

杨会, 吴夏, 俞建国, 等. 湿氧化法测定岩溶区水体中溶解有机碳同位素的影响因素研究[J]. 岩矿测试, 2024, 43(6): 914–927. DOI: [10.15898/j.ykcs.202405130108](https://doi.org/10.15898/j.ykcs.202405130108).

YANG Hui, WU Xia, YU Jianguo, et al. Influencing Factors of Dissolved Organic Carbon Isotope Determination in Water Samples of a Karst Area by Wet Oxidation Method[J]. Rock and Mineral Analysis, 2024, 43(6): 914–927. DOI: [10.15898/j.ykcs.202405130108](https://doi.org/10.15898/j.ykcs.202405130108).

## 湿氧化法测定岩溶区水体中溶解有机碳同位素的影响因素研究

杨会<sup>1,2</sup>, 吴夏<sup>1,2\*</sup>, 俞建国<sup>1,2</sup>, 唐伟<sup>1,2</sup>, 蓝高勇<sup>1,2</sup>

(1. 中国地质科学院岩溶地质研究所, 自然资源部/广西岩溶动力学重点实验室/联合国教科文组织国际岩溶研究中心, 广西 桂林 541004;

2. 广西平果喀斯特生态系统国家野外科学观测研究站, 广西 平果 531406)

**摘要:** 溶解有机碳 (DOC) 是研究岩溶作用强度、岩溶碳源、汇特征与岩溶碳循环过程的重要指标。利用岩溶区 DOC 碳同位素值 ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$ ), 可以精确计算岩溶流域的碳源和汇通量, 这一参数对于全球气候变化研究至关重要。鉴于岩溶区水体中  $\text{HCO}_3^-$  含量较高, DOC 含量较低且组分复杂, 目前湿氧化法应用于测定岩溶区域水体中  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  值的检测方法尚未完善。本文采用 GasBench II 与同位素质谱分析 (IRMS) 联用技术, 探讨了湿氧化法测试岩溶水体中  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  值的影响因素。针对不同市售纯水、顶空瓶与大气的平衡方式、DOC 含量、水中碳酸氢根 ( $\text{HCO}_3^-$ ) 去除, 研究了这些因素对  $^{44}\text{CO}_2$  峰面积和  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  测量的影响。实验结果表明: 不同空白纯水产生的  $^{44}\text{CO}_2$  峰面积存在显著差异, 最大  $^{44}\text{CO}_2$  峰面积是最小  $^{44}\text{CO}_2$  峰面积的 3.8 倍。采用气密针与大气平衡的方式能增强样品信号强度, 同时确保样品测试结果的内部精度最优。水样用磷酸酸化至  $\text{pH} < 3$  时, 可以消除岩溶水体中  $\text{HCO}_3^-$  的影响。使用氮吹仪在 250 mL/min 流速下吹扫 5~10 min, 可以去除酸化后可能存在的游离  $\text{CO}_2$ 。在使用无菌双蒸水作为空白, 气密针与大气平衡, 磷酸酸化至  $\text{pH} < 3$ , 250 mL/min 流速吹扫 5 min 的实验条件下, 对于 DOC 含量大于 2 mg/L 的岩溶区水样, 经过空白校正, 可以确保测试结果与标定参考值的偏差优于 0.40%。湿氧化法测定岩溶区水样中  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  的结果与总有机碳分析仪-稳定同位素质谱仪联机方法进行对比, 测定结果差值小于 0.30%。利用湿氧化法测试岩溶区高  $\text{HCO}_3^-$  含量的  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  样品能够满足测试要求。

**关键词:** 溶解有机碳; 碳酸氢根; 湿氧化法; 同位素质谱法; 空白样品

**要点:**

- (1) 在岩溶区水样中加入磷酸进行酸化, 并经过适当时间的吹扫, 对于 DOC 含量大于 2 mg/L 的样品, 测试精度优于 0.40%。
- (2) 平衡顶空瓶中样品气体的压力可以提高  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  信号的强度, 并减少测试结果的偏差。
- (3) 使用低本底的纯水产生的空白峰面积是影响低含量 DOC 水样测试结果的一个重要因素。

中图分类号: O657.63

文献标识码: A

溶解有机碳 (Dissolved organic carbon, DOC) 通常是研究海洋、河流和水库等水体生物地球化学循环中物质来源和迁移转化的重要指标<sup>[1-3]</sup>。随着对岩溶碳循环过程研究的不断深入, 研究者发现岩溶

收稿日期: 2024-05-13; 修回日期: 2024-09-28; 接受日期: 2024-10-11; 网络出版日期: 2024-10-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (41501222); 广西自然科学基金项目 (2018GXNSFBA138042, 2018GXNSFAA281320); 中国地质科学院岩溶地质研究所基本科研业务费项目 (2023015, 2023018); 浙江省地质碳汇调查、监测与应用试点项目 (浙地质函 [2024]35 号)

第一作者: 杨会, 硕士, 高级工程师, 主要从事同位素地球化学研究。E-mail: [hy5302230@163.com](mailto:hy5302230@163.com)。

通信作者: 吴夏, 博士, 副研究员, 主要从事同位素地球化学研究。E-mail: [cugwuxia@126.com](mailto:cugwuxia@126.com)。

区具有巨大的固碳潜力,是全球碳循环的重要组成部分<sup>[4-6]</sup>。在岩溶流域水体中,存在颗粒无机碳、颗粒有机碳、溶解有机碳和溶解性无机碳在水体内部相互转化,其中DOC是水体中有机碳的主要存在形式。DOC在岩溶流域水体中的含量虽然相对较低,但在碳循环和生物地球化学过程中扮演着重要角色。在岩溶流域中,低DOC含量可能限制了微生物对有机物的利用,影响DOC的循环。因此,了解这些转化过程对于评估岩溶流域碳循环及其对全球碳收支的贡献至关重要<sup>[7-9]</sup>。特别是,岩溶区水体生态系统中DOC可以通过微生物的作用转化为其他形式的碳,这些转化过程有助于维持生态系统中碳的动态平衡,进而对碳汇的稳定性发挥关键作用<sup>[10-11]</sup>。通过分析溶解有机碳的碳同位素值( $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$ )可以指示岩溶水体中的多种形态碳之间的相互转化,可以更深入地理解岩溶碳汇的过程和机理<sup>[12-14]</sup>,进而有效地揭示岩溶流域碳的来源及其对碳循环的贡献率<sup>[15-16]</sup>。

随着稳定同位素测试技术的持续进步,针对海洋、地表河流等环境中 $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$ 值的测试方法日益成熟<sup>[17-18]</sup>。现阶段 $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$ 测试方法主要包括三个步骤:①样品过滤、酸化和去除产生 $\text{CO}_2$ 的过程;②将样品中的DOC氧化转化成 $\text{CO}_2$ 气体;③对 $\text{CO}_2$ 气体进行检测分析。在第二步中,将DOC转化为 $\text{CO}_2$ 的方法主要有高温氧化法和湿氧化法。其中湿氧化法是通过添加酸处理水样,将其中无机碳转化为 $\text{CO}_2$ 并排出,以消除无机碳的干扰。之后,向样品中加入氧化剂,在一定的温度条件下,水中DOC被氧化成 $\text{CO}_2$ 。元素分析仪与气体同位素质谱联用(EA-IRMS)的高温氧化法要求将酸处理后的DOC水样冷冻干燥成固体进行测试,样品中含碳量需达到几十微克至一毫克碳<sup>[19-20]</sup>。该方法对样品前处理的要求较高,需要严格操作以确保分析结果的准确性和可靠性。有研究者对元素分析仪进样系统、氧化炉、检测器和数据采集软件进行改造,使其能够测定含碳量比传统方法少三个数量级的样品,只需41nmol的碳就能保证分析精度优于1.0%<sup>[21]</sup>。另一种方法是通过激光烧蚀冷冻干燥后的小颗粒样品,产生 $\text{CO}_2$ 进行分析,该方法仅需65ng的碳<sup>[22]</sup>。但这些方法都需要将几升的样品过滤、浓缩至1~2mL,前处理流程耗时且样品需求量大。同时,高温氧化法产生的空白值较高,对低含量样品的影响较大,且需要专门的仪器和耗材<sup>[23]</sup>。因此,高温氧化法在 $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$ 测试中效率较低,需要配备多套外围设备,成

本高,技术复杂,难以在日常测试中普及。近年来,总有机碳分析仪与稳定同位素质谱仪联用技术(TOC-IRMS)开始得到应用。这种方法在线酸化处理水样后,将其注入高温富氧的总有机碳分析仪氧化管中,将水体中的DOC转化为 $\text{CO}_2$ ,随后由载气引入,经过纯化、干燥和富集,最终进入稳定同位素质谱仪进行分析测试<sup>[3]</sup>。这种改进方法能够全自动测定海洋和淡咸水样品中的 $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$ 值,并且具有全自动操作和高通量测定的优势<sup>[24-25]</sup>。然而,该分析系统主要针对水体中DOC、TOC含量和 $\delta^{13}\text{C}$ 值,测试指标相对单一,且实验成本较高,这些因素限制了该方法在实验室中的广泛应用。因此研究者也在不断探索新的方法和技术,以克服现有的限制,提高分析效率和经济适用性。

现阶段的湿氧化法经过不断地改进和优化前处理条件,已经具备运行成本低、操作简便和完全自动化的特点。后续研究者将湿氧化法处理后的样品与气体同位素质谱仪联用技术相结合,实现了在线连续测试 $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$ 值,对于碳含量约3 $\mu\text{g}$ 的水样, $\delta^{13}\text{C}$ 的测试精度优于0.4‰,而对于碳含量约1.2 $\mu\text{g}$ 的样品, $\delta^{13}\text{C}$ 的测试精度优于0.8%<sup>[17]</sup>。这表明该方法结合气体同位素质谱仪,能够快速、准确地测定淡水中的 $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$ 值。然而,针对岩溶水体中利用湿氧化法测试 $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$ 值的相关讨论尚不充分。这是由于岩溶地区地表和地下水体中的碳主要以可溶性碳酸盐(Dissolved inorganic carbon, DIC)的形式存在,且水化学类型主要为 $\text{HCO}_3^-$ -Ca型<sup>[26-28]</sup>;此外,岩溶区水体中DOC含量相对于DIC含量较低<sup>[29]</sup>。针对岩溶区水体中高Ca离子是否可能会与氧化剂反应,形成难溶的沉淀,干扰氧化过程;高DIC导致在湿氧化过程中产生大量的 $\text{CO}_2$ ,影响样品中 $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$ 值的准确测定;低DOC含量影响着湿氧化法可能无法准确测定低含量的样品,这些特性均需要对湿氧化法测定岩溶水体中 $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$ 值的前处理条件进行相应的优化。因此,本文旨在研究纯水对空白信号的影响、顶空瓶与大气的平衡方式、无机碳去除效果等因素,这些因素可能影响 $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$ 值的测试结果。通过使用邻苯二甲酸氢钾和碳酸氢钠配制不同溶液,模拟岩溶水体中的DOC和DIC情况,以优化湿氧化法测定岩溶水体 $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$ 值的前处理条件。同时,利用优化后的湿氧化法测定岩溶水体中 $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$ 值,并与TOC-IRMS法进行结果比对研究。本文研究目标是明确湿氧化法测试岩溶区水体 $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$ 值的最佳实验条件,提高该方法的准确度。

## 1 实验部分

### 1.1 样品信息

样品地理位置: 采样地点位于浙江省杭州市富阳区万市镇葛溪流域。该流域是钱塘江支流渚渚江的支流, 发源于浙江临安市告塘坞村张村坞, 流经杭州市富阳区, 距离杭州市区直线距离大约在 54 ~ 76km。流域面积大约 400km<sup>2</sup>, 其中碳酸盐岩分布面积约占 150km<sup>2</sup>, 涵盖了浙江省所有地质时代的碳酸盐岩地层。在浙西北的葛溪流域采集了 2 个岩溶水样。样品采集后, 使用 1000mL 聚丙烯灭菌瓶进行灌装, 并带回实验室进行过滤处理。随后, 将过滤后的样品在 4℃ 低温条件下保存, 以备后续测试使用。

### 1.2 样品前处理方法

湿氧化法的前处理流程如下: ①移取 4mL 样品放入顶空瓶中; ②向顶空瓶中加入 1mL 氧化剂; ③加入适量的 8.5% 磷酸, 调节溶液的 pH < 3; ④使用吹扫装置将顶空瓶中的 CO<sub>2</sub> 吹扫干净; ⑤将顶空瓶放置在恒温加热器上, 在 100℃ 下加热 1h; ⑥加热后, 将顶空瓶冷却至室温; ⑦离心去除瓶盖上的水滴; ⑧将处理后的顶空瓶放置在多用途气体样品制备装置样品盘中, 平衡后使用气体同位素质谱仪进行测试 (图 1)。其中吹扫过程分为两步: 第一步, 在拧上顶空瓶盖之前, 使用氮吹仪先吹扫水样中酸化产生的游离 CO<sub>2</sub>。为了方便顶空瓶的取放并避免吹气针被腐蚀, 氮吹仪的吹气针上装配了聚四氟乙烯软管。第二步, 拧上顶空瓶盖之后, 将顶空瓶放置在多用途气体样品制备装置样品盘中, 吹扫顶空瓶顶部的空气, 以排除顶空瓶中的氧气和其他气体, 确保测试的准确性。

### 1.3 实验仪器

气体同位素质谱仪 (MAT253 型, 美国 ThermoFisher 公司), 配套外围设备配有: 多用途气体样品制备装置 (GasBench II 型, 美国 ThermoFisher 公司)、元素分析仪 (Flash 2000 型, 美国 ThermoFisher 公司), 主要用于水样中  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  分析测试。干式氮吹仪 (LC-DCY-24GP 型, 上海力辰邦西仪器科技有限公司), 主要用于吹扫水样中游离 CO<sub>2</sub>; 干式恒温器 (MK200-4 型, 杭州奥盛仪器有限公司), 主要用于恒温加热样品, 使氧化剂氧化水中 DOC; 百万分之一天平 (XP6 型, Mettler Toledo 公司); 万分之一天平 (BS224S 型, Sartorius 公司); 超纯水仪 (Advantage A10 型, Merck Millipore 公司)。

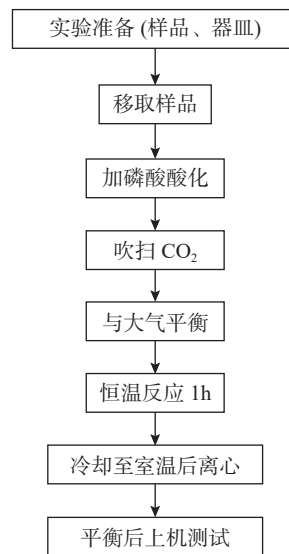


图1 实验流程总体示意图

Fig. 1 Overall diagram of experimental process.

### 1.4 主要试剂

溶于水的有机化合物: 本实验初选邻苯二甲酸氢钾 (KHP)、葡萄糖 (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) 作为 DOC 实验的工作标准物质。邻苯二甲酸氢钾: 工作基准试剂, 天津市科密欧化学试剂有限公司生产; 葡萄糖, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司生产; 过硫酸钾, 优级纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司生产; 磷酸, 分析纯, 成都市科隆化学品有限公司生产。

纯水: 市场上销售的不同类型的水, 分别为色谱级水: 厦门艾美漫妮生物科技有限公司生产; 三次蒸馏水: 广州和为医药科技有限公司生产; 一级超纯水: 广州和为医药科技有限公司生产; 无菌双蒸水: LABCOMS 公司生产; 一次蒸馏水: 比克曼生物科技有限公司生产; 本实验室超纯水: 为 Milli-Q Advantage A10 超纯水仪制水。选择不同纯水的目的是为了确定能够产生最低空白信号强度的纯水, 从而减少对样品检测结果的干扰。

邻苯二甲酸氢钾溶液的配制: ①称取 2.1273g 邻苯二甲酸氢钾, 纯水溶于 1000mL 容量瓶中, 定容至刻度, 得到含碳量为 1g/L 的母液; ②采用逐级稀释的方法, 对 1g/L 的母液进行稀释, 以制备不同含碳量的溶液。首先, 将 1g/L 母液稀释至含碳量为 25mg/L 的溶液。然后, 进一步稀释, 分别制备含碳量为 15.0、10.0、5.0、2.0、1.0mg/L 的溶液。该试剂的使用是为了模拟不同 DOC 浓度梯度的岩溶水体环境。

碳酸氢钠溶液的配制: 称取 10.50g 碳酸氢钠, 纯水溶于 1000mL 容量瓶中, 配制成含 7625mg/L 的



HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>溶液。在岩溶区,水体中通常含有较高浓度的无机碳,尤其是碳酸氢盐(HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>)。该试剂的使用是为了模拟岩溶水体中存在无机碳的影响。

邻苯二甲酸氢钾-碳酸氢钠混合溶液的配制:根据岩溶区 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量为 280.6mg/L,非岩溶区东江水 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量为 30.5mg/L,混合水 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量为 219.6mg/L<sup>[30]</sup>,本实验模拟水体中 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>的情况<sup>[31]</sup>,配制了两种混合溶液 A 和 B。A 溶液含有 122mg/L 的 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>和含碳量为 5mg/L 的邻苯二甲酸氢钾:分别移取 1.25mL 含碳量为 1g/L 的邻苯二甲酸氢钾溶液和 4mL 7625mg/L 的 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>溶液于 250mL 容量瓶中,加纯水定容。B 溶液含有 305mg/L 的 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>和含碳量为 5mg/L 的邻苯二甲酸氢钾:分别移取 1.25mL 含碳量为 1g/L 的邻苯二甲酸氢钾溶液和 10mL 7625mg/L 的 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>溶液于 250mL 容量瓶中,加纯水定容。

氧化剂的配制:①称取 2.00g 过硫酸钾放入烧杯中;②加入 50mL 超纯水并用玻璃棒搅拌使过硫酸钾充分溶解;③加入 0.1mL 的 85% 磷酸。配制的氧化剂应在 24h 内使用,以确保其活性。

### 1.5 两种标准物质的 $\delta^{13}\text{C}$ 值标定

碳同位素标准物质:国际原子能标准 IAEA-CH-6 ( $\delta^{13}\text{C}=-10.449\%$ );国家一级标准物质:GBW04407 ( $\delta^{13}\text{C}=-22.43\%$ )、GBW04408 ( $\delta^{13}\text{C}=-36.91\%$ )。

利用元素分析仪和气体同位素质谱仪对邻苯二甲酸氢钾和葡萄糖两种化合物进行标定,主要步骤为:使用 4mm×6mm 的锡杯称取一定量的碳同位素标准物质和化合物,放入元素分析仪测定碳同位素值。利用碳同位素标准物质的真值和测量值绘制校准曲线(相关系数  $R=0.999$ ),测量结果经校准后即邻苯二甲酸氢钾和葡萄糖的标定参考值。邻苯二甲酸氢钾和葡萄糖的  $\delta^{13}\text{C}$  标定参考值分别为  $-29.76\%$  和  $-11.09\%$  ( $n=6$ )。由于岩溶水体的  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  值主要分布范围为  $-20\%$  至  $-30\%$ <sup>[15-16]</sup>,因此本实验选择邻苯二甲酸氢钾作为可溶于水的化合物进行后续实验。

### 1.6 方法优化

本实验的目的是优化实验条件以提高检测结果的准确性,方法优化内容:①纯水本底的测试:实验首先评估了不同级别纯水对空白信号的影响。在条件实验中,选择了本底最低的纯水用于配制溶液,以减少实验空白值。②顶空瓶压力平衡:针对顶空瓶吹扫后可能出现的瓶内压力过大的问题,研究了与大气平衡的不同方法:不与大气平衡;使用双头针与大气平衡,其中针管的一头放置在水中,以防止大气

倒灌进入顶空瓶;使用一次性注射器的针头手动扎进瓶盖,实现与大气平衡;采用 10mL 气密针与大气平衡。③通过配制不同浓度的邻苯二甲酸氢钾溶液,检验上述实验条件优化后的实验结果准确性。④模拟岩溶水体中 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>的存在,通过改变磷酸体积和氮吹仪吹扫时间,检验 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>的去除效果。最后,利用优化后的实验条件对岩溶区的 2 个水样进行检测。将检测结果与 TOC-IRMS 的检测结果进行对比,以验证优化条件的有效性和可靠性。

### 1.7 数据处理

检测的结果需要进行空白校正,可以根据质量平衡原理进行校正,校正公式如下:

$$\delta^{13}\text{C}_T \times A_T = \delta^{13}\text{C}_S \times A_S + \delta^{13}\text{C}_B \times A_B \quad (1)$$

$$\delta^{13}\text{C}_S = (\delta^{13}\text{C}_T \times A_T - \delta^{13}\text{C}_B \times A_B) / (A_T - A_B) \quad (2)$$

式中: $\delta^{13}\text{C}_T$  为样品测得  $\delta^{13}\text{C}$  值( $\%$ ); $\delta^{13}\text{C}_S$  为样品校正后的  $\delta^{13}\text{C}$  值( $\%$ ); $\delta^{13}\text{C}_B$  为空白  $\delta^{13}\text{C}$  值( $\%$ ); $A_T$  为测得样品峰面积( $V_s$ ); $A_S$  为样品峰面积( $V_s$ ),即为测得样品峰面积扣除空白峰面积; $A_B$  为空白峰面积( $V_s$ )。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同类型的纯水对空白信号的影响

由于自然水体中 DOC 含量相对较低,例如河水中 DOC 含量低至 0.4mg/L<sup>[32]</sup>,如果空白产生信号强度过高,可能掩盖样品所产生的信号强度,在数据处理时扣除空白峰面积从而导致检测结果的不准确。因此在测定  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  值的前处理过程中,本底控制对测试结果的准确性起着至关重要的作用。此外,在配制 DOC 溶液和氧化剂时,使用的纯水质量也会对溶液和化学试剂产生影响。因此,本研究选取了 6 种不同类型的纯水,以评估它们对空白信号的影响。6 种纯水产生的信号强度数据如表 1 所示。前 5 种纯水为市售纯水,最后一种为实验室自制的超纯水(电阻率 18.2M $\Omega$ ·cm)。测试结果显示,这 6 种纯水对空白信号的影响存在显著差异。一级超纯水对空白信号的影响最大,其<sup>44</sup>CO<sub>2</sub>峰面积平均值为 6.1Vs,而无菌双蒸水对空白信号的影响最小,其<sup>44</sup>CO<sub>2</sub>峰面积平均值为 1.6Vs,且该纯水三次测量的标准偏差最小,仅为 0.1Vs。在本实验中纯水的最大峰面积是最小峰面积的 3.8 倍,这表明在实验过程中纯水的选择至关重要,它直接影响到低浓度样品测试结果的准确性和后续条件实验的结果。由此可见,湿氧化法不仅可以有效地控制空白信号<sup>[23]</sup>,而且通过前期选择合适的纯水,能够进一步降低空白信号对样品信

表 1 不同纯水的<sup>44</sup>CO<sub>2</sub> 峰面积

Table 1 The <sup>44</sup>CO<sub>2</sub> peak areas of different pure water.

| <sup>44</sup> CO <sub>2</sub> 峰面积 | 色谱级水 | 三次蒸馏水 | 一级超纯水 | 无菌双蒸水 | 一次蒸馏水 | 实验室超纯水 |
|-----------------------------------|------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 第 1 次测定值 (Vs)                     | 2.8  | 2.8   | 6.8   | 1.5   | 6.6   | 2.1    |
| 第 2 次测定值 (Vs)                     | 3.0  | 3.5   | 5.3   | 1.6   | 5.0   | 2.3    |
| 第 3 次测定值 (Vs)                     | 3.9  | 2.4   | 6.2   | 1.6   | 5.8   | 2.4    |
| 标准偏差 (Vs)                         | 0.6  | 0.6   | 0.8   | 0.1   | 0.8   | 0.1    |
| 平均值 (Vs)                          | 3.2  | 2.9   | 6.1   | 1.6   | 5.8   | 2.3    |
| 电导率 (μm/cm)                       | 0.01 | 0.01  | 0.01  | 0.01  | 0.1   | 0.05   |

号的影响。并且对于下一步针对 DOC 含量低于 1mg/L 的样品的测试提供重要参考依据。在后续实验中,使用无菌双蒸水来配制溶液和洗涤器皿。目前,本实验室仅研究了纯水对空白信号的影响,尚未考虑过硫酸钾和磷酸的级别对空白的影响。在下一步实验中,将开展化学试剂对空白影响的研究,以期将空白信号降至最低。

2.2 顶空瓶与大气的平衡方式对信号和  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  值的影响

在进行高温燃烧法或湿氧化法的空白校正时,需要准确计算空白相对于实际样品的质量贡献。这是因为整个测量系统中由碳量产生的相关峰面积对于获得准确的结果至关重要<sup>[17]</sup>。使用 GasBench II 进行氦气吹扫顶空瓶以去除空气时,吹扫后的顶空瓶内压力高于吹扫前的压力,这种正压力可能会影响水样中 DOC 的氧化释放、样品以及空白信号的强度。本研究通过使用含碳量为 25mg/L 的邻苯二甲酸氢钾溶液进行实验,并将纯水当作空白样品进行空白监测,四种不同平衡方式结果如图 2 所示。实验结果表明:不与大气平衡的邻苯二甲酸氢钾溶液产生的<sup>44</sup>CO<sub>2</sub> 峰面积明显低于与大气平衡的峰面积(图 2a),这可能是由于样品瓶吹扫后高压力的氦气背景使得释放的 CO<sub>2</sub> 被稀释,导致进入气体同位素质谱仪的 CO<sub>2</sub> 体积减少,或者是因为顶空瓶顶部气体压力过大,不利于 CO<sub>2</sub> 的释放。采用双头针平衡方式产生<sup>44</sup>CO<sub>2</sub> 峰面积最高(图 2a),这可能是因为顶空瓶中的氦气压力与大气完全平衡,导致反应产生的 CO<sub>2</sub> 体积稀释最小,但同时也增加了空白<sup>44</sup>CO<sub>2</sub> 峰面积(图 2b),这可能会降低 DOC 含量低的样品数据准确性。手动扎针平衡和气密针扎针平衡产生的<sup>44</sup>CO<sub>2</sub> 峰面积基本一致,但是采用气密针方法测得的<sup>44</sup>CO<sub>2</sub> 峰面积重现性最好(图 2a),这可能是因为气密针能够更精确地控制排除气体体积,从而有利于保持每个顶空瓶中气体与大气平衡后的压力基本相同。

因此,测试样品时采用气密针与大气平衡的方式提供了最好的  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  值重现性(图 2c),且与邻苯二甲酸氢钾标定参考值偏差最小。不与大气平衡的  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  值与邻苯二甲酸氢钾标定参考值偏差最大。选择使用气密针与大气平衡的方式可以在增加<sup>44</sup>CO<sub>2</sub> 峰面积的同时,保持  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  值具有良好的重现性,从而使得  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  测定值与标定值之间的偏差最小。这种方法对于提高低 DOC 含量样品的测试准确性和可靠性具有重要意义。

2.3 DOC 含量对  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  值的影响

岩溶区水体中 DOC 含量通常具有较大的含量变化范围,其范围通常在 0.87 ~ 6.89mg/L 之间<sup>[29]</sup>。在测定自然水体中  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  值时,结果主要受到空白校正和氧化效率的共同影响<sup>[33]</sup>。因此,在实验过程中产生的空白对 DOC 含量和  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  值的测定均有一定的影响,这种影响可以通过质量平衡进行校正。本实验通过使用不同浓度的邻苯二甲酸氢钾配制溶液,检测<sup>44</sup>CO<sub>2</sub> 峰面积扣除空白峰面积后与邻苯二甲酸氢钾溶液含碳量的关系,线性回归系数达到 0.9982(图 3)。本实验说明不同浓度的邻苯二甲酸氢钾溶液含碳量与<sup>44</sup>CO<sub>2</sub> 的峰面积呈显著的线性关系,通过<sup>44</sup>CO<sub>2</sub> 的峰面积大小可以计算出溶解有机碳的浓度,为溶解有机碳的浓度提供参考。

对于低浓度的邻苯二甲酸氢钾配制溶液未经过空白校正时, $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  测定值与标定参考值的偏差较大,含碳量为 1mg/L、2mg/L、5mg/L 的邻苯二甲酸氢钾配制溶液  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  测定值与标定参考值的偏差分别为 2.35%、1.48%、0.91%。然而,经过空白校正后偏差降低,与标定参考值的偏差分别为 0.66%、0.30%、0.39%(图 4)。这表明空白校正是提高低浓度样品测试结果准确性的关键步骤。对于含碳量达到 15mg/L 和 25mg/L 的邻苯二甲酸氢钾配制溶液,两者的测定值与标定参考值基本一致,偏差仅为 0.15%和 0.07%。这说明溶液浓度越高,产生的峰面

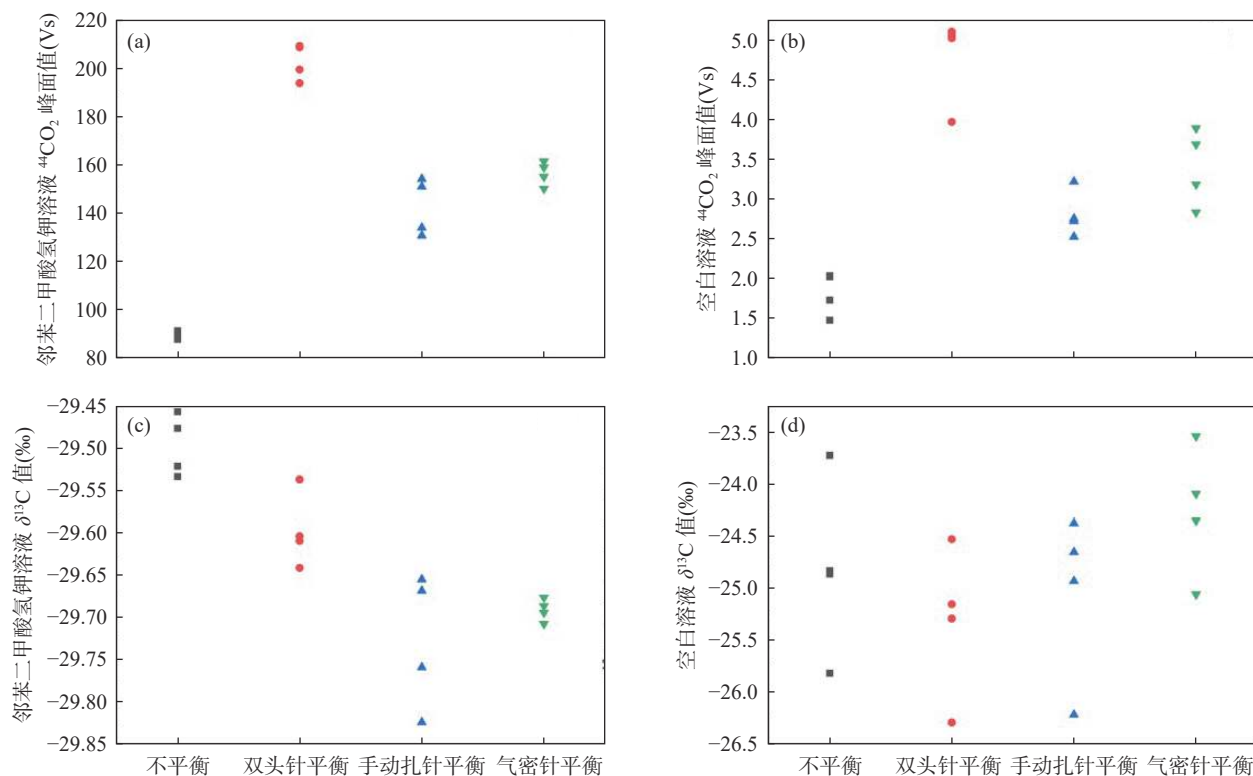


图2 不平衡、双头针平衡、手动扎针平衡和气密针平衡方式对样品 $^{44}\text{CO}_2$ 峰面积和 $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$ 值的影响(图中每种方法4个点代表4份测试样品)

Fig. 2 Effects of unbalanced, dual-needle balancing, manual puncture balancing, and airtight needle balancing methods on the  $^{44}\text{CO}_2$  peak areas and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  values of the samples (Each method in the graph is represented by four points, indicating four test samples).

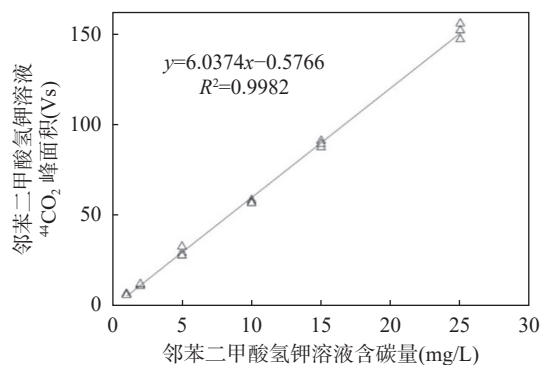


图3 邻苯二甲酸氢钾溶液含碳量与 $^{44}\text{CO}_2$ 峰面积的关系

Fig. 3 Relationship between the carbon content of potassium hydrogen phthalate and  $^{44}\text{CO}_2$  peak area.

积越大,空白对其影响就越小。因此,对于低浓度样品,空白校正尤为重要。综上所述,湿氧化方法在处理DOC含量高于2mg/L的样品时, $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$ 值测试准确度可以达到0.40‰以内。

## 2.4 无机碳去除效果对 $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$ 值的影响

### 2.4.1 加入磷酸的体积

岩溶区水样具有 $\text{pH} > 7$ 和高 $\text{HCO}_3^-$ 含量的特

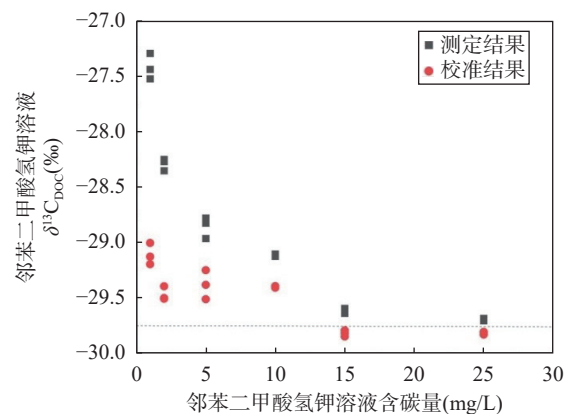


图4 不同含碳量的邻苯二甲酸氢钾的 $\delta^{13}\text{C}$ 值

Fig. 4 The  $\delta^{13}\text{C}$  values of potassium hydrogen phthalate at different carbon concentrations.

性,其 $\text{HCO}_3^-$ 含量在280.6mg/L左右变化<sup>[30]</sup>。因此,传统湿氧化法将溶液调至 $\text{pH} < 3$ ,是否能够彻底地消除无机碳对 $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$ 值的影响,以及加入过量的磷酸是否会导致空白值上升或是否存在其他因素影响测试结果的准确性,这些问题亟需进行深入探讨和

明确。因此,在配制 122mg/L 和 305mg/L 两种含有  $\text{HCO}_3^-$  的邻苯二甲酸氢钾溶液中,加入浓度为 8.5% 磷酸使溶液  $\text{pH} < 3$ , 研究加入磷酸体积是否对  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  值存在影响。本实验设计了加入 60 $\mu\text{L}$ 、100 $\mu\text{L}$  和 150 $\mu\text{L}$  磷酸的实验,每组三个平行样品,结果如图 5 所示。加入 8.5% 的磷酸 60 $\mu\text{L}$ , 两种溶液中  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  值均为 -29.43‰ 左右,说明加入 60 $\mu\text{L}$  磷酸能够完全去除 305mg/L 的  $\text{HCO}_3^-$ 。随着加入磷酸体积增加, $\delta^{13}\text{C}$  值的变化小于 0.15‰(图 5 中 a、b)。理论上,向样品中加入过量磷酸可以更有效地去除样品中的  $\text{HCO}_3^-$ 。然而,在确保完全去除样品中  $\text{HCO}_3^-$  的同时,应避免加入过量的磷酸,以防止由此引起的空白信号增加。因此,邻苯二甲酸氢钾溶液在使用磷酸酸化时, $\text{pH} < 3$  即可满足实验需求。

#### 2.4.2 氦气吹扫时间

在岩溶区,通过溶蚀过程,大气和土壤中的  $\text{CO}_2$  持续转化为岩溶水体中的  $\text{HCO}_3^-$ 。然而, $\text{HCO}_3^-$  的稳定性较差,部分  $\text{HCO}_3^-$  会分解并释放出游离  $\text{CO}_2$  进入水体<sup>[34]</sup>。与此同时,岩溶水体中 DIC 含量较高,在酸化过程中也会释放出一部分  $\text{CO}_2$  溶解于水

体中。因此,根据岩溶区水样  $\text{HCO}_3^-$  含量和游离  $\text{CO}_2$  的特点,利用碳酸氢钠配制了 122mg/L 和 305mg/L 两种含  $\text{HCO}_3^-$  的邻苯二甲酸氢钾溶液,使用氮吹仪在流速为 250mL/min 进行吹扫,分别吹扫 5min、10min、15min。经空白校正后的  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  结果如图 6,对于含有相同浓度  $\text{HCO}_3^-$  的溶液,吹扫 5min 和吹扫 10min 的  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  值测试结果基本一致(图 6 中 a、b),这可能是因为氮吹仪的流速相对较高,5min 就能将溶液中氧化 DOC 所释放的  $\text{CO}_2$  吹扫干净。对于含有较高浓度的 305mg/L  $\text{HCO}_3^-$  溶液,使用 5min 同样也能将溶液中氧化 DOC 所释放的  $\text{CO}_2$  吹扫干净。当吹扫 15min 时,两种溶液中的  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  值均出现逐渐偏正的现象,这可能是因为氮吹仪的流速过高,吹扫时间过长导致溶液中富集  $^{12}\text{C}$  易挥发的有机质损失,从而使  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  值的检测结果偏重。

由此可见,选择合适的吹扫时间能够有效地减少在高纯氦气吹扫无机碳过程中,在室温下易潮解或在低 pH 值条件下易挥发的有机物被吹扫出去,从而避免这些因素对 DOC 测定结果的影响<sup>[18]</sup>。因

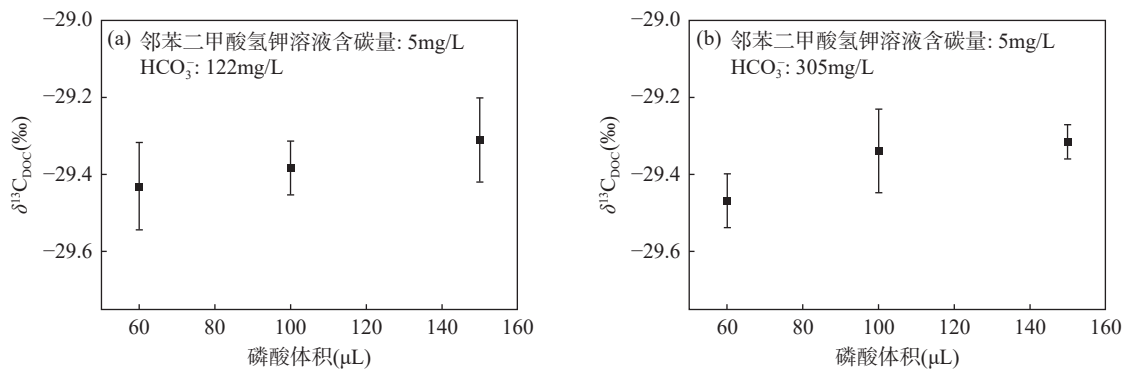


图5 磷酸体积对  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  值的影响

Fig. 5 Effect of phosphoric acid volume on  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  value.

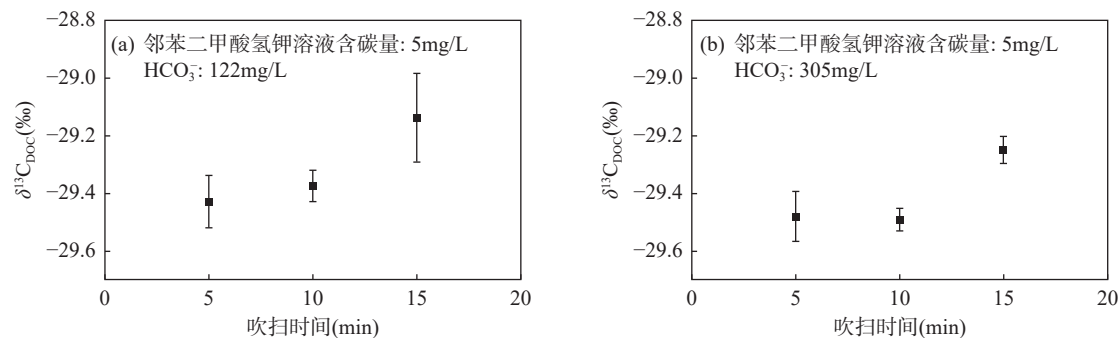


图6 不同的吹扫时间对  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  值的影响

Fig. 6 Effect of different blowing time on  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  value.



此使用氮吹仪进行 CO<sub>2</sub> 吹扫时, 将时间控制在 5 ~ 10min。

2.5 湿氧化法在岩溶区水样的应用

采样点位于浙江省杭州市富阳区万市镇的葛溪流域。该流域覆盖了浙江省内各个时代的碳酸盐岩地层。此外, 采样点未受到人为活动的干扰, 因此 DOC 含量没有异常, 确保了所采集样品能够代表岩溶水体的特性。在采集的 2 个水样 (样品编号为 W1、W2) 中, 其 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 含量分别为 168.97mg/L、183.61 mg/L, DOC 含量分别为 1.20mg/L、1.40mg/L。在比较 TOC-IRMS 方法和湿氧化法进行 δ<sup>13</sup>C<sub>DOC</sub> 值测定时, 两种方法的结果显示了较高的一致性 (表 2)。其中 TOC-IRMS 测定的 δ<sup>13</sup>C<sub>DOC</sub> 值分别为 -25.38‰、-25.12‰, 而湿氧化法测定每个样品三次, 其结果与 TOC-IRMS 测定结果的最大差值分别为 0.29‰和 -0.28‰, 表明湿氧化法在测定 δ<sup>13</sup>C<sub>DOC</sub> 值时具有较高的准确性和重复性。

本文优化的湿氧化法测定岩溶区水样与 TOC-IRMS 测定结果之间存在一定差异。这可能是 δ<sup>13</sup>C<sub>DOC</sub> 在测试过程中, 不同分析方法引入的系统误差, 或者样品的保存条件对测试结果产生影响。因为样品在存放过程中, 由于微生物的作用, δ<sup>13</sup>C<sub>DOC</sub> 值可能会发生变化。研究表明, 内源性 DOC 可以支持一定比例的细菌生长代谢活动, DOC 是微生物代谢活动的主要能量来源 [35-37]。岩溶区水体中 DOC 主要来自于水生物的初级生产力、外源水和水生生物作用对无机碳的吸收转化。水生植物、浮游植物及自养微生物光合作用生成的 DOC 可以被水体中的异养微生物降解矿化再次形成 CO<sub>2</sub> 释放到大气中 [38-40]。

因此, 为了减少微生物活动对 DOC 值的影响, 采集的样品应尽快经过 0.45μm 的滤膜过滤, 并在 4℃ 温度下保存, 以减缓微生物的活动。这些措施有助于保持样品的原始状态, 减少测试误差, 确保

表 2 岩溶区样品 DOC 的 δ<sup>13</sup>C<sub>DOC</sub> 值

Table 2 The δ<sup>13</sup>C<sub>DOC</sub> values in karst area samples.

| 样品编号 | 本实验 δ <sup>13</sup> C <sub>DOC</sub> 测试 |        | 标准偏差<br>(‰) | TOC-IRMS 法<br>δ <sup>13</sup> C <sub>DOC</sub> 测定值<br>(‰) | 两种方法<br>差值 (‰) |
|------|-----------------------------------------|--------|-------------|-----------------------------------------------------------|----------------|
|      | 测定值                                     | 平均值    |             |                                                           |                |
| W1   | -25.24                                  |        |             |                                                           | 0.14           |
|      | -25.24                                  | -25.19 | 0.09        | -25.38                                                    | 0.14           |
|      | -25.09                                  |        |             |                                                           | 0.29           |
| W2   | -25.40                                  |        |             |                                                           | -0.28          |
|      | -25.35                                  | -25.32 | 0.09        | -25.12                                                    | -0.23          |
|      | -25.22                                  |        |             |                                                           | -0.10          |

δ<sup>13</sup>C<sub>DOC</sub> 值测定结果的可靠性。

3 结论

针对岩溶水体的特性, 即 pH>7、高 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 含量和低 DOC 含量, 对传统的湿氧化法进行了优化。通过条件实验选择的纯水降低了空白对测试结果产生影响, δ<sup>13</sup>C<sub>DOC</sub> 检测结果经过空白校正后, 能提高检测结果的准确性。此外, 确定了适合岩溶水样的最佳酸化条件、吹扫时间和平衡方式, 以消除游离 CO<sub>2</sub> 及氧化反应产生的 CO<sub>2</sub> 对结果的影响。在控制空白样品信号强度的同时, 提高了水样中 δ<sup>13</sup>C<sub>DOC</sub> 测量的信号强度, 确保了测试结果的准确性。经过优化实验条件, 该方法不仅能够有效地应用于实际样品的分析测试, 还实现了对试剂用量的有效控制。

本文针对岩溶区水体中 δ<sup>13</sup>C<sub>DOC</sub> 值的测试, 对湿氧化法进行了优化, 以避免空白信号、平衡方式、无机碳去除等因素对测试结果的干扰。然而, 对于 DOC 含量低于 1mg/L 的极低含量自然水样的前处理方法, 可以通过低温浓缩来提升水样中单位体积 DOC 的含量, 但实验条件尚需进一步探究和优化。

**致谢:** 感谢审稿人对本文提出的建设性修改意见和指导。



# Influencing Factors of Dissolved Organic Carbon Isotope Determination in Water Samples of a Karst Area by Wet Oxidation Method

YANG Hui<sup>1,2</sup>, WU Xia<sup>1,2\*</sup>, YU Jianguo<sup>1,2</sup>, TANG Wei<sup>1,2</sup>, LAN Gaoyong<sup>1,2</sup>

(1. Institute of Karst Geology, Chinese Academy of Geological Sciences; Key Laboratory of Karst Dynamics, Ministry of National Resources & Guangxi Autonomous; Region/International Research Center on Karst under the Auspices of UNESCO, Guilin 541004, China;

2. Pingguo Guangxi, Karst Ecosystem, National Observation and Research Station, Pingguo, Guangxi 531406, China)

## HIGHLIGHTS

- (1) Phosphoric acid was added to the water sample in a karst area for acidification, and sweeping for an appropriate period; the test accuracy was better than 0.40‰ for the sample with DOC content greater than 2mg/L.
- (2) The pressure of the sample gas in the equilibrium headspace vial plays a significant role in enhancing the intensity of the  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  signal and reducing the bias of the testing results.
- (3) The blank peak area, a significant factor produced by low-background pure water, is crucial in affecting the testing results of water samples with low DOC content.

**ABSTRACT:** Due to the high content of  $\text{HCO}_3^-$ , low content of DOC and complex composition in the karst water, the current wet oxidation method for the determination of  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  needs to be improved. The study examined the impact of different pure waters, headspace bottle atmospheric equilibrium methods, DOC content, and the removal of bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) in water on  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  values. The experimental results show significant differences in the  $^{44}\text{CO}_2$  peak areas produced by different blank pure waters, with the most prominent peak area being 3.8 times the smallest. Using a gas-tight syringe for atmospheric equilibrium enhances the sample signal strength and ensures the optimal internal precision of the sample test results. Acidifying the water samples to  $\text{pH}<3$  with phosphoric acid eliminates the influence of  $\text{HCO}_3^-$  in karst waters. A nitrogen-blowing apparatus at a 250mL/min flow rate for 5–10min removes the free  $\text{CO}_2$  present after acidification. Under the above experimental conditions, the deviation between the test results and the calibrated reference values for karst water samples with DOC content greater than 2mg/L is better than 0.40‰ after blank correction. The difference in the measured results of  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  in karst water samples measured by the wet oxidation method compared to the total organic carbon analyzer-stable isotope mass spectrometer online method was less than 0.30 ‰. The BRIEF REPORT is available for this paper at <http://www.ykcs.ac.cn/en/article/doi/10.15898/j.ykcs.202405130108>.

**KEY WORDS:** dissolved organic carbon;  $\text{HCO}_3^-$ ; wet oxidation method; isotope mass spectrometry; blank sample

## BRIEF REPORT

**Significance:** Dissolved Organic Carbon (DOC) is typically an essential indicator for studying the sources and transformation of materials in the biogeochemical cycle of water bodies such as oceans, rivers, and reservoirs<sup>[1-3]</sup>. In a karst watershed, DOC is the main form of organic carbon. Research on the karst carbon cycle processes has found that karst areas have a significant carbon sequestration potential and are an essential part of the global carbon cycle<sup>[4-6]</sup>. The carbon sink effect generated by different forms of carbon cannot be ignored throughout the carbon cycle process in the karst area<sup>[7-9]</sup>. In particular, DOC plays a crucial role in the stability of carbon sinks in the karst water ecosystem<sup>[10-11]</sup>. By analyzing the  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  and its mutual transformation with DIC and POC in karst water bodies,

we can gain a deeper understanding of the processes and mechanisms of karst carbon sinks<sup>[12-14]</sup>, and effectively reveal the sources of carbon in karst basins and their contribution rates to the carbon cycle<sup>[15-16]</sup>.

The high-temperature oxidation method of EA-IRMS involves freezing and drying acid-treated DOC water samples into solids for testing, with a required carbon content of less than one milligram<sup>[19-20]</sup>. This method has high requirements for sample pretreatment and demands strict operation to ensure the accuracy and reliability of the analysis results. Researchers have modified the elemental analyzer to achieve an analytical precision better than 1.0‰ with just 41 nmol of carbon<sup>[21]</sup>. A laser ablation method on freeze-dried small particle samples requires only 65 ng of carbon<sup>[22]</sup>. However, these methods necessitate filtering and concentrating several liters of sample to 1-2 mL, which is time-consuming and requires a large volume of samples. The high-temperature oxidation method produces high blank values, significantly affecting the analysis of samples with low carbon content and requiring specialized instruments and consumables<sup>[23]</sup>. The TOC-IRMS method, which involves online acidification of water samples followed by conversion of DOC to CO<sub>2</sub> for analysis with a stable isotope mass spectrometer<sup>[3]</sup>, offers the advantages of fully automated operation and high-throughput determination for  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  values in marine and fresh-brackish water samples<sup>[24-25]</sup>. However, this analytical system primarily measures DOC, TOC content, and  $\delta^{13}\text{C}$  in water samples, with a relatively narrow scope of test indicators and high experimental costs, which limits its widespread adoption in laboratories.

The analysis of karst water samples presents unique and complex challenges for dissolved organic carbon analysis. The high concentration of Ca ions can react with oxidants, forming insoluble precipitates that interfere with the oxidation process. Additionally, the high DIC can produce a large amount of CO<sub>2</sub> during wet oxidation, affecting the accurate determination of  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  values. The low DOC can also hinder the damp oxidation method from accurately measuring samples with low DOC. These characteristics require the careful optimization of pretreatment conditions for  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  determination in karst water samples. In this research, the addition of phosphoric acid enhances measurement precision (better than 0.40‰). Balancing the pressure of the sample gas in the headspace vial enhances the  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  signal intensity and reduces deviation. The blank peak area produced by pure water is an essential factor affecting the test results of water samples with low DOC content.

**Methods:** The sampling location is in the Gexi watershed of Wanshi Town, Fuyang District, Hangzhou City, Zhejiang Province. The watershed covers an area of approximately 400 km<sup>2</sup>, with about 15 km<sup>2</sup> distributed with carbonate rocks, including all geological ages of carbonate strata in Zhejiang Province. The sample pretreatment method follows: ①Take 4 mL of the sample. ②Add 1 mL of oxidant. ③Add 8.5% phosphoric acid until the pH is less than 3. ④Sweep away CO<sub>2</sub>. ⑤Heat at 100 °C for 1 h. ⑥Cool to room temperature. ⑦Centrifuge. ⑧Prepare for testing, and after equilibration, use a gas isotope mass spectrometer (MAT253, ThermoFisher Scientific, USA) for analysis. The calibration process was conducted on two compounds: potassium hydrogen phthalate and glucose, with  $\delta^{13}\text{C}$  values of -29.76‰ and -11.09‰ ( $n=6$ ), respectively. Since the  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  value of karst waters mainly ranges from -20‰ to -30‰<sup>[15-16]</sup>, potassium hydrogen phthalate was selected for subsequent experiments. The optimization of experimental conditions includes: ①Testing the background with pure water. ②Equilibrating the pressure. ③Preparing potassium hydrogen phthalate solution to verify the accuracy. ④Testing the effectiveness of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> removal. The detection results require blank correction, which can be performed using the mass balance principle.

**Data and Results:** The maximum peak area of the six pure water types was 3.8 times the minimum peak area, indicating that the choice of pure water directly affected the accuracy of test results for low-concentration samples and subsequent conditional experiments. When purging the headspace vial with helium to remove air, the pressure inside the vial after purging was higher than before, and this positive pressure affected the oxidation release of DOC in the water samples, as well as the intensity of the sample and blank signals. The study used a potassium hydrogen phthalate solution with a carbon content of 25 mg/L for experimentation and pure water as a blank sample for blank

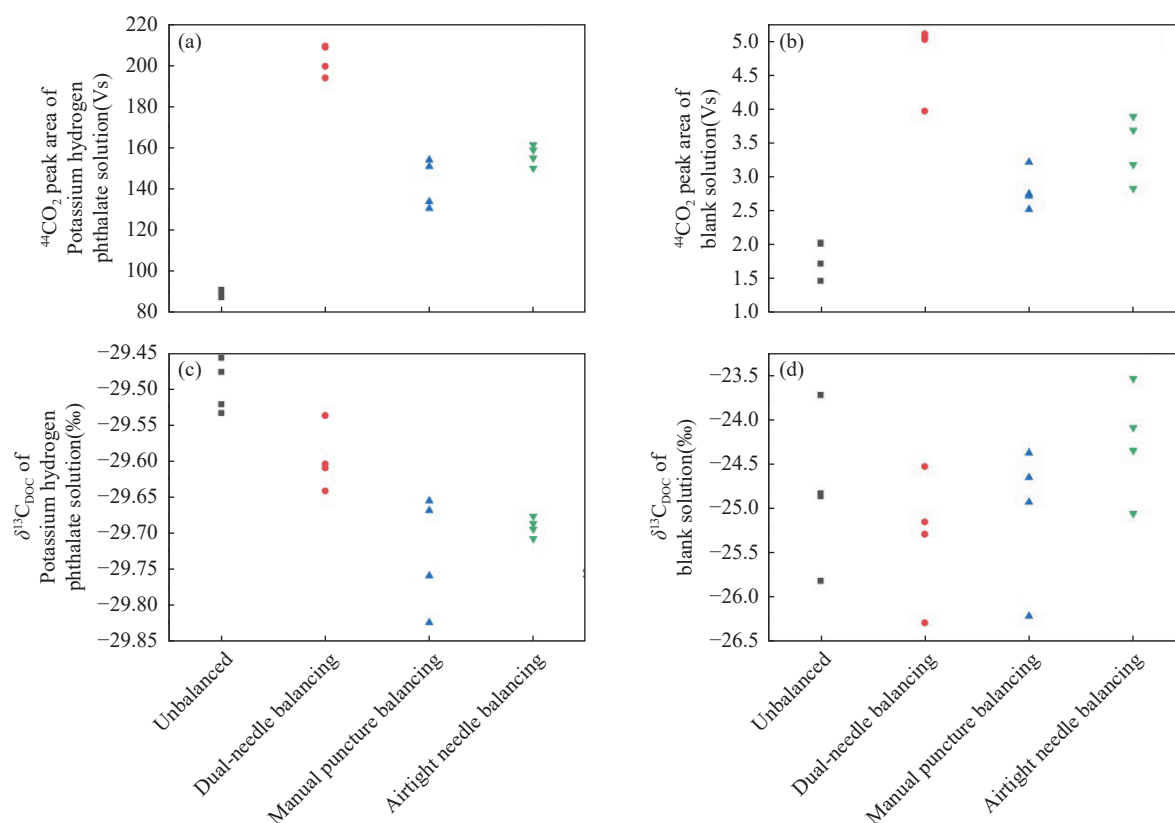


Fig. E.1 Effects of unbalanced, dual-needle balancing, manual puncture balancing, and airtight needle balancing methods on the  $^{44}\text{CO}_2$  peak area and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  values of the samples (Each method in the graph is represented by four points, indicating four test samples).

monitoring. The results of four different equilibrium methods shown in Fig.E.1, the airtight needle method providing the best reproducibility of  $^{44}\text{CO}_2$  peak areas and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  values, and the slightest deviation from the calibration reference value of potassium hydrogen phthalate. The linear regression coefficient between the  $^{44}\text{CO}_2$  peak area (after subtracting the blank peak area) and the carbon content in potassium hydrogen phthalate solutions with different concentrations reached 0.9982. Therefore, blank correction is significant for low-concentration samples. In summary, the wet oxidation method, with its precision, can achieve an accuracy of  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  testing within 0.40‰ when processing samples with DOC content higher than 2mg/L. This method, when using phosphoric acid to acidify solutions (pH<3) containing 122mg/L of  $\text{HCO}_3^-$  and 305mg/L of potassium hydrogen phthalate solution, shows reliable results. Using a nitrogen blowing apparatus at a flow rate of 250mL/min, when the blowing time reached 15min, the  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  in both solutions shows a gradual trend towards positive values, indicating the need to control the blowing time between 5–10min. The high consistency of the results when comparing the TOC-IRMS and wet oxidation methods for  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  determination further verifies the reliability of the wet oxidation method.



## 参考文献

- [1] 宋昂, 彭文杰, 何若雪, 等. 好氧不产氧光合细菌反馈作用下的五里峡水库坝前水体化学特征研究[J]. *岩矿测试*, 2017, 36(2): 171–179.
- Song A, Peng W J, He R X, et al. Hydrochemistry characteristics in front of the Wulixia Reservoir Dam associated with feedback from aerobic anoxygenic phototrophic bacteria[J]. *Rock and Mineral Analysis*, 2017, 36(2): 171–179.
- [2] 朱帅, 曹建华, 杨慧, 等. 岩溶区植被与岩石地球化学背景间相互作用机制研究进展[J]. *岩矿测试*, 2023, 42(1): 59–71.
- Zhu S, Cao J H, Yang H, et al. A review of the interaction mechanism and law between vegetation and rock geochemical background in karst areas[J]. *Rock and Mineral Analysis*, 2023, 42(1): 59–71.
- [3] 粟蓉, 申凯文, 尹希杰, 等. TOC-IRMS 联用在线高温氧化测定溶解有机碳稳定同位素组成的方法研究[J]. *应用海洋学学报*, 2023, 42(2): 339–345.
- Su R, Shen K W, Yin X J, et al. On-line high temperature oxidation determination of stable carbon isotope composition of dissolved organic carbon by TOC-IRMS analysis[J]. *Journal of Applied Oceanography*, 2023, 42(2): 339–345.
- [4] 章程, 肖琼, 孙平安, 等. 岩溶碳循环及碳汇效应研究与展望[J]. *地质科技通报*, 2022, 41(5): 190–198.
- Zhang C, Xiao Q, Sun P A, et al. Progress on karst carbon cycle and carbon sink effect study and perspective[J]. *Bulletin of Geological Science and Technology*, 2022, 41(5): 190–198.
- [5] 蒋忠诚, 章程, 罗为群, 等. 我国岩溶地区碳汇研究进展与展望[J]. *中国岩溶*, 2022, 41(3): 345–355.
- Jiang Z C, Zhang C, Luo W Q, et al. Research progress and prospect of carbon sink in karst region of China[J]. *Carsologica Sinica*, 2022, 41(3): 345–355.
- [6] 章程. 岩溶动力学理论与现代岩溶学发展[J]. *中国岩溶*, 2022, 41(3): 378–383.
- Zhang C. Theory of karst dynamics and development of modern karst science[J]. *Carsologica Sinica*, 2022, 41(3): 378–383.
- [7] 章程, 肖琼, 苗迎, 等. 广西桂林漓江典型河段水化学昼夜动态变化及其对岩溶碳循环的影响[J]. *地球学报*, 2018, 39(5): 613–621.
- Zhang C, Xiao Q, Miao Y, et al. Day and night aqueous chemical changes and their impact on karst carbon cycle at typical monitoring sites of the Lijiang River, Guilin, Guangxi[J]. *Acta Geoscientica Sinica*, 2018, 39(5): 613–621.
- [8] 黄芬, 吴夏, 杨慧, 等. 桂林毛村地下河流域岩溶关键带碳循环研究[J]. *广西科学*, 2018, 25(5): 515–523.
- Huang F, Wu X, Yang H, et al. Study on carbon cycle of karst critical zone in Maocun subterranean river basin of Guilin[J]. *Guangxi Science*, 2018, 25(5): 515–523.
- [9] 黄奇波, 覃小群, 刘朋雨, 等. 山西柳林泉域岩溶地下水溶解无机碳特征及控制因素[J]. *地质论评*, 2019, 65(4): 961–972.
- Huang Q B, Qin X Q, Liu P Y, et al. Characteristics and control factors of dissolved inorganic carbon in karst groundwater in Liuling Spring catchment, Lüliang, Shanxi[J]. *Geological Review*, 2019, 65(4): 961–972.
- [10] 李强, 黄雅丹, 何若雪, 等. 岩溶水体惰性有机碳含量及其存在机理[J]. *岩矿测试*, 2018, 37(5): 475–478.
- Li Q, Huang Y D, He R X, et al. The concentration of recalcitrant dissolved organic carbon in the karst hydrosphere and its existing mechanism[J]. *Rock and Mineral Analysis*, 2018, 37(5): 475–478.
- [11] 何若雪, 李强, 于爽, 等. 异养细菌作用下岩溶水体惰性有机碳变化及其环境影响因素分析[J]. *地球学报*, 2022, 43(4): 438–448.
- He R X, Li Q, Yu S. Variation of recalcitrant dissolved organic carbon in karst water under the influence of heterotrophic bacteria and its environmental controlling factors[J]. *Acta Geoscientica Sinica*, 2022, 43(4): 438–448.
- [12] de Montety V, Martin J B, Cohen M J, et al. Influence of diel biogeochemical cycles on carbonate equilibrium in a karst river[J]. *Chemical Geology*, 2011, 283: 31–43.
- [13] 章程. 岩溶作用时间尺度与碳汇稳定性[J]. *中国岩溶*, 2011, 30(4): 368–371.
- Zhang C. Time-scale of karst processes and the carbon sink stability[J]. *Carsologica Sinica*, 2011, 30(4): 368–371.
- [14] 刘再华. 岩石风化碳汇研究的最新进展和展望[J]. *科学通报*, 2012, 57(2/3): 95–102.
- Liu Z H. New progress and prospects in the study of rock-weathering-related carbon sinks[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2012, 57(2/3): 95–102.
- [15] 王华, 张春来, 杨会, 等. 利用稳定同位素技术研究广西桂江流域水体中碳的来源[J]. *地球学报*, 2011, 32(6): 691–698.

- Wang H, Zhang C L, Yang H, et al. The application of stable carbon isotope to the study of carbon sources in Guijiang Watershed, Guangxi[J]. *Acta Geoscientica Sinica*, 2011, 32(6): 691–698.
- [16] 黄奇波, 覃小群, 唐萍萍, 等. 桂江流域河流有机碳特征[J]. *地质科技情报*, 2014, 33(2): 148–153.
- Huang Q B, Qin X Q, Tang P P. Characteristics of riverine organic carbon in Guijiang Watershed, Guangxi[J]. *Geological Science and Technology Information*, 2014, 33(2): 148–153.
- [17] Lang S Q, Bernasconi S M, Gretchen L F. Stable isotope analysis of organic carbon in small ( $\mu\text{g C}$ ) samples and dissolved organic matter using a GasBench preparation device[J]. *Rapid Communications Mass Spectrometry*, 2011, 26(1): 9–16.
- [18] 王骏博. 溶解有机碳同位素测定方法研究及其在九龙江的应用[D]. 厦门: 国家海洋局第三海洋研究所, 2015.
- Wang J B. Method of determining carbon isotope of dissolved organic carbon and application in Jiulong River[D]. Xiamen: The Third Institute of Oceanography Ministry of Natural Resources, 2015.
- [19] Werner R A, Bruch B A, Brand W A. ConFlo III—An interface for high precision  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  analysis with an extended dynamic range[J]. *Rapid Communications Mass Spectrometry*, 1999, 13: 1237–1241.
- [20] Groot P A. Handbook for stable isotope analytical techniques (Vol. 2)[M]. Amsterdam: Elsevier, 2009.
- [21] Werner R A, Bruch B A, Brand W A, et al. Measurement of  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  isotopic composition on nanomolar quantities of C and N[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(2): 755–763.
- [22] Moran J J, Newburn M K, Alexander M L, et al. Laser ablation isotope ratio mass spectrometry for enhanced sensitivity and spatial resolution in stable isotope analysis[J]. *Rapid Communications Mass Spectrometry*, 2011, 25(9): 1282–1290.
- [23] 申凯文. 高温氧化法和湿氧化法测试水样溶解有机碳及同位素对比研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2020.
- Shen K W. Comparative study on dissolved organic carbon and isotopes in water samples by high temperature oxidation and wet oxidation[D]. Xiamen: Xiamen University, 2020.
- [24] Panetta R J, Ibrahim M, Gelinas Y. Coupling a high temperature analytic oxidation total organic carbon analyzer to an isotope ratio mass spectrometer to measure natural abundance  $\delta^{13}\text{C}$ —dissolved organic carbon in marine and freshwater samples[J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(13): 5232–5239.
- [25] Troyer I D, Bouillon S, Barker S, et al. Stable isotope analysis of dissolved organic carbon in soil solutions using a catalytic combustion total organic carbon analyzer— isotope ratio mass spectrometer with a cryofocusing interface[J]. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 2010, 24(3): 365–374.
- [26] 姜光辉, 于爽, 常勇. 利用水化学方法识别岩溶水文系统中的径流[J]. *吉林大学学报 (地球科学版)*, 2011, 41(5): 1535–1541.
- Jiang G H, Yu S, Chang Y. Identification of runoff in karst drainage system using hydrochemical method[J]. *Journal of Jilin University (Earth Science Edition)*, 2011, 41(5): 1535–1541.
- [27] 黄奇波, 覃小群, 刘朋雨, 等. 硫酸对乌江中上游段岩溶水化学及  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  的影响[J]. *环境科学*, 2015, 36(9): 3220–3229.
- Huang Q B, Qin X Q, Liu P Y, et al. Influence of sulfuric acid to karst hydrochemical and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  in the upper and middle reaches of the Wujiang River[J]. *Environmental Science*, 2015, 36(9): 3220–3229.
- [28] 叶慧君, 张瑞雪, 吴攀, 等. 基于主成分分析的岩溶水水化学组成及影响因素研究——以贵州水城盆地为例[J]. *中国岩溶*, 2017, 36(2): 215–225.
- Ye H K, Zhang R X, Wu P. et al. Hydrogeochemical characterization of groundwater and surface water and their influencing factors based on principal component analysis: An example in the Shuicheng Basin of Guizhou[J]. *Carsologica Sinica*, 2017, 36(2): 215–225.
- [29] 熊佰炼, 张进忠, 彭韬, 等. 典型岩溶地区岩溶泉溶解性碳浓度变化及其通量估算[J]. *环境科学*, 2018, 39(11): 4991–4998.
- Xiong B L, Zhang J Z, Peng T, et al. Concentration variations and flux estimation of dissolved carbon in karst spring of a typical karst area[J]. *Environmental Science*, 2018, 39(11): 4991–4998.
- [30] 杨会, 王华, 吴夏, 等. 样品采集和保存方法对水中溶解无机碳同位素分馏的影响[J]. *中国岩溶*, 2015, 34(6): 642–647.
- Yang H, Wang H, Wu X, et al. The influence of different pretreatment methods on the  $\delta^{13}\text{C}$  value of dissolved inorganic carbon in water[J]. *Carsologica Sinica*, 2015,

- 34(6): 642–647.
- [31] 罗振宇, 杨琰, 李计, 等. 石漠化治理区表层岩溶泉流量衰减分析及无机碳通量估算: 以重庆酉阳龙潭槽谷老泉为例[J]. *中国岩溶*, 2023, 42(2): 337–350.
- Luo Z Y, Yang Y, Li J, et al. Flow attenuation analysis and inorganic carbon flux estimation of surface karst spring in rocky desertification control area: A case study at Laoquan Spring in the Longtan Trough Valley, Youyang County, Chongqing City, China[J]. *Carsologica Sinica*, 2023, 42(2): 337–350.
- [32] 杨丽阳. 河流-河口系统溶解有机物的动态及其影响因素[D]. 厦门: 厦门大学, 2012: 22.
- Yang L Y. Dynamics and influencing factors of dissolved organic matter in river-estuarine system[D]. Xiamen: Xiamen University, 2012: 22.
- [33] 王骏博. 溶解有机碳同位素测定方法研究及其在九龙江的应用[D]. 厦门: 国家海洋局第三海洋研究所, 2015.
- Wang J B. A method of determine in g carbon isotope of dissolved organic carbon and application in Jiulong River[D]. Xiamen: The Third Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, 2015.
- [34] Chen L, Tan L, Zhao M. Karst carbon sink processes and effects: A review[J]. *Quaternary International*, 2023, 652: 63–73.
- [35] Kragh T, Sondergaard M, Borch N H. The effect of zooplankton on the dynamics and molecular composition of carbohydrates during an experimental algal bloom[J]. *Journal of Limnology*, 2006, 65(1): 52–58.
- [36] 周殷竹, 郭华明, 逯海. 高砷地下水中溶解性有机碳和无机碳稳定同位素特征[J]. *现代地质*, 2015, 29(2): 252–259.
- Zhou Y Z, Guo H M, Lu H. Stable isotope characteristics of dissolved organic carbon and inorganic carbon in high arsenic groundwater[J]. *Geoscience*, 2015, 29(2): 252–259.
- [37] 赵海娟, 肖琼, 吴夏, 等. 漓江地表水体有机碳来源[J]. *环境科学*, 2017, 38(8): 3200–3208.
- Zhao H J, Xiao Q, Wu X, et al. Source of organic carbon in the surface water of Lijiang River[J]. *Environmental Science*, 2017, 38(8): 3200–3208.
- [38] 肖琼, 赵海娟, 章程, 等. 岩溶区地表水体惰性有机碳研究[J]. *第四纪研究*, 2020, 40(4): 1058–1069.
- Xiao Q, Zhao H J, Zhang C, et al. Study of the recalcitrant dissolved organic carbon in karst surface water[J]. *Quaternary Sciences*, 2020, 40(4): 1058–1069.
- [39] Jonsson A, Meili M, Bergström A K, et al. Whole-lake mineralization of allochthonous and autochthonous organic carbon in a large humic lake (Örträsket, N. Sweden)[J]. *Limnology and Oceanography*, 2001, 46(7): 1691–1700.
- [40] Newton R J, Jones S E, Eiler A, et al. A guide to the natural history of freshwater lake bacteria[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2011, 75(1): 14–49.