

MS10 质谱计进样系统的改制

及在 ^{15}N 分析中的应用

赫崇岩 赵玉珍 李忠彦

(吉林省农科院土肥所生物物理室)

用质谱法测定 ^{15}N 丰度的相对变化,是目前广泛应用的一种方法。随着农业和生物学示踪研究普遍开展,质谱法测定 ^{15}N 技术也不断改进,特别是消化技术、气化装置和进样系统的改进以及降低样品用量,低丰度样品的准确测定等方面都取得了很大进展,为 ^{15}N 在农业研究的广泛应用以及对动物、植物营养、生理生化代谢的研究,具有重要意义。

我们使用的MS10型质谱计,是测定气体同位素样品的小型质谱计。该仪器配备的是毛细管进样系统。这种进样系统要求在常压下有大量的气体样品连续进样,而在农业和生物学示踪研究中样品的含氮量都很低,产生的氮气也很少,在标准状况只有一毫升左右,这样少的气体样品是满足不了毛细管进样要求的。因此,我们设计和制作了一套气化装置和玻璃进样系统,并用这个系统与MS10质谱计联用,对降低样品用量、低丰度样品的准确测定等进行了初步的研究,同时研究了空气、普通硫酸、标记硫酸、生物样品中 ^{15}N 的测定值,获得了较好的结果。

玻璃进样系统

设计的真空气化装置和玻璃进样系统如图所示。根据质谱分析的要求,少量的气体样品(一毫升左右)在一定时间内(十五分钟左右)必须保持稳定的压力和均匀的气流进入质谱计。因此,进样系统要保持一定的真空,同时要有—定的容积来缓冲从气化装置进入的气体样品。而储气球对这两个因素起着重要作用。因此,在设计整个系统时我们着重考虑的是储气球内压力的变化。现分别加以讨论:

一、储气球的容积

储气球的大小主要受真空气化装置和MS10质谱计所约束。当储气球内的压力固定时,储气球的容积只与气化装置中反应球的容积和压力有关,根据气体状态方程 $p_1 V_1 = p_2 V_2$ 可计算出储气球容积。式中: p_1 、 V_1 , 分别为反应球的压力和容积, 根据设计要求 $p_1 = 60\text{ mm Hg}$, $V_1 = 50\text{ ml}$ 。 p_2 、 V_2 , 分别为储气球的压力和容积, 根据MS10质谱计要求 $p_2 \leq 3\text{ mm Hg}$ 。这样,可计算出 $V_2 = p_1 V_1 / p_2 = 1000\text{ ml}$, 即储气球的容积应在1000毫升左右。

二、储气球内压力的变化

储气球内的气体样品进入质谱计后, 根据质谱分析的要求, 在测定过程中(一般为十五分钟)球内的压力变化不得超过2%。否则, 因为压力的变化而引起质谱峰值的波动, 将直接影响 ^{15}N 的测定值。我们设计的储气球内压力的变化可根据下式计算: $p_t = p_0 \cdot e^{-\frac{L}{V}t}$ 。 p_0 为起始压力, MS10质谱计要求 $p_0 = 3 \text{ mmHg}$ 。 p_t 为经过 t 时间储气球压力。 V 为储气球的容积, 即 $V \cong 1000 \text{ ml}$, L 为MS10质谱计入口漏孔的通导, $L = 1.32 \times 10^{-5} \text{ 升/秒}$ 。

按上面公式可计算出储气球内压力随时间的变化, 结果见表一。从表中可以看出: 当压力减少百分之一, 即 $p_t = 0.99 p_0$, 这时 $t = 766$ 秒; 当压力减少百分之二时, $t = 1532$ 秒。也就是说, 储气球内的气体样品进入质谱计, 在1532秒内球内的压力变化不到2%, 而在 ^{15}N 质谱分析中这种稳定状态只要保持300秒就足够用了。

制作的玻璃进样系统通过可阀接头与MS10质谱计连结。当质谱计的高真空抽至 10^{-8} mm Hg 以上, 进样系统抽至 10^{-5} mm Hg 时通入氮气, 这时质谱计的高真空降至 10^{-7} mm Hg 左右, 储气球的真空降至 $1 - 5 \text{ m}$

mHg 。15分钟内质谱计的高真空, 储气球的低真空基本没有变化, 仪器工作正常, N_2^{28+} 、 N_2^{29+} 峰值稳定。可以认为, 设计的真空化装置和进样系统符合 ^{15}N 质谱分析的要求。

表 I 储气球压力与时间表

p_t/p_0	$\ln/\frac{p_t}{p_0}$	L/V	t (秒)
0.99	-0.0101	1.32×10^{-5}	766
0.98	-0.0202	1.32×10^{-5}	1532
0.95	-0.0513	1.32×10^{-5}	3900

^{15}N 测定值的实验

质谱分析中 ^{15}N 的测定值受各种因素影响。从样品的消化、气化、进样、电离、检测、到最后的计算, 每一步骤都对 ^{15}N 测定值有很大影响, 特别是对低丰度样品的 ^{15}N 测定值影响更大。因此, 在质谱分析中必须对 ^{15}N 测定值进行研究, 找出影响 ^{15}N 测定值的因素, 并设法排除这种影响, 从而保证为示踪研究提出准确、可靠的数据。

1、参考标准: 参考标准的正确选择和准确测定能随时发现仪器状态的偶然变化, 并为及时排除故障获得正确的分析结果提供依据。

本实验选择的参考标准是质谱室内的空气。为了消除氧气对灯丝的影响和避免其他杂质气体的干扰, 参考标准要经Fisser溶液处理和液氮冷阱充分冷却。去氧率一般都在90%以上。不同人员多次测得本实验室的参考标准为 $0.367 \pm 0.003\%$ 。与其他仪器测定结果相比较见表二。从表中可以看出, 尽管有时间差异, 但各单位的参考标准值基本一致, 本实验的参考标准与标准值更接近。近二年来, 本实验的参考标准都稳定在在0.367%左右。

在氮的氧化和进样过程中, 难免有极少量的空气混入到氮气中而进入质谱计。混入的空气稀释了样品中 ^{15}N 的丰度, 对测定结果有很大的影响。因此, 在计算时必须对空气的

真空气化装置和玻璃进样系统示意图

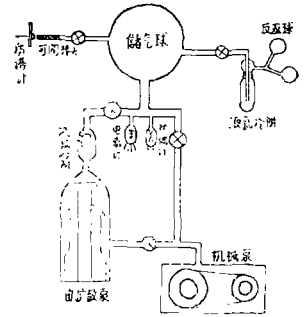


表 2

空气中¹⁵N丰度值¹⁵N%

作 者	仪 器	年份	¹⁵ N丰度	备 注
中国农业科学院	MN—1305 (苏)	1964	0.372	相对测量
上海化工研究院	M86 (西德)	1976	0.361	"
南京土壤研究所	ZhT—1301 (中国)	1977	0.369 ± 0.003	"
本 实 验	Ms10 (英)	1977	0.367 ± 0.003	"
Nier, A、o		1950	0.365 ± 0.001	绝对测量
Jar, G		1958	0.3663 ± 0.0004	"

污染进行校正。根据空气中²⁸N₂、²⁹N₂、³²O₂、⁴⁰Ar的固定比例关系，再通过质谱计测得O₂³²⁺、Ar⁴⁰⁺的峰值，就可以换算出因空气的混入N²⁸⁺、N₂²⁹⁺的增加值，然后进行校正。多次实验测得本仪器N₂²⁸⁺/N₂²⁹⁺ = 136，N₂²⁸⁺/Ar⁴⁰⁺ = 60，N₂²⁸⁺/O₂³²⁺ = 5。我们用Ar⁴⁰和O₂³²同时对空气污染进行校正，结果基本一致。这两种方法本实验同时采用。但是，由于次溴酸钠容易分解释放出氧气而影响O₂³²⁺值，而Ar⁴⁰⁺的峰值一般都很低，又很难准确测量，所以这两种校正方法本身就存在一定误差，而目前又难以消除。

2、测定值的重现性

¹⁵N的质谱分析系相对测量，不同型号的质谱计因离子化、质量分离和离子检验过程中产生的“质量畸视”等效应以及测定过程中引进的误差，即使测定同一样品也很难得到完全相同的结果。也可以说，用相对测量的方法不可能得出准确度的数据。而在农业和生物学示踪研究中只须测定¹⁵N丰度的相对变化，而无须测定¹⁵N丰度的绝对值。因此，测定值的重现性非常重要，在某种意义上说也是考察仪器性能的一个主要指标。

我们选择的是高丰度和各种不同低丰度的硫酸铵以及大豆茎叶样品做重现性实验，不同人员不同时间测定的结果列于表三和表四。表三是空气、普通硫酸铵、各种不同低丰度标记硫酸铵的测定值，每次测定时间间隔不等，有时长达半年以上，每次测定都取5—10组数据。从结果看标准偏差S·D都在±0.003左右，变异系数C、V都在1%以下；表四为大豆茎叶样品，丰度在0.5~3.0%之间，每个样品测定两次，每次取5—10组数据，同时还测定了空气、普通硫酸铵和高丰度的硫酸铵样品，从结果看，重现性较好，测定的平均偏差一般都在1%以下。

为提高测定值的重现性，除了使仪器的各项指标满足质谱分析的要求外，同时考虑到可能出现的偶然误差而影响测定值的重现性。MS10质谱计的放大器零点漂移以及受温度、噪声的影响都可能出现异常的质谱峰，这个峰值即不是来自样品也不是来自仪器的本底，通常称之为假峰。这个假峰虽然因各种条件而发生变化，但我们经过几年的摸索，MS10质谱计N₂²⁹⁺本底的假峰值一般在0.01 mv左右。在计算本底时把这个假峰值减去，基本上消除了偶然误差的影响。

本仪器使用的是油扩散泵，尽管油的蒸气压很低，但也对离子源有一定的污染。因此，每次工作前必须烘烤，一般烘烤十二小时，个别时要烘烤三十小时以上。这时本底值 N_2^{28+} 在0.5mv以下， N_2^{29+} 、 Ar^{40+} 都在0.01~0.02mv。在这个本底范围内测定样

表3 测定值的重现性 $^{15}N\%$

样品 次数	空气	普通 硫铵	标记硫铵		
			1	2	3
1	0.369	0.362	0.537	0.681	0.798
2	0.368	0.369	0.544	0.668	0.796
3	0.368	0.369	0.540	0.670	0.794
4	0.370	0.371	0.542	0.675	0.798
5	0.367	0.369	0.539	0.673	0.797
6	0.367	0.367			
7	0.366	0.368			
8	0.363	0.369			
9	0.365	0.369			
10	0.366				
11	0.371				
12	0.369				
平均	0.367	0.369	0.540	0.673	0.797
±S·D	0.0031	0.0029	0.0027	0.005	0.002
C·V	0.81	0.79	0.50	0.74	0.25

表四 植物样品测定值的重现性 $^{15}N\%$

样品	编号	^{15}N 丰度			偏差 (%)
		1	2	平均	
大豆结荚期茎叶	1	0.513	0.519	0.516	±0.58
	2	0.660	0.661	0.661	±0.15
	3	1.098	0.106	1.102	±0.36
	4	1.675	1.665	1.670	±0.30
	5	1.721	1.757	1.739	±1.04
	6	2.074	2.047	2.061	±0.68
	7	3.079	3.062	3.071	±0.29
	8	3.394	3.435	3.415	±0.61
普通硫铵	9	0.369	0.368	0.369	±0.27
空气	10	0.367	0.368	0.368	±0.27
标记硫铵	11	12.05	12.02	12.03	±0.17

品，重现性一般都较好，C·v都不超过1%。

为了检查MS10质谱计测定结果与其他仪器测定结果的偏离程度。我们与有关单位一起同时对普通硫铵和几种标记硫铵进行了测定，结果见表五。从表中可以看出，无论是高丰度的标记硫铵还是低丰度的普通硫铵以及空气等，各种仪器的测定值基本相近，除个别的偏差接近2%，其余的都在1%以下。可认为本仪器的测定值与其他仪器测定值偏离较小，出现的差异也是允许的。

表5 ^{15}N 丰度测定值

单位	仪器型号	参考标准 (空气)	普通硫铵	$^{15}N\%$				测定 时间
				No1 硫铵	No2 硫铵	No3 硫铵	No4 硫铵	
中国农业科学院	MN-1305 (苏)	0.372	0.378				9.26	1976.7
南京土壤所	ZhT-1301 (中国)	0.369	0.369	11.99	11.26	12.72		1977.9
上海化工院	M86 (西德)	0.361		12.03	11.30	12.73		1976.6
本实验	MS10 (英国)	0.367	0.369	12.02	11.25	12.76	9.02	1977.12
标准值	Nier	0.365						1950

MS10质谱计电离室很小, 进样量过大不仅影响灯丝寿命, 同时因为电离不完全而影响测定值。因此, 进样量不宜过多, 一般控制在进样后真空为 $1 \sim 5 \times 10^{-7}$ mmHg即可。在正常进样情况下, 一分钟内样品即可完全电离, 各离子间就处于平衡状态。在做富集样品的实验时, 我们测定了平衡常数K值。经多次测定, 丰度为9.02%和12.02%的标记硫铵K值分别为 4.08 ± 0.006 和 4.001 ± 0.0058 , 其结果与理论值 $K = 4.00$ 是相近的。

3、测定值的直线性

把富集的标记硫铵样品, 用普通硫铵准确地稀释含不同浓度的各个样品, ^{15}N 丰度应和浓度一样按比例变化, 用稀释率计算, 各测定值的原子百分超应呈直线性。

本实验用丰度为 12.76% 的标记硫铵按稀释率公式稀释为各种浓度的溶液, 测定后的 ^{15}N 丰度、原子百分超、换算为稀释率为 1 的原子百分超列于表六。

样 品	稀释率	^{15}N 丰度	^{15}N 原子百分超	稀释率为 1 的 ^{15}N 原子百分超
标记硫铵	1	12.76	12.41	12.41
稀释液	1 / 4	3.478	3.123	12.49
"	1 / 16	1.133	0.778	12.45
"	1 / 32	0.735	0.380	12.16
"	1 / 104	0.479	0.124	12.59
平 均				12.42
S. D				± 0.16
C. V				1.3

硫铵的丰度为 0.355% (1975年)

各稀释液是按普通硫铵和标记硫铵之间的重量比配制的, 因此, 可能在称量过程中引进误差。尽管这样, 从结果看: 各种浓度的稀释液 ^{15}N 的原子百分超都和浓度一样按比例变化, 换算为稀释率为 1 的 ^{15}N 原子百分超基本接近; 如果做图, 亦基本呈直线性。测定值的标准偏差 $S \cdot D = \pm 0.16$, 变异系数 $C \cdot V = 1.3\%$, 也都在允许范围内。

关于样品用量, 我们分别用 0.25mg, 0.30mg, 0.35mg, 0.40mg, 0.45mg, 0.5mg 和 1mg 的普通硫铵做实验, 结果基本一致。可以认为 MS10 质谱计在测定含氮量为 0.25mg 以上, ^{15}N 的原子百分超为 0.05% 以上的样品时, 测定值和理论值基本一致, $C \cdot V$ 一般都在 1% 以下。

4、样品对测定值的影响

使用不同丰度的 ^{15}N 样品进行连续测定时, 如果中间不进行“气洗”(用普通硫铵转化的 N_2 清洗), 往往由于前样品的残留而影响下个样品的 ^{15}N 丰度。也就是说在测定一个高丰度样品后再测定一个低丰度样品时就表现出高值, 相反就表现出低值。这种影响称为记忆效应。在测定低丰度样品时这种影响是很严重的。如日本的 Ms1-10 型质谱计在测定丰度为 21.30% 的标记硫铵之后再测定普通硫铵, 结果普通硫铵的 ^{15}N 丰度由 0.365% 增加到 0.640%, 用普通硫铵转化的氮气清洗四次仍为 0.390%。可见在质谱分析中必须考

考虑到记忆效应，特别是农业和生物学示踪研究中 ^{15}N 样品丰度都很低，一般都在1%左右。因此，更要考虑到记忆效应，并设法排除这种影响，以求获得准确的测定结果。

表七为高丰度和低丰度样品的连续测定值。从结果可以看出，测定高丰度样品后再测定低丰度的普通硫酸铵和空气，即使中间不进行“气洗”，结果都没有出现偏高的现象；同样，在测定高丰度样品后再测定低丰度的生物样品时也未发现 ^{15}N 丰度偏高现象。两年多的工作也未发现过这种记忆效应的影响。可以认为MS10质谱计不存在记忆效应。

表 7 各样品的测定值 $^{15}\text{N}\%$ 1977. 12

测定次序	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
样品名称	No 1 硫酸铵	普通硫酸铵	普通硫酸铵	No 1 硫酸铵	空气	空气	No3 硫酸铵	普通硫酸铵	No 1 硫酸铵	空气
测定值	12.02	0.369	0.368	12.08	0.367	0.369	12.19	0.369	12.07	0.368
理论值*	12.02	0.369	0.369	12.02	0.367	0.367	12.76	0.369	12.02	0.367

* 理论值系正常情况下多次测定的平均值

小 结

改制的真空气化装置和玻璃进样系统与MS10质谱计一起，构成了一套适用于为农业和生物学示踪研究测定 ^{15}N 的质谱分析系统。在测定含氮量为0.25mg以上、原子百分超为万分之五以上的植物和土壤样品时， ^{15}N 的测定值都获得了良好结果。

但是，本仪器的进样系统操作复杂；油蒸气极易污染仪器；空气污染的校正也十分麻烦；玻璃系统易损坏以及对含氮量为0.25mg以下，原子百分超在万分之五以下的样品的准确测定等等，都有待于今后继续改进和深入研究。

参 考 文 献

- 〔1〕涉谷政夫、小山雄生，日本土壤肥料学杂志，第44卷第11号
- 〔2〕尤崇杓、李玉桂等，生物样本中 ^{15}N 的质谱分析，科学研究年报，1964年第一部分
- 〔3〕邢光熹， ^{15}N 示踪及其测定方法的进展，土壤农化（参考资料）1975年第5期
- 〔4〕季欧，质谱仪器及其应用（一），分析仪器，1972年第2期
- 〔5〕王成智等，真空质谱计及其应用，分析仪器，1973年第2期