

质谱法测定植物和土壤中 稳定性同位素 ^{15}N

彭 运 生

(北京农业大学)

(摘要) 随着农业科学的发展, 质谱仪器应用于农业方面越来越广泛⁽¹⁾。本文着重阐述质谱法测量植物和土壤中的稳定性同位素 ^{15}N 。

一、绪 言

标记的 ^{15}N 稳定性同位素在植物及土壤中是以有机氮和无机氮化合物的形式存在。质谱仪不能直接分析这种氮化物, 必须把这种化合物转变为最简单, 能满足质谱分析要求的气体形式。在氮的情况下, 符合质谱分析最好的气体形式是 N_2 ⁽²⁾。其优点是: (1) 把不同形式的氮化物转化 N_2 比 NO 、 NO_2 容易; 并且 NH_3 、 N_2 容易分离; (2) N_2 是不活泼的气体, 不与设备起反应; (3) 因为 N_2 同位素分析的解释简单, 其它元素干扰可以忽略。

氮的化合物转化为 N_2 , 通常有三种方法: 凯氏 (Kjeldahl) — 雷登伯尔格 (Rittenberg) 法、改进的杜马 (Dumas) 法和凯氏—杜马氏联合法。凯氏—雷登伯尔格法是雷登伯尔格在1948年公开发表的, 但目前仍是普遍采用的方法。这种方法的主要分析步骤是⁽³⁾:

- (1) 将标记化合物的氮转化成铵;
- (2) 在真空条件下, 用碱性次溴酸溶液, 将铵转化成 N_2 ;
- (3) 用质谱计测定其 N_2 的同位素组成;

二、 ^{15}N 化合物的处理

1. 样品准备: 样品准备是把要分析的植物、土壤样品进行采集、反复挑选、烘干、研磨。为得到满意的结果, 样品磨得越细, 消化就越快、越完全⁽⁴⁾。植物样品放在 60°C — 80°C 烘箱中烘干后, 应立即研磨, 磨碎后通过60孔筛; 而土壤一般烘干后研磨, 再通过60孔或100孔筛。为防止交叉污染, 样品应尽可能地按丰度从低到高排列。

2. 将标记化合氮转化成铵

如果不需要将样品中的硝态氮和亚硝态氮定量地转化成铵时, 植物和土壤样品的处理,

1986年8月22日收

一般采用常规的常量凯氏法 (Bremner 和 Shaw, 1958年, Bremner, 1958和1960年) 或半微量凯氏法 (Bremner, 1960年)。常规的常量凯氏法是称取约含10毫克氮的样品置于干的常量凯氏瓶中, 加20毫升水, 摇动数分钟并静置 30 多分钟。加 10 克硫酸钾, 1 克硫酸铜和 0.1 克硒粉以及 30 毫升浓硫酸, 将瓶子放在消化柜中加热消化, 当水被除去而停止冒泡时, 加高温度到溶液呈清亮。然后再继续缓煮 2 小时或 5 小时 (土样消煮呈清亮后再消煮 5 小时, 而植物样品消煮清亮后再消煮 2 小时)。也可以用半微量凯氏法, 即称取约含有 1 毫克氮的样品置于干的微量凯氏瓶中, 加水 2 毫升摇动数分钟, 并静置 30 分钟。然后加入 1.1 克硫酸钾催化剂和 3 毫升浓硫酸, 将凯氏瓶放在消化柜内加热消化。再按常规的常量凯氏法步骤进行。不管那种方法都应控制消化温度, 使酸的烟雾在瓶颈上部约 $1/3$ 的地方冷凝。

但如果需要将硝态氮和亚硝态氮完全转化为铵时, 要用凯氏法的水杨酸改进法 (经 Bremner 和 Shaw (1958年) 改进过的 Olsen (1929年) 法)。H. H. Cheng 和 J. M. Bremner (1963) 提出了水杨酸改进法, 这种方法可定量地测定含有一定水分的样品中的硝态氮和亚硝态氮。具体步骤是称取约含有 10 毫克氮的样品置于干的常规凯氏瓶中, 加 40 毫升水杨酸—硫酸混合液, 摇动瓶子让酸充分地跟样品混合, 并将溶液静置数小时 (或过夜)。通过长颈漏斗将 5 克硫酸钠加入到凯氏瓶球部以下, 然后将瓶子放在消化柜内加热, 直至停止冒泡。待冷却后, 加 20 毫升水, 10 克硫酸钾、1 克硫酸铜和 0.1 克硒进行凯氏消化。待清亮后, 土样继续消化 5 小时, 植物样再消化 2 小时。

消化样品时, 时间不能太短, 否则消化液中就会含有一些挥发性含氮物, 例如乙胺、二乙胺、甲胺等^[3]。这些杂质在消化液与碱反应时又会随氮被蒸馏出来, 在用次溴酸溶液处理蒸出液时, 将污染放出的氮气, 在质谱分析中会产生质量 28、29 的离子, 干扰分析结果。

消化液完全冷却后, 一般用蒸馏水将消化液移入容量瓶中定容。然后吸取一部分置于蒸馏器中, 加入 20 毫升 10M NaOH 溶液进行蒸气蒸馏。蒸馏器可以用常规凯氏蒸馏器 (Bremner, 1965), 也可以用最近由 G. Pruden 等人改进的蒸馏器^[5]。Newman (1966), Martin 和 Ross (1968) 报道了用不锈钢和金属容器组成的蒸馏器比用玻璃的“记忆效应”小^[6, 7]。由蒸馏器蒸出液接在装有 2% 的硼酸—指示剂三角瓶中吸收氨, 再用 0.01N H_2SO_4 标准液滴定到 pH 4.7—5, 使氨转变成铵 (NH_4^+) 的形式。然后计算分析样品中的含氮量。

为防止蒸馏过程中样品之间的交叉污染, 特别是在蒸馏了高丰度的 ^{15}N 样品之后立即蒸馏低丰度的 ^{15}N 样品和自然丰度时, 必须在样品蒸馏的间隔中蒸馏少量的 (15~20 毫升) 95% 乙醇或用蒸气蒸馏消除蒸馏器中的氨^[3, 8, 9]。

为避免在蒸馏时所产生的“记忆效应”而引起样品间交叉污染, 还可以用另一种方法, 即 G. Pruden 等人^[5]最近提出的“双蒸馏法”。即把一个消煮样品分成两等分蒸馏, 蒸馏第一等分用来测定总 N; 蒸馏第二等分用来测定 $^{14}N/^{15}N$ 比。 ^{15}N 富集度的任何改变不会引起误差, 因为二者 ^{15}N 富集度相同。蒸馏第一等分样品在蒸馏器内所吸附的氨将与第二等分样品的氨交换。表 1 说明了“双蒸馏法”消除“记忆效应”的作用。先蒸馏一个非富集硫酸铵, 测定富集的 ^{15}N 原子百分超, 立即蒸馏一个富集度为 4.756 ^{15}N 原子百分超的 $(NH_4)_2SO_4$ 。再蒸馏一个非富集的 $(NH_4)_2SO_4$, 接着蒸馏测定三次。由表 1 看出, 最后一次测得蒸馏期间的 ^{15}N 原子百分超与最初的相同。同时也看出, 在蒸馏期间吸附的氨, 几乎完全在下次蒸馏中被显示。

表1 蒸馏设备中的“记忆效应”

样 品	在蒸馏中测得的 ^{15}N 原子百分超
蒸馏富集样品前的未标记 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.0011
^{15}N 标记的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4.7559
蒸馏富集样品后的未标记 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	
第一等分试样	0.0030
第二等分试样	0.0012
第三等分试样	0.0011

注：每个样品含有1毫克氮，蒸馏整个过程都用同一设备和玻璃瓶。

用硫酸滴定过的蒸出液，放在 $60^\circ\text{--}80^\circ\text{C}$ 的真空干燥箱中或小功率的电炉上浓缩至1~2毫升溶液或蒸干。为保证质谱分析，蒸出液中应含有1毫克氮左右。若暂时不进行质谱分析，将浓缩过的蒸出液用盖塞紧，置于冰箱中保存，以免生长微生物和防止大气中的 NH_3 污染。并且蒸出液用酸滴定后应含有一定的酸量，防止浓缩过程中铵受损失。但酸量不能过量，否则在用次溴酸处理时会生成溴（ $\text{Br}^- + \text{OBr}^- + 2\text{H}^+ = \text{H}_2\text{O} + \text{Br}_2$ ）⁽⁴⁾。

3. 将铵转变为氮气

在真空条件下，用碱性次溴酸钠处理样品。将铵氧化成供质谱分析用的氮气。其反应式如下： $2\text{NH}_4^+ + 4\text{NaOBr} = 4\text{NaBr} + 4\text{H}_2\text{O} + \text{N}_2$ 。反应瓶和装置一般用Sprinson和Rittenberg (1949) 所介绍的。如图1 (a), (b) 所示。

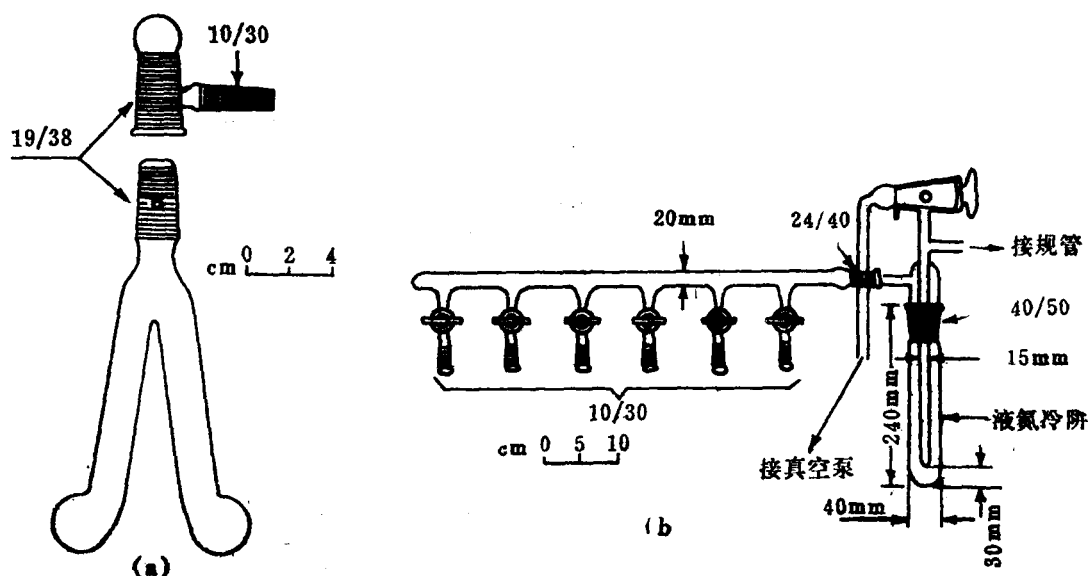


图1 将铵转化成质谱分析氮气装置图

图1 (a) 是用次溴酸溶液将铵氧化成 N_2 的反应瓶（又称Y-型反应瓶）、一臂放样品，另一臂放次溴酸溶液。图1 (b) 是制备质谱分析气体样品用的真空系统。这是一种由Edwards和Bremner (1949) 改进了的Sprinson和Rittenberg的系统。主要改进是歧管由4根增加到6根；油扩散泵代替了水银扩散泵；同时冷阱用液氮冰冻而不用干冰；真空系统压强

由0.01毫米汞柱到0.001毫米汞柱。

为了把铵氧化成 N_2 ，首先要配制次溴酸—碘化钾溶液。其方法是溶解200克氢氧化钠于300毫升水中（纯蒸馏水），将溶液置于冰中冷却。取一半冷却了的溶液移入500毫升广口三角瓶中，将瓶子浸埋在碎冰中，并在30分钟的时间内加入60毫升溴。加溴时应剧烈地搅拌溶液，同时应控制加入的速度，以使溶液温度不超过 $5^\circ C$ 。当溴加完后，再加入另一半氢氧化钠溶液，搅拌混合液数分钟，塞紧瓶塞，置于冰箱中贮存4—6天即可用。在冷藏期间会形成大量的氢氧化钠沉淀，用前要过滤，并用等体积的0.2%的碘化钾溶液稀释滤液。将此溶液塞紧瓶塞放入冰箱中贮存。在制备和保存此试剂时，应十分小心，尽量避免与大气中的二氧化碳接触。此溶液1毫升可使5—6毫升的铵氧化成氮气。如将这种试剂置于冰箱中保存，其活性可保持在6个月以上。

铵转化成 N_2 的方法有三种：第一种是将铵溶液与次溴酸溶液反应生成 N_2 的气化装置不与质谱计直接相联，而是采用J. M. Bremner (1965)改进的方法^[3]，在图1(b)真空系统中制取 N_2 ，然后取下反应瓶联接到质谱计上分析。或者采用Rittenberg (1949)和G. Lascock (1954年)提出的方法。其方法是用Toepler泵将气体从次溴酸钠反应的混合物中分离出来，并移注到气样管中，供质谱测定 ^{15}N 丰度。第二种方法是铵溶液转化成 N_2 的气化装置直接与质谱计联接。方法是吸取1毫升铵溶液，置于带标准玻璃磨口接头的Y型反应瓶的一臂，再吸取2毫升次溴酸钠—碘化钾溶液加入另一臂。然后在Y型瓶的磨口处涂上真空油脂联接到气化装置上去。把Y型瓶放入液氮冰冻，用机械泵抽反应瓶及整个系统的真空。直到热偶管指示真空度为 1×10^{-3} 托，接着加热溶解样品及次溴酸钠，并抽高真空除去其溶解空气。这时关闭阀门将反应瓶与真空系统隔开，翻转Y型反应瓶，使次溴酸钠与样品溶液混合将铵转化成氮气。氮气停止发生时将Y型瓶浸埋在液氮中，以冻结水蒸汽和反应过程中生成的杂质气体。生成的 N_2 可以直接进入质谱分析管道进行 $^{14}N/^{15}N$ 比值分析。第三种方法用Ross和Martin以及G. Pruden, D. S. Powelson等人^[5,10,11,12]所报道的气化装置。这种方法与一般方法的主要区别是除了气化装置直接与质谱计联接外，样品铵是固体而不是液体；次溴酸溶液在一储存器排出。样品瓶是平口玻璃瓶，而不是Y型瓶。在加入次溴酸钠（或次溴酸锂）前后样品瓶不必冰冻。为证明这个问题，G. Pruden等人在他们设计的装置中，用1毫克未标记的 $(NH_4)_2SO_4$ 与试剂反应，测得 ^{15}N 原子百分超是 0.009 ± 0.00011 (S.E)，然后用1%的 $(NH_4)_2SO_4$ 样品进行处理，随后又处理未标记的 $(NH_4)_2SO_4$ ，测定最后一个样品的 ^{15}N 原子百分超是0.0008。表明样品不用冰冻，交叉污染不会发生。

4. 用质谱测定氮气(N_2)同位素比值。

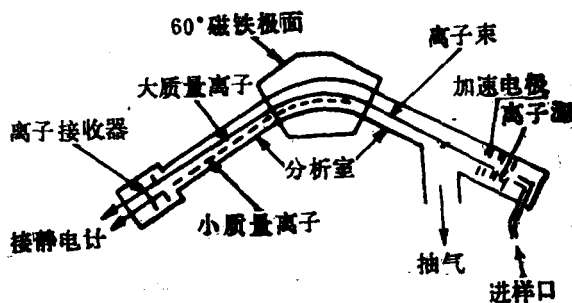


图2 带有两个接收器的扇形质谱计示意图

测定氮气的同位素比值的质谱计有多种,但主要结构基本相同。图2是一种简单的Nier型60°扇形质谱计的示意图^[3]。

表2是氮气分子在离子源被电离后所产生的离子形式。²⁸N₂⁺、²⁹N₂⁺离子是主要存在形式,也是我们感兴趣的离子。这两种不同质荷比(m/e)的离子聚焦后分别落在两个接收器上(如图2所示)。经放大测量其比值。

表2 分子氮在离子源中离子形式

质量数	离子
30	(¹⁵ N ¹⁵ N) ⁺
29	(¹⁴ N ¹⁵ N) ⁺
28	(¹⁴ N ¹⁴ N) ⁺
15	(¹⁵ N) ⁺ 和(¹⁵ N ¹⁵ N) ²⁺
14½	(¹⁴ N ¹⁵ N) ²⁺
14	(¹⁴ N) ⁺ 和(¹⁴ N ¹⁴ N) ²⁺

为确保氮气分子有效电离,在分析前,质谱计电离室和分析室真空度应保持在1×10⁻⁵毫米汞柱以上^[13],仪器本底应低而稳定。对氮气而言,在正常操作条件下,给出²⁸N₂⁺的离子峰小于100毫伏,²⁹N₂⁺的离子峰小于3毫伏为宜。

在同位素比例分析中,除采用双接收器外,还采用单接收器,即通过电场或磁场扫描使不同质荷比的离子,在不同的时间内由一个接收器接收。

¹⁵N百分比可用Huck和Bremner(1976)以及Bremner(1965)推导的公式计算。也可以用G. Pruden等人推导的公式计算。如果用Bremner(1965)推导的公式(目前国内在计算¹⁵N%时,都用此式),则

$$^{15}\text{N}\% = \frac{100}{2R+1}$$

式中R为质量28和29离子流强度之比值,当¹⁵N丰度比较低时(<10%),用上式最为方便;但在¹⁵N丰度比较高(约10%以上)时,应用下列公式计算¹⁵N%:

$$^{15}\text{N}\% = \frac{(29) + 2(30)}{2(28) + 2(29) + 2(30)} \times 100$$

式中(28)(29)(30)分别为各质量离子的离子流强度。在分析过程中,如果样品被空气污染,要根据氦峰(或氧峰)对样品进行校正。为使不同时间测得的结果能在同一仪器下比较,算出样品¹⁵N百分比后还需用仪器校正因素进行校正。一般用空气中¹⁵N%=0.3663作标准^[14],与当天测得空气中的¹⁵N%之比为仪器校正因数再乘上当天的样品值,即

$$\text{样品的}^{15}\text{N}\% = \frac{0.3663}{\text{当天测空气中}^{15}\text{N}\%} \times \text{样品测定值}$$

表3是用¹⁵N标记过的草,分析其中10个样品的结果。氮的总变异系数为0.78%,¹⁵N原子百分超的变异系数为0.12%。每周分析2个样品,一共分析5周。

表4是施有四种不同比例的标记肥料氮的冬小麦的¹⁵N原子百分超。每种肥料应用到三个重复小区,由质谱仪分析其小区间和样品间小麦籽粒、茎、土的¹⁵N原子百分超及其误差。

由表4数据不难看出,标记肥料氮量不同,在小麦各部 and 土壤中分配的¹⁵N原子百分超也不同,施的肥料氮多,小麦吸收的也多,同时也看出小区间的误差比样品间的误差大得多。

表3 一种标准草样分析结果

样 品 号	N %	^{15}N 原子百分超
1	1.417	0.4152
2	1.403	0.4153
3	1.416	0.4150
4	1.423	0.4158
5	1.396	0.4158
6	1.386	0.4154
7	1.403	0.4149
8	1.411	0.4159
9	1.413	0.4163
10	1.405	0.4163
平均	$1.407 \pm 0.0110(\text{SD})$	$0.4156 \pm 0.00050(\text{SD})$

表4 小区间和样品间 ^{15}N 原子百分超及误差

小 区 号	标记肥料 应 用 N, kg/ha	籽 粒			茎			土		
		值	$\pm\text{SD}$ (小区间)	$\pm\text{SD}$ (样品间)	值	$\pm\text{SD}$ (小区间)	$\pm\text{SD}$ (样品间)	值	$\pm\text{SD}$ (小区间)	$\pm\text{SD}$ (样品间)
06	49.3	1.566	0.161	0.004	1.642	0.123	0.009	0.0352	0.0019	0.0002
07	97.5	2.102	0.225	0.002	2.231	0.173	0.015	0.0351	0.0011	0.0003
08	147.4	2.411	0.098	0.001	2.534	0.112	0.006	0.0446	0.0049	0.0006
09	195.8	—	0.011	0.005	2.924	0.045	0.006	0.0481	0.0034	0.0006

参 考 文 献

1. H. Faust, Use of ^{15}N in Agricultural Sciences, Inter-Regional Training Course on the Use of ^{15}N in Soil Research, FAO/IAEA (1976)
2. R. D. Hauck and J. M. Bremner, Use of Tracers for Soil and Fertilizer Nitrogen Research, Adv. Agron., 28, 219—266 (1976)
3. J. M. Bremner, Isotope-Ratio Analysis of Nitrogen in Nitrogen-15 Trace Investigation, In Black CA, ed. Methods of Soil Analysis, Part 2, Agronomy 9, 1256-1286, Madison, Wisc: American Society of Agronomy (1965)
4. R. Fiedler and G. Proksch, The Determination on Nitrogen-15 by Emission and Mass Spectrometry in Biochemical Analysis: A Review, Anal. Chim. Acta, Vol. 78 (1975)
5. G. Pruden, D. S. Powlson and D. S. Jenkinson, The Measurement of ^{15}N in Soil and Plant Material, Fertilizer Research 6:205-218 (1985)
6. A.C.D. Newman, The Distillation of Ammonia for Isotopic Analysis, Chem. Ind 3, 115—116 (1966)
7. A.E. Martin and D.J. Ross, Significance of Errors in ^{15}N Measurements in Soil-Plant Research, Trans 9th Int Congr Soil Sci., 3, 521-529 (1968)
8. R.D. Hauck, Isotope-Ratio Analysis in Investigation Using Stable Nitrogen Traces, In Methods of Soil Analysis, Part 2, 2nd ed. Madison, Wisc: American Society of

- Agronomy (1982)
9. P.G. Saffigna and S.A. Waring, Prevention of ^{15}N Cross-Contamination during Steam Distillation and Potentiometric Titration of ^{15}N -Labeled Samples, *Anal. Chim. Acta*, 89, 203-207 (1977)
 10. B.J. Buresh, E.R. Austin and E.T. Craaswell, Analytical Methods in ^{15}N Research, *Fert Res.*, 3, 37-62 (1982)
 11. L.K. Porter and W.A. O'Deen, Apparatus for Preparing Nitrogen from Ammonium Chloride for Nitrogen-15 Determination, *Anal. Chem.*, 49, 514-516 (1977)
 12. P.J. Ross and A.E. Martin, A Rapid Procedure for Preparing Gas Samples for Nitrogen-15 Determination, *Analyst* 95, 817-822 (1970)
 13. J.P. Payne, The Medical and Biological Application of Mass Spectrometry, London, New York, San Francisco, 35-43 (1979)
 14. A. Mariotti, Atmospheric Nitrogen as a Reliable Standard for Natural Nitrogen-15 Abundance Measurements, *Nature*, 303, 685-687 (1983)

Measuring ^{15}N in Plant and Soil by Mass Spectrometry

Peng Yunsheng

(Beijing Agricultural University)

Received 22 Mar. 1986

Abstract

The mass spectrometric methods for measuring ^{15}N in plant and soil have been reviewed in the present paper. The conventional method is carried out with three procedures: (1) converting the labeled nitrogen to ammonium; (2) converting the ammonium to N_2 by oxidation with alkaline sodium hypobromite under vacuum condition; (3) determining the isotopic composition of N_2 by mass spectrometry.