液:将 4.717 g 硫酸铵溶解于 600 mL 去离子水中,定容至 1 000 mL,此为 1 000 mg/L 的标准储备液。

工作标准溶液:从标准储备液中分别吸取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL 到 100 mL 容量瓶中,用进样清洗液定容。则得到 5、10、15、20、25 mg/L 氮的标准溶液。

1.3.3 仪器参数设置 进样速率为 50 个样品/h;

进样时间与清洗时间比为 2 : 1,即进样 48 s,清洗 24 s。

1.3.4 回收率测定 回收率的测定采用标准加入法。将同一干燥样品分别称取 2 份 0.200 0 g,其中 1 份加入已知氮浓度的硫酸铵标准液,相同条件下进行前处理,分别得到样品氮浓度和检测氮浓度。回收率计算公式:

氮回收率 = (检测氮浓度 - 样品氮浓度) / 加标氮浓度 × 100%。

2 结果与分析

2.1 不同消解硫酸用量下 AA3 流动分析仪的测定参数

针对消解样品时不同的硫酸用量,以最终反应

条件 pH 值为 13 为标准,对缓冲液中 NaOH 的量进行调整,不同硫酸用量下 AA3 流动分析仪的测定参数见表 1。随着 H₂SO₄ 用量的增大,NaOH 用量相应增大,以此将样品背景中过量的硫酸中和,使最终的反应 pH 值保持在 13 左右。3 种不同硫酸用量的标线参数见图 2,经过 NaOH 用量的调整,3 种不同的硫酸用量消解样品,AA3 流动分析仪所测定的标线呈良好的线性,相关系数均达到 0.999 6 以上。同时,由表 1 可知,3 种情况的增益均为 10,增益即 AA3 流动分析仪测定浓度时软件对检测信号的放大倍数,与显色反应的灵敏度相关。当标液最高浓度一致且增益相同,说明 3 种情况下铵离子显色反应的灵敏度没有显著差异。

表 1 不同硫酸用量下 AA3 流动分析仪的测定参数

硫酸用量 (mL)	缓冲液 NaOH 用量 (g)	线性方程	标线相关系数	增益
5	32	$y = 2.9697x + 0.0943$	0.9997	10
8	38	$y = 2.9905x + 0.0919$	0.9998	10
10	45	$y = 2.9954x + 0.1705$	0.9996	10

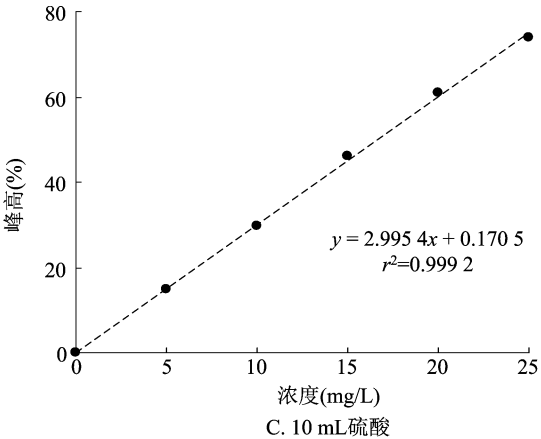
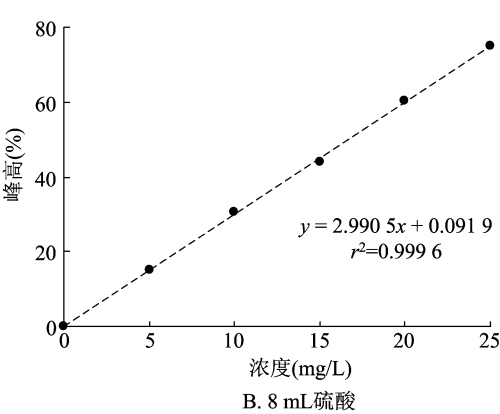
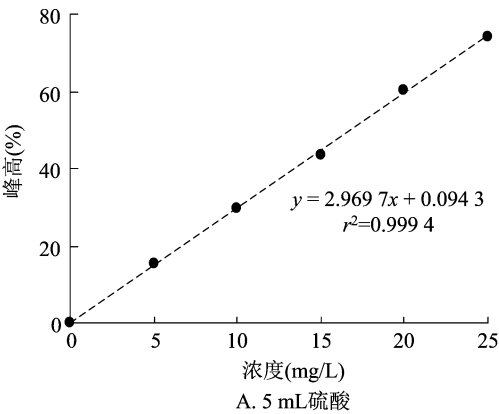


图2 3 种不同硫酸用量的标线参数

2.2 连续流动分析仪准确度与精密度分析

将编号为 1、2 的 2 个水稻植株样品消煮液分别进行 5 次全氮测定。AA3 流动分析仪测定水稻植株全氮含量重复性试验结果见表 2。标准偏差在 0.07 ~ 0.15 g/kg 之间;相对标准偏差在 0.72 ~ 0.99% 之间,均小于 1%。水稻植株全氮含量的 5 次测量结果重复性较好。而且,样品 1、2 被不同硫

酸用量消解后,经仪器检测,其结果无显著差异。
用标准加入法测定回收率。每个不同的硫酸用量处理分别取 3 个已知浓度的样品消解液,分别加入 5、10、15 mg/L 的硫酸铵标准溶液,AA3 流动分析仪回收率测定结果见表 3。由表 3 可知,从低到高的原始氮浓度样品,在 3 种不同硫酸用量下,加标回收率均在 95.40% ~ 104.20% 之间。

表 2 AA3 流动分析仪测定水稻植株全氮含量重复性试验

样品号	硫酸用量 (mL)	全氮含量 (g/kg)	平均值 (g/kg)	标准偏差 (g/kg)	相对标准偏差 (%)
1	5	15.23、15.15、15.49、15.31、15.11	15.26	0.13	0.88
2	5	8.12、8.25、8.18、8.14、8.29	8.20	0.07	0.88
1	8	15.33、15.16、15.4、15.21、15.15	15.25	0.11	0.72
2	8	8.18、8.27、8.15、8.30、8.34	8.25	0.08	0.98
1	10	15.26、15.13、15.39、15.35、15.09	15.24	0.13	0.86
2	10	8.14、8.28、8.21、8.25、8.36	8.25	0.08	0.99

表 3 AA3 流动分析仪回收率测定结果

硫酸用量 (mL)	样品原始氮浓度 (mg/L)	加标氮浓度 (mg/L)	测得加标后氮浓度 (mg/L)	回收率 (%)
5	20.24	5	25.16	98.40
5	17.01	10	26.95	99.40
5	5.70	15	20.33	97.53
8	19.16	5	24.37	104.20
8	12.93	10	23.12	101.90
8	7.13	15	22.02	99.27
10	18.28	5	23.05	95.40
10	11.18	10	21.31	101.30
10	4.90	15	19.78	99.20

3 讨论与结论

3.1 AA3 流动分析仪与其他仪器比较

AA3 流动分析仪采用的是水杨酸钠和次氯酸钠与铵离子产生有色化合物并在特定波段下进行比色的原理。这种方法与一般自动凯氏定氮仪的滴定原理不同。本研究并未与其他仪器进行测定比较,但目前已经有研究表明流动分析仪与自动凯氏定氮仪所测样品含量无显著差异^[6],这 2 种方法优缺点比较明显。常见的全自动凯氏定氮仪通过预设程序控制蒸馏和滴定等过程,每个样品测定时间 5 ~ 10 min,每样品消耗试剂 20 ~ 30 mL。AA3 流动分析仪测定速率可设定为 50 个/h,每样品试剂消耗为 5 ~ 8 mL,因此 AA3 流动分析仪具有更高效、更

低成本的优势。

3.2 AA3 流动分析仪测定参数设置

AA3 流动分析仪测定参数有很多,最主要的包括进样速率、进样清洗比(单位进样周期内进样针吸样时间和吸清洗液时间的比值)和平滑。仪器所带方法中给定的进样速率为 60 个样品/h,进样清洗比为 3 : 1。但是在实际操作中,由于中外药品纯度差异等因素,直接采用方法给定的参数并不能带来良好的测定效果。进样速率和进样清洗比值不宜过高,否则会导致样品间相互干扰,造成样品出峰异常,根据经验,本研究采用的进样速率为 50 个样品/h,进样时间与清洗时间比为 2 : 1。平滑的概念是对应的连续数据点数的平均值,一般平滑设置为 16 或 30,它可以有效消除峰值噪音带来的数据波

动。因此适宜的参数既能保证较高的检测速度,也能保证检测准确性。

3.3 针对不同氮含量待测液的管路调整

由于样品氮含量差异较大,而且方法中原管路测试范围是 0~25 mg/L。当待测液及标液氮含量超出范围,反应显色会较深,影响标线的线性,进而影响结果的准确性。

因此,需要对管路进行相应的调整,使测试范围扩大。调整内容:将原来的进样泵管用更细型号泵管代替。这样减少了待测液的进量,当试剂进量不变的情况下,检测浓度就能够提升。原来进样泵管为 blk/blk 型号,流速为 0.32 mL/min,检测范围是 0~25 mg/L,当换成 orn/wht 泵管(0.23 mL/min)或 orn/gre(0.1 mL/min)泵管时,检测范围分别扩大到 0~50 mg/L、0~75 mg/L。

3.4 试剂用量的估算

AA3 流动分析仪测定酸消解凯氏氮的试剂都有一定的保质期,比如次氯酸钠溶液需要现配现用,水杨酸钠溶液保质期为 1 周。为避免试剂配制过少不够用或配制过多造成浪费,可以根据泵管流速对试剂用量进行估算。公式如下:

试剂用量 = 样品数量 ÷ 进样速率 × 泵管流速。

每种型号的泵管都对应固定的流速,测定酸消解凯氏氮常用泵管包括: blu/blu (1.60 mL/min)、red/red (0.80 mL/min)、blk/blk (0.32 mL/min)、orn/wht(0.23 mL/min)。若测 200 个样品,进样速率为 50 个样品/h,可推算需配制缓冲液 384 mL,次氯酸钠 76.8 mL,水杨酸钠 76.8 mL。但是考虑到前期运行试剂基线以及突发事件,需要在此基础上再预留 1~2 h 的试剂用量,因此测定 200 个样品所需试剂用量分别为 500、100、100 mL。

AA3 流动分析仪测定植株全氮时,根据样品前处理的硫酸用量不同,须要对试剂中缓冲液的 NaOH 浓度进行调整,从而达到检测 pH 值为 13。调整后测定的标线相关系数均在 0.999 6 以上;不同硫酸用量处理下,相同样品检测结果无明显差异;检测的回收率均在 95.40%~104.2% 之间;在检测过程中,不同的调整都能够达到良好的重复

性,重复 5 次的相对标准偏差均小于 1%。因此,针对不同的硫酸用量消解方法,本研究基于 AA3 流动分析仪对检测植株全氮含量的方法进行改进,最终满足检测需求。对比自动凯氏定氮仪,具有更高效率及低试剂消耗的 AA3 流动分析仪能够成为实验室分析的更优选择,同时本研究介绍了扩大测试范围和试剂用量估算方法,为更有效测定提供一些经验。

参考文献:

- [1] van Keulen H. Graphical analysis of annual crop response to fertiliser application[J]. *Agricultural Systems*, 1982, 9(2): 113–126.
- [2] Girma K, Holtz S, Tubaña B, et al. Nitrogen accumulation in shoots as a function of growth stage of crop and winter wheat[J]. *Journal of Plant Nutrition*, 2011, 34(2): 165–182.
- [3] 曹小闯, 李烨锋, 吴龙龙, 等. 氨基酸水溶肥施用模式对水稻氮素吸收和转运的影响[J]. *江苏农业学报*, 2020, 36(4): 888–895.
- [4] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2000.
- [5] Sáez – Plaza P, Michałowski T, Navas M J, et al. An overview of the Kjeldahl method of nitrogen determination. Part I. Early history, chemistry of the procedure, and titrimetric finish [J]. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2013, 43(4): 178–223.
- [6] 温云杰, 李桂花, 黄金莉, 等. 连续流动分析仪与自动凯氏定氮仪测定小麦秸秆全氮含量之比较[J]. *中国土壤与肥料*, 2015(6): 146–151.
- [7] 武娟, 章明洪. 用 AA3 型连续流动分析仪测定复混肥料中氨态氮的方法研究[J]. *化肥工业*, 2008, 35(3): 27–31.
- [8] 贝美容, 罗雪华, 杨红竹. AA3 型连续流动分析仪(CFA)同时测定橡胶叶全氮、全磷、全钾的方法研究[J]. *热带作物学报*, 2011, 32(7): 1258–1264.
- [9] 张英利, 许安民, 尚浩博, 等. AA3 型连续流动分析仪测定土壤和植物全氮的方法研究[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2006, 34(10): 128–132.
- [10] 张丽萍, 王久荣, 袁红朝, 等. 植物全氮的 AA3 型流动分析仪测定方法研究[J]. *湖南农业科学*, 2016(10): 83–86.
- [11] 姜密. 空气隔断连续流动分析法简述[J]. *磷肥与复肥*, 1999(4): 63–64, 80.
- [12] Owusu – Apenten R K. Kjeldahl method, quantitative amino acid analysis and combustion analysis [M]//Protein Analysis. Boca Raton: CRC Press, 2002: 1–45.