



中华人民共和国国家标准

GB/T ×××××—××××

土壤质量 土壤与生物样品中有机碳和全氮含量与碳、氮同位素比值的质谱分析方法

Soil quality Methods of Mass Spectrometric Analysis of Contents and Carbon\Nitrogen Isotope Ratios of Organic Carbon and Total Nitrogen in Soil and Biological Samples

(征求意见稿)

2021. 8. 8

××××—××—××发布

××××—××—××实施

国家市场监督管理总局
中国国家标准化管理委员会

发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由中华人民共和国农业农村部提出。

本文件由全国土壤质量标准化技术委员会（SAC/TC 404）归口。

本文件起草单位：中国科学院南京土壤研究所、中国科学院城市环境研究所、中国科学院亚热带农业生态研究所、南京师范大学地理科学学院、上海交通大学、北京科荟测试技术有限公司和江苏省质量和标准化研究院。

本文件主要起草人：曹亚澄、王曦、孙晓丽、孙德玲、张晗、袁红朝、温腾、张莉、杨禄、戴沈艳、贺珍、魏来、杨帆、张姗姗、查明霞、吴杰。

本文件为首次制定。

土壤质量 土壤与生物样品中有机碳和全氮含量与碳、氮同位素比值的质谱分析方法

1 范围

本文件描述了利用元素分析-稳定同位素比值质谱联用仪(EA-IRMS)测定土壤与生物样品中有机碳和全氮含量与碳、氮同位素比值($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)的方法。

本文件适用于土壤与生物样品中有机碳和全氮含量的测定,同时适用于非标记和示踪试验(^{13}C atom.% $\leq 30\%$; ^{15}N atom.% $\leq 30\%$)的土壤与生物样品中有机碳、全氮的碳、氮同位素比值测定。

本文件测定有机碳和全氮含量与碳、氮同位素比值的方法最低检测限(以绝对样品量计): C: 30 μg ; N: 50 μg 。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6379.2 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度)第2部分:确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法

GB/T 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 符号和缩略语

下列符号和缩略语适用于本文件。

Air: 为大气氮(Air),是氮稳定同位素比值的国际基准物质。

EA-IRMS: 元素分析-稳定同位素比值质谱联用仪(Elemental Analyzer-Isotope Ratio Mass Spectrometer),是一种碳、氮自动分析仪通过专用接口与稳定同位素比值质谱仪相连接的联用仪器,用于测定固体土壤与生物样品中碳、氮元素的含量和稳定同位素比值。

VPDB: 为维也纳-PeeDee 箭石(Vienna Pee Dee Belemnite),是稳定碳同位素比值的国际基准物质。

$\delta^{13}\text{C}$: 为样品的稳定碳同位素比值相对于参比物质的稳定碳同位素比值的千分差。

$\delta^{15}\text{N}$: 为样品的氮稳定同位素比值相对于参比物质的氮稳定同位素比值的千分差。

^{13}C atom%: 为碳元素中 ^{13}C 原子数占总的碳原子($^{12}\text{C}+^{13}\text{C}$)的百分数,即为 ^{13}C 的原子百分数(atom% ^{13}C)。

GB/T ×××××—××××

$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$: 为稳定碳同位素比, 是稳定碳同位素 ^{13}C 和 ^{12}C 的丰度之比。

^{15}N atom%: 为被测定样品的 ^{15}N 丰度的表达式, 即 100 个氮原子中含有 ^{15}N 原子的百分数。使用标记 ^{13}C 和 ^{15}N 物质示踪试验样品的同位素质谱测定结果都应以 atom% 表示。

$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$: 为氮稳定同位素比, 是稳定氮同位素 ^{15}N 与 ^{14}N 的丰度之比。

5 原理

装有土壤或生物样品的锡杯在元素分析仪中闪燃。样品中的有机碳和氮元素分别转化为 CO_2 和 N_2 。产生的 CO_2 和 N_2 随载气进入同位素比值质谱仪中, 通过对应质荷比离子流 (CO_2 (有机碳): $m/z44 [^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}]^+$ 、 $m/z45 [^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}]^+$; N_2 (全氮): $m/z28 [^{14}\text{N}^{14}\text{N}]^+$ 和 $m/z29 [^{14}\text{N}^{15}\text{N}]^+$) 的相对强度得到样品有机碳和全氮的碳、氮稳定同位素比值, 并根据元素分析仪中的 TCD 信号得到样品的有机碳和全氮含量。

6 试剂和材料

除非另有说明, 所用试剂均为分析纯, 实验用水应符合 GB/T 6682-2008 中二级水的要求。

- 6.1 氧化管: 石英棉、三氧化二铬和镀银氧化钴 (或银丝和氧化铜)。
- 6.2 还原管: 石英棉和高纯还原铜。
- 6.3 化学阱: 高氯酸镁 $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$, 烧碱 (测定氮元素时用于去除 CO_2)。
- 6.4 8mm×5mm 锡杯和 96 孔板。
- 6.5 盐酸 ($6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HCl}$)。
- 6.6 氦气 (He): 纯度 $\geq 99.999\%$ 。
- 6.7 氧气 (O_2): 纯度 $\geq 99.999\%$ 。
- 6.8 二氧化碳 (CO_2) 参比气体: 纯度 $\geq 99.999\%$, 并用碳同位素有证标准物质标定其碳同位素比值。
- 6.9 氮 (N_2) 参比气体: 纯度 $\geq 99.999\%$, 并用氮同位素有证标准物质标定其碳同位素比。
- 6.10 参比物质: 可选择国际原子能机构或全国标准物质管理委员会认定/认可的参考物质, 参见附录 A。

7 仪器与设备

- 7.1 EA-IRMS: 元素分析-稳定同位素比值质谱联用仪, 稳定同位素质谱带有万用三杯, 连续流模式。
- 7.2 分析天平: 感量 0.01g。
- 7.3 百万分之一天平: 感量 0.001mg。
- 7.4 pH 计: 测量范围: pH 0 ~ pH 14。
- 7.5 烘箱: $70 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

8 分析步骤

8.1 土壤和植物样品的制备

土壤样品：取适量的风干土样（总量不得少于 20 克）于研磨机中研磨，使之全部通过 0.15 mm 筛，混合均匀后备用。

如土壤样品中含有无机碳需在分析前去除无机碳。取约 5 g 研磨后的土壤样品置于锥形瓶中，加入 20 mL 6 mol·L⁻¹的 HCl 溶液浸泡 48 h，直至无 CO₂ 气体冒出，再用去离子水反复冲洗酸化后的样品至 pH 为 7，然后在 70 °C 下烘干备用。

植物或生物样品：取适量经杀青、烘干的植物样品（总量不得少于 2 克），用植物粉碎机粉碎，使之全部通过 0.25 mm 筛，混合均匀后在避光、干燥环境下保存备用。在称取前应置于 70 °C 下干燥 18 h。

8.2 分析样品的称取

测定有机碳及碳同位素比值：准确称取土壤样品 2 mg~3.5 mg，或植物样品 0.2 mg~0.3 mg（约含 30 μg-C~50 μg-C）。

测定全氮及氮同位素比值：准确称取土壤样品约 10 mg~50 mg，或植物样品约 2 mg~3.5 mg，或生物样品（动物、微生物等）约 0.2 mg 左右（约含 50 μg-N~80 μg-N）。

小心地将粉末样品放入锡杯中并紧密包裹成小球状，并按样品编号依次放进 96 孔板内备用。

8.3 参比气体的标定

分别配备一瓶 CO₂ 和一瓶 N₂ 作为参比气体，气体纯度≥99.999%。在 EA-IRMS 上，选择两种以上国际原子能机构或国家标准物质管理委员会认定/认可的参考物质进行标定，获得参比气体的稳定同位素比值（CO₂：δ¹³C_{V-PDB}；N₂：δ¹⁵N_{Air}）。

8.4 元素分析仪参考参数

元素分析仪参数设定如下：

——氧化炉温度：1020 °C。

——还原炉温度：680 °C。

——载气流速：100 mL·min⁻¹。

——氧气流速：175 mL·min⁻¹。

——注氧时间：3 s。

8.5 测定

8.5.1 仪器准备

8.5.1.1 EA-IRMS 稳定性检查：连续测定同一个参比物质，三次测量结果（δ¹³C 或 δ¹⁵N）的标准偏差≤0.3‰为合格。

8.5.1.2 EA-IRMS 线性检查：连续测定不同质量的同一个参比物质，三次测量结果的标准偏差≤0.3‰为合格。

8.5.1.3 EA-IRMS 回归检查：连续测定三种不同的参比物质，每种参比物质连续测定三次，分别测定后对比测定值（ $\delta^{13}\text{C}$ 或 $\delta^{15}\text{N}$ ）和给定值（ $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ 或 $\delta^{15}\text{N}_{\text{Air}}$ ），测定值与给定值的线性相关系数 $R^2 \geq 0.99$ 为合格。

8.5.2 样品分析

样品置于 EA-IRMS 的进样盘中，待仪器稳定后，按 8.4 中的条件进行样品分析，并按照仪器说明书的要求进行质谱信号的检测和积分。

8.5.3 分析序列

采用两点标准漂移校正模式安排分析序列，测试序列的开始和结束各测定3次参考物质，序列中每隔10次测试后应再次测定参考物质。

9 计算

9.1 自然丰度样品测定结果的计算

9.1.1 自然丰度样品测定结果的表述

自然丰度样品的碳（氮）同位素组成以其对参比物质中相应同位素比值的千分差（记为‰）表示，按公式（1）计算：

$$\delta^m X\text{‰} = \frac{R_{SA} - R_{ST}}{R_{ST}} \times 1000 \dots\dots\dots (1)$$

式中：

$\delta^m X\text{‰}$ ——样品的同位素比值测定值相对于参比物质的同位素比值测定值的千分差；

R_{SA} ——样品的同位素比值的测定值；

R_{ST} ——参比物质的同位素比值的测定值。

结果保留两位小数。

9.1.2 测定结果的计算和校准

所有样品中稳定同位素比值的测定结果需校准到国际基准物质的值上，按公式（2）或（3）计算并校准至国际基准（C：VPDB；N：Air）的值：

$$\delta^{13}C_{SA-VPDB} = \delta^{13}C_{SA-ST} + \delta^{13}C_{ST-VPDB} + \frac{\delta^{13}C_{SA-ST} \cdot \delta^{13}C_{ST-VPDB}}{1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

$\delta^{13}C_{SA-VPDB}$ ——样品的 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 测定值相对于VPDB的 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 测定值的千分差；

$\delta^{13}C_{SA-ST}$ ——样品的 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 测定值相对于参比物质 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 测定值的千分差；

$\delta^{13}C_{ST-VPDB}$ ——同位素标准物质的 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 测定值相对于VPDB的千分差。

结果保留两位小数。

$$\delta^{15}N_{SA-Air} = \delta^{15}N_{SA-ST} + \delta^{15}N_{ST-Air} + \frac{\delta^{15}N_{SA-ST} \cdot \delta^{15}N_{ST-Air}}{1000} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

$\delta^{15}N_{SA-Air}$ ——样品的 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 测定值相对于Air的 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 测定值的千分差；

$\delta^{15}N_{SA-ST}$ ——样品的 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 测定值相对于参比物质 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 测定值的千分差；

GB/T ×××××—××××

$\delta^{15}\text{N}_{\text{ST-Air}}$ ——同位素标准物质的 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 测定值相对于Air的千分差。

结果保留两位小数。

9.2 富集同位素样品测定结果的计算

富集同位素样品的稳定同位素组成均以原子百分数（记为 atom%）表示，按公式（4）计算：

$$\text{AT}^m\text{X}\% = \frac{m\text{X原子数}}{m\text{X原子数} + m-1\text{X原子数}} \times 100 \dots\dots\dots (4)$$

式中：

$\text{AT}^m\text{X}\%$ ——样品中的重质量稳定同位素的丰度，如 ^{13}C atom% 或 ^{15}N atom%；

^mX ——代表重质量的稳定同位素，例如 ^{13}C 或 ^{15}N ；

^{m-1}X ——代表轻质量的稳定同位素，例如 ^{12}C 或 ^{14}N 。

结果保留三位有效数字。

10 测定结果的精密度

数据的精密度按照GB/T 6379.2的规定确定，重复性和再现性的值以95%的可信度计算。

10.1 重复性

在重复性条件下，获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限（ r ）。本标准四个参数的重复性限（ r ）请见下表。

如果差值超过重复性限（ r ），应当舍弃本次试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

10.2 再现性

在再现性条件下，获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限（ R ）。本标准四个参数的再现性限（ R ）请见下表。

表 1 各测定参数的重复性限（ r ）和再现性限（ R ）

测定项目	OC (%)	^{13}C atom (%)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ (‰)	TN (%)	^{15}N atom (%)	$\delta^{15}\text{N}_{\text{Air}}$ (‰)
r	0.253	0.014	0.203	0.044	0.002	0.096
R	0.674	0.021	0.521	0.077	0.006	0.188

11 质量保证、控制和注意事项

11.1 空白试验

每次试验前应做空白试验，空白的 $m/z44$ 或 $m/z28$ 峰的信号值应小于 100 mV。

11.2 平行和质量控制试验

测试每批样品应测定10%的平行样品和10%的参考物质。平行样品测定结果的绝对差值应满足条款（10）的规定。

附录 A
(资料性)
参考物质

表A.1 参考物质示例

参考物质编号	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} / \delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}} (\text{‰})$	认定认可机构
GBW04407	C: -22.43	全国标准物质管理委员会
GBW04408	C: -36.91	全国标准物质管理委员会
USGS-40	C: -26.39; N: -4.52	美国国家标准与技术研究院
IAEA-N-1	N: 0.4	国际原子能机构
IAEA-N-2	N: 20.3	国际原子能机构
IAEA-311	N: 2.05% (atom%)	国际原子能机构

附录 B

(资料性)

从实验室方法试验中得到的测定结果

B.1 从实验室方法试验结果得到的碳同位素比值的统计数据

表 B.1 以 EA-IRMS 测定国家标准样品有机碳碳同位素比值的精密度

标准样品	GBW-04407 炭黑	GBW-04408 炭黑
测定次数	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} (\text{‰})$	
1	-22.44	-36.76
2	-22.48	-36.70
3	-22.54	-36.83
4	-22.54	-36.87
5	-22.44	-36.91
Mean \pm S. D	-22.45 \pm 0.07	-36.81 \pm 0.08
参考值	-22.43 \pm 0.07	-36.91 \pm 0.10

表 B.2 EA-IRMS 测定 3 种国家土壤标准样品碳百分含量的结果

标准样品	GBW-07423	GBW-07427	GBW-07429
测定项目	C %	C %	C %
1	1.89	1.51	0.88
2	1.90	1.48	0.85
3	1.84	1.54	0.88
4	1.87	1.51	0.90
平均值	1.87	1.51	0.88
参考值	1.90 \pm 0.2	1.53 \pm 0.12	0.93 \pm 0.12

表 B.3 土壤样品中无机碳对测定有机碳碳同位素比值 ($\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}/\text{‰}$) 的影响

测定样品	未经酸处理的样品	经酸处理后的样品
1	-10.49, -8.98	-22.91, -22.65
2	-17.09, -16.26	-25.06, -25.35
3	-9.75, -9.21	-23.20, -23.09
4	-16.44, -16.04	-25.43, -25.54

B.2 从实验室方法试验结果得到的氮同位素比值的统计数据

表 B.4 EA-IRMS 测定 3 种国家标准样品氮百分含量的结果

标准样品	GBW-07423	GBW-07427	GBW-07429
测定项目	N (%)		
1	0.132	0.072	0.095
2	0.132	0.072	0.096
3	0.132	0.072	0.095
4	0.129	0.073	0.096
平均值	0.131	0.072	0.096
参考值	0.130 \pm 0.010	0.072 \pm 0.009	0.094 \pm 0.010

表 B.5 EA-IRMS 测定 2 种国际标准样品氮同位素比值的结果

标准样品	IAEA-305A 硫酸铵	IAEA-301B 尿素
测定项目	$\delta^{15}\text{N}_{\text{air}}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}_{\text{air}}$ (‰)
1	40.24	245.19
2	39.92	243.95
3	39.93	244.75
4	40.17	245.54
平均值±S.D.	40.07±0.14	244.86±0.68
参考值	40.00	243.9~245.4

表 B.6 EA-IRMS 测定 3 种 IAEA 考核样品氮同位素比值的结果*

考核样品	I - 2	D - 2	G - 1
测定项目	$^{15}\text{Natom}\%$	$^{15}\text{Natom}\%$	$^{15}\text{Natom}\%$
1	1.183	0.518	1.193
2	1.191	0.518	1.191
3	1.186	0.518	1.189
4	1.186	0.516	1.195
平均值	1.187	0.518	1.192
参考值	1.186±0.003	0.519±0.001	1.194±0.002

*为IAEA三年的考核植物样品

参 考 文 献

- [1] GB/T 1.1-2020 标准化工作导则—第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则标准编写规则
 - [2] JJF 1508-2015 同位素丰度测量基准方法
 - [3] JJF 1258-2006 稳定同位素气体质谱仪校准规范
 - [4] GB/T 6379.2-2004 测定方法于结果的准确度（正确度与精密度）第 2 部分：确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法
 - [5] GB/T 18340.2-2010 地质样品有机地球化学分析方法 第 2 部分：有机质稳定碳同位素测定同位素质谱法
 - [6] SY/T 6039-94 碳酸盐岩碳氧同位素测定 磷酸法
 - [7] 曹亚澄等，稳定同位素示踪技术与质谱分析，北京：科学出版社，2018
 - [8] 曹亚澄等，气体同位素质谱分析 300 问，北京：科学出版社，2020
-