

生物样本全碳测定及 ^{13}C 质谱分析制 样装置的安装和应用*

王 庆

(吉林省农业科学院原子能所)

一、概 述

碳是组成动植物的重要元素之一,据测定植物体一般含碳高达40%左右,在其他有机化合物中碳元素也是占有相当重要的地位。因此碳素的测定,不论在有机化学分析或在农业、生物、药物等方面的研究都具有非常重要的意义。

燃烧法测定碳元素已有悠久的历史,自建立燃烧法以来,人们对其已做了很大的改进和提高,目前已成功地将电子计算机应用在各种元素分析仪器上来,这对碳元素的分析技术也是一个飞跃,但由于这种仪器数量少造价昂贵,对使用条件要求也十分严格,因此应用的广泛性受到了很大的限制。另外这种精密仪器测样量很微小,这是仪器的一大优点;但在一定程度上也是一弊。例如农业试验中各种作物不同部位样品的比重是不一样的,因此很难绝对混合均匀,这对测样量仅有几微克到几毫克的仪器所测出的数据,虽然精确度很高,但客观的代表性却不大。而常规的燃烧法以其测样量大,代表性强的优点一直被人们延用着。因此目前常规的燃烧法测定碳元素仍然是一种可靠的方法被广泛应用。

利用燃烧法测定有机物中碳元素的基本原理就是将样品在氧气或含氧的惰性气流下,经燃烧分解和在氧化剂的作用下,使有机物完全分解氧化,其中的碳定量地转变成二氧化碳。氢定量地转变成水。同时除去有关的干扰元素之后,以碱性石棉收集燃烧后生成的二氧化碳气,称其重量计算碳在样品中的百分含量。因此碳素的测定可以简单归纳为以下三个步骤:1)、燃烧分解;2)、干扰元素的去除;3)、二氧化碳气体的收集测量。

随着科学的发展和我国稳定性同位素 ^{13}C 的诞生,为生物示踪研究又开辟了新途径。但在同位素质谱测量含有 ^{13}C 生物样品时,还必须防止自然界中的 ^{12}C 对 ^{13}C 示踪元素的稀释。还要排除主要干扰元素对测定 ^{13}C 丰度的影响和对质谱仪的污染。为此我们在全碳测定装置上,增设抽真空部分和气体取样装置等。使该装置即可测定有机样品中全碳的含量,又能为质谱计分析提供气态或固态二氧化碳样品。

二、测定装置的结构及简单操作程序

1、测定装置结构

本装置主要由以下几个部分组成:氧气供给部分;燃烧和温度控制部分;二氧化碳吸收部分;真空测量等部分。详见图1。

* 本文承蒙高金方所长审阅,特此致谢。

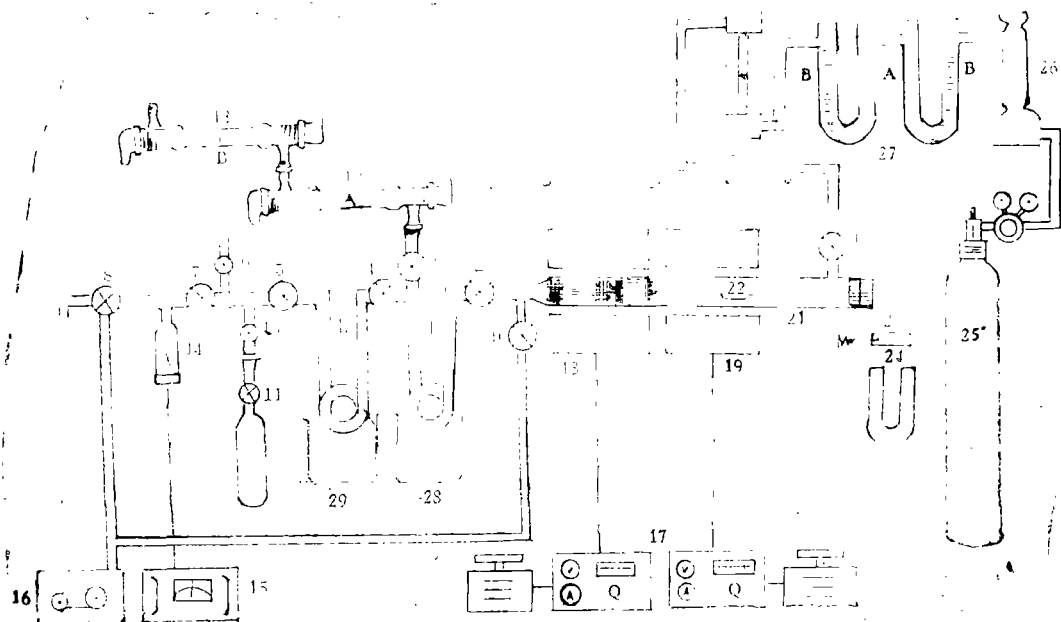


图1 生物样本全碳测定及¹³C质谱分析制样装置

1~10、玻璃真空阀门

12、CO₂吸收管

14、热电偶

16、机械真空泵

18、管式电炉

20、氧气流量计

22、样品舟

24、永久磁铁

26、过滤塔

28、酒精液氮瓶

“I”“I”：为两只蛇形冷阱。

11、气体取样瓶

13、Mg(ClO₄)₂保护管

15、真空计

17、炉温控制器

19、与18相同

21、石英燃烧管

23、送样铁柱

25、氧气瓶

27、“U”形管其中A碱石棉B.Mg(ClO₄)₂

29、液氮瓶

(1) 氧气供给部分

用氧气钢瓶，瓶上装有医用浮标式氧气吸入器，因该吸入器配有微调旋钮与气体流量计配合调解氧气的流量。在气体流量计的出口处装有过滤塔和两支“U”形管，其中分别装入无水高氯酸镁和碱性石棉，以除去氧气中的水分和少量的二氧化碳。

(2) 燃烧和温度控制部分

该部主要有两只SRJK管式高温电炉。其中一只电炉温度控制在950℃做样品分析炉，另一只电炉其温度控制在600℃做燃烧管内充填物质的加温还原。两只电炉分别由两个热偶计与两只温度自动控制器和两只调压器连接用来调解和控制电炉温度。

燃烧管是一根长950mm直径22mm的石英玻璃管。其中一端经过渡玻璃接到普通玻璃装置上，并在燃烧管内充填一定数量的棒状氧化铜做催化剂。为除去样品在燃烧时所产生的卤素、硫、氮等元素对测量结果的影响，在燃烧管内还装入了银网栓、铬酸铅网栓和还原铜网栓等。详见图2。

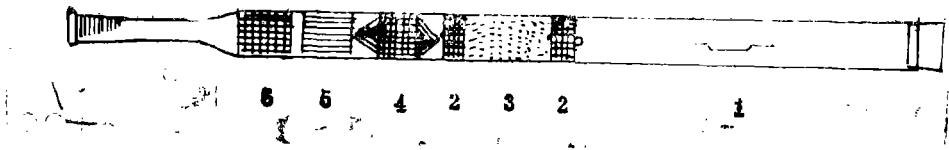


图2 燃烧管与充填物

1、样品舟； 2、铜网栓； 3、氧化铜； 4、铬酸铅网栓； 5、还原铜网栓； 6、银网栓

(3) 二氧化碳吸收部分

样品在燃烧时生成的二氧化碳气经纯化后，通过一个两端带有磨口的碱石棉吸收管，图1〔12〕。气流中的二氧化碳被管中的碱性石棉全部吸收固定。在碱性石棉吸收管的尾部还串接了一个装有无水高氯酸镁的保护管，图1〔13〕，用来隔离空气中水蒸气避免进入二氧化碳吸收管而增加测量的误差。

为质谱仪制备 ^{13}C 气体样品时，样品燃烧后生成的二氧化碳，用液氮收集于一个带有真空阀门的气体取样瓶，图1〔11〕中。从转化装置上取下送质谱计分析。也可用氢氧化钡吸收，以碳酸钡的形态长期保存备用。

(4) 真空及测量部分

该部由一台机械真空泵和真空计、热电偶以及数个真空阀门等玻璃装置组成。主要作用是抽去测量装置内的空气，以排除为质谱制样时空气中 ^{12}C 对样品中 ^{13}C 的稀释。同时配合用液氮将样品分解出来的二氧化碳冻结下来之后，经抽气可把其中的氧、氢、一氧化碳等未被冻结的气体抽走，以达到纯洁二氧化碳气的目的。

2、分析操作程序

(1) 全碳定量分析操作方法

1) 空白试验，首先关闭测定装置上的阀门〔4〕、〔9〕，打开全碳测定阀门〔3〕。再分别打开两个电炉的温度控制器的开关，调整好温度控制器的温度控制位置、样品燃烧炉为 950°C ，充添物的还原炉为 600°C 。一次调整好一般无需再动。根据电炉的所标功率用调压器调整好所需的适当电压和电流。当两电炉温度恒定在所要求的温度时，打开氧气瓶的阀门，调整氧气流量，使其保持在 $35\text{--}50\text{ml}/\text{分钟}$ 之间。打开燃烧管的塞子，将准备称样用的瓷舟用金属钩送到样品燃烧炉的中间，塞好燃烧管的塞子。接着把事先准备好的 $-45^{\circ}\text{C}\sim-50^{\circ}\text{C}$ 酒精液氮瓶〔28〕提升使冷阱的圆环全部插入液体中。待3—5分钟后将装有碱性石棉吸收管和装有无水高氯酸镁的保护管一齐接到测定装置的接口处。待15—20分钟后，取下二氧化碳吸收管，关闭两端阀门，用清洁而又干燥的软布擦去两端磨口处的密封油脂。在擦油的过程开始可稍稍用些力，然后只能轻轻地擦，但也不能擦的时间过久，以免产生静电效应。擦好后用干燥的布包好静置2—3分钟用分析天秤准确地称其重量，已称重后的吸收管再次连同保护管接到测定装置上继续烧15—20分钟后，再次取下吸收管。操作同前。二次称重恒定后，表示燃烧装置完好，可以准备送样。相反，两次称量结果相差很大还应继续反复上述操作，一直达到恒重为止。产生上述问题多数情况是由于管道漏气，

吸水剂失效冷阱内部结冻堵塞或氧气瓶压力太低等。

2) 测样, 当空白试验合格后, 打开燃烧管塞, 用金属小钩取出样品舟, 放在瓷板或特制金属台上, 置于干燥器内冷却数分钟后准确称其自重, 然后再称取一定数量的样品于舟内。将装有样品的瓷舟连同一块送样用的软铁柱一起放入燃烧管内, 塞好燃烧管的塞子。此刻再检查一下酒精液氮的温度, 氧气的流量和炉温等。当一切都处于正常状态时, 用磁铁由管外吸引软铁柱轻轻地将样品舟分四次推入管式电炉内, 具体操作是当瓷舟进入炉内 $1/3$ 时燃烧 5 分钟, $1/2$ 时 5 分钟, 全部进入 5 分钟, 再推入炉中心 10 分钟, 最后继续通氧 5 分钟。这样分段分解样品的目的是使样品缓慢地燃烧分解, 让吸收管内的碱性石棉有充分的时间将样品分解的二氧化碳全部吸收。但应注意在每次推送样品舟后, 送样用的软铁柱都要吸回原来的位置上。当燃烧完毕后, 关闭氧气阀门, 从测定装置上取下吸收管, 具体操作同空白试验。之后准确地称取吸收二氧化碳后的管重。

应当说明的是, 在全碳定量分析的整个操作过程中, 严禁赤手接触任何与测量有关的器皿, 必须始终戴着干燥而又清洁的软手套。

3) 结果计算:

$$C\% = \frac{(S-B)}{W} \times \frac{C}{CO_2} \times 100$$

式中: S: 吸收管吸 CO_2 后的重量

B: 已恒重的吸收管重

W: 样品重

$$\text{或 } C\% = \frac{(S-B) \times 0.2729}{W} \times 100$$

(2) ^{13}C 质谱分析样品的制备

由于 ^{13}C 同位素标记过的生物样品, 在质谱测定前, 必须转化成二氧化碳气体样品。下面简略地介绍一下利用本装置进行样品转化的操作方法。

1)、打开电炉温度控制器真空计的开关。关闭全碳测定的阀门〔3〕, 当炉温达到要求时, 启动机械真空泵, 从装置的尾部向前逐级抽真空。使整个装置的真空达到 $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-3}$ 托时, 关闭真空泵及阀门〔7〕〔8〕〔10〕, 停止抽气。

2)、打开氧气瓶的阀门及阀门〔1〕, 向已抽真空的装置内充氧气, 当测定装置的内外达到平衡或内压略高于外压时, 打开燃烧管的塞子, 将装有样品的瓷舟和送样用的软铁柱一同放入管内, 将塞子塞好。然后打开氧气出口〔6〕, 氧气的流量调整到 35—50 ml/分钟。

3)、把已整调好的 $-45 \sim -50^\circ C$ 酒精液氮瓶上提套在冷阱〔I〕上, 使其下面圆环全部插入液体中。把纯液氮瓶上提套在冷阱〔II〕上, 但应注意液氮面应与冷阱的底面保持约 0.5cm 左右距离。

4)、在上述操作 5 分钟后, 用磁铁吸引管内的铁柱将样品分三次送入电炉内进行充分燃烧分解, 最后继续通氧气 5 分钟。

5)、当样品彻底燃烧分解后, 关闭氧气瓶阀门〔1〕和阀门〔4〕、〔6〕、

〔7〕，将液氮瓶上提，使冷阱〔II〕圆环插入液氮中，然后取下套在冷阱〔I〕上的酒精液氮瓶，启动机械泵打开阀门〔2〕、〔9〕将冷冻在冷阱〔I〕中的水蒸气等其他物质融解抽走。

6)、关闭阀门〔4〕、〔9〕，打开阀门〔8〕、〔7〕、〔10〕和取样瓶阀门〔11〕、真空抽1—2分钟后，打开阀门〔5〕将冷阱〔II〕中除被液氮固定的二氧化碳外的其他气体抽走。

7)、当真空达到 $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-3}$ 托时，关闭阀门〔7〕停止抽气，迅速将冷阱〔II〕上的液氮瓶取下套在取样瓶上，再将从冷阱〔I〕上取下来的酒精液氮瓶迅速套在冷阱〔II〕上。目的是使冷阱〔II〕中冻结的二氧化碳在 -45°C 左右的温度下融解气化，被用液氮冷冻的取样品瓶收集。同时在冷阱〔II〕中的水蒸气和其他杂质仍被 -45°C 左右的低温固定以免进入取样瓶。取样5—10分钟后关闭取样阀门〔11〕和取样瓶接口阀门〔10〕，将取样瓶从转化装置上取下送质谱测定。

另外，如果将气体取样瓶改用一个装有氢氧化钡溶液的取样瓶时，可以将气态二氧化碳转化为碳酸钡固体样品，经洗涤离心干燥之后可长期保存备用。

表1 几种有机物的含碳量

样 本 次 数	生长期 豆 叶	豆 数	玉米粒	骨 粉
1	43.05	49.70	41.28	9.88
2	43.14	49.97	41.27	9.18
3	43.98	49.74	41.77	9.65
4	43.24	50.43	41.42	9.58
5	43.38	50.07	41.23	
6	43.37	45.59	41.86	
7	43.94	50.34	42.24	
8		49.52		
9		50.49		
10				
平 均	43.37	49.98	41.58	9.57
S.D	± 0.25	± 0.37	± 0.38	
C.V	0.67	0.74	0.91	

三、测量结果分析

1、利用该装置，我们对现有的几个生物样品全碳的含量进行了反复的测量。结果见表1。经数理统计变异系数均在1%以下，完全可以满足目前农业试验中的需要。

为检验本装置所测定结果的可靠程度，将由本装置所测的同一样品，委托有关单位用元素分析仪进行了测定，其结果比较见表2。

从上表中可看出，由本装置所测结果与各种元素分析仪器测定结果比较偏差不大。因此利用该装置进行有机样品碳素的定量分析是可行的。

表2 不同仪器分析的碳素含量

测 试 单 位	分 析 仪 器	青豆叶粉	大豆粉	玉米粉	骨 粉
本实验装置	常规法	43.37	49.98	41.58	9.56
中国科学院上海有机所	〔意〕1108元素分析仪	43.36	49.95	42.22	9.07
华东师范大学	〔美〕240元素分析仪	43.24	49.98	41.68	9.51
中国科学院长春应化所	〔意〕1108元素分析仪	42.54	49.42	41.51	9.68
上海药物工业研究院	〔国产〕C.H元素分析仪	44.46	51.01	42.89	

2、利用这个装置制备的 $^{13}\text{C}\text{O}_2$ 气体样品，通过本室的MS10型质谱计分析观察，

表3 燃烧法测定有机物和无机物的¹³C丰度(%)

样 本	生长期叶	豆粒	玉米粒	碳酸钡	碳酸钙	标记豆叶
¹³ C丰度	1.081	1.095	1.100	1.073	1.112	1.123

令人满意的。

不含有氯、硫、氮等化合物的杂质峰谱。只有28峰谱偏高,这可能是少量CO₂电离成CO所致,但不影响44和45峰谱,其测定结果见表3。

综上所述证明,本装置用于有机样品的全碳定量分析和¹³C样品转化其结果是

主要参考文献

- (1)、余仲健:《有机元素定量分析》,高等教育出版社,1959。
- (2)、兰州大学化学系中国科学院上海药物所:《有机微量定量分析》,科学出版社,1978。
- (3)、中国科学院贵阳地球化学研究所:《¹⁴C年龄测定方法及其应用》,科学出版社,1977。
- (4)、R. P林斯台德等:《有机化学近代技术》,人民教育出版社,1960。
- (5)、赫崇岩等:《生物样品¹³C转化和质谱分析技术》,《质谱学杂志》,1985,第六卷 第2期。

《国外特种经济动植物》征订启事

《国外特种经济动植物》向您介绍国外有关水貂、紫貂、兔、鹿、貉、雉鸡、人参、西洋参、山葡萄等经济价值较高的动物和植物的最新科技成果与动态。适于各级科技人员及教学人员参考。本刊为季刊,每期定价五角,全年订费二元(包括邮费在内)。欲订者请通过邮局汇款至吉林省吉林市左家特区中国农业科学院特产研究所《国外特种经济动植物》编辑部订购(全年随时均可订阅)。请在汇款单上注明用途。