

基于双还原体系与膜进样质谱快速测定 ^{15}N 加富水样中 $^{15}\text{NO}_3^-$ 的方法*

罗 畅^{1, 2, 3} 宋国栋^{1, 2} 刘素美^{1, 2}

(1. 中国海洋大学 深海圈层与地球系统前沿科学中心/海洋化学理论与工程技术教育部重点实验室 山东青岛 266100; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋生态与环境科学功能实验室 山东青岛 266237; 3. 中国海洋大学化学化工学院 山东青岛 266100)

摘要 海洋中的氮循环是海洋生物地球化学研究的热点领域之一, 而硝化过程是氮循环的关键一环, 准确获取硝化速率对于丰富海洋氮循环的认识至关重要。 ^{15}N 标记同位素技术是目前国际上最为广泛使用的硝化速率测定方法, 该方法的核心在于准确测定 ^{15}N 加富样品产生的 $^{15}\text{NO}_2^-$ 和 $^{15}\text{NO}_3^-$ 的含量, 但目前的方法普遍存在测试时间较长、测试成本较高、所需样品体积较大或者检测限较高等问题。研究以低成本的膜进样质谱作为 ^{15}N 加富样品测试设备, 建立了基于镉柱与氨基磺酸双还原体系测定 ^{15}N 加富样品中 $^{15}\text{NO}_3^-$ 含量的方法。经条件优化实验确定的具体方法: 采用 1 mol/L HCl 配制 15 mmol/L 的氨基磺酸(SA)作为反应试剂除去样品原有的 NO_2^- , 然后利用镉柱将 $^{15}\text{NO}_3^-$ 还原为 $^{15}\text{NO}_2^-$, 再按照 1:60 (V:V) 的比例加入 SA 将 $^{15}\text{NO}_2^-$ 还原为 $^{29}\text{N}_2$, 最终被膜进样质谱检测。此方法可以测定的 $^{15}\text{NO}_3^-$ 样品浓度范围为 0~40 $\mu\text{mol/L}$, 其精密度为 0.3% (10 $\mu\text{mol/L}$), 并具备成本低、测定快速(3 min/样品)、样品消耗体积小、检测限低(0.05 $\mu\text{mol/L}$)且无显著的盐效应等特点。利用该方法测得青岛石老人 0~10 cm 砂质沉积物中 $^{15}\text{NH}_4^+$ 和 $^{15}\text{NO}_2^-$ 的潜在氧化速率分别为 0.08~0.17 $\text{nmol N}/(\text{cm}^3\cdot\text{h})$ 和 0.53~1.56 $\text{nmol N}/(\text{cm}^3\cdot\text{h})$, 验证了研究所建立的方法适用于沉积物中硝化速率的测定。

关键词 ^{15}N 加富样品; 硝化; 氨基磺酸; 膜进样质谱

中图分类号 P734 doi: 10.11693/hyhz20211000237

氮是影响海洋初级生产乃至引起生态系统改变的关键生源要素(Gruber *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2020), 具有多种价态和存在形式, 而各种氮形态之间的转化构成了复杂的氮循环(Casciotti, 2016)。硝酸盐(NO_3^-)是海水溶解无机氮(NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-)中含量最丰富的形态, 其参与的海洋氮循环过程主要包括同化吸收(Glibert *et al.*, 1984)、异化硝酸盐还原(包括反硝化、厌氧铵氧化和异化硝酸盐还原为铵, 即 DNRA)和硝化过程(Song *et al.*, 2013; Devol, 2015)。硝

酸盐主要通过硝化作用产生, 一般分为两个步骤: 第一步 NH_4^+ 被氧化成 NO_2^- , 第二步 NO_2^- 被氧化成 NO_3^- , 每一步都由不同的微生物群落所控制, 但由 NH_3 直接到 NO_3^- 完全的硝化途径目前也已经被证实(Daims *et al.*, 2015; van Kessel *et al.*, 2015)。 NO_3^- 作为氮循环过程中氧化途径的终点和还原途径的起点, 厘清硝化作用对硝酸盐的供给作用对于研究氮的转化十分重要(Jenkins *et al.*, 1984; Jäntti *et al.*, 2011)。目前测定硝化速率最常用和可靠的方法为 ^{15}N 标记方法, 即采

* 国家自然科学基金, U1806211 号, 42076035 号, 41606093 号; 中国海洋大学中央高校基本科研业务, 202072001 号。罗 畅, 硕士研究生, E-mail: 1051392235@qq.com

通信作者: 宋国栋, 副教授, E-mail: gsong@ouc.edu.cn

收稿日期: 2021-10-09, 收修改稿日期: 2021-12-02

用 $^{15}\text{NH}_4^+$ 或者 $^{15}\text{NO}_2^-$ 作为底物进行培养实验, 以产物 $^{15}\text{NO}_2^-$ 和 $^{15}\text{NO}_3^-$ 的产率来衡量硝化速率(Jensen *et al*, 1996; Jäntti *et al*, 2012; Lin *et al*, 2021)。因此准确测定 $^{15}\text{NO}_2^-$ 和 $^{15}\text{NO}_3^-$ 的含量就成为研究硝化过程的关键。

测定 $^{15}\text{NO}_3^-$ 的主要方法涵盖早期的蒸馏法和扩散法, 以及目前常用的反硝化细菌法等, 根据操作流程、测试设备等具有不同的方法特点(表 1)。比如, 蒸馏法(Hoering, 1957; Moore, 1974)或扩散法(Brooks *et al*, 1989)等预处理实验操作繁琐; 硝酸银法(Silva *et al*, 2000)和反硝化细菌法(Sigman *et al*, 2001)等测试时间较长; 基于传统的扇区磁质谱同位素比值质谱法(IRMS)尽管测试精度较高, 但测试成本也较高。测定硝化速率的 ^{15}N 加富培养实验一般会产生大量样品, 目前的一些 $^{15}\text{NO}_3^-$ 分析方法难以在此研

究领域普遍推广。

膜进样质谱仪(MIMS)是一种成本较低用来分析气体同位素的仪器, 目前在氮循环研究中应用越来越广泛。如 Groffman 等(2006)把 MIMS 用于沉积物-水体系反硝化速率的直接测定。Yin 等(2014)利用 KBrO 氧化法将 $^{15}\text{NH}_4^+$ 转化为 $^{29}\text{N}_2$ 和 $^{30}\text{N}_2$, 利用 MIMS 测定, 并获得 $^{15}\text{NH}_4^+$ 浓度。Moraes 等(2019)结合硝酸盐还原酶和 MIMS 来研究沉积物中的硝化作用。MIMS 可直接测定水中溶解气体和 ^{15}N 加富样品的同位素, 具有快速简便、用样量少、不需要脱气等优点(Kana *et al*, 1994; 谢成军等, 2020)。虽然 MIMS 的精密度比 IRMS 低, 但可以应用于 ^{15}N 加富样品的测定。若用合适的方法将 $^{15}\text{NO}_3^-$ 转化为 MIMS 可测定的气体, 将有望实现 ^{15}N 加富水样中 $^{15}\text{NO}_3^-$ 的快速测定。

表 1 测定 ^{15}N 标记 NO_3^- 一些主要方法及其原理和特点

Tab.1 Some main methods, principles, and characteristics for the determination of ^{15}N labeled NO_3^-

方法	原理	特点	参考文献
蒸馏法	锌铜将 NO_3^- 还原成 NH_4^+ 蒸馏收集, 用次溴酸钠转化为 N_2O 或 N_2	操作繁琐, 预处理时间至少 1 天, 需样品体积至少几十毫升	Hoering, 1957; Moore, 1974
扩散法	锌铜合金将 NO_3^- 还原成 NH_4^+ 进行扩散分离, 用次溴酸钠转化为 N_2O 或 N_2	氨扩散样品处理需 6 天时间以上, 所需样品体积 >40 mL	Brooks <i>et al</i> , 1989
硝酸银法	盐酸洗脱阴离子交换柱硝酸盐, 用 Ag_2O 中和、过滤、冷冻干燥产生无水硝酸银, 燃烧转换成 N_2	前处理复杂至少 1 天, 试剂消耗大, 分析超 30 min/样品, 适用于离子强度低的淡水样品	Silva <i>et al</i> , 2000
硝酸银改进法	用特定的阴离子交换树脂柱, 减少 Ag_2O 中和剂用量	相对节约时间简化操作, 成本高耗时, 适于淡水样品	Xing <i>et al</i> , 2011
反硝化细菌法	反硝化细菌(N_2O 还原基因缺陷)将 NO_3^- 转化成 N_2O	细菌培养至少 1 周; $\text{NO}_3^- < 1 \mu\text{mol/L}$ 时精密度达 0.2%; 主要测定天然水体 $^{15}\text{NO}_3^-$	Sigman <i>et al</i> , 2001
叠氮法	用海绵铜将 NO_3^- 还原成 NO_2^- , 再利用叠氮酸醋酸缓冲液将 NO_2^- 还原成 N_2O ; 改进法将缓冲液稀释	叠氮酸(HN_3)有毒性和挥发性, 前处理麻烦, 样品分析时间长(1 000 s/样品), 适用于天然同位素测定	McIlvin <i>et al</i> , 2005; Tu <i>et al</i> , 2016
高效阳离子交换法	锌将 NO_3^- 还原为 NH_4^+ , 分析 NH_4^+ 的 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 比值	样品体积需 15 mL, 但成本高, 测试 10 min/样品, 检测限较高, 至少 $\text{NO}_3^- > 1 \mu\text{mol/L}$	Gardner <i>et al</i> , 1995
反应连续流四极杆质谱技术(RCFQMS)	利用碘化钾试剂将 NO_2^- 还原为 N_2 , 再由质谱仪测定	灵敏, 快速地测定 $^{15}\text{N}-\text{NO}_2^-$ 和 NO_3^- , 检测限较高 $\text{NO}_2^- > 2.17 \mu\text{mol/L}$	Russow <i>et al</i> , 1996
无机氮制备单元与四极质谱仪耦合(SPINMAS)	用三氯化钒试剂将 NO_3^- 转化成 NO , 再由质谱仪测定	简单省时, 自动化反应装置成本高, 检测限较高 $\text{NO}_3^- > 0.97 \mu\text{mol/L}$	Stange <i>et al</i> , 2007
基于膜进样质谱的化学还原方法(REOX/MIMS)	用锌粉将 NO_3^- 还原成 NH_4^+ , 然后用次溴酸碘溶液将 NH_4^+ 氧化成 N_2 , 再由膜进样质谱测定	NO_3^- 检测限低至 $0.1 \mu\text{mol/L}$, 快速简便, 样品体积 15~20 mL	Lin <i>et al</i> , 2021
硝酸盐还原酶与 MIMS 结合	利用沉积物微生物将 NO_3^- 还原成 N_2 , 再由膜进样质谱仪测定	沉积物微生物培养操作复杂, 培养时间超 20 h	Moraes <i>et al</i> , 2019

氨基磺酸(sulfamic acid, SA)作为一种有效的还原剂,在酸性条件下可以快速将 NO_2^- 转化为 N_2 , 以前常被用于硝酸盐同位素分析前亚硝酸盐干扰的消除(Granger *et al.*, 2009), 反应式为 $\text{HNO}_2 + (\text{H}_2\text{N})\text{HSO}_3 = \text{H}_2\text{SO}_4 + \text{N}_2 + \text{H}_2\text{O}$ 。顺此思路, 只要预先将 $^{15}\text{NO}_3^-$ 还原为 $^{15}\text{NO}_2^-$, 然后再加入 SA 发生反应, 由 $^{15}\text{NO}_2^-$ 提供一个 ^{15}N , 然后与 SA 中未经标记的 ^{14}N 反应结合成质量数为 29 的 $^{29}\text{N}_2$, 即可实现将 $^{15}\text{NO}_3^-$ 转化为 MIMS 可检测的 $^{29}\text{N}_2$ 。而利用镉柱将 NO_3^- 还原为 NO_2^- 是目前国际上测定硝酸盐时最为常用的方法。由此, 建立镉柱与氨基磺酸双还原体系, 将 $^{15}\text{NO}_3^-$ 转化为 $^{29}\text{N}_2$, 并结合低成本的膜进样质谱测定 $^{29}\text{N}_2$, 即可实现 $^{15}\text{NO}_3^-$ 的快速分析。

本研究基于现有的膜进样质谱仪(MIMS)对 $^{29}\text{N}_2$ 和 $^{30}\text{N}_2$ 的成功测定(谢成军等, 2020)以及间接测定 $^{15}\text{NH}_4^+$ 的方法开发(徐颢铭等, 2022), 拟开发基于镉柱与氨基磺酸双还原体系测定 ^{15}N 加富样品中 $^{15}\text{NO}_3^-$ 含量的方法, 包括优化方法条件(如镉柱的还原效率、SA 的浓度、反应体系的酸度和反应时间等), 并实现此方法在石老人沙滩硝化过程研究的初步应用, 可为海洋沉积物硝化等过程研究提供有效的技术支持。

1 材料和方法

1.1 测定 ^{15}N 加富样品中 $^{15}\text{NO}_3^-$ 的分析步骤

测定 $^{15}\text{NO}_3^-$ 样品的方法基于镉柱与氨基磺酸双还原体系并结合膜进样质谱, 分析测试流程如下(图 1): 取 5 mL ^{15}N 加富培养产生的 $^{15}\text{NO}_3^-$ 样品, 加入 0.1 mL SA 试剂混匀并利用高纯 He 吹扫去除样品中原有的 $^{15}\text{NO}_2^-$, 再加入 0.1 mL 1 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH; 然后加入等体积的 NH_4Cl 缓冲溶液(pH=8.5), 混匀, 以 10 mL/min 的流速经镉柱还原为 $^{15}\text{NO}_2^-$, 将流出液接入 6 mL Exetainer 瓶中装满, 加入 0.1 mL SA 试剂, 加盖旋紧混匀, 常温反应 10 min 后用 MIMS 测定 $^{28}\text{N}_2$, $^{29}\text{N}_2$ 和 $^{30}\text{N}_2$ 的信号值。 $^{15}\text{NO}_3^-$ 工作曲线按照上述同样流程操作, 工作曲线可用高纯水或者盐度相近的具有低含量 NO_3^- 的陈化海水配制。以 $\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ 为纵轴, 以 $^{15}\text{NO}_3^-$ 浓度为横轴绘制工作曲线, 然后根据样品的 $\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ 值计算样品中 $^{15}\text{NO}_3^-$ 浓度。 $\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ 为 $^{29}\text{N}_2$ 与总的 N_2 信号值的比值与 $^{15}\text{NO}_3^-$ 零添加浓度时所测定的 $^{29}\text{N}_2$ 与总的 N_2 信号值的比值的差值。样品中 $^{15}\text{NO}_2^-$ 的含量则通过直接与 SA 试剂反应转化成 $^{29}\text{N}_2$ 利用 MIMS 进行测定。

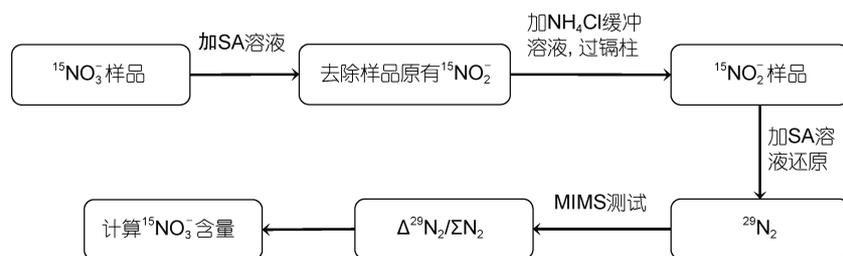


图 1 基于镉柱与氨基磺酸双还原体系并结合膜进样质谱测定 ^{15}N 加富样品中 $^{15}\text{NO}_3^-$ 的简单流程

Fig.1 A simple process for the determination of $^{15}\text{NO}_3^-$ in ^{15}N -enriched samples based on the double reduction system of cadmium column and aminosulfonic acid combined with membrane injection mass spectrometry

整个方法涉及多项因素的条件测试, 影响因素和条件设定如表 2, 方法的条件测试具体步骤见 1.2~1.5, 方法对样品的应用测试见 1.6。

1.2 镉柱还原率及还原硝酸盐浓度范围测定

按照标准方法制备镉还原柱(中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局等, 2008)。将处理好的镉粒灌装于长度 10 cm 内径 3 mm 的聚四氟乙烯管中, 管上端连接 5 mL 移液管枪头, 下端连接蠕动泵。配制 NO_3^- 和 NO_2^- 标准溶液浓度分别为 0、1、2、5、8 和 10 $\mu\text{mol/L}$, 以 10 mL/min 流速进行过柱, 过柱后接收

至 10 mL 离心管, 而另一组 0、1、2、5、8 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 NO_2^- 标准溶液无需过柱。配制 0、0.5、1、2、5、10、20、40、60、80、100、150 和 200 $\mu\text{mol/L}$ NO_3^- 标准溶液, 均由镉柱还原为 NO_2^- 后, 将浓度高于 10 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液按理论稀释为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。配制 $^{15}\text{NO}_3^-$ 和 $^{14}\text{NO}_3^-$ 标准溶液浓度分别为 0、1、2、5、8 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 进行过柱。利用磺胺-萘乙二胺分光光度法测定每条工作曲线的斜率。通过计算 NO_3^- 和 NO_2^- 工作曲线的斜率的比值来评估镉柱的还原效率。

表 2 基于镉柱与氨基磺酸双还原(SA)体系结合膜进样质谱测定 $^{15}\text{NO}_3^-$ 影响因素和条件设定Tab.2 Influencing factors and conditions for determination of $^{15}\text{NO}_3^-$ by membrane injection mass spectrometry based on cadmium column and sulfamic acid double reduction (SA) system

影响因素	条件设定
镉柱还原率	配制 NO_3^- 和 NO_2^- 标准溶液 0、1、2、5、8、10 $\mu\text{mol/L}$
试剂 SA 浓度	0.5、1、2、4、8、16、20 mmol/L
试剂 SA 加入 HCl 浓度	0、0.1、0.2、0.3、0.5、0.6、1 mol/L
试剂 SA 反应时间	10 min、20 min、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h
线性范围	配制 $^{15}\text{NO}_3^-$ 标准溶液 0、0.5、1、2、5、10、20、40、60、80、100、150、200 $\mu\text{mol/L}$
精密度	配制 $^{15}\text{NO}_3^-$ 标准溶液 1 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 分别取 4 个平行样
盐效应	盐度为 0、5、10、15、20、25、30、35 的海水配制 10 $\mu\text{mol/L}$ $^{15}\text{NO}_3^-$ 标准溶液

$^{14}\text{NO}_2^-$ 过柱的目的在于监测镉柱是否存在过度还原。

$^{15}\text{NO}_3^-$ 过柱目的为检验其与 $^{14}\text{NO}_3^-$ 的工作曲线斜率是否存在显著性差异。

1.3 氨基磺酸浓度、试剂酸度及反应时间

$^{15}\text{NO}_3^-$ 由镉柱还原为 $^{15}\text{NO}_2^-$ 后需要在酸性条件下再被 SA 还原为 $^{29}\text{N}_2$ ，为了探究适宜的 SA 试剂浓度和酸度，配制 SA 试剂浓度梯度为 0.5、1、2、4、8、16 和 20 mmol/L ，HCl 浓度梯度为 0、0.1、0.2、0.3、0.5、0.6 和 1 mol/L 的混合溶液，共计 49 个全因子组合实验。将 10 $\mu\text{mol/L}$ $^{15}\text{NO}_3^-$ 使用液，以 10 mL/min 的流速进行过柱，过柱之后接收至 6 mL Exetainer 瓶装满。分别加入 0.1 mL 上述不同酸度和不同浓度的 SA 溶液，利用膜进样质谱上机测试 $^{28}\text{N}_2$ 、 $^{29}\text{N}_2$ 和 $^{30}\text{N}_2$ 的信号值，并转化为 $\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ 。并用分光光度法检测剩余样品中 NO_3^- 含量，来验证 $^{15}\text{NO}_2^-$ 的转化率。从 SA 浓度和酸度实验选择优化条件，确定适宜的 SA 试剂。

利用 10 $\mu\text{mol/L}$ $^{15}\text{NO}_3^-$ 标准溶液，经镉柱还原后，再加入 SA 试剂，设置时间梯度为 10 min、20 min、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h，然后上机测试 $\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ ，验证此反应随反应时间变化的关系。

1.4 线性范围、精密度及检测限

线性范围: 配制 $^{15}\text{NO}_3^-$ 浓度为 0、0.5、1、2、5、10、20、40、60、80、100、150 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 的标准系列，经镉柱还原后，将流出液接入 6 mL Exetainer 瓶中装满，分别向瓶中加入 0.1 mL 1 mol/L HCl 和 15 mmol/L SA 溶液，加盖旋紧，用膜进样质谱仪测定 $^{29}\text{N}_2$ 。以 $\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ 为纵坐标， $^{15}\text{NO}_3^-$ 标准系列浓度为横坐标绘制工作曲线，通过线性拟合寻求线性范围。

精密度: 配制 1 和 10 $\mu\text{mol/L}$ $^{15}\text{NO}_3^-$ 标准溶液由

镉柱还原后，收集装满至 6 mL Exetainer 瓶，每个浓度的样品取 4 个平行样；加入 SA 试剂 0.1 mL 上机测定，计算相对标准偏差。

检测限: 以工作曲线线性回归方程截距标准偏差的 3 倍除以斜率即检测限。

1.5 盐效应

使用陈化海水配制盐度梯度为 0、5、10、15、20、25、30、35 的海水，再与 NH_4Cl 缓冲溶液 1:1 配制 10 $\mu\text{mol/L}$ $^{15}\text{NO}_3^-$ 标准溶液，经镉柱和 SA 试剂还原，上机测试并计算 $\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ ，计算相对偏差，验证本方法在已优化的条件下是否存在盐效应。实验所用陈化海水于 2016 年 5 月采自南海开阔海域，盐度为 34.5，经过 0.4 μm 醋酸纤维滤膜过滤后避光陈化保存待用， NO_x^- ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) 的本底小于 0.1 $\mu\text{mol/L}$ ， NH_4^+ 的本底小于 0.2 $\mu\text{mol/L}$ ，对于本实验中的工作曲线的配制无显著影响。

1.6 石老人沙滩沉积物中铵氧化与亚硝酸盐氧化速率的测定

于 2019 年 5 月 15 日早上 08:30 (低潮位时刻) 在青岛石老人沙滩 (36°5'48"N, 120°28'25"E) 获取沉积物柱状样，将表层 10 cm 沉积物以 2 cm 的垂向分辨率现场进行分割装入密封袋中；获取沉积物的同时获取 5 L 海水，与分割好的沉积物一同保存在装有冰盒的保温箱带回实验室进行后续实验。

NH_4^+ 潜在氧化速率测定实验: 对每个层次取 30 mL 沉积物加入气密性培养袋中，加入 280 mL 海水，排尽培养袋中气泡，加入 0.3 mL 100 mmol/L 的 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 溶液，混匀， $^{15}\text{NH}_4^+$ 最终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 左右，然后利用 10 mL 注射器分别在 0、1、2、4 和 7 h 抽取培养袋中的样品 10 mL ，经 0.22 μm 聚醚砜滤头过滤后，冷冻保存。按照 1.1 中的步骤进行测定。 NO_2^-

潜在氧化速率测定实验: 类似 NH_4^+ 潜在氧化速率测定实验, 将 $\text{Na}^{15}\text{NO}_2$ 作为所添加的 ^{15}N 标记物进行培养, 然后按照同样的过程进行分析测试。

样品中 $^{15}\text{NH}_4^+$ 氧化速率以 $v(^{15}\text{NH}_4^+)$ 表示, $^{15}\text{NO}_2^-$ 氧化速率以 $v(^{15}\text{NO}_2^-)$ 表示, 计算公式如下:

$$v(^{15}\text{NH}_4^+) = \frac{\alpha \cdot V_2}{V_1} \quad (1)$$

$$v(^{15}\text{NO}_2^-) = \frac{\beta \cdot V_2}{V_1} \quad (2)$$

加富 $^{15}\text{NH}_4^+$ 的样品, 以产生的 $^{15}\text{NO}_2^-$ (或 $^{15}\text{NO}_3^-$) 质谱信号值 ($\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$) 带入 $^{15}\text{NO}_2^-$ (或 $^{15}\text{NO}_3^-$) 工作曲线计算样品中 $^{15}\text{NO}_2^-$ (或 $^{15}\text{NO}_3^-$) 的浓度, 以 $^{15}\text{NO}_2^-$ (或 $^{15}\text{NO}_3^-$) 浓度对培养时间进行线性回归, 其斜率即为 $^{15}\text{NO}_2^-$ (或 $^{15}\text{NO}_3^-$) 产生速率, 记为 α ; 加富 $^{15}\text{NO}_2^-$ 的样品, 以产生的 $^{15}\text{NO}_3^-$ 质谱信号值 ($\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$) 带入 $^{15}\text{NO}_3^-$ 工作曲线计算样品中 $^{15}\text{NO}_3^-$ 的浓度, 以 $^{15}\text{NO}_3^-$ 浓度对培养时间进行线性回归, 其斜率即为 $^{15}\text{NO}_3^-$ 产生速率, 记为 β ; 其中培养实验中加入沉积物的体积记为 V_1 , 培养袋中沉积物与海水的混合体积为 V_2 。

2 结果与讨论

2.1 镉柱还原率

整个方法基于镉柱-氨基磺酸(SA)双还原体系, 实现由 $^{15}\text{NO}_3^- \xrightarrow{\text{镉柱}} ^{15}\text{NO}_2^- \xrightarrow{\text{SA}} ^{29}\text{N}_2$ 的转化, 设方法的转化率为 η , 镉柱还原率为 e , 氨基磺酸还原效率为 f , 则转化率如公式(3)

$$\eta = \frac{C_{^{29}\text{N}_2}}{C_{^{15}\text{NO}_3^-}} = \frac{C_{^{15}\text{NO}_2^-}}{C_{^{15}\text{NO}_3^-}} \cdot \frac{C_{^{29}\text{N}_2}}{C_{^{15}\text{NO}_2^-}} = e \cdot f \quad (3)$$

镉柱还原率 $e \leq 1$, SA 还原效率 $f \leq 1$, 为实现转化率 η 越大, 则需 e 和 f 越接近 1。

镉柱还原效率结果如图 2 所示。由图 2b 和 2c 可知, NO_2^- 已过柱和 NO_2^- 不过柱的工作曲线斜率之比为 $0.114/0.115=99\%$, 可知制备的镉柱不会过度还原; 由图 2a 和 2b 可知, NO_3^- 过柱与 NO_2^- 过柱的工作曲线斜率之比为 $0.108/0.114=95\%$, 即 $e=95\%$, 可知还原效率较好, 满足实验要求; 而浓度高于 $10 \mu\text{mol/L}$ 的 NO_3^- 溶液, 先由镉柱还原后并按理论稀释为 $10 \mu\text{mol/L}$ 后测定吸光度, 经检验符合工作曲线, 镉柱至少可还原 $200 \mu\text{mol/L}$ 的 NO_3^- 溶液。由图 2 d 可知, $^{14}\text{NO}_3^-$ 和

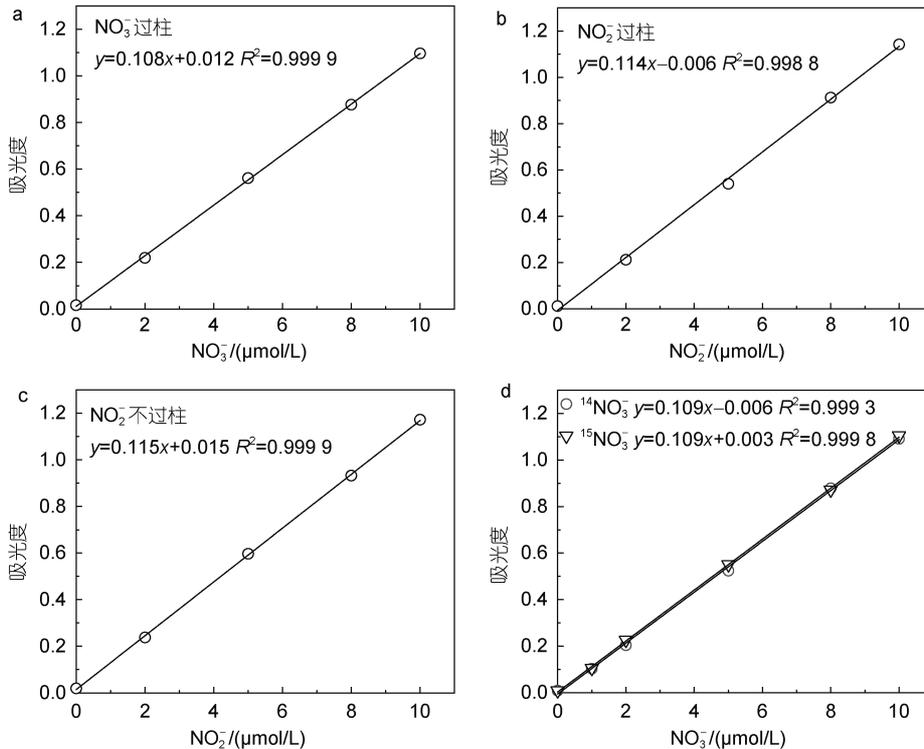


图 2 NO_3^- 过柱(a), NO_2^- 过柱(b), NO_2^- 不过柱(c), $^{14}\text{NO}_3^-$ 过柱与 $^{15}\text{NO}_3^-$ 过柱(d)工作曲线

Fig.2 Working curves of NO_3^- passed through the column (a); NO_2^- passed through the column (b); NO_2^- not passed through the column (c); $^{14}\text{NO}_3^-$ and $^{15}\text{NO}_3^-$ passed through the column (d)

$^{15}\text{NO}_3^-$ 过柱的斜率均为 0.109, 斜率相对偏差 < 0.1%, 可知 $^{14}\text{NO}_3^-$ 和 $^{15}\text{NO}_3^-$ 过柱的结果没有显著性差异。

2.2 $^{15}\text{NO}_2^-$ 被 SA 还原时 SA 试剂浓度、酸度和反应时间影响

实验控制 SA 试剂浓度和酸度的影响结果如图 3 所示。当 HCl 浓度低于 0.3 mol/L, SA 浓度从 0 mmol/L 逐渐增加至 20 mmol/L, $\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ 数值与本底无明显差异(图 3a), 可知此范围条件下 $^{15}\text{NO}_2^-$ 基本未被还原; 当 HCl 浓度高于 0.5 mol/L, $\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ 明显增大, 并随着 SA 浓度增加而升高(图 3a); HCl 浓度为 0.6 mol/L 和 1 mol/L 且 SA 浓度大于 8 mmol/L, $\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ 数值最大且保持不变(图 3a), 说明此条件下 $^{15}\text{NO}_2^-$ 被稳定地还原为 $^{29}\text{N}_2$ 。通过光度法测定样品加入 SA 试剂后

剩余 $^{15}\text{NO}_2^-$, 验证了 $^{15}\text{NO}_2^-$ 转化率(图 3b), 可知 $^{15}\text{NO}_2^-$ 转化率与图 3a 中 $\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ 基本对应, 证明 HCl 浓度大于 0.6 mol/L 且 SA 浓度大于 8 mmol/L, 可实现 $^{15}\text{NO}_2^-$ 完全转化为 $^{29}\text{N}_2$, 此条件下氨基磺酸还原效率 $f=100\%$, 整个方法的还原效率 $\eta=95\%$ 。因此, 为保证反应可靠进行, 选择 SA 浓度为 15 mmol/L 且 HCl 浓度为 1 mol/L 为 SA 试剂优化条件。

$^{15}\text{NO}_2^-$ 被 SA 还原时反应时间影响如图 4 所示。可知 10 $\mu\text{mol/L}$ $^{15}\text{NO}_3^-$ 溶液在试剂条件为 15 mmol/L SA (1 mol/L HCl) 下, 经镉柱和 SA 试剂还原, $\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ 数值随时间梯度基本不变化, 测定结果的相对标准偏差为 2%, 可知在选择的条件下测定时 $^{15}\text{NO}_2^-$ 和 SA 试剂反应非常迅速, 加入 SA 试剂后即可进行测定。

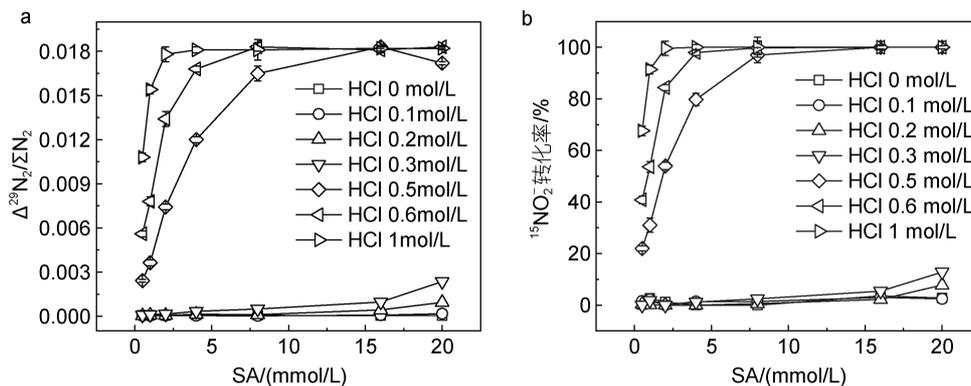


图 3 不同氨基磺酸(SA)浓度(0.5~20 mmol/L)和酸度(HCl 浓度 0~1 mol/L)条件下, $^{15}\text{NO}_2^-$ 转化为 $^{29}\text{N}_2$ 的信号比值 $\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ 变化(a)和 $^{15}\text{NO}_2^-$ 转化率(b)

Fig.3 The signal ratio $\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ variation from $^{15}\text{NO}_2^-$ to $^{29}\text{N}_2$ (a) and $^{15}\text{NO}_2^-$ conversion (b) under different sulfamic acid (SA) concentration (0.5~20 mmol/L) and acidity (expressed as HCl concentration 0~1 mol/L)

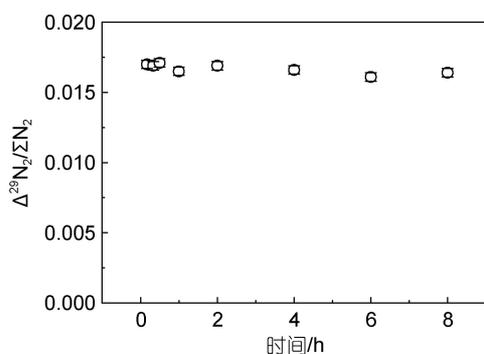


图 4 10 $\mu\text{mol/L}$ $^{15}\text{NO}_3^-$ 经镉和 15 mmol/L SA (1 mol/L HCl) 试剂还原后测试信号随时间的变化

Fig.4 The change of test signal with time on the reduction test of 10 $\mu\text{mol/L}$ $^{15}\text{NO}_3^-$ by cadmium and 15 mmol/L SA (1 mol/L HCl) reagent

2.3 线性范围、检出限和精密度

本研究中镉柱还原硝酸盐的线性范围完全满足需要, 利用镉柱还原-SA 反应测定 0~200 $\mu\text{mol/L}$ $^{15}\text{NO}_3^-$ 线性范围(图 5)。通过线性拟合, 当 $^{15}\text{NO}_3^-$ 浓度处于 0~40 $\mu\text{mol/L}$ 范围, 测定 $^{29}\text{N}_2$ 的信号值 $\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ 与 $^{15}\text{NO}_3^-$ 浓度成明显线性关系; 当 $^{15}\text{NO}_3^-$ 浓度高于 40 $\mu\text{mol/L}$, $\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ 偏离拟合线, 因此本方法的线性范围为 0~40 $\mu\text{mol/L}$ 。

根据 $^{15}\text{NO}_3^-$ 0~10 $\mu\text{mol/L}$ 的工作曲线(图 6), 计算出该方法的检测限为 0.05 $\mu\text{mol/L}$ 。

分别进行了 1 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ $^{15}\text{NO}_3^-$ 溶液平行测试($n=4$), 其 $\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ 相对标准偏差分别为 1.1%和 0.3% (表 3)。

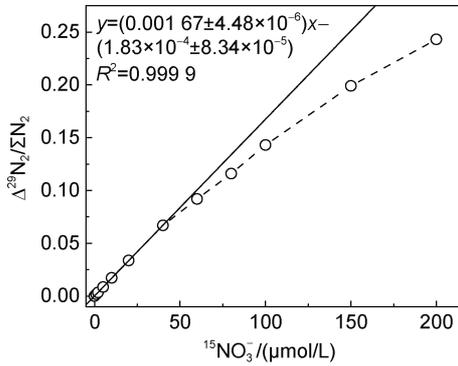
图5 镉柱还原-SA反应测定 $^{15}\text{NO}_3^-$ 的线性范围测试

Fig.5 Determination of linear range of $^{15}\text{NO}_3^-$ by cadmium column reduction-SA reaction

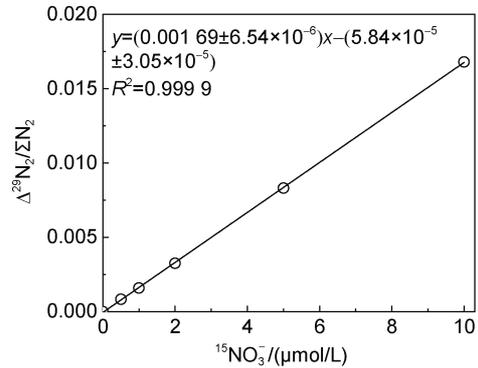
图6 镉柱还原-SA反应测定 $^{15}\text{NO}_3^-$ 的工作曲线(0~10 μmol/L)

Fig.6 Working curve of determination of $^{15}\text{NO}_3^-$ by cadmium column reduction-SA reaction (0~10 μmol/L)

表3 $^{15}\text{NO}_3^-$ 标准分别为1和10 μmol/L时测得 $\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ 平均值和 $\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ 标准偏差和 $\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ 相对标准偏差($n=4$)

Tab.3 $\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ average measured at 1 and 10 μmol/L of $^{15}\text{NO}_3^-$ standard and the $\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ standard deviation and $\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ relative standard deviation ($n=4$)

$^{15}\text{NO}_3^-$ /(μmol/L)	$\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ 平均值	$\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ 标准偏差	$\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ 相对标准偏差
1	1.81×10^{-3}	1.94×10^{-5}	1.1%
10	1.73×10^{-2}	5.66×10^{-5}	0.3%

2.4 盐效应影响

通过测定盐度范围为0~35的 $\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ 与盐度为0时 $\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ 信号比值计算相对误差(图7),表明当盐度为5、30和35, $\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ 相对误差明显低于1%, $\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ 基本未发生变化;当盐度为10~25, $\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ 相对误差约为2%, $\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ 受到的影响也较小。因此,整个反应过程可视为无显著的盐效应。

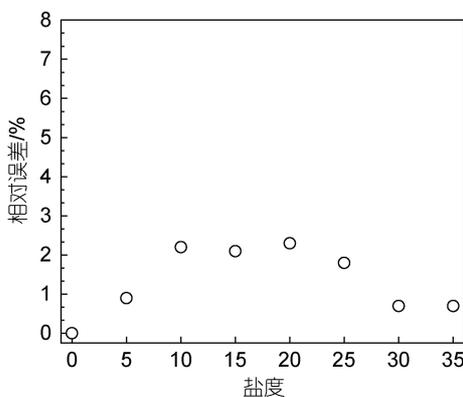
图7 盐度为0~35时 $\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ 相对误差变化

Fig.7 The relative error of $\Delta^{29}\text{N}_2/\Sigma\text{N}_2$ change at salinity with 0~35

2.5 石老人沙滩沉积物中潜在的铵氧化与亚硝酸盐氧化速率

$^{15}\text{NH}_4^+$ 加富样品中生成的 $^{15}\text{NO}_2^-$ 经测定浓度过

低,均 $<0.1 \mu\text{mol/L}$,与背景值之间并无显著差异。 $^{15}\text{NH}_4^+$ 加富样品中 $^{15}\text{NO}_3^-$ 生成与培养时间的关系、 $^{15}\text{NO}_2^-$ 加富样品中 $^{15}\text{NO}_3^-$ 生成与培养时间的关系如图8a, 8b所示。可知,沉积物 $^{15}\text{NH}_4^+$ 加富在0~10 cm随着培养时间增加,除最表层沉积物0~2 cm外, $^{15}\text{NO}_3^-$ 整体上均有升高,发现 NH_4^+ 氧化为 NO_3^- 的硝化过程。沉积物 $^{15}\text{NO}_2^-$ 加富在0~10 cm随着培养时间增加, $^{15}\text{NO}_3^-$ 均有升高,明显发生了 NO_2^- 氧化为 NO_3^- 的硝化过程;并且随着深度增加, $^{15}\text{NO}_3^-$ 升高更明显,氧化速率更高。

铵氧化及亚硝酸盐氧化速率与沉积物深度的关系结果如图9所示。石老人沙滩沉积物中存在明显的硝化过程。沉积物 $^{15}\text{NH}_4^+$ 氧化为 $^{15}\text{NO}_2^-$ 的速率难以检测;而沉积物 $^{15}\text{NH}_4^+$ 氧化为 $^{15}\text{NO}_3^-$ 的速率变化范围为 $0.08\sim 0.17 \text{ nmol N}/(\text{cm}^3 \cdot \text{h})$,随着深度增加而增加,8~10 cm $^{15}\text{NH}_4^+$ 氧化为 $^{15}\text{NO}_3^-$ 的速率最高;沉积物 $^{15}\text{NO}_2^-$ 氧化为 $^{15}\text{NO}_3^-$ 的速率也有明显变化,变化范围为 $0.53\sim 1.56 \text{ nmol N}/(\text{cm}^3 \cdot \text{h})$,随着深度增加,速率变化小,但在8~10 cm速率明显高。由石老人沙滩沉积物测得的硝化速率大小结果与一些研究相似(杜佳鑫等, 2015; 常永凯, 2016; Chang *et al.*, 2021)。石老人沙滩沉积物是砂质的潮间带沉积物,在表面难以发现

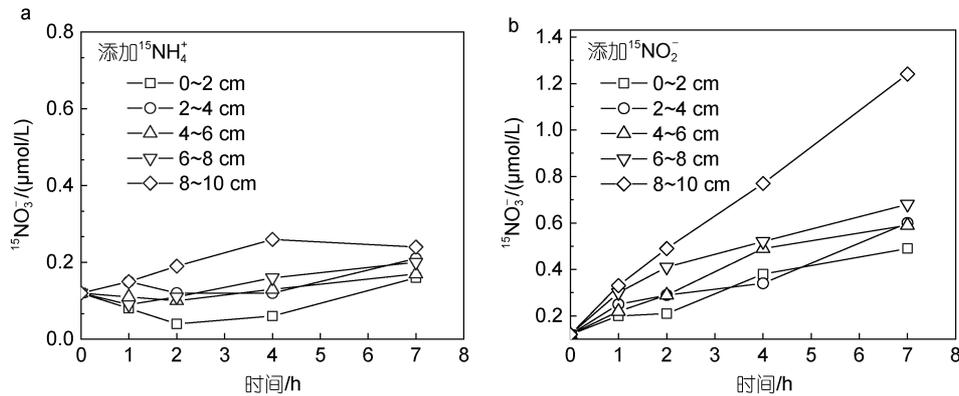


图 8 $^{15}\text{NH}_4^+$ 加富样品(a)和 $^{15}\text{NO}_2^-$ 加富样品(b)中 $^{15}\text{NO}_3^-$ 生成与培养时间的关系

Fig.8 Relationship between $^{15}\text{NO}_3^-$ production and incubation time in $^{15}\text{NH}_4^+$ -enriched samples (a) and $^{15}\text{NO}_2^-$ -enriched samples (b)

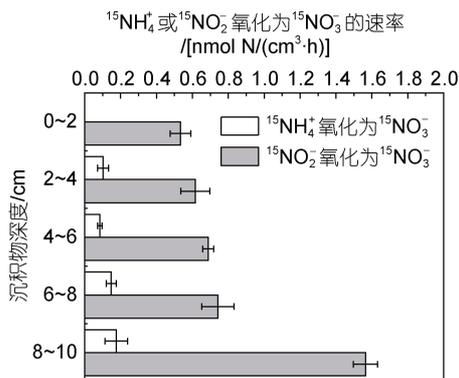


图 9 $^{15}\text{NH}_4^+$ 氧化为 $^{15}\text{NO}_3^-$ 及 $^{15}\text{NO}_2^-$ 氧化为 $^{15}\text{NO}_3^-$ 的速率与沉积物深度的关系

Fig.9 Relationship between the oxidation rate from $^{15}\text{NH}_4^+$ to $^{15}\text{NO}_3^-$ and $^{15}\text{NO}_2^-$ to $^{15}\text{NO}_3^-$ and sediment depth

明显的由铵被氧化为亚硝或硝酸盐的硝化过程, 而沉积物 2~10 cm 则有明显的硝化过程, 将 $^{15}\text{NH}_4^+$ 氧化为 $^{15}\text{NO}_3^-$ 的速率与深度做相关性分析, 结果 $P=0.022<0.05$, 由 $^{15}\text{NH}_4^+$ 氧化为 $^{15}\text{NO}_3^-$ 的速率与深度显著相关; 而将 $^{15}\text{NO}_2^-$ 氧化为 $^{15}\text{NO}_3^-$ 的速率与深度做相关性分析, 结果 $P=0.085>0.05$, 与深度无明显相关性。

3 结论

本研究优化了基于双还原体系与膜进样质谱测定 ^{15}N 加富水样中 $^{15}\text{NO}_3^-$ 的方法。通过实验优化, $^{15}\text{NO}_3^-$ 还原为 $^{29}\text{N}_2$ 的最佳条件为: 先用 SA 除去样品原有的 $^{15}\text{NO}_2^-$, 然后利用镉柱将 $^{15}\text{NO}_3^-$ 还原为 $^{15}\text{NO}_2^-$, 再加入 0.1 mL 15 mmol/L SA(HCl 浓度为 1 mol/L) 将 $^{15}\text{NO}_2^-$ 还原为 $^{29}\text{N}_2$, 最后由膜进样质谱测定 $^{29}\text{N}_2$, 并

通过工作曲线得出 $^{15}\text{NO}_2^-$ 的浓度。此方法测量样品快速简便、成本低、效率高, 可测 $^{15}\text{NO}_3^-$ 浓度上限至少可以达到 40 $\mu\text{mol/L}$, 对 ^{15}N 加富产生的大量样品测定优势显著。石老人沙滩沉积物中存在明显的硝化过程, 沉积物 0~10 cm $^{15}\text{NH}_4^+$ 氧化为 $^{15}\text{NO}_3^-$ 及 $^{15}\text{NO}_2^-$ 氧化为 $^{15}\text{NO}_3^-$ 的速率变化明显, 在整体上, 随着深度增加氧化速率增加, 由 $^{15}\text{NH}_4^+$ 氧化为 $^{15}\text{NO}_3^-$ 的速率与深度显著相关。

致谢 感谢谢成军同学对本研究实验过程与仪器操作所提供的协助; 感谢广西大学海洋学院宁志铭老师对本文的修改指正。

参 考 文 献

- 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会, 2008. 海洋监测规范 第 4 部分: 海水分析: GB 17378.4—2007[S]. 北京: 中国标准出版社: 115-117.
- 杜佳鑫, 杜华超, 王连峰, 2015. 辽东湾河口潮间带沉积物及附近土壤硝化和反硝化强度研究[J]. 环境保护科学, 41(5): 123-127.
- 徐颢铭, 宋国栋, 刘素美, 等, 2022. 基于次溴酸钠氧化-氨基磺酸还原测定沉积物 ^{15}N 加富培养样品中的 $^{15}\text{NH}_4^+$ 的方法探索[J]. 海洋学报, 44(01): 147-156.
- 常永凯, 2016. 辽河口沉积物中氨氧化微生物多样性和硝化作用研究[D]. 大连: 大连海洋大学: 9-12.
- 谢成军, 宋国栋, 刘素美, 等, 2020. 自组装膜进样质谱系统及其在砂质沉积物异化硝酸盐还原研究中的应用[J]. 海洋学报, 42(2): 22-29.
- BROOKS P D, STARK J M, MCINTEER B B, *et al*, 1989. Diffusion method to prepare soil extracts for automated nitrogen-15 analysis [J]. Soil Science Society of America Journal, 53(6): 1707-1711.
- CASCIOTTI K L, 2016. Nitrogen and oxygen isotopic studies of the marine nitrogen cycle [J]. Annual Review of Marine

- Science, 8: 379-407.
- CHANG Y K, YIN G Y, HOU L J, *et al*, 2021. Nitrogen removal processes coupled with nitrification in coastal sediments off the North East China Sea [J]. *Journal of Soils and Sediments*, 21(10): 3289-3299.
- DAIMS H, LEBEDEVA E V, PJEVAC P, *et al*, 2015. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria [J]. *Nature*, 528(7583): 504-509.
- DEVOL A H, 2015. Denitrification, anammox, and N₂ production in marine sediments [J]. *Annual Review of Marine Science*, 7: 403-423.
- GARDNER W S, BOOTSMA H A, EVANS C, *et al*, 1995. Improved chromatographic analysis of ¹⁵N:¹⁴N ratios in ammonium or nitrate for isotope addition experiments [J]. *Marine Chemistry*, 48(3/4): 271-282.
- GLIBERT P M, MCCARTHY J J, 1984. Uptake and assimilation of ammonium and nitrate by phytoplankton: indices of nutritional status for natural assemblages [J]. *Journal of Plankton Research*, 6(4): 677-697.
- GRANGER J, SIGMAN D M, 2009. Removal of nitrite with sulfamic acid for nitrate N and O isotope analysis with the denitrifier method [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23(23): 3753-3762.
- GROFFMAN P M, ALTABET M A, BÖHLKE J K, *et al*, 2006. Methods for measuring denitrification: diverse approaches to a difficult problem [J]. *Ecological Applications*, 16(6): 2091-2122.
- GRUBER N, GALLOWAY J N, 2008. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle [J]. *Nature*, 451(7176): 293-296.
- HOERING T, 1957. The isotopic composition of the ammonia and the nitrate ion in rain [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 12(1/2): 97-102.
- JÄNTTI H, LESKINEN E, STANGE C F, *et al*, 2012. Measuring nitrification in sediments-comparison of two techniques and three ¹⁵NO₃⁻ measurement methods [J]. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 48(2): 313-326.
- JÄNTTI H, STANGE F, LESKINEN E, *et al*, 2011. Seasonal variation in nitrification and nitrate-reduction pathways in coastal sediments in the Gulf of Finland, Baltic Sea [J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 63(2): 171-181.
- JENKINS M C, KEMP M W, 1984. The coupling of nitrification and denitrification in two estuarine sediments [J]. *Limnology and Oceanography*, 29(3): 609-619.
- JENSEN K M, JENSEN M H, KRISTENSEN E, 1996. Nitrification and denitrification in Wadden Sea sediments (Königshafen, Island of Sylt, Germany) as measured by nitrogen isotope pairing and isotope dilution [J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 11(2): 181-191.
- KANA T M, DARKANGELO C, HUNT M D, *et al*, 1994. Membrane inlet mass spectrometer for rapid high-precision determination of N₂, O₂, and Ar in environmental water samples [J]. *Analytical Chemistry*, 66(23): 4166-4170.
- LIN X B, LU K J, HARDISON A K, *et al*, 2021. Membrane inlet mass spectrometry method (REOX/MIMS) to measure ¹⁵N-nitrate in isotope-enrichment experiments [J]. *Ecological Indicators*, 126(15): 107639.
- MCILVIN M R, ALTABET M A, 2005. Chemical conversion of nitrate and nitrite to nitrous oxide for nitrogen and oxygen isotopic analysis in freshwater and seawater [J]. *Analytical Chemistry*, 77(17): 5589-5595.
- MOORE H, 1974. Isotopic measurement of atmospheric nitrogen compounds [J]. *Tellus*, 26(1/2): 169-174.
- MORAES P C, GÓMEZ D M A, VINCENZI F, *et al*, 2019. Analysis of ¹⁵N-NO₃⁻ via anoxic slurries coupled to MIMS analysis: an application to estimate nitrification by Burrowing Macrofauna [J]. *Water*, 11(11): 2310.
- RUSSOW R, SICH I, STEVENS R J, 1996. Rapid, sensitive and highly selective ¹⁵N analysis of ¹⁵N enriched nitrite in water samples and soil extracts by nitric oxide production and CF-QMS measurement [J]. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 32(4): 323-328.
- SIGMAN D M, CASCIOTTI K L, ANDREANI M, *et al*, 2001. A bacterial method for the nitrogen isotopic analysis of nitrate in seawater and freshwater [J]. *Analytical Chemistry*, 73(17): 4145-4153.
- SILVA S R, KENDALL C, WILKISON D H, *et al*, 2000. A new method for collection of nitrate from fresh water and the analysis of nitrogen and oxygen isotope ratios [J]. *Journal of Hydrology*, 228(1/2): 22-36.
- SONG G D, LIU S M, MARCHANT H, *et al*, 2013. Anammox, denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium in the East China Sea sediment [J]. *Biogeosciences*, 10(11): 6851-6864.
- STANGE C F, SPOTT O, APELT B, *et al*, 2007. Automated and rapid online determination of ¹⁵N abundance and concentration of ammonium, nitrite, or nitrate in aqueous samples by the SPINMAS technique [J]. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 43(3): 227-236.
- TU Y, FANG Y T, LIU D W, *et al*, 2016. Modifications to the azide method for nitrate isotope analysis [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 30(10): 1213-1222.
- VAN KESSEL M A H J, SPETH D R, ALBERTSEN M, *et al*, 2015. Complete nitrification by a single microorganism [J]. *Nature*, 528(7583): 555-559.
- XING M, LIU W G, 2011. An improved method of ion exchange for nitrogen isotope analysis of water nitrate [J]. *Analytica Chimica Acta*, 686(1/2): 107-114.
- YIN G Y, HOU L J, LIU M, *et al*, 2014. A novel membrane inlet mass spectrometer method to measure ¹⁵NH₄⁺ for isotope-enrichment experiments in aquatic ecosystems [J]. *Environmental Science & Technology*, 48(16): 9555-9562.
- ZHANG X N, WARD B B, SIGMAN D M, 2020. Global nitrogen cycle: critical enzymes, organisms, and processes for nitrogen budgets and dynamics [J]. *Chemical Reviews*, 120(12): 5308-5351.

DETERMINATION OF $^{15}\text{NO}_3^-$ IN ^{15}N -ENRICHED WATER SAMPLES BASED ON DOUBLE REDUCTION SYSTEM IN MEMBRANE INJECTION MASS SPECTROMETRY

LUO Chang^{1,2,3}, SONG Guo-Dong^{1,2}, LIU Su-Mei^{1,2}

(1. *Frontiers Science Center of Deep Ocean Multispheres and Earth System/Key Laboratory of Marine Chemistry Theory and Technology, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266100, China*; 2. *Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266237, China*; 3. *College of Chemistry and Chemical Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China*)

Abstract The nitrogen cycle in the ocean is one of the hot fields of marine biogeochemistry, and nitrification process is a key part of the nitrogen cycle. Accurate acquisition of nitrification rate is very important to understand marine nitrogen cycle. The ^{15}N labeled isotope technique is currently the most widely used method for determining the rate of nitrification in the world. The core of the method is to accurately determine the concentrations of $^{15}\text{NO}_2^-$ and/or $^{15}\text{NO}_3^-$ in the ^{15}N -enriched sample. However, the current methods generally have problems of long test time, high cost, large sample volume, and high detection limit. A robust and fast method was developed to determine the $^{15}\text{NO}_3^-$ concentration in the ^{15}N -enriched sample with the double reduction system of cadmium column reduction and sulfamic acid (SA). All the $^{15}\text{NO}_3^-$ is converted to $^{29}\text{N}_2$ and the $^{29}\text{N}_2$ can be easily measured by membrane injection mass spectrometer (MIMS) with low cost and small volume. The specific method determined by the condition optimization experiment is: first, the 15 mmol/L SA (dissolved in 1 mol/L HCl) as the reaction reagent remove the original NO_2^- , $^{15}\text{NO}_3^-$ is reduced by a cadmium column, and the 15 mmol/L SA (dissolved in 1 mol/L HCl) is added to the solution with a reagent: sample = 1 : 60 (V/V). The produced $^{29}\text{N}_2$ can be measured by MIMS, and the original concentration of $^{15}\text{NO}_3^-$ can be derived from the signal of $^{29}\text{N}_2$. The method has a detection limit of 0.05 $\mu\text{mol/L}$ for $^{15}\text{NO}_3^-$, a linear range of 0~40 $\mu\text{mol/L}$, and a precision of 0.3% (at 10 $\mu\text{mol/L}$), with no salt effect. The potential oxidation rates of $^{15}\text{NH}_4^+$ and $^{15}\text{NO}_2^-$ in the 0-10 cm layer of the sandy sediment of Qingdao Shilaoren were 0.08~0.17 nmol N/(cm³·h) and 0.53~1.56 nmol N/(cm³·h) with the method, respectively. The established method in this study can be applied to determine the potential rate of nitrification in sediments.

Key words ^{15}N enriched sample; nitrification; sulfamic acid; membrane injection mass spectrometry