

^{15}N 示踪-离子质谱法测定新生产力的研究*

焦念志 王荣

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

黄庆文

(北京信通科学仪器公司, 100080)

提要 本文提出了 ^{15}N 示踪-离子质谱法实测新生产力的方法, 并于 1991 年 11 月—1992 年 5 月结合胶州湾现场调查的实际样品, 对示踪剂量、培养时间、样品贮存、消解剂量和时间、铵离子的扩散吸收, 以及方法的空白值、检出限、精密度和准确度等进行了实验研究。结果表明, 该法具有较高的精密度和良好的准确度, 与经典的气体质谱法相比, 还具有进样量少以及可同时分析 ^{15}N 丰度、总氮浓度和水中铵离子浓度等特点, 对于含氮量极低、铵氮再生迅速的海洋环境中新生产力的研究, 具有特殊的意义。

关键词 氮吸收 同位素 质谱 新生产力

新生产力, 作为了解生源要素生物地球化学循环过程, 和了解海洋对大气 CO_2 进而对全球气候调节能力的重要手段而被纳入一些重大的国际性研究计划, 如 JGOFS (全球海洋通量联合研究), 并将在全球范围内展开研究。新生产力的研究方法有多种, 但大多数是间接估计法 (Eppley, 1989)。迄今应用最多, 也是最基本的实测方法是同位素示踪法。这方面国外已有不少工作 (Harrison, 1983; Dugdale 等, 1986), 但目前仍未形成统一的规范方法。在国内, 这方面研究尚属空白。本文提出了 ^{15}N 示踪-离子质谱法, 开辟了新生产力测定的一条新途径。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 离子质谱法 ^{15}N 测定的仪器为北京信通科学仪器公司研制的 ST-IMS 88 型离子质谱计 (黄庆文等, 1989)。消解仪器为 JK-1 型远红外消煮炉。

示踪剂: K^{15}NO_3 丰度为 94.55%, $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 丰度为 95.26%。氧化剂: AR 级浓 H_2SO_4 。增温剂: AR 级 K_2SO_4 。催化剂: AR 级 $\text{CuSO}_4 \cdot \text{Se}$ 。加速剂: 按 $\text{K}_2\text{SO}_4:\text{CuSO}_4:\text{Se} = 200:20:1$ 比例配成。扩散剂: AR 级 NaOH (10 mol/L)。吸收剂: GR 级 HCl (0.6 mol/L)。

1.2 采样与培养 浮游生物样品, 于 1991 年 11 月和 1992 年 2 月、5 月采自胶州湾中心 5 号站。水样用 200 μm 筛绢过滤以除去大型浮游动物的干扰。每样 1000 ml, 于甲板上流水控温模拟现场培养。

* 中国科学院海洋研究所研究报告第 2138 号。国家自然科学基金委资助项目, 39200022 号。

本研究在样品前处理试验中曾得到南春波副研究员和彭根元副教授的支持和帮助, 均此一并表示衷心谢忱。

收稿日期: 1992 年 7 月 21 日; 接受日期: 1992 年 9 月 18 日。

1.3 样品贮存 用 450—500℃ 下经 5—6h 灼烧过的 Whatman GF/F 滤膜在不高于 0.03MPa 的负压下抽滤, 取两组膜样品分别于 -20℃ 下贮存和在 60℃ 下干燥 48h 后密闭贮存。

1.4 消解 采用 Kjeldahl 法消解, 将有机氮转化为 NH_4^+ 态氮。

1.5 NH_4^+ 的扩散吸收 将消解液定容, 取适量于小型 Conway 皿之外槽, 将盛有 300—400 μl 的吸收剂的小表面皿置于 Conway 皿之中心。在消解液中加入 8—10ml 扩散剂, 混匀后在 40℃ 下扩散吸收 12h。

1.6 ^{15}N 丰度、氮浓度测定 经扩散吸收提纯的样品, 再经低温风干浓缩至 15—25 μl , 取 1—2 μl 于样品靶上, 低温风干后进样测定 ^{15}N 丰度。 NH_4^+ 浓度、总氮浓度可由同位素稀释法同时测得。

1.7 新生产力的计算 分别测得新生氮源(主要是 NO_3^- -N)和再生氮源(主要是 NH_4^+ -N)现场培养前后水中和颗粒态氮的 ^{15}N 丰度和氮浓度, 按照 Collos (1987) 的(8')式或 Blackburn-Caperon 模型¹⁾ (Laws, 1984) 求得两种氮源的吸收率 $V_{\text{新生}}$ 和 $V_{\text{再生}}$, $V_{\text{新生}}$ 与 $(V_{\text{新生}} + V_{\text{再生}})$ 之比即为 f 比, f 比与初级生产力之积即为新生产力。

2 结果及分析

2.1 示踪剂量 由图 1 可见, 浮游植物对 NO_3^- , NH_4^+ 的吸收遵循 Michaelis-Menten 动力学方程, NO_3^- , NH_4^+ 的吸收半饱和常数 K_s 分别为 0.74 $\mu\text{mol/L}$ 和 1.17 $\mu\text{mol/L}$, 最大比吸收率 V_m 分别是 0.0049 h^{-1} 和 0.0166 h^{-1} 。由此可推算出给定误差水平下示踪剂的限量。如, 当介质浓度等于半饱和常数时, 欲控制加入示踪剂引起的误差低于 5%, $^{15}\text{NO}_3^-$ 的加入量应不高于 0.08 $\mu\text{mol/L}$, $^{15}\text{NH}_4^+$ 的加入量应不高于 0.14 $\mu\text{mol/L}$, 这分别相当于介质浓度的 10.81% 和 11.96%。

2.2 培养时间 浮游植物对 NO_3^- , NH_4^+ 的吸收随培养时间的变化如图 2 所示。1991 年秋季(图 2a) NO_3^- 的线性吸收时间超过 10h, NH_4^+ 的线性吸收时间约为 7h; 1992 年春季(图 2b) NO_3^- 和 NH_4^+ 的线性吸收时间分别达 15h 和 12h。可见, NO_3^- 的线性吸收时间较长, NH_4^+ 的线性吸收时间较短。通常, 培养时间在 6h 之内是适宜的。

2.3 样品贮存方法比较 冷冻法和干燥法贮存样品的 ^{15}N 丰度和总氮含量两项指标的分析结果见表 1。显著性检验表明, 两种贮存方法的效果无明显差异。其中, 冷冻法较简便, 贮存四周未发现明显变化, 可作为常规贮存方法。

表 1 干燥法和冷冻法贮存效果比较

Tab. 1 Comparison of storage effects by dry method and frozen method

指 标	贮存方式	样本数	均 值	标准差	变异系数	差异显著性检验
^{15}N 丰度 (%)	冷 冻	9	0.4528	0.025	0.055	$t = 0.64 < t_{0.01} = 3.11$
	干 燥	4	0.4657	0.049	0.106	
总氮含量 (μg)	冷 冻	9	132.33	7.90	0.059	$t = 1.08 < t_{0.01} = 3.11$
	干 燥	4	127.00	8.21	0.065	

1) 当同时考虑 NH_4^+ 再生时, NH_4^+ 的吸收率由此模型求得。

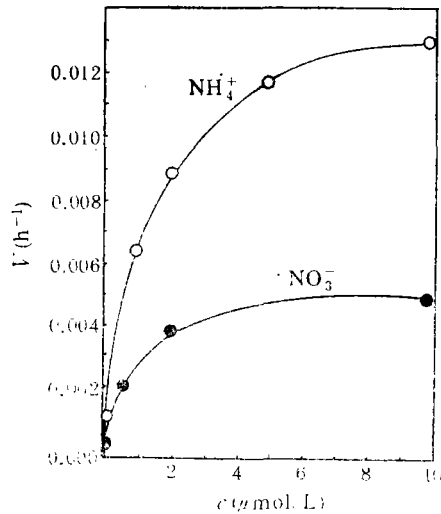


图1 胶州湾秋季(1991)浮游植物N吸收率(V)与介质N浓度(c)的关系

Fig. 1 Nitrogen uptakes by phytoplankton assemblages from the Jiaozhou Bay in Autumn 1991 as functions of ambient nitrogen concentrations

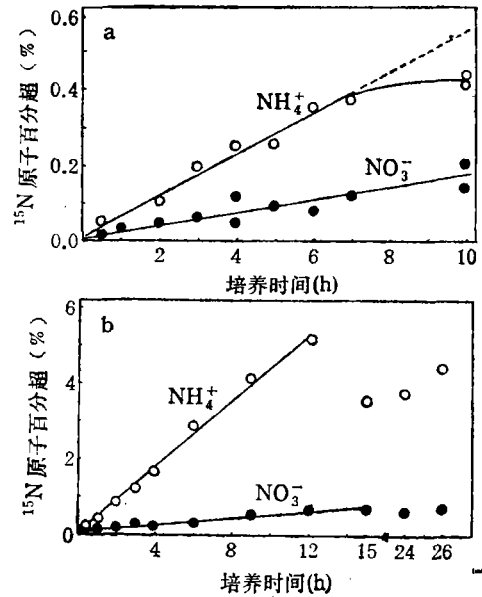


图2 胶州湾浮游植物氮吸收(以 ^{15}N 积累表示)随时间的变化

Fig. 2 Time-course accumulation of ^{15}N into phytoplankton in the Jiaozhou Bay
a. 1991年秋季, b. 1992年春季。

2.4 消解条件 消解剂量和消解时间的两因子三水平试验结果见表2。方差分析表明,不论是 ^{15}N 丰度还是总氮含量,在实验设计范围内随消解剂量和消解时间的变化均不显著(表3)。为降低试剂本底干扰和减少工作量,可视样品含氮量的高低,采用氧化剂1—2.5ml、加速剂0.5—1g、消解时间1—2h为常规消解条件。

表2 不同消解条件的结果比较

Tab. 2 Comparison of digestion results at different conditions

消解时间 (h)	氧化剂 1ml 加速剂 0.5g		氧化剂 2.5ml 加速剂 1.0g		氧化剂 5ml 加速剂 1.5g	
	丰度(%)	总氮(μg)	丰度(%)	总氮(μg)	丰度(%)	总氮(μg)
1	1.714	103	1.599	—	1.513	112
2	1.641	105	1.685	—	1.656	103
3	1.806	103	1.695	—	1.656	106

2.5 扩散吸收效果检验 用浓 H_2SO_4 含量为10%(体积比)、 ^{15}N 丰度为0.9627%的标准液,经扩散吸收后测定吸收液的 ^{15}N 丰度。9个重复样的测定结果为0.948,0.957,0.967,0.948,0.956,0.959,0.957,0.977,0.954;均值为0.958,标准差为0.0091(单位均为%),变异系数为0.95%,平均回收率为99.51%。可见,扩散吸收的重现性和可靠性是良

表 3 消解条件方差分析

Tab. 3 Variance analysis of digestion condition

指 标	方差来源	自由度	均 方	F 值	显著性检验
丰 度	剂量 (A)	2	0.009 30	2.44	$F_A < F_{0.05}(2,4) = 6.94$
	时间 (B)	2	0.009 15	2.40	$F_B < F_{0.05}(2,4) = 6.94$
	误 差	4	0.003 81		
含 氮 量	剂量 (A)	1	9.75	0.58	$F_A < F_{0.05}(1,2) = 18.5$
	时间 (B)	2	6.00	0.36	$F_B < F_{0.05}(2,2) = 19.0$
	误 差	2	16.88		

好的。微小的丰度值降低来自 10% 体积的浓 H_2SO_4 中微量天然丰度氮的同位素稀释作用。

2.6 空白值、检出限与样品需求量 试剂空白：按氧化剂 2ml、加速剂 0.7g，消解 2h，按方法“1.5”步骤扩散吸收，用同位素稀释法测本底氮含量。材料空白：取冷冻贮存的滤膜（见方法“1.3”）经上述方法消解和扩散吸收后测含氮量再减去试剂空白。试剂空白的 9 个重复样的测定值为 8.02, 11.78, 10.61, 11.80, 9.96, 10.28, 9.65, 10.04, 11.19 μg ；均值为 10.37 μg ，标准差为 1.18。膜空白仅为 0.08 μg （均值），可见方法空白主要来自试剂，经过高温处理后的滤膜基本上不含氮。由空白变异推知，方法检出限优于 4 μg 。

取 N 含量为 1 $\mu g/ml$ 的天然丰度的 NH_4Cl 溶液 10ml，经扩散吸收后测 ^{15}N 丰度。5 次重复的结果为，0.369, 0.371, 0.359, 0.368, 0.374；均值为 0.368，标准差为 0.0056，变异系数为 1.53%。可见 10 μg 氮的样品即可满足测定要求。实际测定中，滴到样品靶上的氮量约为 1 μg 。

2.7 方法精密度和准确度 取含氮量为 80 μg 的天然丰度的尿素 8 个样品，经消解、扩散吸收后测 ^{15}N 丰度，同位素稀释法测总氮量，结果见表 4。可见，方法精密度和准确度都是令人满意的。

表 4 方法的精密度和准确度检验

Tab. 4 Examination of the precision and the accuracy of the method

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8	均值	方差	变异系数 (%)	回收率 (%)
丰度 (%)	0.364	0.369	0.363	0.366	0.362	0.374	0.367	0.375	0.367	0.0049	1.32	100.27
含氮量 (μg)	81.2	82.0	80.9	82.3	80.0	77.6	83.1	80.5	80.95	1.188	2.08	101.19

2.8 新生产力测定实例 1991 年秋季胶州湾 5 号站新生产力测定结果（以碳表示）：表层为 0.4035 $mg/(m^3 \cdot h)$ ，6.5m 处为 0.1093 $mg/(m^3 \cdot h)$ ，13.5m 处为 0.01018 $mg/(m^3 \cdot h)$ 。

3 讨论

3.1 ^{15}N 示踪培养的实验条件 示踪剂量和培养时间是关系到实验结果可靠性的两个关键问题。通常认为示踪剂量应低于介质浓度的 10%（Dugdale 等，1986），但未见到

有关这个剂量标准的任何依据。本文从浮游植物营养吸收动力学和误差分析推出,当介质氮含量高于氮吸收半饱和常数时,示踪剂量可略高于 10% 介质浓度,以便有利于缩短培养时间和提高检测精度。这种情况适合于沿岸海区(如,胶州湾 1991 年秋季 NO_3^- 含量约为 $1\mu\text{mol/L}$, NH_4^+ 含量约为 $5\mu\text{mol/L}$)。反之,当介质氮含量低于氮的吸收半饱和常数时,为保持相应的误差水平,应降低示踪剂量比例,直至仪器可检测水平。 NO_3^- 和 NH_4^+ 的线性吸收范围,随着季节、海区和浮游生物组成的不同而有所变化。胶州湾 1991 年秋季和 1992 年春季浮游植物氮吸收时间曲线显示了相同的规律: NO_3^- 线性吸收时间较长、 NH_4^+ 线性吸收时间较短。但在 6h 之内计算平均吸收率均是可靠的。这与前人的结论 (Harrison, 1983; Dugdale 等, 1986) 是一致的。

3.2 ^{15}N 同位素的检测方法 ^{15}N 丰度的测定方法有多种,最常用的是质谱法。以往的 ^{15}N 同位素质谱测定均是气体法,即以 Kjeldahl 法对样品消解,将有机氮转化为 NH_4^+-N 之后再经 Rittenburg 法将 NH_4^+-N 转化为 N_2 , 或者采用 Dumas 法将样品密封燃烧直接转化为 N_2 , 以 N_2 形式进入质谱测定。Dumas 法是一种较为先进的方法,但目前国内尚无自动 Dumas 法装置,手工 Dumas 法制备 N_2 与 Kjeldahl-Rittenburg 法一样费时、且误差环节多,而且样品需求量大,要求样品含氮量不低于 $30\mu\text{g}$ (Harrison, 1983)。本文利用离子质谱计以 NH_4^+ 形式进样测定,免去了由 NH_4^+ 向 N_2 转化的大量工作和误差因素,而且样品需求量仅为气体质谱法的 $\frac{1}{3}$, 这对于含氮量极低的海洋浮游生物样品

分析具有特别重要的意义(减少实验水体、缩短操作时间,有利于扩大实验规模)。由于采用易于处理的 NH_4^+ 形式(以液态而不是气态)进样,可方便地应用同位素稀释法测定样品的总含氮量,这为新生产力的计算提供了极为方便的条件。此外,该法还可直接用于海水中 NH_4^+ 浓度和 $^{15}\text{N}-\text{NH}_4^+$ 丰度的测定, 这为研究浮游生物氮循环以及由 NH_4^+ 再生引起的同位素稀释效应提供了有效的手段。

3.3 离子质谱法的样品前处理 Kjeldahl 消解法的增温剂和催化剂比例通常是 $\text{K}_2\text{SO}_4:\text{CuSO}_4:\text{Se} = 100:10:1$, 消解时间通常是 4h (王福钧, 1989)。由于浮游生物细胞极易破碎分解,有机氮很容易转化为 NH_4^+ , 因而,反应过分剧烈反而会造成氮的损失(以 N_2 形式挥发)。故本实验采用 $\text{K}_2\text{SO}_4:\text{CuSO}_4:\text{Se} = 200:20:1$ 的比例配加速剂。同样,反应时间过长也会使中间产物 $(\text{NH}_4)_2\text{SeO}_3$ 分解产生 $\text{NH}_3\uparrow$ 和 $\text{N}_2\uparrow$ 而造成损失。本实验证明,消解 1—2h 即可使有机氮充分转化为 NH_4^+-N 。

消解液沸点高、内含物复杂,不利于进样分析。采用扩散吸收的办法将 NH_4^+ 转移到低沸点的盐酸水溶液中,排除杂质干扰,同时提高了 NH_4^+ 的浓度,保证了分析效果。

此外,当培养时间短、温度又低时,浮游植物吸收的 NO_3^- 不能完全被同化,而未被同化的 NO_3^- 在消解过程中(酸性条件下)受热逸出,故此造成负误差。这个误差在以往的 Kjeldahl-Rittenburg 法中被忽略了。我们的研究证明,在某些情况下(如冬季),这种误差可高达 15%, 是不容忽视的。对此,采用铬法还原后再行消解可获得满意的效果¹⁾。

1) 焦念志,浮游植物 NO_3^- 吸收和同化与环境因子的关系(待发表)。

4 小结

4.1 ^{15}N 示踪-离子质谱法的关键性实验条件 示踪剂量为介质浓度的 10% 左右; 培养时间在 6h 之内; 样品贮存可采用冷冻法; 消解剂量: 氧化剂 1—2.5ml, 加速剂 (K_2SO_4 : CuSO_4 : $\text{Se} = 200:20:1$) 0.5—1g; 消解时间在 1—2h; 扩散剂量在 8—10ml; 吸收剂量在 300—400 μl ; 扩散吸收时间为 40 $^{\circ}\text{C}$ 下 12h。

4.2 离子质谱法的特点 进样量少; 可同时分析颗粒态氮的 ^{15}N 丰度和浓度; 可同时分析介质中 NH_4^+ - ^{15}N 丰度和 NH_4^+ 浓度; 方法精密度和准确度较高; 分析速度较快; 仪器造价低。

参 考 文 献

- 王福钧, 1989, 农学中同位素示踪技术, 农业出版社(北京), 66—74。
- 黄庆文等, 1989, 新的质谱电离法测定氨根中 ^{15}N 的丰度, 科学通报, 16: 1236—1239。
- 焦念志, 1992, 生物海洋学中 ^{15}N 技术的方法与问题, 海洋科学, 6: 65—69。
- Collos, Y., 1987, Calculations of ^{15}N uptake rates by phytoplankton assimilating one or several nitrogen sources, *Appl. Radiat. Isot.*, 38(4): 275—282.
- Dugdale, R. C. and Wilkerson, F. P., 1986, The use of ^{15}N to measure nitrogen uptake in eutrophic oceans, experimental consideration, *Limnol. Oceanogr.* (U. S. A.), 31(4): 673—689.
- Eppley, R. W., 1989, New production: history, method, problems, *In* Productivity in the Ocean: Present and Past, John Wiley & Sons Limited, pp. 86—97.
- Harrison, W. G., 1983, Use of Isotopes, *In* Nitrogen in the Marine Environment, Academic Press, pp. 763—808.
- Laws, E., 1984, Isotope dilution models and mystery of the vanishing N, *Limnol. Oceanogr.* (U. S. A.), 29(2): 379—386.

MEASUREMENT OF NEW PRODUCTION BY ^{15}N TRACE-ION MASS SPECTROMETRY METHOD*

Jiao Nianzhi, Wang Rong

(*Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao 266071*)

Huang Qingwen

(*Beijing Syntone Scientific Instrument Co, 100080*)

ABSTRACT

A new approach of ^{15}N isotope measurement with ion-mass spectrometer was introduced for new production study by ^{15}N techniques, which take NH_4^+ , other than N_2 as usual, as an analytical state. Experimental conditions including the variation of nitrogen uptake rate with different addition of labeled compound and linear uptake duration lasted in incubation, and analytical procedures (particularly pre-treatment of incubated samples, such as digestion condition, the effects of NH_4^+ transference from digested samples to analytical samples) were examined with field samples from the Jiaozhou Bay collected from Nov., 1991 to May, 1992. The results showed a good achievement in accuracy and precision of the method ($\text{CV} \leq 2\%$, $\text{RE} \leq 1\%$). Furthermore, comparison to the classical mass-spectrometry method, the new approach is characterized by its lesser demand for nitrogen amount in samples ($10\mu\text{g}$), and by its simultaneous measurement of ^{15}N abundance, particulate nitrogen and ambient NH_4^+ concentration. These are advantageous for new production studies in marine environment where nitrogen content is often extremely low, and isotope dilution is sometimes severe due to rapid ammonium regeneration.

Key words Nitrogen uptake Isotope Mass spectrometry New production

* Contribution No. 2138 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.