

【生命与健康 / Life and Health】

全自动真空冷凝抽提系统的检验、优化及应用

简静¹, 文伟^{1,2}, 宋欣^{1,2}

1) 深圳大学生命与海洋科学学院, 广东深圳 518071; 2) 深圳大学深圳市海洋生物资源与生态环境重点实验室, 广东深圳 518071

摘要: 植物及土壤水分的真空抽提是同位素生态水文研究的核心环节。为验证新一代基于低温真空抽提(cryogenic vacuum distillation, CVD)的水分提取技术——全自动真空冷凝抽提系统的稳定性及可靠性, 优化该系统的抽提条件以及探索该系统的应用性, 分别利用手动CVD系统与自动CVD系统, 对自来水及4种野外采样的木本植物叶片和枝条进行水分抽提后, 比较样品水的稳定氢氧同位素比值($\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$); 分别利用手动CVD系统与自动CVD系统在不同抽提时长下对浸泡复水的叶片、枝条及土壤样品进行水分抽提后比较样品水 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$; 将自动CVD系统作为样品水提取工具, 对木樨主要吸水层位及水源水利用比例进行研究。研究表明: 两种系统对自来水及野外采样的植物抽提后的样品水 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 不存在显著性差异, 且样品水同位素间存在与1:1线无统计差别的强线性关系; 自动CVD系统分别对叶片抽提1 h、枝条2 h及土壤2 h后样品水的 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值, 与手动CVD进行抽提后的结果无统计学差异, 复水后的样品水 $\delta^2\text{H}$ 较参考水贫化; 基于 $\delta^2\text{H}$ 所确定的木樨吸水层位、水源水利用比例与基于 $\delta^{18}\text{O}$ 确定的结果不一致。本研究验证了自动CVD系统与手动CVD系统不存在差异, 为该系统支撑同位素生态水文的相关应用提供了重要保障; 优化了自动CVD系统抽提时间, 提高了抽提效率; 同时也发现, CVD系统无法使复水后的植物及土壤样品的 $\delta^2\text{H}$ 恢复至参考水的 $\delta^2\text{H}$, 为生态水文领域近年来揭示的CVD系统存在固有 $\delta^2\text{H}$ 偏差这一重要现象增添了证据; 利用CVD系统抽提后的样品水 $\delta^2\text{H}$ 于植物水源示踪及利用模式研究时需更加谨慎。

关键词: 植物生态学; 稳定同位素; 氢同位素; 氧同位素; 低温真空抽提偏移; 自动低温真空抽提系统; 植物水源; 根系吸水

中图分类号: Q178.1

文献标志码: A

doi: 10.3724/SP.J.1249.2023.02179

Examination, optimization and application of automatic cryogenic vacuum distillation system

JIAN Jing¹, WEN Wei^{1,2}, and SONG Xin^{1,2}

1) College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen University, Shenzhen 518071, Guangdong Province, P. R. China

2) Shenzhen Key Laboratory of Marine Biotic Resources and Ecological Environment, Shenzhen University, Shenzhen 518071, Guangdong Province, P. R. China

Abstract: Cryogenic extraction of water from plant and soil samples constitutes a critical element in isotope eco-hydrological studies. This study was undertaken to examine the stability and reliability of a new generation of water extraction technology based on cryogenic vacuum distillation (CVD)-automatic cryogenic vacuum distillation water extraction system, and to optimize the extraction time and improve the extraction efficiency for this system, as well as

Received: 2022-11-06; **Accepted:** 2023-01-09; **Online (CNKI):** 2023-02-20

Foundation: National Natural Science Foundation of China (42177048); Shenzhen Peacock Innovative Research Team Program (KQTD2017032715165926)

Corresponding author: Professor SONG Xin. E-mail: xinsong@szu.edu.cn

Citation: JIAN Jing, WEN Wei, SONG Xin. Examination, optimization and application of automatic cryogenic vacuum distillation system [J]. Journal of Shenzhen University Science and Engineering, 2023, 40(2): 179-187. (in Chinese)



<http://journal.szu.edu.cn>

to explore the applicability of this system. For these purposes, water extraction from tap water and leaves and stems of four species of woody plants was carried out by using manual and automatic CVD systems and then the hydrogen and oxygen isotope values ($\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$) of water extracted from the two systems were compared. Besides, rehydrated leaves, stems and soils were extracted by manual CVD system and automatic CVD system under different extraction time lengths, then the $\delta^2\text{H}$ 、 $\delta^{18}\text{O}$ of water extracted with the two systems were compared too. Moreover, we conducted a separate experiment to use the automatic CVD system to confirm the depth of water absorption and the utilization ratio of source water of *Osmanthus fragrans* (Thunb.) Loureiro. The results are as follows. There is no significant difference in the hydrogen and oxygen isotope values ($\delta^2\text{H}$, $\delta^{18}\text{O}$) of water extracted with the two systems and that data obtained from the two methods are strongly linearly correlated, with the correlation line being statistically indistinguishable from the 1:1 line. The $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$ values of rehydrated sample water extracted from leaves, stems and soils for 1 h, 2 h, and 2 h by automatic CVD system are not statistically different from those extracted by manual CVD system. The depth of water uptake and the proportion of water use of *Osmanthus fragrans* (Thunb.) Loureiro determined based on $\delta^2\text{H}$ is inconsistent with that determined based on $\delta^{18}\text{O}$. Therefore, this study systematically verifies for the first time that there is no difference between automatic CVD system and manual CVD system, which provides a guarantee of reliability in the related application of isotope eco-hydrology; further, this study enables us to establish recommendations on optimizing the extraction time and improving the extraction efficiency for the automatic CVD system. Meanwhile, our finding of that the $\delta^2\text{H}$ of water extracted from the rehydrated samples were more depleted than the reference water adds evidence to the recently revealed phenomenon of "deuterium deviation" as caused by CVD in the ecohydrological field; as such, we suggest more caution in utilizing CVD-generated $\delta^2\text{H}$ data to trace plant water sources and determine the water use strategies in plant and ecosystem studies.

Key words: plant ecology; stable isotope; deuterium isotope; oxygen isotope; the offset of cryogenic vacuum distillation; automatic cryogenic vacuum distillation system; plant water source; root water uptake

稳定水同位素在水文生态和植物生理生态等研究中发挥重要作用^[1], 是示踪土壤水分的蒸发、下渗和径流过程, 判断植物水分来源、水分利用模式及效率, 以及重建古气候等研究的有力工具^[2]. 进行上述研究的前提和关键在于如何将水从样品中快速且无分馏地提取出来. 目前, 低温真空抽提(cryogenic vacuum distillation, CVD)是应用最广泛、适用样品类型多、精确度高、所需样品量少的样品水提取方法^[3], 被认为是“黄金标准”. 其原理是在真空条件下加热样品使水分挥发, 随后水蒸气运输到低温环境下冷凝, 收集管中凝结的水的同位素特征遵循瑞利蒸馏曲线^[4]. 基于质量守恒原理的无分馏效应, 当抽提率达到 100% 时便可获取无分馏的样品水. 传统的手动 CVD 系统需要较高的运营及维护成本, 提取过程耗时耗力^[5]. 而全自动真空冷凝抽提系统作为新兴自动 CVD 系统, 大大节省了成本与人力, 操作安全性提高, 且抽提系统可控性增强. 王欣等^[6-7]研究已使用自动 CVD 系统进行样品水的抽提. 但目前暂无研究系统地检验该系统的可靠性、稳定性, 以及针对不同类型样品优化抽提条件.

本研究利用传统手动 CVD 系统与当前主流的自动 CVD 系统(Li-2100, 北京理加联合科技有限公司生产)对自来水、野外采样的植物叶片及枝条样品进行水分抽提. 利用手动 CVD 系统与不同抽提时间设定下的自动 CVD 系统对浸泡复水的植物叶片、枝条和土壤样品进行抽提, 比较抽提后样品水稳定氢氧同位素比值($\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$), 针对不同类型样品优化自动 CVD 系统的抽提时间, 提高抽提效率. 同时, 利用自动 CVD 系统作为抽提工具, 对野外木樨潜在主要吸水层位及水源的利用比例进行研究, 验证自动 CVD 系统的应用性.

1 采样区域概况

采样地点位于中国广东省深圳市深圳大学粤海校区, 占地约 1.34 km², 地理位置为 22°35'N — 114°10'E. 属南亚热带海洋性季风气候, 全年温暖且湿润, 年均气温 23.3 °C, 年降水量 1 932.9 mm. 深圳大学内植被资源丰富, 多为人工种植的热带及亚热带植物^[8].

2 材料方法

2.1 样品采集与处理

手动与自动CVD系统抽提效果比较实验的样品包括自来水和植物两类, 自来水样取自于深圳大学深圳市海洋生物资源与生态环境重点实验室, 每个样品使用移液枪吸取2 mL至样品瓶中, 密封后冷藏保存。植物样品于2021年8月原位采样自深圳大学校园内, 包括洋紫荆(*Bauhinia variegata* L.)、高山榕(*Ficus altissima*)、黄葛树(*Ficus virens* Aiton)和大叶紫薇(*Lagerstroemia Speciosa*)4种湿润、半湿润地区常见绿化树种(后文简称*Bvl*、*Fa*、*Fv*和*Ls*)。采集完全木质化的枝条以及健康叶片, 去除枝条韧皮部和叶片中脉后立即分别装进样品管, 密封后装入冷藏箱, 返回实验室后于-25 °C保存。以上样品随机分成两部分, 分别利用手动CVD系统和自动CVD系统进行抽提。

所有样品水均使用TC/EA高温裂解元素分析仪耦合同位素质谱仪(Thermo Fisher Scientific, Delta V Advantage)分析样品的²H和¹⁸O组成。其中, $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 分别表示样品中氢和氧稳定同位素相对于各自标准物比值的千分差, 具体计算方法为

$$\delta(X) = (R_{\text{样品}} / R_{\text{标准}} - 1) \times 1000\text{‰} \quad (1)$$

其中, X 为元素²H或¹⁸O; $R_{\text{样品}}$ 和 $R_{\text{标准}}$ 分别为样品和维也纳标准海水(Vienna standard mean ocean water,

VSMOW)中同类重轻同位素丰度之比(²H丰度/¹H丰度或¹⁸O丰度/¹⁶O丰度)。

自动CVD系统抽提时间优化实验的样品包括植物和土壤, 植物样品为洋紫荆、黄葛树和大叶紫薇的新鲜叶片与枝条。实验操作步骤为: 将样品固定在架子上并放入两个装有自来水的储存箱(约66 L)中, 于25 °C下浸泡24 h以达到同位素平衡。取平衡24 h后箱内水作为参考水, 其中, 浸泡洋紫荆样品的参考水1中 $\delta^2\text{H}$ 为 $(-32.05 \pm 0.33)\text{‰}$, $\delta^{18}\text{O}$ 为 $(-5.05 \pm 0.09)\text{‰}$; 浸泡黄葛树及大叶紫薇的参考水2中 $\delta^2\text{H}$ 为 $(-39.99 \pm 0.61)\text{‰}$, $\delta^{18}\text{O}$ 为 $(-5.53 \pm 0.12)\text{‰}$ 。浸泡后样品吸干表面水分后放入样品管中, 称取质量(叶片样品净质量为 (1.38 ± 0.57) g, 枝条样品净质量为 (2.46 ± 0.60) g), 密封后立即冷藏保存。土壤样品包括黏壤土、壤土及砂土, 采集地点及土壤理化性质信息见表1。将土壤样品研磨过孔径2 mm标准筛后于150 °C烘干24 h后, 称取质量(土壤样品净质量为 (1.50 ± 0.08) g)后装入样品管中, 用自来水作为参考水($\delta^2\text{H}$ 为 $(-36.59 \pm 0.36)\text{‰}$, $\delta^{18}\text{O}$ 为 $(-4.93 \pm 0.17)\text{‰}$)以最大田间持水量对土壤样品在25 °C浸泡复水24 h后, 封口膜密封后放入冰箱冷藏保存。以上样品随机分成4份, 1份利用手动CVD系统进行抽提, 剩下3份利用自动CVD系统进行抽提, 抽提条件为195 °C下分别抽提1、2和3 h。

表1 土壤样品采样地点及理化性质信息

Table 1 Sampling locations and textures of experimental soils

土壤类型	采样地点	w (田间持水量)/%	w (黏粒)/%	w (粉粒)/%	w (砂粒)/%	w (有机质)/(g·kg ⁻¹)	阳离子交换量/(mmol·kg ⁻¹)
黏壤土	广东深圳市	27.52	16.40	63.70	19.90	0.51	1.91
壤土	黑龙江双鸭山市	32.40	9.69	47.41	42.90	32.05	16.71
砂土	宁夏中卫市	19.52	0.00	0.00	100.00	2.85	8.16

木樨主要吸水层位和潜在水源的利用比例实验样品于2022年2月采样自深圳大学杜鹃山, 采样前10 d内无降雨事件。样品包括植物和土壤, 植物物种为木樨(*Osmanthus fragrans* (Thunb.) Loureiro), 植物样品采集与处理方式同上。土壤采样点以木樨为中心, 半径为1 m圆周内不受人为干扰的空地, 并以深度为0~25、25~50、50~75和75~100 cm分4层采集, 分层混匀样品后分别装入样品管并密封后放入冷藏箱, 待返回实验室后放入冰箱中。以上样品均利用自动CVD系统进行抽提。抽提后得

到的样品水同位素测定同上。

2.2 样品抽提

手动CVD系统构造及抽提过程参照文献[5]研究方法。自动CVD系统(北京理加联合科技有限公司)沿用传统经典的真空蒸馏冷冻方法, 利用压缩机制冷代替液氮制冷, 电磁加热代替水浴加热(加热温度 ≤ 195 °C), 在控制系统的监控下自动完成。系统抽提温度推荐195 °C, 且根据不同类型样品设定了不同的标准抽提时间(水2 h, 植物3 h, 土壤3 h)。

2.3 数据分析

采用 R studio (版本 1.4.17) 进行统计分析、模型分析与作图, 通过 t 检验、单因素方差分析法 (one-way ANOVA) 和 Tukey 多重比较法进行显著性比较 ($\alpha = 0.05$), 简单线性回归进行数据拟合 ($\alpha = 0.001$). 实验数据为平均值 $\pm$ 标准误差 ($\bar{x} \pm s, n = 4$). MixSIAR 模型用于计算植物对潜在水源的利用比例, 将水源水 $\delta^2\text{H}$ 、 $\delta^{18}\text{O}$ 和 $\delta^2\text{H} + \delta^{18}\text{O}$ 作为源数据输入模型. 各潜在水源数据平均值设为 0 (默认根系吸水不发生同位素分馏), 蒙特卡罗马尔可夫链运行时长设定为“长” (模型结果已确保 Gelman 和 Geweke 诊断模型收敛), 模型输出结果用平均值表示.

3 实验结果

3.1 手动与自动 CVD 系统抽提效果比较

3.1.1 自来水抽提效果比较

图 1 为不同 CVD 系统及抽提条件对自来水抽提效果. 由图 1 可见, 未经过抽提的样品水中 $\delta^2\text{H}$ 为 $(-30.99 \pm 0.54)\text{‰}$, $\delta^{18}\text{O}$ 为 $(-4.59 \pm 0.06)\text{‰}$; 手动 CVD 系统抽提后的样品水 $\delta^2\text{H}$ 为 $(-31.17 \pm 0.35)\text{‰}$, $\delta^{18}\text{O}$ 为 $(-4.56 \pm 0.08)\text{‰}$; 自动 CVD 系统 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 抽提 3 h 后的样品水 $\delta^2\text{H}$ 为 $(-31.73 \pm 0.56)\text{‰}$, $\delta^{18}\text{O}$ 为 $(-4.70 \pm 0.15)\text{‰}$; 自动 CVD 系统 $195\text{ }^\circ\text{C}$ 抽提 2 h 后的样品水 $\delta^2\text{H}$ 为 $(-31.09 \pm 0.48)\text{‰}$, $\delta^{18}\text{O}$ 为 $(-4.58 \pm 0.09)\text{‰}$. 其中, 经过自动 CVD 系统 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 抽提后的水样较经过其他抽提方

式抽提后的水样 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 贫化, 且标准误差较其他条件更大. 但 one-way ANOVA 分析及 Tukey 多重比较分析表明, 手动及自动 CVD 系统抽提后的水 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 与未经抽提的水样品 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 之间不存在显著性差异.

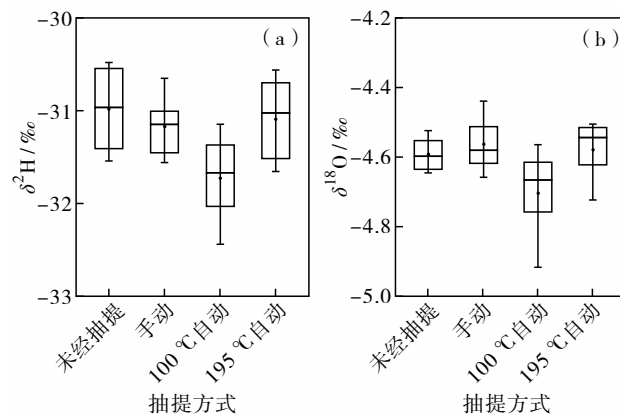


图 1 不同 CVD 系统及抽提条件对自来水抽提效果
(a) $\delta^2\text{H}$; (b) $\delta^{18}\text{O}$

Fig. 1 Effects of different CVD systems and extraction conditions on tap water extraction. (a) $\delta^2\text{H}$ and (b) $\delta^{18}\text{O}$.

3.1.2 野外植物样品的抽提效果比较

利用手动及自动 CVD 系统对 4 种野外采样的木本植物叶片及枝条抽提的结果见图 2. 由图 2 可知, 两种抽提系统对叶片样品抽提结果平均差异 $\delta^2\text{H}$ 为 0.92‰ , $\delta^{18}\text{O}$ 为 0.43‰ ; 枝条样品间平均差异 $\delta^2\text{H}$ 为 1.23‰ , $\delta^{18}\text{O}$ 为 0.32‰ . t 检验结果显示, 两种 CVD 系统对植物枝条及叶样品的抽提结果间均无显著性差异.

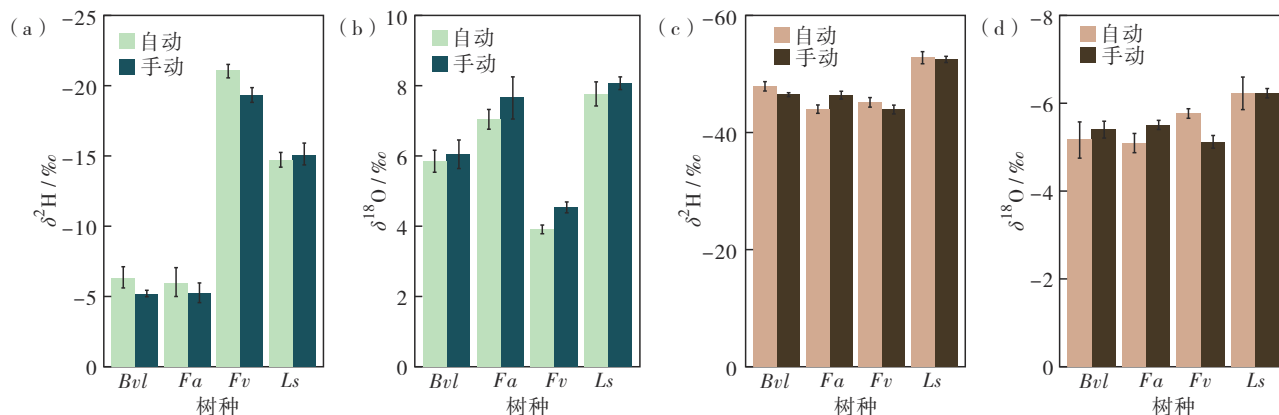


图 2 手动与自动 CVD 系统对原位采样植物 (a) 和 (b) 叶片及 (c) 和 (d) 枝条抽提效果

Fig. 2 Effects of manual and automatic CVD systems on extraction of leaves ((a) and (b)) and stems ((c) and (d)) of plants sampled in situ.

自动及手动 CVD 系统对自来水、植物叶片及枝条样品抽提结果比较见图 3, 其中, 红色虚线为 1:1 参考线, 代表自动与手动 CVD 系统抽提后结果

完全相同; 黑色虚线为利用简单线性回归对自动及手动 CVD 系统抽提后的样品水 H 和 O 同位素值的拟合结果, 灰色阴影代表 95% 置信区间的显著水平.

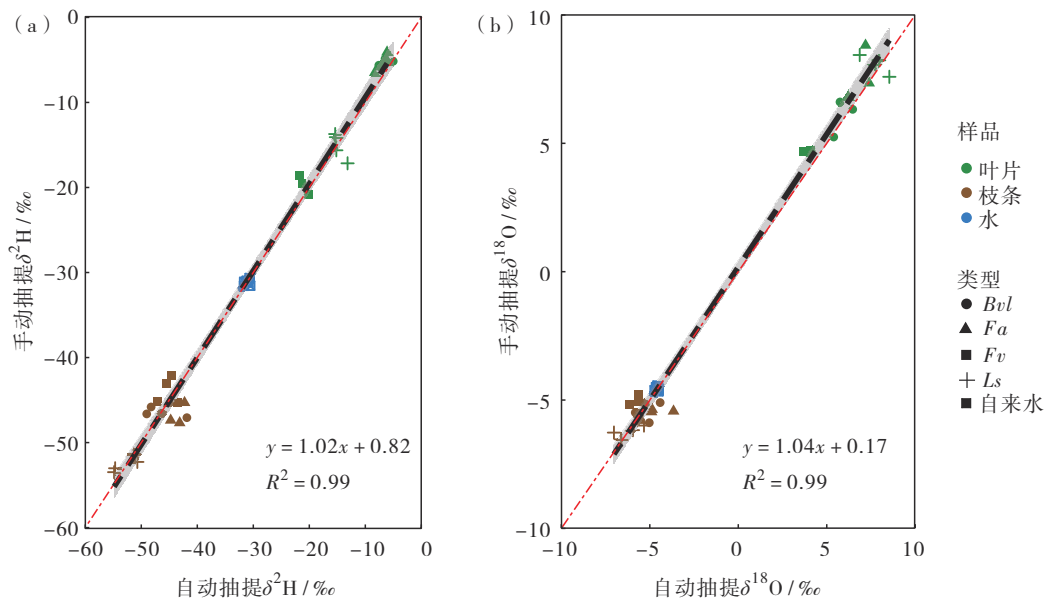


图3 手动与自动CVD系统对植物叶片、枝条及水样品抽提后样品水的(a) $\delta^2\text{H}$ 和(b) $\delta^{18}\text{O}$ 结果比较

Fig. 3 Comparisons of water isotope ratio (a) $\delta^2\text{H}$ and (b) $\delta^{18}\text{O}$ extracted by automatic CVD systems (horizontal axis) versus manual CVD systems (vertical axis) for samples of leaves, stems and water.

3.2 自动CVD系统对不同类型样品抽提时间优化

3.2.1 对复水叶片抽提结果比较

利用CVD系统对复水叶片进行抽提的结果如表2, 其中, 通过手动及不同抽提时间下的自动CVD系统抽提后, 叶片水抽提率均 $\geq 99\%$, 且抽提

后的样品水 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 间在统计学上均无显著性差异. 然而, 所有抽提后叶片水的 $\delta^2\text{H}$ 均较对应参考水表现出贫化现象, 且贫化程度在不同树种间存在差异为 $4.11\text{‰} \sim 7.68\text{‰}$. 即利用CVD系统无法使抽提后复水叶片水恢复至参考水 $\delta^2\text{H}$.

表2 手动与不同抽提时间下自动CVD系统对复水叶片抽提后的样品水 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值

Table 2 $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$ of water extracted from the rehydration leaves with manual and automatic CVD methods under different extraction time

抽提方式	<i>Bvl</i>		<i>Fv</i>		<i>Ls</i>		抽提率 / %
	$\delta^2\text{H} / \text{‰}$	$\delta^{18}\text{O} / \text{‰}$	$\delta^2\text{H} / \text{‰}$	$\delta^{18}\text{O} / \text{‰}$	$\delta^2\text{H} / \text{‰}$	$\delta^{18}\text{O} / \text{‰}$	
手动	-38.52 ± 0.87	-3.83 ± 0.22	-45.05 ± 0.79	-5.15 ± 0.20	-45.89 ± 0.60	-5.21 ± 0.13	≥ 99
自动1 h	-39.73 ± 2.15	-4.88 ± 0.25	-43.38 ± 0.83	-4.88 ± 0.19	-45.14 ± 0.75	-5.25 ± 0.12	≥ 99
自动2 h	-36.16 ± 0.90	-4.33 ± 0.32	-44.31 ± 0.85	-5.46 ± 0.33	-44.15 ± 2.05	-5.67 ± 0.34	≥ 99
自动3 h	-38.02 ± 0.58	-4.73 ± 0.18	-43.41 ± 0.67	-5.51 ± 0.15	-45.46 ± 0.44	-6.17 ± 0.17	≥ 99

3.2.2 对复水枝条抽提结果比较

利用手动及CVD系统对复水枝条进行抽提的结果如表3. 由表3可见, 通过手动及不同时间自动CVD系统抽提后, 枝条水的抽提率均 $\geq 99\%$. 方差分析及多重比较分析结果表明, 若以手动CVD系统抽提后的枝条水为标准值, 通过自动CVD系统抽提1 h后的结果与其有显著性差异, 2 h和3 h的抽提结果与其无显著性差异. 但同样利用两种CVD系统对枝条抽提后的样品水 $\delta^2\text{H}$ 较参考水贫化, 贫化程度较叶片更大, 不同树种间存在差异,

贫化程度为 $6.77\text{‰} \sim 10.77\text{‰}$, 即利用CVD系统无法使抽提后复水枝条水 $\delta^2\text{H}$ 恢复至参考水 $\delta^2\text{H}$.

3.2.3 对复水土壤抽提结果比较

利用CVD系统对复水土壤进行抽提的结果如表4. 由表4可见, 通过手动及不同抽提时间下的自动CVD系统抽提后, 枝条水的抽提率均 $\geq 98\%$. 以手动CVD系统抽提后土壤水为参考值, 则仅有自动CVD系统抽提1 h后的结果与其有显著性差异. 然而, 利用两种CVD系统抽提后的样品水 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 较参考水存在贫化现象, $\delta^2\text{H}$ 贫化程度为

表3 手动与不同抽提时间下自动CVD系统对复水枝条抽提后的样品水 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值¹⁾Table 3 $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$ of water extracted from the rehydration stems with manual and automatic CVD methods under different extraction time

抽提方式	<i>Bvl</i>		<i>Fv</i>		<i>Ls</i>		抽提率 / %
	$\delta^2\text{H} / \text{‰}$	$\delta^{18}\text{O} / \text{‰}$	$\delta^2\text{H} / \text{‰}$	$\delta^{18}\text{O} / \text{‰}$	$\delta^2\text{H} / \text{‰}$	$\delta^{18}\text{O} / \text{‰}$	
手动	-40.91 ± 0.29	$-5.27 \pm 0.09^{\text{ab}}$	-48.65 ± 0.63	$-6.32 \pm 0.14^{\text{a}}$	-48.30 ± 0.63	-5.74 ± 0.25	≥ 99
自动 1 h	-41.64 ± 0.60	$-4.48 \pm 0.18^{\text{b}}$	-45.76 ± 0.61	$-5.22 \pm 0.16^{\text{b}}$	-49.26 ± 0.38	-5.67 ± 0.07	≥ 99
自动 2 h	-42.82 ± 0.94	$-5.13 \pm 0.33^{\text{ab}}$	-46.04 ± 0.27	$-6.43 \pm 0.10^{\text{a}}$	-46.76 ± 0.76	-5.67 ± 0.34	≥ 99
自动 3 h	-40.14 ± 0.89	$-5.25 \pm 0.10^{\text{a}}$	-46.42 ± 0.54	$-6.23 \pm 0.05^{\text{a}}$	-49.99 ± 0.65	-5.84 ± 0.14	≥ 99

¹⁾同列上标字母不同表示不同抽提系统及抽提条件抽提后样品水同位素组成间有显著性差异,无上标字母的数值表示无显著性差异,表4一致。

表4 手动与不同抽提时间下自动CVD系统对复水土壤抽提后的样品水 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 值Table 4 $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$ of water extracted from the rehydration soil with manual and automatic CVD methods under different extraction time

抽提方式	黏壤土		壤土		沙土		抽提率 / %
	$\delta^2\text{H} / \text{‰}$	$\delta^{18}\text{O} / \text{‰}$	$\delta^2\text{H} / \text{‰}$	$\delta^{18}\text{O} / \text{‰}$	$\delta^2\text{H} / \text{‰}$	$\delta^{18}\text{O} / \text{‰}$	
手动	-43.40 ± 0.38	$-5.79 \pm 0.06^{\text{a}}$	-44.45 ± 1.05	$-6.34 \pm 0.10^{\text{ab}}$	-39.76 ± 1.55	$-5.47 \pm 0.33^{\text{ab}}$	≥ 99
自动 1 h	-45.09 ± 0.13	$-6.87 \pm 0.08^{\text{b}}$	-45.88 ± 0.46	$-6.87 \pm 0.11^{\text{b}}$	-42.52 ± 0.56	$-6.51 \pm 0.12^{\text{b}}$	≥ 98
自动 2 h	-43.16 ± 0.19	$-5.86 \pm 0.09^{\text{a}}$	-43.97 ± 0.70	$-5.71 \pm 0.12^{\text{a}}$	-41.84 ± 0.82	$-5.86 \pm 0.10^{\text{a}}$	≥ 99
自动 3 h	-43.51 ± 0.23	$-5.22 \pm 0.03^{\text{a}}$	-43.51 ± 0.20	$-6.11 \pm 0.05^{\text{ab}}$	-41.84 ± 0.65	$-5.69 \pm 0.04^{\text{a}}$	≥ 99

3.17‰~9.29‰, $\delta^{18}\text{O}$ 贫化程度为 0.29‰~1.94‰, 其中, 黏壤土及壤土较沙土贫化程度及标准误差更大。

3.3 木樨的吸水深度及潜在水源的利用比例研究

图4为木樨木质部水与不同深度土壤水 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 的关系。结果表明, 若将土层划分为浅层(0~25 cm)、中上层(25~50 cm)、中下层(50~75 cm)和深层(75~100 cm)4个层级。比较木质部水和土壤水的 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$, 结果表明, 木质部水 $\delta^2\text{H}$

(-50.07 ± 0.25)‰与深层土壤水 $\delta^2\text{H}$ (-51.38 ± 0.96)‰更加接近, 可以推断木樨的主要吸水土层为 75~100 cm。 $\delta^{18}\text{O}$ 结果显示, 木质部水 $\delta^{18}\text{O}$ (-7.27 ± 0.05)‰与中上层土壤水 $\delta^{18}\text{O}$ (-7.26 ± 0.01)‰及深层土壤水 $\delta^{18}\text{O}$ (-7.23 ± 0.09)‰相匹配。由此可以推断, 木樨主要利用中上层及深层土层的土壤水。

利用 MixSIAR 模型进一步对木樨潜在水源利用比例分析结果见图5。由图5可知, 当水源水数据

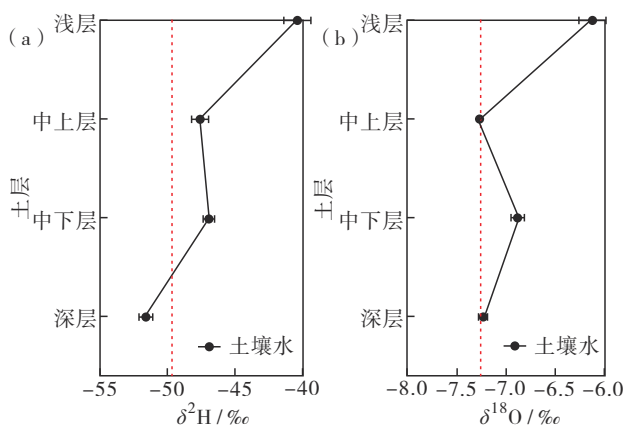


图4 木樨木质部水与土壤水(a)氢和(b)氧同位素关系(红色虚线代表木质部水同位素值)

Fig. 4 The relationship between hydrogen and oxygen isotopes in stem water of *Osmanthus fragrans* (Thunb.) Loureiro and soil water at different depths. The red dotted line represents the water isotopes of xylem.

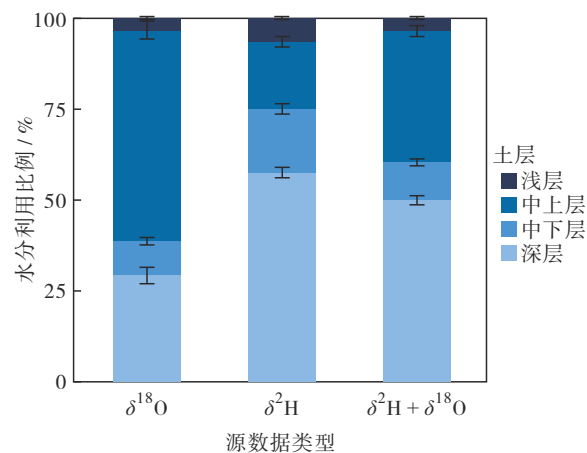


图5 不同源数据类型输入下木樨对4个深度土层潜在水源利用比例

Fig. 5 The relative contributions of soil water at four varying depths to the total water uptake of *Osmanthus fragrans* (Thunb.) estimated by inputting different type of source data.

只考虑 $\delta^2\text{H}$ 时,木樨对浅、中和深层土壤的水分利用率分别为3.6%、46.7%和49.8%,说明木樨对浅层土壤水分利用较少,对中层及深层土壤水分利用较为平均;当水源水数据只考虑 $\delta^{18}\text{O}$ 时,木樨对3种土壤层的水分利用率分别为3.4%、66.1%和30.5%,可以推断木樨对浅层土壤水分利用较少,主要利用中层土壤水分,其次利用深层土壤水分;当水源水数据同时考虑 $\delta^2\text{H}$ 及 $\delta^{18}\text{O}$ 时,木樨的水分利用率为6.5%、36.1%和57.5%,说明木樨主要利用深层土壤水分,其次利用中层土壤水,较少利用浅层土壤。

4 讨论

4.1 手动与自动CVD系统抽提效果比较

通过比较未经过抽提的水样品和使用CVD系统抽提后的水样品之间 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 是否存在差异,检验CVD程序本身对抽提效果的影响^[9]。自动CVD系统在100℃抽提的样品水较195℃抽提结果标准误差更大、 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 均更贫化,说明100℃抽提条件下自动CVD系统可能存在更大分馏,因此,利用自动CVD系统抽提时推荐设定抽提温度为195℃。统计学意义上,手动及自动CVD系统195℃抽提后结果与未经过抽提的水 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 间无显著性差异,说明后续实验中使用的两种CVD系统的抽提程序本身的潜在分馏较小,可以忽略不计。

此外,两种CVD系统对野外采样的植物叶片及枝条的抽提结果无统计学差异,但自动CVD系统抽提结果略小于手动CVD系统,原因可能是:①相较手动CVD系统,自动CVD系统进行抽提过程缺少利用液氮对样品进行固定这一步骤,因此导致将系统抽至真空时样品水升华而发生分馏,然而这种分馏过程十分复杂^[10];②自动CVD系统加热方式为电磁加热,加热过程较为缓慢,且不如水浴加热方式直接,可能促进了样品有机质与动态变化的样品水间的氢交换;③野外采样的植物样品存在天然变异性以及采集、运输及保存过程中人为操作带来一定误差。

4.2 自动CVD系统对不同类型样品抽提时间优化

样品水抽提完成时间会因样品类型与性质、CVD系统结构与设置,以及实验室内部精度等因素而不同^[11]。理论上水提取过程必须完全才能获取无

分馏的水样,但该过程大约需时1~16 h^[4]。众多研究通过缩短抽提时间、优化抽提设备和增加抽提单位等方式,旨在提高抽提效率。如WEST等^[5]通过创建抽提时间曲线,确定了提取未分馏水样的最短时间,其中,植物茎及叶的最短抽提时间为60~75 min及20~30 min,黏土及沙土最短抽提时间为40 min和30 min。然而,Li-2100自动CVD系统为植物及土壤样品设定的标准抽提时间远长于WEST等^[5]所提出的最小抽提时间,因此,有必要进一步优化自动CVD系统的抽提时间,为确定样品水抽提率,本研究对抽提后样品再烘干,得到抽提后样品与再烘干后样品质量差,即水量差。结果显示,自动CVD系统对本植物叶、茎及土壤样品的抽提率均超过98%,符合ARÁGUAS-ARÁGUAS等^[3]提出的抽提率达98%以上可获得准确可重复的结果;与手动CVD系统抽提后的样品水 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 也无显著性差异,因此,本研究建议可考虑将抽提时间进行缩短。但样品的类型、性质及量的大小也会影响抽提时间。文献[12]研究表明,同样量的植物茎样品下,灌木所需的抽提时间小于乔木;土壤样品的黏粒含量及含水量越高,所需的抽提时间越长^[4]。因此,本研究对不同类型的样品给出的优化抽提时间仅作为参考,建议研究者在进行正式抽提操作前,根据样品的量和性质及实验室精度要求等因素设定适合的抽提时间。

通过对比手动及自动CVD系统对复水植物叶、枝条样品及土壤样品进行抽提的结果显示,抽提后的植物样品 $\delta^2\text{H}$ 均较参考水贫化,这与CHEN等^[13-14]研究结果一致,即CVD系统存在固有偏差,导致水提取过程中枝条纤维素中有机结合的氢与环境液态水之间动态交换。这种动态交换程度可能取决于样品的相对含水量。而DIAO等^[14]认为,CVD系统导致的 $\delta^2\text{H}$ 偏差取决于提取水的绝对量,提取水量小于600 μL 会放大偏差。本研究选取的植物均叶片较大,且枝条含水量较高,因此所提取的样品水量均已超过600 μL ,从一定程度上避免了偏差的放大。另外,有研究认为植物茎内不同水池间存在同位素异质性^[15],可能会导致对标记(非浸泡)的样品进行抽提后的样品水同位素值无法恢复至参考值。但本研究通过自来水浸泡样品24 h,以确保样品与周围自来水达到同位素平衡,消除了水池间同位素异质性^[13,16]。同样,植物叶片水也存在 $\delta^2\text{H}$ 偏差,贫化范围略小于木质部水,产生偏差的可能原

因与枝条相似, 贫化程度与叶片含水量、纤维素含量及纤维素可交换氢比例相关. 由于对土壤样品进行浸泡较为困难, 因此, 本研究以土壤最大田间持水量对黏壤土、壤土及沙土进行复水, 以减小对烘干土壤复水后产生的记忆效应^[17]. 对复水的 3 种土壤分别进行抽提的结果显示, 黏壤土及壤土的偏差大于沙土, 与 ORLOWSKI 等^[9]研究结果匹配. 综上所述, 本研究对不同类型样品提出了优化的抽提时间, 同时验证了 CVD 系统在抽提过程中存在的固有偏差, 而导致偏差存在的原因还需进一步的实验探究.

4.3 木樨吸水深度及潜在水源的利用比例

目前研究表明, 非干旱地区淡水植物根部吸收的水分在到达蒸腾部位(叶片或幼嫩未栓化枝条)之前同位素组成不发生变化^[2,13], 因此, 利用 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 可以更加有效及便利地研究植物的水分来源、吸水深度及水分利用模式等^[18]. 通过直接匹配木质部水与不同深度土壤水稳定 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 可以判断植物的吸水深度. 本研究结果显示, 直接对比法考虑 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 作为判断植物吸水深度所得到的结果并不相同. 而王宝宁等^[19]对木樨根系垂直分布研究表明, 木樨主根深可达 2 m、须根丰富且多分布于较浅层土壤中, 基于此, 推断考虑 $\delta^{18}\text{O}$ 作为判断木樨吸水深度研究条件更为准确.

MixSIAR 模型充分考虑了水源的不确定性, 使之成为量化植物水源水利用的主流工具^[20]. 本研究中当水源水数据输入分别为 $\delta^2\text{H}$ 、 $\delta^{18}\text{O}$ 以及 $\delta^2\text{H} + \delta^{18}\text{O}$ 时, 木樨的不同土壤层的水分利用率不同. 换言之, 基于 $\delta^2\text{H}$ 计算的水源水利用率与基于 $\delta^{18}\text{O}$ 及 $\delta^2\text{H} + \delta^{18}\text{O}$ 双同位素的计算结果不一致. 文献^[20]表明, 在盐碱地、干旱及沿海地区, 植物根系吸水过程中可能存在 $\delta^2\text{H}$ 的分馏, 这可能导致利用 $\delta^2\text{H}$ 分析植物水源水贡献率存在偏差, 在湿润地区则较少有报道^[15]. 本研究采样地属亚热带季风气候, 且土壤不为盐碱土, 采样月平均降雨量达 181.4 mm, 因此, 本研究与因干旱及盐碱地导致土壤水与 $\delta^2\text{H}$ 存在偏差的案例无关. 基于以上分析, 本研究认为在湿润非盐碱地区域利用水源水 $\delta^2\text{H}$ 量化植物利用水源水比例需更加谨慎. 结合利用 CVD 系统无法使复水后的茎水及土壤水恢复至参考水的 $\delta^2\text{H}$ 值这一结论, 本研究认为, CVD 系统存在的固有 $\delta^2\text{H}$ 偏差可能导致利用 $\delta^2\text{H}$ 判断植物主要吸水深度存在不确定性, 同时也可能导致利用 $\delta^2\text{H}$ 分析植

物水源水贡献率与利用 $\delta^{18}\text{O}$ 分析存在偏差.

5 结 论

1) 通过对比手动与自动 CVD 系统对自来水、野外采样的木本植物叶及枝条样品进行抽提的结果表明, 两种系统不存在潜在系统分馏且系统间不存在显著性差异, 自动 CVD 系统作为新兴抽提系统, 稳定性与可靠性得以验证.

2) 自动 CVD 系统对浸泡复水的叶片、枝条及土壤在 195 °C 分别抽提 1、2 和 2 h 的结果与利用手动 CVD 系统抽提结果无显著性差异, 相较于 Li-2100 为不同类型样品设立的抽提时间(植物及土壤 3 h), 本研究优化了抽提时间, 提高了抽提效率. 同时本研究也发现经过 CVD 系统无法使复水的植物及土壤样品的 $\delta^2\text{H}$ 值恢复至参考水值, 为 CVD 系统存在固有 $\delta^2\text{H}$ 偏差增添了证据.

3) 通过直接对比法对木樨主要吸水深度及通过 MixSIAR 模型量化木樨的水源水利用比例研究结果表明, 在湿润非盐碱地区域基于样品 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{18}\text{O}$ 对木樨吸水深度及不同深度土壤水利用比例结果不一致, 此差异可能是由于自动 CVD 系统抽提过程存在 $\delta^2\text{H}$ 固有偏差导致. 未来研究或许可以通过对 CVD 系统固有偏差的校正抑或是利用平衡法规避经过抽提导致样品水同位素分馏等举措, 进一步提高对植物水份利用模式研究的准确性.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(42177048); 深圳市海外高层次人才资金孔雀团队资助项目(KQTD201703271516 5926)

作者简介: 简静 (1998—), 深圳大学硕士研究生. 研究方向: 稳定同位素生理生态学研究.

E-mail: j13270701050@163.com

引 文: 简静, 文伟, 宋欣. 全自动真空冷凝抽提系统的检验、优化及应用[J]. 深圳大学学报理工版, 2023, 40(2): 179-187.

参考文献 / References:

- [1] BOWEN G J, CAI Zhongyin, FIORELLA R P, et al. Isotopes in the water cycle: regional- to global-scale patterns and applications [J]. Annual Review of Earth and Planetary Sciences, 2019, 47(1): 453-479.
- [2] YANG Qiu, XIAO HongLang, ZHAO Liangju, et al. Stable isotope techniques in plant water sources: a review [J]. Sciences in Cold and Arid Regions, 2010, 2(2): 112-122.
- [3] ARAGUÁS-ARAGUÁS L, ROZANSKI K, GONFIANTINI

- R, et al. Isotope effects accompanying vacuum extraction of soil water for stable isotope analyses [J]. *Journal of Hydrology*, 1995, 168(1/4): 159-171.
- [4] INGRAHAM N L, SHADEL C. A comparison of the toluene distillation and vacuum/heat methods for extracting soil water for stable isotopic analysis [J]. *Journal of Hydrology*, 1992, 140(1/4): 371-387.
- [5] WEST A G, PATRICKSON S J, EHLENGER J R. Water extraction times for plant and soil materials used in stable isotope analysis [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006, 20(8): 1317-1321.
- [6] 王欣, 贾国栋, 邓文平, 等. 季节性干旱地区典型树种长期水分利用特征与模式[J]. *应用生态学报*, 2021, 32(6): 1943-1950.
- WANG Xin, JIA Guodong, DENG Wenping, et al. Long-term water use characteristics and patterns of typical tree species in seasonal drought regions [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2021, 32(6): 1943-1950. (in Chinese)
- [7] SUN Long, YANG Lei, CHEN Liding, et al. Short-term changing patterns of stem water isotopes in shallow soils underlain by fractured bedrock [J]. *Hydrology Research*, 2019, 50(2): 577-588.
- [8] 张永夏, 胡学强, 洪锐沙, 等. 深圳大学校园维管植物调查研究[J]. *生物学杂志*, 2007, 24(4): 70-72, 76.
- ZHANG Yongxia, HU Xueqiang, HONG Ruisha, et al. Investigation of vascular plant resources on the campus of Shenzhen University [J]. *Journal of Biology*, 2007, 24(4): 70-72, 76. (in Chinese)
- [9] ORLOWSKI N, FREDE H G, BRÜGGEMANN N, et al. Validation and application of a cryogenic vacuum extraction system for soil and plant water extraction for isotope analysis [J]. *Journal of Sensors and Sensor Systems*, 2013, 2(2): 179-193.
- [10] HAM J Y, HUR S D, LEE W S, et al. Isotopic variations of meltwater from ice by isotopic exchange between liquid water and ice [J]. *Journal of Glaciology*, 2019, 65(254): 1035-1043.
- [11] ORLOWSKI N, BREUER L, ANGELI N, et al. Inter-laboratory comparison of cryogenic water extraction systems for stable isotope analysis of soil water [J]. *Hydrology and Earth System Sciences*, 2018, 22(7): 3619-3637.
- [12] JIA Guodong, YU Xinxiao, DENG Wenping, et al. Determination of minimum extraction times for water of plants and soils used in isotopic analysis [J]. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 2012, 10(3/4): 1035-1040.
- [13] CHEN Yongle, HELLIKER B R, TANG Xianhui, et al. Stem water cryogenic extraction biases estimation in deuterium isotope composition of plant source water [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(52): 33345-33350.
- [14] DIAO Haoyu, SCHULER P, GOLDSMITH G R, et al. Technical note: on uncertainties in plant water isotopic composition following extraction by cryogenic vacuum distillation [J]. *Hydrology and Earth System Sciences*, 2022, 26(22): 5835-5847.
- [15] BARBETA A, JONES S P, CLAVÉ L, et al. Unexplained hydrogen isotope offsets complicate the identification and quantification of tree water sources in a riparian forest [J]. *Hydrology and Earth System Sciences*, 2019, 23(4): 2129-2146.
- [16] 马小军, 靳静静, 司炳成, 等. 提取方法对土壤水同位素和植物水源分割的影响[J]. *应用生态学报*, 2019, 30(6): 1840-1846.
- MA Xiaojun, JIN Jingjing, SI Bingcheng, et al. Effects of extraction methods on soil water isotope and plant water source segmentation [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2019, 30(6): 1840-1846. (in Chinese)
- [17] NEWBERRY S L, PRECHSL U E, PACE M, et al. Tightly bound soil water introduces isotopic memory effects on mobile and extractable soil water pools [J]. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 2017, 53(4): 368-381.
- [18] 周艳清, 高晓东, 王嘉昕, 等. 柴达木盆地灌区枸杞根系水分吸收来源研究[J]. *中国生态农业学报中英文*, 2021, 29(2): 400-409.
- ZHOU Yanqing, GAO Xiaodong, WANG Jiaxin. *Lycium barbarum* root water uptake characteristics in the Qaidam Basin irrigation [J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2021, 29(2): 400-409. (in Chinese)
- [19] 王宝宁, 邹世慧, 李玲莉. 两种常绿绿化树种的根系生长规律研究[J]. *绿色科技*, 2019(23): 164-166.
- WANG Baoning, ZOU Shihui, LI Lingli. Study on root growth law of two evergreen tree species [J]. *Journal of Green Science and Technology*, 2019(23): 164-166. (in Chinese)
- [20] POCA M, COOMANS O, URCELAY C, et al. Isotope fractionation during root water uptake by *Acacia caven* is enhanced by arbuscular mycorrhizas [J]. *Plant and Soil*, 2019, 441(1): 485-497.

【中文责编: 晨兮; 英文责编: 艾琳】