

文章编号:1003-8701(2010)02-0019-05

土壤酸水解氨基酸和氨基糖态氮 测定方法的比较研究

刘延美,刘小虎*

(沈阳农业大学土地与环境学院/辽宁省农业资源与环境重点实验室,沈阳 110161)

摘要:对3种不同土壤(黑土、棕壤、红壤)用 $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{HCl}$ 水解后,分别采用Bremner蒸馏法与色谱法测定土壤中氨基糖态氮、氨基酸态氮的含量。结果表明,对于土壤氨基糖态氮,Bremner蒸馏法和色谱法测定结果和精密度无显著差异,但对于黑土和棕壤中的氨基酸态氮,色谱法的检测更为完全,且有较高的精密度。利用色谱法可实现土壤中各种氨基糖和氨基酸分离和定量化,对深入研究土壤中氮的来源及转化具有十分重要的意义。

关键词: Bremner蒸馏法;色谱法;氨基糖态氮;氨基酸态氮;土壤

中图分类号:S158.2

文献标识码:A

Comparison of Methods for Determining the Content of Hydrolyzed Amino sugar-N and Amino acid-N in Soil

LIU Yan- mei, LIU Xiao- hu

(College of Land and Environment Science, Shenyang Agricultural University/Key Laboratory of Agricultural Resource and Environment in Liaoning Province, Shenyang 110161, China)

Abstract: The content of amino sugar- N and amino acid- N in three types of soil (black soil, brown soil and red soil) was determined by Bremner method and chromatography detection after being hydrolyzed in $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{HCl}$. The results showed that there was no significant difference in both the content and the variation between the two methods for the determination of amino sugar- N in soil. However, the content of amino acid- N in black soil and brown soil detected by liquid chromatography was significantly higher than that by Bremner method, and furthermore, less variation was found in liquid chromatography determination. The individual amino acids and amino sugars can be separated and identified in chromatography determination and this is essential to investigate the source and the transformation of soil nitrogen.

Keywords: Bremner method; Chromatography detection; Amino sugar- N; Amino acid- N; Soil

有机形态氮是土壤氮素的主要存在形式,其含量占土壤全氮的95%以上。它不仅影响微生物的活性和营养元素的有效性,同时也是交换性铵和硝态氮的源和汇,在土壤-植物系统氮素转化循环过程中扮演着重要角色。土壤有机

氮的组成十分复杂且功能各异,为此,Bremner于1965年建立了测定土壤有机态氮素组分的方法并一直沿用至今。在该方法中,酸水解有机氮组分主要被分为氨基酸态氮、氨基糖态氮、未知水解态氮和残渣态氮。利用蒸馏法测定化合物中氮含量是Bremner方法的核心,因而能获得氨基酸和氨基糖态氮的总量。但是,由于化学性质存在差异,不同种类的氨基酸和氨基糖对土壤氮素循环的贡献有所不同,仅了解对其氮素总量无法得出更科学更严谨的结论。近年来,色谱技术以其有效

收稿日期:2010-02-02

基金项目:国家自然科学基金项目(40871149)

作者简介:刘延美(1983-),女,硕士研究生,主要从事植物营养与土壤肥力研究。

通讯作者:刘小虎 男 博士 教授 E-mail:liuxiaohu-mail@163.com

分离,准确度和灵敏度高而越来越多地被应用于土壤氨基酸、氨基糖的测定中。但是,由于定量原理不同,对蒸馏法和色谱法测定之间尚缺乏比较研究。利用 6-氨基喹啉基-N-羟基琥珀酰亚氨基甲酸酯衍生-高效液相色谱法测定,可实现土壤中 15 种氨基酸的分离和定量,因操作简便和衍生定量化而被广泛应用;利用醛糖脎乙酸酯衍生-气相色谱法测定,可实现土壤中氨基葡萄糖(GluN)、氨基半乳糖(GalN)、甘露糖胺(ManN)和胞壁酸(MurN)的分离和定量。因而,本研究将分别利用 Bremner 酸水解-蒸馏法与色谱法测定 3 种不同土壤中氨基糖态氮和氨基酸态氮的含量并进行比较分析,以其为土壤中各种有机氮组分准确定量提供可靠的技术手段。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

半微量定氮蒸馏装置、50 mL 硬质开氏瓶、PHS-3B 型 pH 计、Agilent HP 6890 气相色谱仪、N-N 型旋转蒸发仪、FD-1 型冷冻干燥仪、Reacti-Therm III 型精密加热器、TDL-5-A 和 TGL-16G 离心机、DHG-9123A 型烘箱等。

酸水解蒸馏法中的试剂均为分析纯;色谱法中所用标准试剂如氨基葡萄糖、氨基半乳糖、氨基甘露糖和胞壁酸、肌醇(内标),含有 18 种氨基酸的标准液及其 2-氨基丁酸(内标)均购自 Sigma-Aldrich 公司,衍生试剂盐酸羟胺、4-二甲氨基吡啶从 Sigma-Aldrich 公司购买,二氯甲烷、乙酸乙酯、正己烷和无水甲醇从 Dikma 公司购买,吡啶、盐酸和乙酸酐均为分析纯。

1.2 供试土壤

选择不同有机质水平的 3 种土壤(0~20 cm)进行实验。其中,黑土采自吉林省公主岭市国家黑土肥力与肥料效益长期定位监测基地,无任何处理;棕壤采自辽宁省沈阳市棕壤长期肥料定位试验站;红壤采自江西省南昌市江西农业大学农学实验基地,为低产旱田土壤。土样均在室温下风干备用。供试土壤的基本理化性质见表 1。

1.3 土壤样品分析

表 1 供试土壤基本理化性质

土壤类型	采样地点	有机碳 (g·kg ⁻¹)	全氮 (g·kg ⁻¹)	pH
黑土	北纬 43° 36' 东经 124° 40'	12.51	1.22	6.10
棕壤	北纬 41° 49' 东经 123° 34'	9.10	1.09	6.00
红壤	北纬 28° 46' 东经 115° 50'	7.68	0.79	5.50

1.3.1 酸水解-蒸馏测定土壤氨基酸和氨基糖

态氮

①水解液的制备:准确称取约含 5 mg N 的土壤样品(小于 100 目)于水解瓶中,加入 10 mL 6 mol·L⁻¹ HCl,105℃下水解 12 h。水解完毕后过滤水解混合物,中和滤液至 pH 6.5±0.1 并容至 50 mL 容量瓶。

②氨基酸态氮的测定:取 5 mL 中和过的水解液于开氏瓶中,加 1 mL 0.5 mol·L⁻¹ NaOH,置于沸水中加热,使样品蒸发至剩余 2~3 mL。冷却后,加 0.50 g 柠檬酸和 0.01 g 茚三酮,使开氏瓶球部完全浸于沸水中加热,1 min 后,在沸水中震荡开氏瓶数秒,继续保持开氏瓶于沸水中 9 min。冷却后,用 10 mL 磷酸盐-硼酸盐缓冲液将开氏瓶中的样品洗入蒸馏装置,加 1 mL 5 mol·L⁻¹ NaOH,蒸馏,当馏出液达接收三角瓶(体积 100 mL,加有 5 mL 硼酸-指示剂)的 35 mL 标线时,停止蒸馏,以 0.005 mol·L⁻¹ 硫酸标准液滴定馏出液由绿色至弱淡红色。另作空白实验。

③氨态氮的测定:取 10 mL 中和过的水解液于蒸馏装置,加入 0.07±0.01 g MgO,蒸馏,当馏出液达接收三角瓶(体积 100 mL,加有 5 mL 硼酸-指示剂)的 20 mL 标线时,停止蒸馏,滴定同上。另作空白实验。

④氨及氨基糖态氮的测定:取 10 mL 中和过的水解液于蒸馏装置,加入 10 mL 磷酸盐-硼酸盐缓冲液当馏出液达接收三角瓶(体积 100 mL,加有 5 mL 硼酸-指示剂)的 35 mL 标线时,停止蒸馏,滴定同上。另作空白实验。

⑤氨基糖态氮的测定:氨及氨基糖态氮的测定值减去氨态氮的测定值。每种土壤样品的测定过程均重复 5 次。

⑥结果计算: $w(N)=c \times (v-v_0) \times M \times t_s \times 1000/m$

其中 $w(N)$ 为土壤中某种有机氮的质量 mg·kg⁻¹, v 为样品滴定硫酸标准液的体积, mL; v_0 为空白滴定硫酸标准液的体积, mL; M 为氮的摩尔质量, $M(N)=14$ g·mol⁻¹; t_s 为分取倍数; m 为土壤样品质量, g。

1.3.2 色谱测定土壤氨基酸和氨基糖

①氨基酸的测定:准确称取约含 0.2 mg N 的土壤样品(小于 60 目)置于水解瓶中,加 10 mL 6 mol·L⁻¹ HCl,105℃下水解 12 h。冷却至室温后,加入 100 μL 2.5 mmol·L⁻¹ L-2-氨基丁酸,振荡均匀后过滤。滤液用旋转蒸发仪蒸干,用 4 mL 0.05 mol·L⁻¹ HCl 溶解。将溶液转移至样品纯化柱中,利用阳离子交换树脂(Dowex 50WX8,100-200

目)进行纯化,树脂用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 草酸(pH 1.6~1.8)淋洗 5 次以除去土壤中 铁、铝等金属离子,每次用量 5 mL;然后,向树脂柱中先后加入 5 mL $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 和 5 mL 去离子水,淋洗液弃去。利用 25 mL $2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 洗脱氨基酸,每次用 5 mL,将各次洗脱液接收合并后,利用旋转蒸发仪蒸发至干。将干燥后样品用 4 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶解,离心 15 min ($4\ 200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$),将上清液倒入 5 mL 反应瓶中进行冷冻干燥(8 h 以上)。将干燥好的样品用 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶解。移取 $10 \mu\text{L}$ 上述土壤样品溶液 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 含有 17 种氨基酸和内标物的混合标准溶液放入 6 mm \times 50 mm 样品管底部,加入 $110 \mu\text{L}$ 硼酸盐缓冲溶液,涡旋混合 10 s 后,将 $15 \mu\text{L}$ AQC 衍生试剂溶液边涡旋边加入到样品管中,用封口膜密封样品管,室温放置 1 min,于 55°C 加热 20 min,取出冷却至室温,移至进样瓶中,即可进行高效液相色谱的测定。

② 氨基糖的测定:准确称取约含 4 mg 有机碳(不少于 0.3 mg N)的土壤样品置于水解瓶中,加 10 mL $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl, 105°C 下水解 8 h。冷却至室温后,加入 $100 \mu\text{L}$ $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 肌醇溶液(内标)振荡摇匀后过滤。滤液用旋转蒸发仪蒸干,残余物溶解于 20 mL 蒸馏水中,并用 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KOH 调 pH 至中性(pH 6.6~6.8),然后以 $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 去除沉淀。上清液用冷冻干燥仪冻干后,残留的固体物质用 3 mL 无水甲醇溶解,再次离心 10 min 以除去盐分。将上清液转移到 5 mL 衍生瓶中,用 N_2 在 45°C 下吹干,加入 1 mL 水。然后再次进行冷冻干燥(8 h 以上)。向上述衍生瓶中加入 $300 \mu\text{L}$ 衍生试剂,加盖密封,在 $75\sim 80^\circ\text{C}$ 条件下加热 30 min,其间振荡数次。冷却至室温后,加入 1 mL 乙酸酐,密封再次加热 20 min。冷却后加入 1.5 mL 的二氯甲烷。过量的衍生试剂通过以下两步来去除:首先,加入 1 mL $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl,激烈振摇 30 s 后,移走上层液体。其次,与上面步骤相同,用 1 mL 的蒸馏水洗 3 次,在最后一次洗涤过程中尽可能去除水相。剩余的有机相在 45°C 下用 N_2 吹干后,用 $200 \mu\text{L}$ 的乙酸乙酯-正己烷混合溶剂(V:V=1:1)溶解后转移至进样瓶中,即可进行气相色谱测定。每种土壤样品的测定过程均重复 5 次。

③ 结果计算 $m_r = m_s \times R_f \times (A_r/A_s)$

$$w(\text{N}) = \sum m_r \times \text{N}\%$$

其中 A_r 、 A_s 分别为供试品和内标物质的峰面

积, m_r 、 m_s 分别为被测样品中每种氨基酸(糖)的量和加入内标物质的量, $w(\text{N})$ 为土壤中某种有机氮的质量分数, $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $\text{N}\%$ 为每种氨基酸(糖)含氮百分数。

2 结果与讨论

2.1 土壤酸水解氨基酸态氮、氨基糖态氮的测定结果比较

利用酸水解-蒸馏法和色谱法测定的土壤氨基酸和氨基糖态氮含量如表 2 所示。其中,酸水解-蒸馏法测得的 3 种土壤中氨基酸态氮平均含量分别为 $400.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $371.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $222.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 分别占土壤全氮量的 32.8%、34.1% 和 28.2%; 色谱法测得的 3 种土壤中氨基酸态氮平均含量分别为 $436.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $407.7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $233.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 分别占土壤全氮量的 35.8%、37.4% 和 29.5%。由此可见,氨基酸态氮是土壤有机质酸解产物中主要可鉴别的含氮化合物,约占有机氮总量的 20%~50%。利用色谱法测得的黑土和棕壤中氨基酸态氮含量显著高于蒸馏法,增加比例可达 5%~8%。这主要是由于色谱法能检测出土壤中多种类型的氨基酸并能将每一种氨基酸定量,尤其是碱性氨基酸和杂环氨基酸,而酸水解-蒸馏法中,茚三酮可与 α -氨基酸和仲胺氨基酸反应,但与氨基酸中其他形态氮的作用较小,因此测量结果偏低。进一步利用精氨酸(除含有伯胺和仲胺基团外,还含有胍基氮)采用标准加入法测定蒸馏法回收率发现,精氨酸氮的回收率低于 70%,表明茚三酮对氨基酸中伯胺和仲胺的选择性是造成测定结果偏低的重要原因。

表 2 3 种不同土壤中氨基糖态氮、氨基酸态氮的含量及变异系数

土壤样品	氨基糖态氮($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)		氨基酸态氮($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	
	酸水解-蒸馏法	色谱法	酸水解-蒸馏法	色谱法
黑土	92.3 (6.8)*	85.5 (7.6)	400.6 (4.6)	436.2 (1.2)
棕壤	87.4 (7.9)	79.5 (6.8)	371.9 (3.7)	407.7 (2.1)
红壤	59.4 (7.1)	61.1 (8.8)	222.8 (6.7)	233.1 (4.1)

* 括号内数字为变异系数。

酸水解-蒸馏法测得的 3 种土壤中氨基糖态氮平均含量分别为 $92.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $87.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $59.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 分别占土壤全氮量的 7.6%、7.7% 和 7.5%; 色谱法测得的 3 种土壤中氨基糖态氮平均含量分别为 $85.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $79.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $61.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 分别占土壤全氮量的 7.0%、7.3% 和 7.7%。两种方法测得的氨基糖态氮含量无显著差异,均占有有机氮总量的 5%~10%,与文献报道范围一致。

如表 2 所示,在土壤氨基酸态氮的测定中,酸水解-蒸馏法的变异系数在 4.6%~6.7%之间,而色谱法的在 1.2%~4.1%之间;在土壤氨基糖态氮的测定中,酸水解-蒸馏法的标准偏差在 6.8%~7.9%之间,而色谱法的在 7.6%~8.8%之间。因此,对于土壤氨基糖态氮的测定,两种方法的精密度和准确度相当;而对于土壤氨基酸态氮的测定,色谱法的精密度和准确度均高于酸水解-蒸馏法。

这可能是由于土壤样品成分比较复杂,需要较多的处理过程,而在色谱法的测定中均采用了内标法,有效地消除系统误差和样品损失所带来的误差,增加了实验的精密度和准确度。因此,利用色谱法测定土壤氨基酸和氨基糖含量对于不同性质、不同有机质含量的土壤均有广泛的适用性。

2.2 不同土壤中氨基糖、氨基酸的分布规律

已有研究表明,土壤中的氨基糖主要来源于微

表 3 3 种不同土壤中氨基糖的分布

土壤样品	氨基糖(mg·kg ⁻¹)				
	氨基葡萄糖	氨基甘露糖	氨基半乳糖	胞壁酸	总量
黑土	617.5	29.3	316.0	77.0	1096.4
棕壤	644.3	28.2	269.7	70.4	1019.2
红壤	463.8	20.1	141.5	78.5	783.1

生物。在目前被定量的 4 种土壤氨基糖中,氨基葡萄糖主要来源于真菌,氨基半乳糖和甘露糖主要是细菌的产物,胞壁酸唯一来源于细菌,因而氨基葡萄糖与氨基半乳糖或胞壁酸的比值常用来指示微生物在土壤有机质转化过程中的相对贡献。色谱法测得的 3 种不同土壤的氨基糖中(表 3),氨基葡萄糖和氨基半乳糖的含量较高,分别约占氨基糖总量的 56.3%~63.2%和 18.1%~28.8%,且在不同土壤中含量变化较大,而胞壁酸和氨基甘露糖的含量则较低,分别占氨基糖总量的 7.6%~20.1%和 2.6%~2.8%,而其含量在不同土壤之间无显著变化。

表 4 3 种不同土壤中氨基酸的分布

氨基酸(mg·kg ⁻¹)	土壤样品			
	黑土	棕壤	红壤	
酸性氨基酸	天冬氨酸	281.6	217.0	76.2
	谷氨酸	256.1	226.7	100.8
	总和	537.7	443.7	177.0
碱性氨基酸	组氨酸	67.5	73.1	62.1
	精氨酸	361.1	370.2	130.0
	赖氨酸	259.2	210.8	166.3
	总和	687.8	654.1	358.4
中性氨基酸	丝氨酸	24.0	37.9	61.4
	甘氨酸	277.5	270.8	130.6
	苏氨酸	178.1	180.0	71.2
	丙氨酸	194.3	159.9	107.2
	脯氨酸	148.2	124.3	93.1
	酪氨酸	197.3	173.0	122.3
	缬氨酸	150.7	77.8	135.7
	异亮氨酸	81.0	62.9	49.6
	亮氨酸	143.2	118.0	98.4
	苯丙氨酸	179.7	145.0	111.2
	总和	1 574.0	1 349.6	980.7
氨基酸总量	2 799.5	2 447.4	1 516.1	

除胱氨酸外,色谱法可以检测出土壤中 15 种氨基酸(表 4)。根据 -NH₂、-COOH 基团的相对分布,可把氨基酸分为酸性氨基酸(天冬氨酸、谷氨酸)、碱性氨基酸(组氨酸、精氨酸、赖氨酸)和中性氨基酸(丝氨酸、甘氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸、酪氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸) 3

类,其中以中性氨基酸所占比例最大,其次为碱性和酸性氨基酸。在 3 种不同土壤中,中性氨基酸所占比例平均分别为 57.8%(黑土)、56.6%(棕壤)、64.7%(红壤),碱性氨基酸所占比例平均分别为 23%、25.3%和 23.6%,酸性氨基酸所占比例平均分别为 19.2%、18.1%和 11.7%。显然,黑土和棕壤中氨基酸分布无显著性差异,但红壤中中性氨基酸含量显著增加,而酸性氨基酸含量显著降低。

3 结 论

对于土壤氨基糖态氮含量, Bremner 蒸馏法和色谱法测定结果和精密度无显著差异,但对于黑土和棕壤中土壤氨基酸态氮,色谱法的检测更为完全,且有较高的精确度和准确度。利用色谱法可实现土壤中各种氨基糖和氨基酸的分离和定量,对深入研究土壤中氮的来源及转化具有十分重要的意义。

参考文献:

- [1] 孙成斌. 什么形态的氮容易被作物吸收[J]. 化学教育, 2002 (5): 3-5.
- [2] 徐阳春, 沈其荣, 等. 长期使用有机肥对土壤及不同粒级中酸解有机氮含量与分配的影响[J]. 中国农业科学, 2002, 35(4): 403-409.
- [3] 孙敬, 侯松岷, 何红波, 等. 土壤中氨基酸分析方法的研究进展[J]. 化学研究与应用, 2007, 19(1): 17-23, 28.
- [4] Stevenson F J. Isolation and identification of amino sugars in soils [J]. Soil Science Society of America Journal, 1983, 47: 61-65.
- [5] Zhang X, Amelung W. Gas chromatographic determination of muramic acid, glucosamine, galactosamine, and mannosamine in soil [J]. Soil Biol. Biochem. 1996, 28(9): 1201-1206.
- [6] Gieseking J E. Soil Components Vol 1, Organic Components. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1975: 284-286.
- [7] 侯松岷, 等. AQC 柱衍生反相高效液相色谱法测定土壤中氨基酸[J]. 分析化学, 2006, 34(10): 1395-1400.

- [8] 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, 2000:191-196.
- [9] Amelung W, Miltner A, Zhang X, Zech W. Fate of microbial residues during litter decomposition as affected by minerals [J]. *Soil Science*, 2001, 66:598-606.
- [10] Amelung W, Zhang X. Determination of amino acid enantiomers in soils [J]. *Soil Biol. Biochem.*, 2001, 33:553-562.
- [11] 侯松岷. 土壤氨基酸微生物转化过程研究[D]. 中国科学院沈阳应用生态研究所, 2007, 博士学位论文.
- [12] 何红波, 等. 测定土壤氨基糖和氨基酸手性异构体中氮同位素比值的气相色谱/质谱方法 [J]. *土壤学报*, 2009, 55(3): 289-298.
- [13] Campbell C A, Sohnitzer M, Lafond G P, Zentner R P, Knipfel J E. Thirty year crop rotations and management practices effects on soil and amino nitrogen [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1991, 55(3):739-745.
- [14] Stevenson F J. Organic forms of soil nitrogen [M]. In: Stevenson F J. ed. *Nitrogen in Agricultural Soils*. Am. Soc. of Agron. Inc. Madison, Wis. USA. 1982:67-122.