doi: 10.11838/sfsc.20150624

## 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

温云杰1,李桂花1,黄金莉2,刘云霞1,高 翔3,汪 洪1\*

- (1. 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所/耕地培育技术国家工程实验室/农业部植物营养与肥料重点实验室,北京 100081; 2. 中通科技发展有限公司,北京 100088;
  - 3. 安徽农业大学资源与环境学院,安徽 合肥 230036)

摘 要: 凯氏定氮法是测定植株全氮含量的经典方法,但费时费力。选择 24 个小麦秸秆样品,用浓  $H_2SO_4-H_2O_2$ 消煮,分别利用连续流动分析仪与全自动凯氏定氮仪测定消煮液中氮含量,比较了两种方法测定结果,探讨利用连续流动分析仪测定植株样品全氮含量的可行性。结果表明:两种仪器测定的小麦秸秆中全氮含量无明显差异,彼此间呈显著线性相关,回归直线方程为 Y (连续流动分析仪 -N) = 0.892X (凯氏蒸馏滴定 -N) + 0.753,相关系数 r=0.942 1 (n=24, P<0.01)。连续流动分析仪测定的回收率在  $96.6\%\sim102.3\%$  之间,对 5 个样品消煮液中氮浓度分别重复测定 5 次,相对标准偏差在 5% 以下。连续流动分析仪分析速度快,消耗试剂少,可用于大批量  $H_2SO_4-H_2O_2$ 消煮的植株样品中全氮含量分析。研究结果为采用连续流动分析仪测定植株全氮含量提供了技术依据。

关键词:连续流动分析仪;自动凯氏定氮仪;植物全氮

中图分类号: S151.9<sup>+</sup>5 文献标识码: A 文章编号: 1673-6257 (2015) 06-0146-06

氮是植物必需的营养元素,是植物体内蛋白质、核酸、磷脂的主要成分,是细胞原生质的重要成分,氮还是植物激素及叶绿素等的成分,氮在植物的生命活动中占有重要的地位,被称为植物的生命元素[1]。研究土壤与植物氮素营养诊断、植物氮素吸收利用以及作物氮肥施用效应,都需要测定植株样品中全氮含量。

植物全氮的测定通常采用凯氏法,包括植物样品消煮和待测液中铵盐定量分析两过程,即用硫酸 – 混合加速剂或氧化剂消煮分解样品中含氮化合物,使其转化为硫酸铵。消煮液中铵盐定量分析方法有蒸馏滴定法、扩散法和比色法[2-4]。蒸馏滴定法为常用标准方法,即向消煮液中加入过量氢氧化钠,将铵盐转化成氨,在加热状态下

收稿日期: 2014-11-30; 最后修订日期: 2015-01-08

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (2013CB127402); 中央级公益性科研院所专项资金资助项目 (IARRP-2014-39)。

作者简介: 温云杰 (1989 - ), 男, 山西大同人, 硕士研究生, 主要从事土壤氮磷循环与测试技术研究工作。E - mail: 573834764 @ qq. com。

通讯作者: 汪洪, E-mail: wanghong01@ caas. cn。

氨随蒸馏水蒸气馏出,吸收于过量的硼酸溶液中,酸标准溶液滴定,从而得到样品中全氮含量。自动凯氏定氮仪通过程序化实现样品消煮、蒸馏、滴定等过程自动化控制<sup>[5-6]</sup>。

消煮液中铵测定还可采用比色法,如铵离子与纳氏试剂反应,生成黄色物质,在420 nm 波长下比色测定。另外还有次氯酸 - 水杨酸比色法:碱性条件 (pH值13.0左右)下铵和次氯酸根反应生成氯胺,用硝普钠催化,氯胺与水杨酸反应形成蓝绿色化合物,在波长660 nm 处比色测定<sup>[2,6-7]</sup>。

连续流动分析仪利用次氯酸 - 水杨酸比色法原理测定液体样品中铵<sup>[4,8]</sup>,将复杂的手工操作简化成仪器的自动化检测,连续测试批量样品,分析速度快,广泛应用于土壤、肥料、水环境、烟草等行业<sup>[9-10]</sup>。图 1 为连续流动化学分析仪构成图,主要由自动进样器、蠕动泵、化学分析模块、比色计和数据处理系统组成。通过预设程序,按顺序将样品和试剂定量注入到化学反应模块中,同时均匀注入空气气泡,将每一个样品分割。样品和试剂混合,经过透析器被过滤和稀释后,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<sup>[11]</sup>。张英利等研究利用 AA3 型连续流

动分析仪测定土壤和植物全氮,平均回收率为97.8%~102.3%,土壤和植物待测液中 $NH_4^+-N$ 的检出限分别为0.0337和0.0165mg/ $L^{[12]}$ 。贝美

容等通过改进 AA3 型连续流动分析仪所附试剂配制方法,实现对橡胶叶片  $H_2SO_4 - H_2O_2$ 消煮液中的氮、磷、钾含量同时测定[13]。

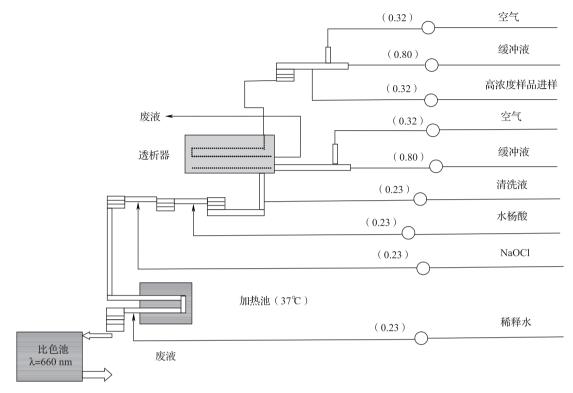


图 1 连续流动分析仪 MT7 模块测定 NH<sub>4</sub> + - N 原理流路图

注:括号里数字单位为 mL/min

本实验室现有连续流动分析仪和自动凯氏定氮仪各一台,两种仪器测定植株氮的结果可比性如何尚不甚清楚。选择 24 个小麦秸秆样品,利用浓硫酸 - 双氧水消煮,采用上述两种仪器测定消煮液中氮含量,比较两种方法测定结果,为采用连续流动分析仪测定植株全氮含量提供技术依据。

#### 1 材料与方法

#### 1.1 样品

小麦秸秆样品采自山东省聊城市高唐县,样品烘干后粉碎,过0.50 mm 筛。

#### 1.2 样品消煮

参照鲁如坤<sup>[2]</sup>的方法,称取 0.25 g (精确至 0.000 1 g) 干燥样品,送入消煮管中,加入 5 mL 浓硫酸,摇动使硫酸与样品混匀,静置过夜,第二天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 300℃,瓶内硫酸开始冒白烟后 15 min,取下消煮管,稍冷却,滴加 30% 过氧化氢,不断摇动消煮管,继续加热

15~20 min,如瓶内溶液仍有黑色或棕黄色,则在消煮管稍冷后,再滴加过氧化氢,随后再加热,如此反复处理3~5次,直至瓶内溶液完全清亮无色为止。然后再加热 10 min,除去过量过氧化氢。消煮完毕后,冷却,消煮液用去离子水定容至 100 mL。

#### 1.3 自动凯氏定氮仪测定消煮液中氮含量

#### 1.3.1 仪器

自动凯氏定氮仪的蒸馏仪型号: KjelFlexK - 360, 配置自动滴定仪型号: DL15, 滴定管体积 20 mL, 分辨率 1/10 000, 电极 DG115 - SC, 电位分辨率 0.1 mV。

#### 1.3.2 蒸馏滴定操作

准确吸取 20.00 mL 消煮液转移至自动定氮仪 专用蒸馏管中,打开自动凯氏定氮仪和配套的自动滴定仪开关,打开冷凝用自来水阀,将滴定仪上 pH 电极插入定氮仪接收瓶中。选择仪器"预先准备程序",进行样品测定方法编辑,设定主要参数:加入 40% 氢氧化钠溶液 30 mL、20 g/L 硼酸接收液 (pH 值 4.65) 20 mL、蒸汽力度 100%、反应时间

5 s、蒸馏时间 250 s、蒸馏结束后自动启动滴定, 编辑完毕后保存,按定氮仪上启动开始键,开始自 动蒸馏滴定。仪器测定之前,选择"清洗程序", 安装干净的空样品管,清洗仪器 3 次,仪器空白值 相差 < 0.05 mL 开始测定。

#### 1.4 连续流动分析仪测定消煮液中氮

#### 1.4.1 仪器

连续流动分析仪,配置有MT7化学模块、操作软件AACE。

#### 1.4.2 操作步骤与分析条件

1.4.2.1 试剂配制 (1)缓冲液:溶解35.8g磷酸氢二钠、32g氢氧化钠和50g酒石酸钾钠至600mL水中,稀释至1L,磷酸氢二钠-氢氧化钠-酒石酸钾钠缓冲体系pKa=12.32;缓冲pH值范围11.32~13.32。混合均匀后加入2mL30%聚乙烯月桂醇醚(Brij-35,一种非离子型去污剂)溶液。(2)水杨酸钠溶液:40g水杨酸钠溶于600mL蒸馏水,加入1g硝普钠,稀释至1000mL。溶液混匀。(3)次氯酸钠溶液:加入3mL次氯酸钠溶液至60mL水中。稀释至100mL,混合均匀。(4)清洗液:4%H2SO4溶液。

1.4.2.2 测定参数设置 选择防酸进样针和高浓度进样管,设置进样速率 50 个样/h,进样与清洗时间比为 2:1,进样时间 48 s,清洗时间 24 s。仪器默认设置基线和漂移校正,自动基线参比为 5%;比色滤光片波长为 660 nm,灯强度大于 1 000 mV。样品消煮液中含氮量在连续流动分析仪线性测量范围 (<30 mg/L)内,无需稀释。

1.4.2.3 标准曲线制作 用硫酸铵配制浓度 1 000 mg/L 的标准贮液,测定时配制浓度为 0、5、10、15、20、30 mg/L 的  $NH_4^+$ - N 标准系列,按照上述条件进行测定,仪器测定峰高与标准溶液  $NH_4^+$ - N 浓度之间进行线性回归,制作校准曲线如图 2 所示,相关系数 R=0.999~6。

1.4.2.4 方法回收率测定 采用标准加入法,分别称取两份0.25 g (精确至0.000 1 g) 干燥小麦秸秆样品,送入消煮管中,在其中一份加入已知氮浓度的 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>标准液,按照1.2 设定条件进行消煮,利用连续流动分析仪测消煮液氮浓度,分别得到样品氮浓度和检测氮浓度,计算仪器测定的氮回收率。氮回收率(%) = (检测氮浓度 – 样品氮浓度) ×100/加标氮浓度。

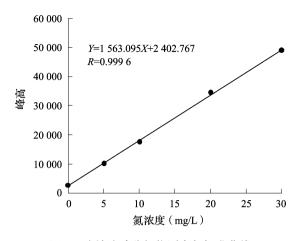


图 2 连续流动分析仪测定氮标准曲线

#### 1.5 统计分析

将24个样品消煮液,分别用连续流动分析仪和自动凯氏定氮仪测定,两种方法测定干燥小麦秸秆样品氮浓度数据间差异显著性采用 Excel 软件中分析工具库 t - 检验,进行成对双样本均值分析,测定数据之间进行相关分析,利用直线方程进行回归,并统计分析相关系数的显著性。

连续流动分析仪测定干燥小麦秸秆氮含量重复性实验选择 5 个小麦秸秆样品消煮液,每个消煮液重复测定 5 次。测量值  $X_i$ 的算术平均值为样品全氮估计值,标准偏差用贝塞尔公式计算[14-15],即:

$$S(x) = \left[\frac{1}{n-1}\sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2\right] \quad n = 5_{\circ}$$

相对标准偏差 (RSD) = 标准偏差/计算结果 算术平均值×100%。

#### 2 结果与分析

#### 2.1 小麦秸秆全氮含量

图 3 列出了连续流动分析仪和自动凯氏定氮仪对小麦秸秆全氮的测定结果。两种仪器测定的 24个小麦秸秆全氮含量范围分别为 6.19~8.87 g/kg和 6.08~9.12 g/kg,平均值分别为 7.68 g/kg和 7.60 g/kg。两种方法的测定结果无显著差异,t 检验的双尾 P 值为 0.195 (表 2)。

将连续流动分析仪和自动凯式定氮仪对 24 个小麦秸秆样品全氮含量测定结果进行相关性分析(图 4),两种方法测定结果呈极显著的线性相关,相关系数 R=0.942~0~(n=24,~P<0.01)。两种方法测定数据之间回归直线方程为 Y(连续流动分析仪 -N) =0.892X(凯氏蒸馏滴定 -N) +0.753。

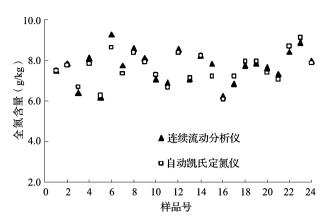


图 3 连续流动分析仪和自动凯氏定氮仪 测定小麦秸秆全氮含量结果比较

表 2 小麦秸秆全氮含量结果 t 检验 (成对双样本均值分析)

	连续流动分析仪	自动凯氏定氮仪
全氮含量平均值 (g/kg)	7. 68 7. 60	
方差	0. 65 0. 58	
样品数	24	24
泊松相关系数	0. 942 0	
假设平均差	0	
df	23	
t 值	1. 334	
$P(T \leqslant t)$ 单尾	0.098	
t 单尾临界	1.714	
$P(T \leq t)$ 双尾	0. 195	
t 双尾临界	2. 069	

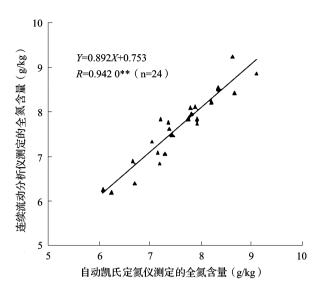


图 4 连续流动分析仪和自动凯氏定氮仪测定 小麦秸秆全氮含量结果间相关分析

### 2.2 连续流动分析仪测定结果准确度与精密度 分析

用标准加入法做回收率测定,选择 3 份小麦秸杆样品,分别添加 3、4 和 5 mg/L 标准硫酸铵溶液,消煮后,利用连续流动分析仪测定 3 次。结果表明连续流动分析仪测定的氮回收率为 96.6% ~102.3% (表 3)。

在相同测量条件下,利用连续流动分析仪对 5 个样品消煮液中全氮含量分别进行了 5 次测量, 小麦秸杆全氮含量结果的重复性较好,相对偏差 在1.96%~3.38%范围内,均小于 5% (表 4)。

表 3 连续流动分析仪测定氮回收率实验

样品 N 浓度 (mg/L)	加标 N 浓度 (mg/L)	检测 N 浓度值 (mg/L)	平均值 (mg/L)	标准回收率(%)
31. 27	3. 00	34. 54 34. 41 34. 08	34. 34	102. 3
8. 62	4. 00	12. 74 12. 61 12. 77	12. 71	102. 3
8. 78	5. 00	13. 56 13. 60 13. 67	13. 61	96. 6

表 4 连续流动分析仪测定小麦秸秆全氮含量重复性实验

样品号	小麦秸杆全氮含量(g/kg)	平均值 (g/kg)	标准偏差 (g/kg)	相对标准偏差(%)
3	7.37 7.45 7.37 7.31 7.76	7.45	0. 18	2. 41
9	8.72 8.12 8.10 8.09 8.11	8. 23	0. 28	3. 38
16	6. 29 6. 56 6. 37 6. 51 6. 26	6. 40	0. 13	2. 04
19	7.89 7.79 7.74 7.55 7.85	7. 69	0. 15	1. 96
24	7.51 7.77 7.96 7.66 7.96	7.77	0. 20	2. 54

#### 3 讨论

#### 3.1 连续流动分析仪测定显色反应 pH 值

连续流动分析仪测定氮原理是基于次氯酸 - 水杨酸显色法,即在碱性条件和硝普钠作催化剂下,植株样品消煮液中铵盐与水杨酸钠和次氯酸钠反应生成蓝绿色化合物,该显色反应适宜 pH 值为 13.0 左右,为确保此 pH 值,需要根据待测液酸度预先确定缓冲溶液中氢氧化钠用量。

本实验中,消煮时加入 5 mL 浓硫酸,消煮液最后定容至 100 mL,因此消煮液中硫酸体积分数 5%,按照其浓度 c (  $H_2$  SO<sub>4</sub> ) 18 mol/L 计算,100 mL消煮液中 c (  $H_2$  SO<sub>4</sub> ) 为 0.9 mol/L,即 [  $H^+$  ] 浓度 1.8 mmol/mL。根据图 1 原理流路,在透析器前样品管流速 0.32 mL/min,进样时间 48 s,每个消煮液样品进样体积为 0.256 mL, [  $H^+$  ] 含量 = 1.8 mmol/mL × 0.256 mL = 0.460 8 mmol;若不计算缓冲范围,仅以每升缓冲液中加 32 g NaOH 计算,c ( NaOH ) 为 0.8 mmol/mL,缓冲液进量流速为 0.8 mL/min,[  $OH^-$  ] 含量 = 0.8 mmol/mL × 0.8 mL = 0.64 mmol,消煮液样品与缓冲液混合后体积 1.056 mL,这样最终 [  $OH^-$  ] 浓度约 0.169 7 mmol/mL,pH = 14 - lg [  $OH^-$  ],约等于 13.2。

透析器下层加入 4% 硫酸清洗液,该处管流速 0.23 mL/min,每次样品进样时硫酸清洗液进样体积 为 0.256 mL, [H<sup>+</sup>] 含量 = 1.8 mmol/mL × 0.23 mL = 0.414 mmol; 此处缓冲液流速为 0.8 mL/min, [OH<sup>-</sup>] 含量 = 0.8 mmol/mL × 0.8 mL = 0.64 mmol, 清洗液与缓冲液混合体积 1.03 mL,混合后 OH<sup>-</sup>浓度约 0.219 mmol/mL,pH = 14 - lg [OH<sup>-</sup>],约等于 13.3。整个流程下来保证了显色反应 pH 值在 13.0 左右,满足显色要求。如消煮时加入硫酸体积有变,可根据待测液的硫酸浓度计算确定缓冲液中氢氧化钠量。

#### 3.2 两种仪器使用比较

凯氏定氮法是测定植株全氮含量的经典方法。本文用连续流动分析仪测定小麦秸株消煮液中全氮含量,两种方法对比,二者的测定结果无明显差异,可用线性回归方程模拟,为Y(连续流动分析仪-N)= 0.892X(凯氏蒸馏滴定-N)+ 0.753,相关系数为 0.942 0(n = 24,P < 0.01),比较两种方法,优缺点明显。

本研究所用自动凯氏定氮仪由预设的程序控

制蒸馏与滴定过程,可以避免带来的人为误差,省力,但每个样品消煮液转移、蒸馏、滴定过程测定时间约6 min,按照7 h/d 测定工作时间计算,每天约测定70个样品,还不包括酸标准滴定溶液与硼酸接收液配制与标定时间。测定过程中每个样品约消耗20~30 mL40%氢氧化钠。

连续流动分析仪依据是水杨酸比色法测定消煮 液中铵含量,通过预定的仪器程序操作,样品待测 液在设定的一致条件(进样速度、显色时间、显色 温度、清洗比)下反应,减小了人为操作误差,比 色后检测器将信号传入电脑, 最后通过软件进行数 据处理、无需烦琐的手工比色过程、分析人员只需 配制显色试剂、编辑测定程序、整理结果报告[7]。 贝美容等计算:用于配制标准溶液及各种试剂时间 为4h, 用于仪器预热及样品消化液的稀释时间为 3 h, 每小时测定 50 个样品, 13 h (相当于 1.5 d 时间)内可测定300个样品消煮液中全氮含量, 这种方法高效、省力;至于试剂消耗,根据图1 连续流动分析仪原理,每分钟两次输入缓冲液 1.6 mL, 水杨酸钠和次氯酸钠的用量 0.23 mL[13]。张英利等计算每测定 100 个样品,消耗缓 冲溶液约 160 mL, 水杨酸钠、次氯酸钠的用量分 别为25 mL, 比常规比色法消耗的试剂量明显减 少[12]。因此连续流动分析仪测定植株全氮时,省 试剂、污染小,同时减小了因条件差异和手工操 作产生的误差。

#### 4 结论

与自动凯氏定氮仪相比,连续流动分析仪测定的小麦秸秆中全氮含量无明显差异,相对标准偏差在5%以下,且该方法测定回收率在96.6%~102.3%之间。鉴于连续流动分析仪分析速度快,消耗试剂少的优点,适于大批量浓硫酸-双氧水消煮的植株样品中全氮含量分析。

#### 参考文献:

- [1] 陆景陵. 植物营养学 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2003. 23-25.
- [2] 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, 2000. 263-264.
- [3] Muñoz Huerta R F, Guevara Gonzalez R G, Ocampo Velazquez R V. A review of methods for sensing the nitrogen status in plants: Advantages, disadvantages and recent advances

- [J]. Sensors, 2013, 13 (8): 10823 10843.
- [4] Sáez Plaza P, Michalowski T, Wybraniec S. An overview of the Kjeldahl method of nitrogen determination. Part I. Early history, chemistry of the procedure, and titrimetric finish [J]. Crit. Rev. Anal. Chem, 2013, 43 (4): 178-223.
- [5] McLeod S. Determination of total soil and plant nitrogen using a micro – distillation unit in a continuous flow analyzer [J]. Anal. Chim. Acta, 1992, 266; 113-117.
- [6] Sáez Plaza P, Navas M J, Asuero A G. An overview of the Kjeldahl method on nitrogen determination. Part II. Sampling preparation, working scale, instrumental finish, and quality control [J]. Crit. Rev. Anal. Chem, 2013, 43 (4): 224-272
- [7] Pansu M, Gautheyrou J. Handbook of soil analysis: Mineralogical, organic and inorganic methods [M]. Berlin: Springer Verlag, 2006. 143 147.
- [8] Khan M A, Flower T H. Elimination of interferences of organic nitrogen compounds by dialysis inclusion with technicon autoanalyzer II in ammonium - N determination [J]. Pak. J. Biol.

- Sci., 1999, 2 (3): 834 837.
- [9] Coakley W A. Handbook of automated analysis: continuous flow techniques [M]. New York: Marcel Dekker, Inc., 1981.
- [10] McLeod S. Determination of total soil and plant nitrogen using a micro distillation unit in a continuous flow analyzer [J]. Anal. Chim. Acta, 1992, 266: 113-117.
- [11] Owusu Apenten R K. Kjeldahl method, quantitative aminoacid analysis and combustion analysis [A]. In: Food protein analysis: quantitative effects on processing [M]. New York: Marcel Dekker, 2002, 1-45.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] GB/T 27411 2012. 检测实验室中常用不确定度评定方法 [S].
- [15] JJF1059.1-2012. 测量不确定度评定与表示[S].

# Determination nitrogen in the Kjeldahl digests of plant samples by continuous flow analyzer in comparison with automated distillation-titration instrument

WEN Yun-jie<sup>1</sup>, LI Gui-hua<sup>1</sup>, HUANG Jin-li<sup>2</sup>, LIU Yun-xia<sup>1</sup>, GAO Xiang<sup>3</sup>, WANG Hong<sup>1</sup>\* (1. Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences/National Engineering Laboratory for Improving Quality of Arable Land / Key Laboratory of Plant Nutrition and Fertilizer, Ministry of Agriculture, Beijing 100081; 2. Zhongtong Science and Technnology Development Company Limited, Beijing 100088; 3. College of Resource and Environment, Anhui Agricultural University, Hefei Anhui 230036)

**Abstract**: Kjeldahl distillation-titration has been used as a reference method for N determination in plants, but it is time consuming. This article aimed at establishing a time saving method for determining of plant N concentrations by continuous flow analyzer (CFA). Twenty four of wheat plant samples were selected and digested with  $H_2 \, SO_4$ - $H_2 \, O_2$ . N contents in the digests were determined by CFA and an automated Kjeldahl distillation-titration (AKDT) instrument, respectively. The test showed that there was no any significant difference of the plant N contents measured by the CFA and the AKDT method. A linear relationship best described the measured N values generated by both methods: CFA-N=0.892 AKDT-N+0.753. The Pearson's correlation coefficient was 0.942 1 with a significance level (n=24, P<0.01). The CFA method for plant N measurement had a high precision with relative standard deviation less than 5%. The standard recovery rate of feed samples with addition of ( $NH_4$ )  $_2SO_4$  was  $96.6\% \sim 102.3\%$ . It suggested that the CFA based on colorimetric detection of the pure ammonium chloride distillate (Berthelot reaction) could be used to determinate N in the Kjeldahl digests of plant samples. The CFA method was labor saving and could handle large numbers of samples. The human error in mixing and other operations was reduced to a great extent.

Key words: continuous flow analyzer; automated Kjeldahl distillation-titration; plant nitrogen