

DOI: 10.11766/trxb201911210536

杨婷, 陆玉芳, 马明坤, 施卫明. 超声提取-气相色谱法测定土壤 1,9-癸二醇[J]. 土壤学报, 2021, 58(4): 968-977.

YANG Ting, LU Yufang, MA Mingkun, SHI Weiming. Determination of 1,9-Decanediol in Soil with Ultrasonic Extraction-Gas Chromatography[J]. Acta Pedologica Sinica, 2021, 58(4): 968-977.

超声提取-气相色谱法测定土壤 1,9-癸二醇*

杨 婷^{1,2}, 陆玉芳¹, 马明坤^{1,2}, 施卫明¹

(1. 中国科学院南京土壤研究所, 南京 210008; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘 要: 1,9-癸二醇是由水稻根系分泌物中发现的一种新型生物硝化抑制剂, 在农业生产中可提高氮肥利用率, 减少氮素损失。为建立一套超声波提取-气相色谱检测土壤中 1,9-癸二醇的方法, 分别对超声波提取条件(提取剂、提取次数、液料比、超声时间)和气相色谱检测参数(进样口温度、检测器温度、升温程序)进行研究。结果表明, 超声波提取土壤 1,9-癸二醇的最佳方法为甲醇作为提取剂超声提取 1 次, 液料比 40 mL·g⁻¹, 超声时间 30 min。气相色谱 Agilent 8890 测定 1,9-癸二醇的最佳条件为进样口温度 250 °C; 氢火焰离子化检测器(FID)温度 310 °C; 升温程序: 初始柱温 60 °C, 保持 2 min, 以 20 °C·min⁻¹ 的速率升至 150 °C, 然后以 3 °C·min⁻¹ 的速率升至 180 °C, 保持 2 min, 最后以 20 °C·min⁻¹ 的速率升至 270 °C。在最佳提取和测定条件下, 不同浓度 1,9-癸二醇的加标回收率为 90.58%~94.55%。超声提取-气相色谱法检测限低、灵敏度和精密度高, 快速高效、重复性好, 为今后 1,9-癸二醇的实际应用工作奠定了基础。

关键词: 1,9-癸二醇; 生物硝化抑制剂; 超声提取条件; 检测参数; 土壤

中图分类号: S145.9 文献标志码: A

Determination of 1,9-Decanediol in Soil with Ultrasonic Extraction-Gas Chromatography

YANG Ting^{1,2}, LU Yufang¹, MA Mingkun^{1,2}, SHI Weiming^{1†}

(1. Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: [Objective] The application of biological nitrification inhibitors (BNIs) is considered an important new strategy to reduce nitrogen loss from agricultural systems. Recently, a new BNI, 1,9-decanediol, has been identified in rice root exudates and the substance is found to be contributive to improvement of nitrogen (N)-use efficiency (NUE) and reduction of N₂O emissions in agriculture. In order to evaluate its stability and effect in soil, an efficient, fast and accurate extraction and detection method needs to be developed. Thus, this study was oriented to develop a method of using ultrasonic extraction-gas chromatography (GC) to

* 国家自然科学基金委中日国际合作项目(31761143015)、江苏省优秀青年基金项目(BK20190108)和山东省重大科技创新工程项目(2019JZZY010701)资助 Supported by the NSFC-JST Project (No. 31761143015), the Natural Science Foundation for Distinguished Young Scholar of Jiangsu Province of China(No. BK20190108) and the Key Research and Development Program of Shandong Province of China(No. 2019JZZY010701)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: wmsi@issas.ac.cn

作者简介: 杨 婷(1994—), 女, 甘肃兰州人, 硕士研究生, 主要从事植物-微生物根际互作研究。E-mail: yangting@issas.ac.cn

收稿日期: 2019-11-21;; 收到修改稿日期: 2020-03-09; 网络首发日期(www.cnki.net): 2020-05-11

determine 1,9-decanediol in soil. 【Method】 Soil samples were collected from a paddy soil at Yixing (31°17' N, 119°54' E), Jiangsu Province of China for extraction of 1,9-decanediol using different methods, including different extractants (water, acetonitrile, methanol, acetone, ethyl acetate, dichloromethane, hexane, and petroleum ether), different liquid to solid ratios (varying in the range of 10-50 mL·g⁻¹), different durations of ultrasonic processing (in the range of 10-50 min), different frequency of extraction (in the range of 1-3 times), and different gas chromatography detection parameters, including inlet temperature (in the range of 200-280°C), detector temperature (in the range of 260-320 °C), and four heating procedures for optimization. Spike recovery of the substance in soil was determination relative to its concentration (10, 100 and 1 000 mg kg⁻¹). 【Result】 Results show that: (1) the method of ultrasonic extraction using methanol as extractant, 40 mL·g⁻¹ in liquid/solid ratio, and going only one round that lasted 30 min was the optimal one; (2) In using the Agilent 8890 gas chromatographer to determine the substance, the optimal conditions were 250 °C at the inlet, 310 °C at the FID detector, 60 °C in the column kept for the first 2 min, and then raised up to 150 °C at 20 °C·min⁻¹ and to 180 °C at 3 °C·min⁻¹, kept for 2 min. and in the end, raised to 270 °C at 20°C·min⁻¹; (3) under such conditions, determination of 1,9-decanediol, 10-100.00 µg·mL⁻¹ in concentration exhibited good linearity, standard curve of $y=26.81x-9.678(R^2=0.999)$, detection limit of 0.03 µg·mL⁻¹, recovery rate of 93.99%–96.91%, intraday precision 1.78% and interday precision of 1.52%; and (4) under such optimal extraction and determination conditions, the spike recovery rate of 1, 9-decanediol in soil samples, regardless of concentration, varied in the range of 90.58%–94.55% with relative standard deviation(RSD) varying in the range of 0.30%–3.41%. 【Conclusion】 This method, low in detection limit, high in sensitivity and precision, and good in reproducibility, and this experiment may lay down a foundation for evaluation of stability and environmental impacts of 1, 9-decanediol in agricultural soils, and provide a good reference for developing methods for extracting other BNIs in soil in future.

Key words: 1,9-decanediol; Biological nitrification inhibitors; Ultrasonic extraction conditions; Detection parameters; Soil

硝化作用是造成农田氮素损失、地表和地下水污染的主要途径^[1]。在农业生产实践中常通过施入合成硝化抑制剂来降低土壤硝化作用，但由于成本过高、增产不显著、性能不稳定等因素未能得到广泛应用^[2-3]。由植物自身合成和分泌的生物硝化抑制剂，能在根系持续精准释放，环境友好，效果稳定，近年来受到广泛关注^[4-6]。1,9-癸二醇是从水稻根系分泌物中分离鉴定出的一种新型生物硝化抑制剂，可减少温室气体 N₂O 的排放，具有提高农田氮素利用率和减少温室气体排放的应用潜力^[7-8]。硝化抑制剂在土壤中的稳定性是影响其应用效果的重要因素之一，建立一种高效、快速、准确的提取和检测方法是评价其作用效果稳定性的前提，但土壤中 1,9-癸二醇的提取方法未有报道，制约了 1,9-癸二醇在土壤中作用效果稳定性的评价。

土壤中有有机物质的提取方法有索氏提取法、加速溶剂萃取法、超临界萃取、超声波提取法等。其中，索氏提取法虽为经典的提取方法，但由于提取效率较低、时间长、提取溶剂用量大而被一些新兴提取方法替代^[9]；超临界萃取虽具有较高的提取效率，但仪器复杂且花费较高^[10]；加速溶剂提取技术

测定结果准确，但一次性设备投资较大^[11]，因而在日常分析中这些提取技术并不普遍应用。超声波提取技术利用超声波高强度的声能量，增强了提取剂的穿透能力，增大被提取成分分子的运动速率和频率，使溶质快速溶解于溶剂，促使提取有效、高速进行，具有提取时间短、效率高、设备花费低的特点，因而被广泛应用于环境样品提取^[12-13]。综合不同提取方法消耗的时间、溶剂、人工和仪器成本，超声提取法具有明显的应用优势，但超声提取所选用的溶剂类型、溶剂体积、提取时间和提取次数等均会影响提取效率^[14]，因此，超声法提取土壤中生物硝化抑制剂 1,9-癸二醇的方法有待进一步探索。

作为一种脂肪醇类化合物，1,9-癸二醇可利用气相色谱进行定量分析。Sun 等^[8]利用 Agilent 6890 气相色谱和 Agilent 5975 质谱联用，分离鉴定出了水稻根系分泌物中的 1,9-癸二醇，并比较了不同水稻品种根系分泌物中的含量；Zhang 等^[15]利用 Agilent 7890 对 1,9-癸二醇的衍生化反应条件进行了优化，并分析了影响水稻根系分泌该物质的因素。随着色谱技术的快速发展与色谱仪器的更新，Agilent 8890 相比于 Agilent 6890 和 Agilent 7890 灵敏度更高，检

测限更低,可实现常量、微量甚至痕量样品的检测和定量分析,但利用 Agilent 8890 测定 1,9-癸二醇的方法有待进一步开发。综上,本文旨在开发土壤中 1,9-癸二醇提取方法的基础上,对气相色谱 Agilent 8890 测定 1,9-癸二醇的各个参数进行优化,从而建立一套完整的超声波提取-气相色谱检测土壤中 1,9-癸二醇的分析方法,为土壤中 1,9-癸二醇后续研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 供试土壤

供试土壤为发育于湖积物的潴育型水稻土,土壤采集自江苏宜兴(31° 16' N, 119° 54' E),理化性质见表 1。

1.2 仪器与试剂

化学标准品 1,9-癸二醇,定制于公司,纯度大于 95%,常温下为液态黏稠物质。有机试剂乙腈、甲醇、丙酮、乙酸乙酯、二氯甲烷、正己烷为色谱纯,石油醚(沸程 60 °C~90 °C)为分析纯,均产自上海安谱实验科技股份有限公司。

样品前处理仪器为数控超声波清洗器(XO25-12DJ, ATPIO, 中国)、防腐型 12 位氮吹仪(EFAA-DC12-RT, ANPEL, 中国)、旋转蒸发器

(N-1100D-WD, EYELA, 日本);样品测定仪器为气相色谱仪(Agilent 8890, 美国。包括 HP 8890 气相色谱、HP 7693 自动进样器, Agilent)。

1.3 气相色谱测定 1,9-癸二醇试验设计

1.3.1 1,9-癸二醇标准溶液的配制 用色谱级正己烷准确配制 1 mg·mL⁻¹ 的 1,9-癸二醇标准溶液,依次取 0.10 mL、0.20 mL、0.40 mL、0.60 mL、0.80 mL、1.00 mL 的标准溶液于容量瓶中,用色谱级正己烷稀释定容至 10 mL,即为 10.00~100.00 μg·mL⁻¹ 的 1,9-癸二醇标准使用液。

1.3.2 气相色谱测定条件优化 采用装备有氢火焰离子化检测器(FID)的 Agilent 8890 工作站,参考 Zhang 等^[15]利用 Agilent 7890 测定 1,9-癸二醇的方法,初始运行参数如下:毛细管色谱柱 HP-5 (25 m×0.2 mm×0.33 μm);进样口温度 250 °C;不分流进样;初始柱温 60 °C,保持 2 min,以 10 °C·min⁻¹ 的速率升至 150 °C,然后以 3 °C·min⁻¹ 的速率升至 195 °C,保持 2 min,最后以 20 °C·min⁻¹ 的速率升至 270 °C;载气为氮气,柱流量 1.5 mL·min⁻¹;进样量 2 μL。在初始条件的基础上设置进样口温度(200、220、240、250、260、270 °C)、检测器温度(260、270、280、300、310、320 °C)、升温程序(表 2)进行优化。1,9-癸二醇浓度 10 μg·mL⁻¹,每个条件设置 6 个重复,考察以上参数的改变对其峰面积的影响。

表 1 供试土壤理化性质

Table 1 Physico-chemical properties of tested soil

土壤 Soil	pH	全氮 Total N /(g·kg ⁻¹)	铵态氮 NH ₄ ⁺ -N / (mg·kg ⁻¹)	硝态氮 NO ₃ ⁻ -N /(mg·kg ⁻¹)	有机质 Organic matter /(g·kg ⁻¹)	阳离子交换量 Cation-exchange capacity /(cmol·kg ⁻¹)
水稻土 ^①	6.25	1.2	8.86	12.56	22.4	11.2

①Paddy soil

1.4 超声提取土壤 1,9-癸二醇试验设计

1.4.1 加标土壤样品的制备 土壤风干研磨后过 2 mm 筛,称取 1.00 g 于离心管中,逐滴加入配制浓度为 2 mg mL⁻¹ 的 1,9-癸二醇标准溶液 0.5 mL,参考硝化抑制剂稳定性实验设置^[16],将体系静置 1 h,使溶液充满整个土壤孔隙,与土壤充分接触但又不会发生降解转化。该加标土壤样品的 1,9-癸二醇浓度为 1 000 mg·kg⁻¹,并作为后续超声提取条件优化实验的浓度。

1.4.2 土壤中 1,9-癸二醇的超声提取 (1) 提取试剂的选择:将上述 1 000 mg·kg⁻¹ 加标土壤样品用不同提取试剂(水、乙腈、甲醇、丙酮、乙酸乙酯、二氯甲烷、正己烷、石油醚)进行超声提取,每个条件设置 4 个加标平行样品。液料比 40 mL·g⁻¹,超声处理 30 min,离心(6 000 r·min⁻¹) 5 min,上清液过滤后转移至茄形瓶中,土壤残渣按上述过程再进行两次处理,即共提取 3 次。将三次提取液置于旋转蒸发器上 40 °C 蒸发至干,残余物用正己烷溶解,

表 2 气相色谱测定 1,9-癸二醇的升温程序

Table 2 Temperature raising procedure of GC in determination of 1,9-decanediol

升温程序 Temperature raising procedure	速率 Heating rate/ ($^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$)	温度 Temperature/ $^{\circ}\text{C}$	保持时间 Holding time/ min	运行时间 Running time/ min
1	10	60	2	28
		270	5	
		60	2	
2	5	160	5	32.5
		270	0	
		60	2	
3	10	150	0	31.75
		3	2	
		20	0	
4	20	60	2	23
		150	0	
		3	2	
	20	270	0	

经 $0.22\ \mu\text{m}$ 有机滤膜过滤后定容至 $10\ \text{mL}$ 。取适量用气相色谱以标准曲线法测定土壤中 1,9-癸二醇含量并计算回收率, 比较不同提取剂对土壤 1,9-癸二醇回收率的影响。(2) 提取次数的选择: 以甲醇作为提取剂, 液料比 $40\ \text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$, 超声处理 $30\ \text{min}$, 提取次数分别为 1 次、2 次、3 次, 其他操作步骤同 1.4.2 (1), 比较提取次数对土壤 1,9-癸二醇回收率的影响。(3) 液料比的选择: 以甲醇作为提取剂, 超声处理 $30\ \text{min}$, 提取 1 次, 液料比分别为 10、20、30、40、 $50\ \text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$, 其他操作步骤同 1.4.2 (1), 比较液料比对土壤 1,9-癸二醇回收率的影响。(4) 超声时间的选择: 以甲醇作为提取剂, 液料比 $40\ \text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$, 提取 1 次, 超声处理时间分别为 10、20、30、40、 $50\ \text{min}$, 其他操作步骤同 1.4.2 (1), 比较超声时间对土壤 1,9-癸二醇回收率的影响。

1.5 不同浓度 1,9-癸二醇加标回收率试验设计

按照 1.4.1 方法配制浓度为 10、100、 $1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的加标土壤, 以甲醇作为提取剂超声提取 1 次, 液料比 $40\ \text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$, 超声时间 $30\ \text{min}$, 其他操作步骤同 1.4.2 (1), 测定不同浓度 1,9-癸二醇的加标回收率。

1.6 统计分析

气相色谱数据通过 Agilent Openlab Data

Analysis 2.4 完成, 实验数据利用 Microsoft excel 2007 和 SPSS 22.0 进行数据统计和分析, 用最小显著差异法 (LSD) 分析各处理间的差异显著性, 不同的小写字母表示处理间有显著差异 ($P<0.05$); 使用 Origin 2017 绘制图表, 图表中数据均为平均值 \pm 标准差。

2 结果与讨论

2.1 气相色谱测定 1,9-癸二醇条件优化

气相色谱进样口温度、检测器温度、升温程序对 1,9-癸二醇的响应值影响如图 1 所示。物质在气相色谱的响应值越高, 则检测灵敏度越高, 越有利于分析^[12]。随着进样口温度升高, 1,9-癸二醇响应值逐渐升高后又有所降低, 这说明当进样口温度较低时待测组分未完全汽化, 温度过高时物质发生分解, 从而导致 1,9-癸二醇部分损失而不利于测定, 因此参考初始条件, 选择 $250\ ^{\circ}\text{C}$ 为较适宜的进样口温度。检测器温度过低, 组分分子电离数目少, 产生电流信号小, 导致灵敏度降低, 过高会影响其使用寿命, 一般检测器温度要高于组分沸点 $50\ ^{\circ}\text{C}$ 以上, 保证流出色谱柱的组分不冷凝^[17], 因此检测器

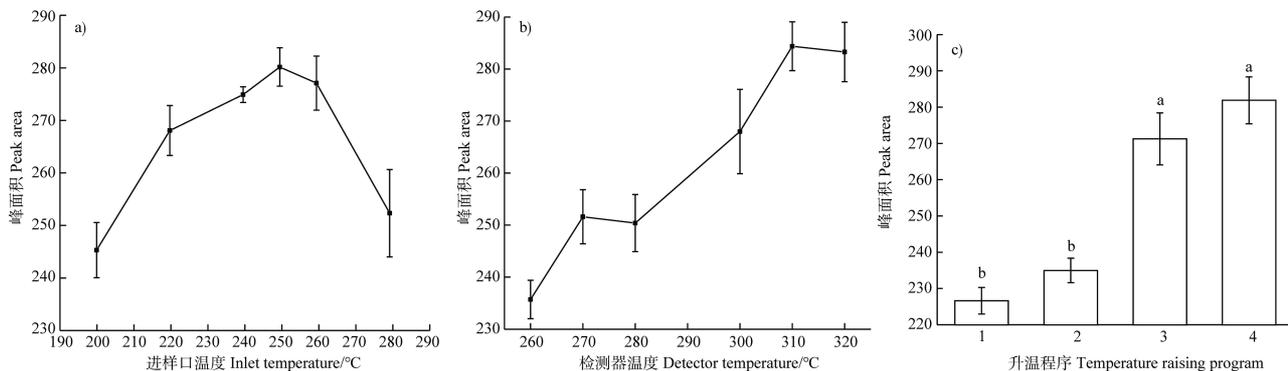


图 1 1,9-癸二醇在气相色谱不同测定参数下的响应

Fig. 1 Determination of 1,9-decanediol relative to gas chromatography parameters

温度 310 °C 为适宜的测定条件。柱温是影响物质分离效果、峰形的重要因素，一般毛细管柱分析多组分时多采用程序升温。虽升温程序 3 和 4 均能使得 1,9-癸二醇达到较高的响应值，但升温程序 3 需运行 31.75 min，升温程序 4 运行时间仅 23 min，可缩短样品分析时间，提高测定效率。综上，气相色谱测定 1,9-癸二醇的最优化条件为：进样口温度 250 °C，检测器温度 310 °C，升温程序：初始柱温 60 °C，保持 2 min，以 20 °C·min⁻¹ 的速率升至 150 °C，然后以 3 °C·min⁻¹ 的速率升至 180 °C，保持 2 min，最后以 20 °C·min⁻¹ 的速率升至 270 °C。

2.2 气相色谱仪器的精密度及标准曲线

标准曲线：依次取 10~100.00 μg·mL⁻¹ 的标准使用液，并以溶剂正己烷作为参比，按最优化条件进行测定，以 1,9-癸二醇的峰面积为纵坐标，浓度为横坐标，进行线性回归，标准曲线如图 2 所示。在所取浓度范围内，1,9-癸二醇的浓度与峰面积之间线性关系良好，线性方程 $y=26.81x-9.678$ ， $R^2=0.999$ 。10 μg·mL⁻¹ 标准样品的气相色谱图如图 3 所示，色谱图基线平稳，1,9-癸二醇的保留时间 R_t 为 9.895 min，且色谱峰无前延或拖尾现象，呈高斯对称，峰形较好，符合色谱分析要求^[17]。

仪器精密度：加标浓度为 40.00 μg·mL⁻¹，在仪器最优条件下，日内和日间平行测定 6 次加标样^[17]，结果如表 3 所示，日内精密度和日间精密度 $RSD<5\%$ ，说明该方法精密度良好。

仪器检出限：以 3 倍信号噪声比对应的样品浓度，与较低的相近浓度的标样信号值相比较，计算得仪器的最低检出限为 0.03 μg·mL⁻¹。

测定方法回收率：加标量为 10 μg·mL⁻¹，连续测定 6 个加标样，按上述线性方程计算得相应目标物的测定浓度，得回收率为 95.94%，符合有机样品的分析要求。

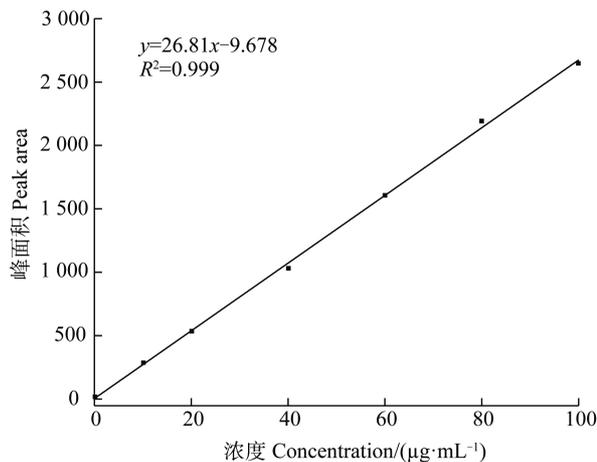


图 2 1,9-癸二醇标准曲线

Fig. 2 Standard curve of 1,9-decanediol

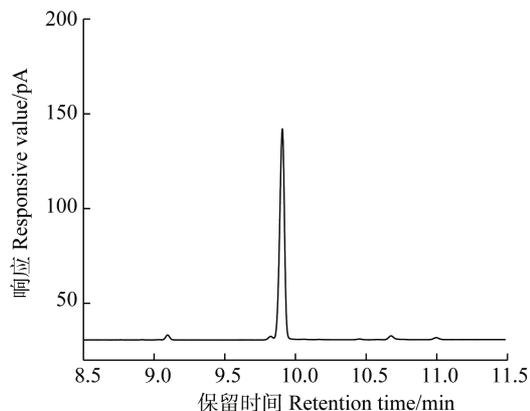


图 3 1,9-癸二醇的气相色谱图

Fig. 3 Standard chromatograms of 1,9-decanediol

表 3 仪器精密度及方法检出限、回收率

Table 3 Precision, detection limit and recovery rate of the instrument

生物硝化抑制剂 ^①	日内精密度 ^② (RSD) /%	日间精密度 ^③ (RSD) /%	检出限 ^④ / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回收率 ^⑤ /%
1,9-癸二醇 ^⑥	1.78	1.52	0.03	93.99~96.91

①Biological nitrification inhibitors, ②Intraday precision, ③Interday precision, ④Detection limit, ⑤Recovery rate, ⑥1,9-decanediol.

2.3 超声提取后土壤中 1,9-癸二醇的气相色谱图

按照 1.4.2 方法对空白土壤和添加 $1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 标样土壤中的 1,9-癸二醇进行提取, 利用上述优化的气相色谱测定方法进行测定, 气相色谱图如图 4 所示。保留时间在 $9.5\ \text{min}\sim 10.5\ \text{min}$ 范围内, 空白土壤的色谱图中仅有一段平稳的基线, 未出现任何色谱峰, 因此空白土壤中未检测到 1,9-癸二醇; 添加标样土壤的色谱图在该时间段内仅出现一个清晰且分离度高的色谱峰, 保留时间 R_t 为 $9.900\ \text{min}$, 与标准品的保留时间 (图 3, R_t 为 $9.895\ \text{min}$) 差异在合理的误差范围内^[19], 因此该峰是 1,9-癸二醇的色谱峰。

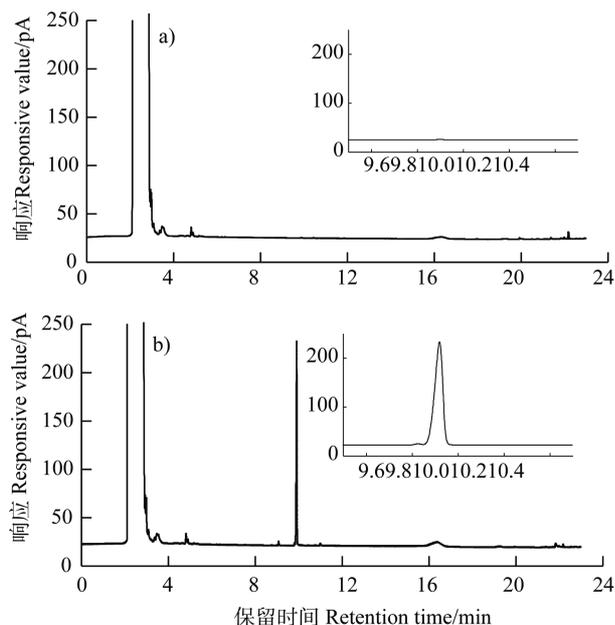


图 4 空白土壤 (a) 及添加 $1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 标样土壤 (b) 的色谱图

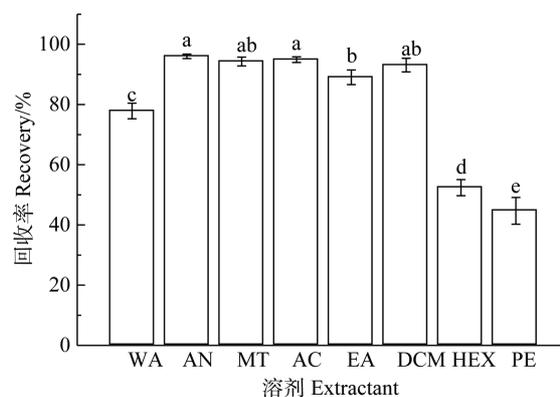
Fig. 4 Chromatograms of original soil samples (a) and soil samples spiked with $1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 1,9-decanediol (b)

除目标峰外, 土壤样品的色谱图中也存在少量杂峰, 但响应值仅为目标物响应值的 $1\%\sim 3\%$, 且超声提取的回收率达 95% , 因此, 杂峰对目标物定量的干扰很小。在杂质不干扰目标物测定的情况下,

不进行提取液净化可减少淋洗液浓缩过程的损失, 也可在很大程度上提高工作效率^[12, 20], 故本方法提取和测定方法可满足实验要求。

2.4 不同提取条件对土壤中 1,9-癸二醇提取效果的影响

2.4.1 提取溶剂 不同提取溶剂对 $1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 加标土壤中 1,9-癸二醇的提取结果如图 5 所示。由于 1,9-癸二醇属于脂溶性极性化合物, 根据相似相溶原理, 利用非极性溶剂石油醚、正己烷提取的回收率较低, 分别为 44.6% 和 52.4% , 水对 1,9-癸二醇的提取回收率为 77.8% , 极性有机溶剂如乙腈、甲醇、丙酮、二氯甲烷等提取回收率较高, 可达到 $93\%\sim 96\%$, 因此, 极性有机溶剂提取土壤中的 1,9-癸二醇效果更好。考虑到以上极性有机溶剂中甲醇的毒性和成本较低, 选择甲醇作为提取剂。



注: WA: 水, AN: 乙腈, MT: 甲醇, AC: 丙酮, EA: 乙酸乙酯, DCM: 二氯甲烷, HEX: 正己烷, PE: 石油醚。Note: WA: water, AN: acetonitrile, MT: methyl alcohol, AC: acetone, EA: ethyl acetate, DCM: dichloromethane, HEX: n-hexane, PE: petroleum ether.

图 5 不同提取溶剂对 1,9-癸二醇回收率的影响

Fig. 5 Recovery rate of 1,9-decanediol relative to extractants

2.4.2 提取次数 $1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 加标土壤经不同次数超声提取后 1,9-癸二醇的回收率结果如表 4 所示。以甲醇作为提取剂, 超声提取一次后土壤中 1,9-

表 4 提取次数对 1,9-癸二醇回收率的影响

Table 4 Recovery rate of 1,9-decanediol relative to extraction frequency

提取次数 Extraction times	回收率 Recovery rate/%
1	92.49±1.89a
2	92.02±3.34a
3	92.84±1.18a

癸二醇的回收率已达到 92.5%，再进行二次提取和三次提取后回收率并无显著上升，说明经过一次超声提取后物质的溶出已经趋近饱和，多次提取仅是消耗更多的提取剂，提取和浓缩时间也会加长。因此，为节约溶剂、缩短样品处理时间，确定最适提取次数为 1 次。

2.4.3 液料比 液料比是指提取剂体积与土壤质量的比值。不同液料比对 1 000 mg·kg⁻¹ 加标土壤中 1,9-癸二醇的提取结果如图 6 所示。当超声提取一次，液料比从 10 mL·g⁻¹ 增加至 40 mL·g⁻¹ 时，回收率从 79.3% 提高至 95.3%，这说明液料比的扩大可增加土壤与提取剂的接触面积，使得目标物 1,9-癸二醇更充分地溶解出来^[21]，而液料比增加至 50 mL·g⁻¹ 后，回收率并无明显变化，但会造成溶剂的浪费，增加样品的浓缩时间，因此为减少提取剂对环境的负面效应、降低实验成本、提高实验效率，确定最佳液料比为 40 mL·g⁻¹。

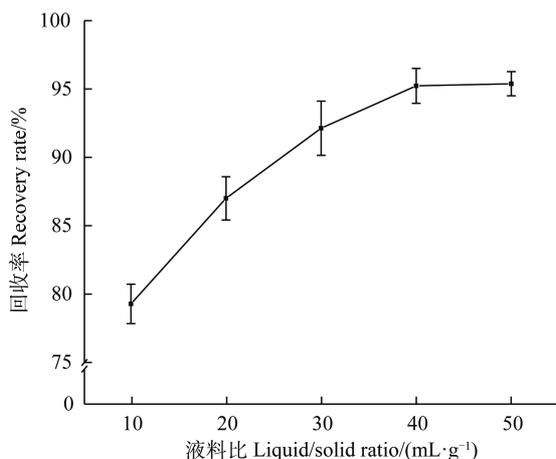


图 6 液料比对 1,9-癸二醇回收率的影响

Fig. 6 Recovery rate of 1,9-decanediol relative to liquid/solid ratio

2.4.4 超声时间 不同超声时间对 1 000 mg·kg⁻¹ 加标土壤中 1,9-癸二醇的提取结果如图 7 所示。超

声时间的长短直接影响溶剂与土壤的接触程度，从而影响提取效率^[22]。超声时间从 10 min 增加至 30 min 时，1,9-癸二醇的回收率从 85.1% 上升至 90.74%，再延长超声时间至 40 min 时，回收率 (91.07%) 略有上升，但与超声 30 min 相比无显著差异。超声时间超过 40 min 后，1,9-癸二醇的提取效率反而下降，这可能是由于随着超声时间的增长，一方面超声过程产生的·OH 和·H 自由基浓度增大，另一方面在空化过程中形成的超临界态水的氧化作用逐渐增强^[23]，因此推测 1,9-癸二醇结构被破坏或者发生氧化降解，该结果与超声提取大豆蛋白^[24]、果胶^[25]、土壤中除草剂^[26]等的结果相似，超声提取时间过长造成一些物质的结构、理化性质等发生变化。因此，综合考虑回收率和样品处理时间成本，超声提取时间控制在 30 min 即可。

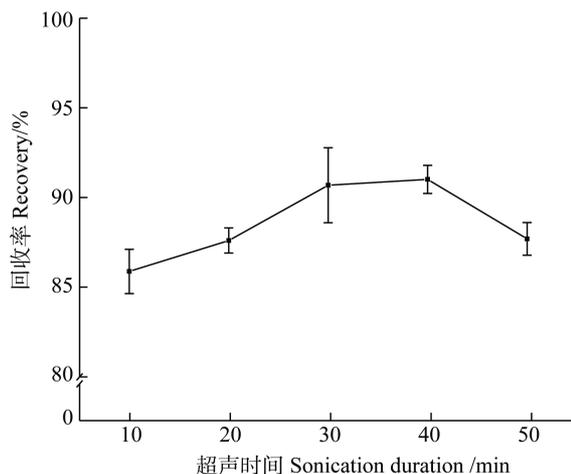


图 7 超声时间对 1,9-癸二醇回收率的影响

Fig. 7 Recovery rate of 1,9-decanediol relative to duration of ultrasonic treatment

综合上述结果，确定超声波提取土壤 1,9-癸二醇的最佳参数为：以甲醇作为提取剂超声提取 1 次，液料比 40 mL·g⁻¹，超声时间 30 min。

2.5 不同浓度 1,9-癸二醇的加标回收率

为了验证本实验方法的可靠性，设置 10、100、1 000 mg·kg⁻¹ 三个土壤样品的加标浓度。设置依据如下：在水培体系下，不同品种水稻根系分泌 1,9-癸二醇含量 0~10 μg·g⁻¹ DW d⁻¹^[8]，推算至根际土壤中 1,9-癸二醇的浓度范围为 0~60 mg·kg⁻¹^[7]，因此设置 10 mg·kg⁻¹ 加标浓度作为土壤中 1,9-癸二醇的自然浓度水平（低浓度水平）。根际微域环境的改变如 NH₄⁺ 浓度、低 pH、氧气等均能显著促进生物硝

化抑制剂的分泌,使其分泌量提高 2~10 倍^[15, 27-28],因此设置 $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 为中浓度水平(低浓度水平的 10 倍)。根系分泌物在特定条件下会呈现脉冲式地突然增加^[4, 29],设置 $1\ 000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 为 1,9-癸二醇的加标高浓度水平(低浓度水平的 100 倍)。而且,本研究设置的 1,9-癸二醇加标高浓度水平 $1\ 000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 也在生物硝化抑制剂在土壤中起作用的浓度范围内,一些生物硝化抑制剂如亚麻酸、亚油酸的土培添加浓度为 $1\ 000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、对羟基苯丙酸甲酯(MHPP)的土培添加浓度为 $2\ 000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,土壤硝化作用可被显著抑制^[30-31],Lu 等^[7]的研究表明, $500\sim 1\ 000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 1,9-癸二醇可显著抑制土壤的硝化作用,减少 N_2O 的排放。

将不同加标浓度的土壤样品按照 2.2.5 所示最优参数超声提取,并测定提取液中 1,9-癸二醇的含量,计算加标回收率,结果如表 5 所示。当土壤中 1,9-癸二醇浓度添加从 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 扩大至 $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、

$1\ 000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,回收率并未发生大幅度的波动,平均值分别为 90.58%、93.25%、94.55%,且变异系数 CV 均小于 5%,说明该方法提取水稻土中的 1,9-癸二醇的结果稳定可靠,重复性好。由于不同类型土壤的 pH、总有机碳含量、阳离子交换量等理化性质不同,待提取目标物质与土壤有机质的结合能力、在提取体系的存在形式等可能有所不同^[32]。然而研究表明,当用甲醇、乙酸乙酯等有机溶剂提取时,有机溶剂对不同土壤中目标物质的提取效率类似。生弘杰等^[33]利用乙酸乙酯提取砖红壤和黄棕壤中的酰基高丝氨酸内酯 C₇-HSL 的回收率分别为 87.90% 和 85.82%;贺仲兵^[34]用甲醇提取红壤和潮土中溴硝醇的回收率分别为 90.66%、90.44%。这可能是因为溶剂效应强于土壤表面颗粒对物质的吸引力,促使其与土壤表面结合键的断开^[35]。由此推测,本研究中利用有机溶剂甲醇超声提取土壤中 1,9-癸二醇的方法也可能适用于不同类型土壤。

表 5 不同浓度 1,9-癸二醇的加标回收率

Table 5 Spike recovery rate of 1,9-decanediol relative to concentration

样品 Sample	添加浓度 Concentration/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	回收率 Recovery/%	变异系数 CV/%
水稻土 Paddy soil	10	87.28~95.93	4.41
	100	91.57~94.91	1.49
	1 000	94.29~94.55	0.30

3 结 论

环境友好的生物硝化抑制剂已成为现代农业中氮肥减施增效的一项新技术。为了评价生物硝化抑制剂在土壤中的应用效果,迫切需要发展简便快速的提取和检测技术。本文建立了一种超声波提取-气相色谱检测土壤中 1,9-癸二醇的方法:以甲醇作为提取剂超声提取 1 次,液料比 $40 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$,提取 30 min;气相色谱 Agilent 8890 进样口温度 $250\text{ }^\circ\text{C}$, FID 检测器温度 $310\text{ }^\circ\text{C}$,初始柱温 $60\text{ }^\circ\text{C}$,保持 2 min,以 $20\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升至 $150\text{ }^\circ\text{C}$,然后以 $3\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升至 $180\text{ }^\circ\text{C}$,保持 2 min,最后以 $20\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升至 $270\text{ }^\circ\text{C}$ 。该方法操作简便、快速高效、回收率高、重复性好。随着今后土壤中根系分泌物原位收集和检测技术的

发展,以及 1,9-癸二醇作为绿色氮肥增效剂在农业中的应用,该方法将为农业土壤中 1,9-癸二醇的稳定性和环境效应等评价奠定基础,也为土壤中其他生物硝化抑制剂提取方法的建立提供参考和借鉴。

参考文献 (References)

- [1] Canfield D E, Glazer A N, Falkowski P G. The evolution and future of earth's nitrogen cycle[J]. *Science*, 2010, 330 (6001): 192-196.
- [2] Qiao C L, Liu L L, Hu S J, et al. How inhibiting nitrification affects nitrogen cycle and reduces environmental impacts of anthropogenic nitrogen input[J]. *Global Change Biology*, 2015, 21 (3): 1249-1257.
- [3] Subbarao G V, Yoshihashi T, Worthington M, et al. Suppression of soil nitrification by plants[J]. *Plant Science*, 2015, 233: 155-164.

- [4] Coskun D, Britto D T, Shi W M, et al. How plant root exudates shape the nitrogen cycle[J]. Trends in Plant Science, 2017, 22 (8) : 661–673.
- [5] Subbarao G V, Arango J, Masahiro K, et al. Genetic mitigation strategies to tackle agricultural GHG emissions: The case for biological nitrification inhibition technology[J]. Plant Science, 2017, 262: 165–168.
- [6] Zeng H Q, Zhu Y Y, Wang H Y, et al. Biological nitrification inhibitor—A new strategy for controlling nitrogen loss from farmland[J]. Acta Pedologica Sinica, 2012, 49 (2) : 382–388. [曾后清, 朱毅勇, 王火焰, 等. 生物硝化抑制剂——一种控制农田氮素流失的新策略[J]. 土壤学报, 2012, 49 (2) : 382–388.]
- [7] Lu Y F, Zhang X N, Jiang J F, et al. Effects of the biological nitrification inhibitor 1,9-decanediol on nitrification and ammonia oxidizers in three agricultural soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2019, 129: 48–59.
- [8] Sun L, Lu Y F, Yu F W, et al. Biological nitrification inhibition by rice root exudates and its relationship with nitrogen-use efficiency[J]. New Phytologist, 2016, 212 (3) : 646–656.
- [9] Yang W Q, Wang H, Jiang B N. Comparison between soxhlet extraction method and ultrasonic extraction method for the determination of residual HCH in soil [J]. Agro-Environment & Development, 2006, 23(6) : 67–69. [杨伟球, 王晖, 蒋宝南. 索氏提取法与超声波提取法测定土壤中六六六残留的比较[J]. 农业环境与发展, 2006, 23 (6) : 67–69.]
- [10] Dai J C, Zhang X, Duan L. Advances on the application of supercritical fluid extraction method for the pesticide residue analysis[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2002, 4 (3) : 6–13. [戴建昌, 张兴, 段苓. 超临界萃取技术在农药残留分析中的应用研究进展[J]. 农药学报, 2002, 4 (3) : 6–13.]
- [11] Liang Z, Yu W J, Sun X Y. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils by accelerated solvent extractor-GC-MS[J]. Chemical Analysis and Meterage, 2009, 18 (3) : 45–48. [梁柱, 余雯静, 孙欣阳. 加速溶剂萃取-色谱质谱联用法测定土壤中的多环芳烃[J]. 化学分析计量, 2009, 18 (3) : 45–48.]
- [12] Wang X L, Cui Z J. Determination of hexabromocyclododecane in soil by an ultrasonic extraction-gas chromatography with FID method[J]. Research of Environmental Sciences, 2019, 32 (3) : 493–499. [王馨蕾, 崔兆杰. 超声波提取-气相色谱氢火焰测定土壤中六溴环十二烷[J]. 环境科学研究, 2019, 32 (3) : 493–499.]
- [13] Yu T T, Chi J. Determination of 1-hydroxypyrene in soil/sediment by ultrasonic extraction-high performance liquid chromatography[J]. Soils, 2016, 48(3) : 534–538. [于田田, 迟杰. 超声萃取-高效液相色谱测定土壤/沉积物中 1-羟基芘[J]. 土壤, 2016, 48 (3) : 534–538.]
- [14] Stankov Jovanović V, Mitić V, Ćirić S, et al. Optimized ultrasonic extraction for the determination of polyaromatic hydrocarbons by gas chromatography–mass spectrometry[J]. Analytical Letters, 2017, 50 (15) : 2491–2504.
- [15] Zhang X N, Lu Y F, Yang T, et al. Factors influencing the release of the biological nitrification inhibitor 1,9-decanediol from rice (*Oryza sativa* L.) roots[J]. Plant and Soil, 2019, 436 (1/2) : 253–265.
- [16] Srivastava A, Rawat K S, Bhatt S C, et al. Degradation of AM nitrification inhibitor in soil of subtropical region[J]. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 2016, 47 (17) : 1961–1966.
- [17] Wang B Q. Instrumental analysis: Chromatographic analysis technique [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2011. [王炳强. 仪器分析-色谱分析技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2011.]
- [18] Chen H, Zhong M, Tang H Y, et al. Determination of BTEXs with static headspace-gas chromatography/mass spectrometer by direct heating soil samples[J]. Acta Pedologica Sinica, 2016, 53 (4) : 1074–1083. [陈虹, 钟明, 唐昊冶, 等. 直接加热—静态顶空—气相色谱/质谱法测定土壤中苯系物[J]. 土壤学报, 2016, 53(4) : 1074–1083.]
- [19] Chen Y S, Luo Y M, Zhang H B, et al. Pretreatment of soil samples for analysis of phthalate esters therein—Effect of concentration and purification of the extract[J]. Acta Pedologica Sinica, 2011, 48(2) : 311–319. [陈永山, 骆永明, 章海波, 等. 土壤样品中酞酸酯含量分析的前处理研究——提取液浓缩过程与净化的影响[J]. 土壤学报, 2011, 48 (2) : 311–319.]
- [20] Wang L X, Xiao H B, Liang X M, et al. Vectorial angle method for evaluating the similarity between two chromatographic fingerprints of Chinese herb[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2002, 37 (9) : 713–717. [王龙星, 肖红斌, 梁鑫淼, 等. 一种评价中药色谱指纹谱相似性的新方法: 向量夹角法[J]. 药化学报, 2002, 37 (9) : 713–717.]
- [21] Shivamathi C S, Moorthy I G, Kumar R V, et al. Optimization of ultrasound assisted extraction of pectin from custard apple peel: Potential and new source[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 225: 115240.
- [22] Lang Y H, Jiang X, Zhao Z H, et al. Studies on the ultrasonic extraction and GC determination of 13 organo-chlorine pesticides in two soils[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2004, 24 (2) : 291–296. [郎印海, 蒋新, 赵振华, 等. 土壤中 13 种有机氯农药超声波提取方法研究[J]. 环境科学学报, 2004, 24(2) : 291–296.]
- [23] Suslick K S. Sonochemistry[J]. Science, 1990, 247 (4949) : 1439–1445.

- [24] Zheng T, Li X H, Taha A, et al. Effect of high intensity ultrasound on the structure and physicochemical properties of soy protein isolates produced by different denaturation methods[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 97: 105216.
- [25] Gharibzahedi S M T, Smith B, Guo Y. Ultrasound-microwave assisted extraction of pectin from fig(*Ficus carica* L.) skin: Optimization, characterization and bioactivity[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 222: 114992.
- [26] Chen B, Wang X M. Combined approach for determining diuron in sugarcane and soil: Ultrasound-assisted extraction, carbon nanotube-mediated purification, and gas chromatography-electron capture detection[J]. Journal of Food Science, 2019, 84 (9) : 2402–2411.
- [27] Zakir H A K M, Subbarao G V, Pearse S J, et al. Detection, isolation and characterization of a root-exuded compound, methyl 3-(4-hydroxyphenyl) propionate, responsible for biological nitrification inhibition by sorghum(*Sorghum bicolor*) [J]. New Phytologist, 2008, 180 (2) : 442–451.
- [28] Subbarao G V, Wang H Y, Ito O, et al. NH_4^+ triggers the synthesis and release of biological nitrification inhibition compounds in *Brachiaria humidicola* roots[J]. Plant and Soil, 2007, 290 (1/2) : 245–257.
- [29] Perry L G, Thelen G C, Ridenour W M, et al. Concentrations of the allelochemical (\pm)-catechin IN *Centaurea maculosa* soils[J]. Journal of Chemical Ecology, 2007, 33 (12) : 2337–2344.
- [30] Subbarao G V, Nakahara K, Ishikawa T, et al. Free fatty acids from the pasture grass *Brachiaria humidicola* and one of their methyl esters as inhibitors of nitrification[J]. Plant and Soil, 2008, 313 (1/2) : 89–99.
- [31] Subbarao G V, Nakahara K, Ishikawa T, et al. Biological nitrification inhibition (BNI) activity in *Sorghum* and its characterization[J]. Plant and Soil, 2013, 366 (1/2) : 243–259.
- [32] Wang A L. Dissipation behaviors of phthalic acid esters in the rhizosphere of wetland plants[D]. Tianjin: Tianjin University, 2011. [王爱丽. 酞酸酯在湿地植物根际环境中的消减行为[D]. 天津: 天津大学, 2011.]
- [33] Sheng H J, Song Y, Bian Y R, et al. Optimization of determination of n-acyl-homoserine lactones in soil solution with gas-chromatography-mass spectrometry[J]. Acta Pedologica Sinica, 2015, 52 (1) : 95–103. [生弘杰, 宋洋, 卞永荣, 等. 土壤提取液中酰基高丝氨酸内酯的气相色谱-质谱检测方法优化[J]. 土壤学报, 2015, 52 (1) : 95–103.]
- [34] He Z B. Degradation of bronopol and its effects on biology in soil[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2006. [贺仲兵. 溴硝醇在土壤中的降解及其对土壤生物的影响[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2006.]
- [35] Cheng H H, Shen J Z. Retention mechanism and extractability of organic residues in soil[J]. Agro-Environment & Development, 1991, 8 (3) : 21–24. [Cheng H H, 申继忠. 土壤中有机残留物的保留机制及可提取性[J]. 农业环境与发展, 1991, 8 (3) : 21–24.]

(责任编辑: 陈荣府)