

气相色谱-燃烧-同位素比值质谱法分析 氨基酸氮稳定同位素并初步评估水生生物体营养级

赵晶晶^{1,2} 张忠义^{1,2} 郑能建^{1,2} 田晶^{1,2} 朱光旭^{1,2} 肖化云^{*1}

¹(中国科学院地球化学研究所 环境地球化学国家重点实验室, 贵阳 550081)

²(中国科学院大学, 北京 100049)

摘 要 氨基酸稳定氮同位素($\delta^{15}\text{N}$)分析能准确有效地评估生物体的营养级以及氮在食物链中的流动。本研究优化了氨基酸氮同位素的分析方法: 样品在酸性条件下水解后, 释放出的蛋白质氨基酸经阳离子交换树脂纯化后, 衍生为对应的 *N*-新戊酰基, *O*-异丙醇 (*N*-pivaloyl-isopropyl, NPP) 酯, 利用气相色谱-燃烧-同位素比值质谱仪(Gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry, GC-C-IRMS)测定其 $\delta^{15}\text{N}$ 。经非极性气相色谱柱 DB-5ms 分离后, 13 种氨基酸 NPP 酯衍生物均可得到良好的基线分离。在样品量不低于 20 ng N 条件下, GC-C-IRMS 方法的精密度优于 1‰, 测得的 $\delta^{15}\text{N}$ 值与 EA-IRMS 法测得的 $\delta^{15}\text{N}$ 值没有明显差异。阳离子树脂纯化前后各氨基酸 $\delta^{15}\text{N}$ 值差异低于 1‰, 表明没有产生明显的同位素分馏。采用本方法成功地估算了阿哈湖生态系统中常见水生生物的营养级, 可作为研究氨基酸代谢以及生态系统特征的新方法。

关键词 *N*-新戊酰基, *O*-异丙醇(NPP)酯; 氨基酸; 气相色谱-燃烧-同位素比值质谱; 营养级

1 引言

氮稳定同位素已广泛用来研究生态系统的特征与过程^[1]。其中, 生物体有机质总氮同位素的组成($\delta^{15}\text{N}$)已成为一系列生态学研究的重要手段之一, 尤其是用于评估有机体的营养级和测定氮在食物链中的流动^[2]。总氮同位素方法用来评估营养级是基于大量研究的平均观测值: $\delta^{15}\text{N}$ 随食物网的富集指示大约为 3.4‰^[3]。然而总氮同位素方法也有局限性: (1) 不同物种间的 $\delta^{15}\text{N}$ 富集程度存在明显差异。DeNiro 和 Epstein 研究发现, 不同纲属动物(昆虫纲, 哺乳纲等)的 $\delta^{15}\text{N}$ 富集因子从-0.5‰到+9.2‰不等。富集因子的差异会导致在估算某种生物营养级的过程中产生较大的偏差^[3]; (2) 初级生产者、尤其是水生生态系统中的藻类或颗粒有机物的 $\delta^{15}\text{N}$ 值具有明显的季节和空间变化。例如: 蓝细菌和水藻类在某些情况下 $\delta^{15}\text{N}$ 变化极其明显, 通常可高达 10‰。研究表明, 藻类的组成、平均寿命、密度、生长特征以及所用氮源(N_2 , NO_3^- , NH_4^+)的同位素特征均会影响其 $\delta^{15}\text{N}$ 值^[4]。因此, 一次或者短期的初级生产者的 $\delta^{15}\text{N}$ 分析值并不能代表其真实值, 仅依赖于少量的样品 $\delta^{15}\text{N}$ 值会造成所研究生态系统中营养关系的严重误判。

氨基酸单体氮同位素组成是可以准确有效地估算有机体营养级。研究表明, 生物体内谷氨酸(Glu)以及苯丙氨酸(Phe)氮同位素比值差异可以指示其营养级^[5-7]。代谢过程中, 谷氨酸快速进行转氨基作用, C—N 键断裂, $\delta^{15}\text{N}$ 富集较大(+8.0‰)。相反, 苯丙氨酸的主要代谢步骤是增加一个羟基基团转化成酪氨酸, 此过程不伴随 C—N 键断裂, $\delta^{15}\text{N}$ 富集不明显(+0.4‰), 这种代谢关系的差异导致在特定营养级的有机体中谷氨酸和苯丙氨酸的 $\delta^{15}\text{N}$ 明显不同。水生生态系统有机体营养级计算公式为^[8,9]:

$$\text{TL}_{\text{Glu/Phe}} = 1 + (\delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}} - 3.4) / 7.6 \quad (1)$$

在文献[10]基础上, 本研究对 GC 条件、前处理方法以及衍生技术进行了优化。本方法准确性高, 重现性好, 为分析氨基酸氮稳定同位素以及评估水生生物体营养级提供参考。

2016-08-09 收稿; 2016-12-20 接受

本文系国家自然科学基金项目(Nos. 41425014, 2016YFA061000) 资助

* E-mail: xiaohuayun@vip.skleg.cn

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

气相色谱-燃烧-同位素比值质谱仪(GC-C-IRMS, 美国 Thermo-Fisher 公司); 气相色谱-质谱仪(GC-MS, 6890-70000C, 美国 Agilent 公司); 元素分析仪(EA, 美国 Thermo-Fisher 公司); 氮吹仪(BYN100-2, 上海秉越电子仪器有限公司)。

13 种氨基酸标准品: 丙氨酸, 甘氨酸, 缬氨酸, 亮氨酸, 异亮氨酸, 脯氨酸, 天冬氨酸, 蛋氨酸, 丝氨酸, 苏氨酸, 谷氨酸和苯丙氨酸和 γ -氨基丁酸, 以及内标氨基酸: 正亮氨酸和 β -氨基丁酸的纯度均为 99.9%, 均购于美国 Sigma-Aldrich 公司。阳离子交换树脂(Dowex 50W X8 H⁺, 200 ~ 400 mesh, Sigma-Aldrich 公司)用于纯化样品。水解和衍生试剂包括: 12.1 mol/L HCl(ACS 级)、甲醇(色谱级)、正己烷、二氯甲烷、亚硫酸氯、新戊酰氯、无水 MgSO₄, 均购于上海阿拉丁公司。

2.2 实验方法

2.2.1 生物样品采集、氨基酸提取以及衍生化 本研究的样品为 2015 年 8 月 10 日自阿哈湖水域(东经 106°39', 北纬 26°33') 随机采集 9 种水生生物。所有样品冷冻干燥后, 研磨均匀。准确称取 10 mg 样品置于反应瓶中, 加入 0.5 mL 2.1 mol/L HCl 后密封, 于 110°C 下水解 24 h。室温冷却后, 水解液在 60°C 下用氮气吹干。水解产物溶解于 0.1 mol/L HCl, 经正己烷-二氯甲烷(3:2, V/V) 充分脱脂后, 过阳离子交换树脂纯化, 用 4 mol/L 氨水洗脱。内标加入洗脱液中, 经氮吹仪吹干, 并按照上述方法进行衍生化。阳离子交换树脂处理后可能存在的背景干扰由相应的空白程序检验。

2.2.2 生物样品氨基酸混标衍生化 标准样品溶液充分干燥后加入 1 mL 亚硫酸氯-异丙醇(1:4, V/V) 于 110°C 下酯化 2 h。氮吹仪吹干后, 再加入 1 mL 新戊酰氯-二氯甲烷溶液(1:4, V/V) 于 110°C 下酰化 2 h, 生成 *N*-新戊酰基和 *O*-异丙醇酯, 多余的衍生化试剂经氮吹后完全去除。氨基酸 NPP 酯溶于 0.5 mL 二氯甲烷溶液, 用 GC-C-IRMS 测定氮同位素值^[10]。

2.2.3 色谱及仪器条件 色谱柱: Agilent DB-5ms 毛细管柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm); 载气: He(99.9999%), 流速 1.4 mL/min; 进样口温度: 250°C; 升温程序: 初始 40°C 保持 2.5 min, 以 15°C/min 升至 110°C, 再以 3°C/min 升至 150°C, 最后以 6°C/min 升至 230°C; 无分流模式进样, 进样量 1.0 ~ 1.5 μL。单个氨基酸保留时间用 GC-MS 确定。氨基酸氮同位素分析使用 GC-C-IRMS 进行, 氨基酸衍生化样品先通过 GC 分离, 然后进入毛细管微反应器(IsoLink) 转化为相应的气体, 燃烧产生的水分由全氟磺酸渗透膜去除, 将连通燃烧管与质谱仪的毛细管置于液氮冷阱中, 以固定样品燃烧产生的 CO₂, 每测定 10 个样品后, 将冷阱去掉, 以释放固定住的 CO₂, 防止堵塞该毛细管^[11]。设定燃烧炉温度为 1030°C, 选用 N₂ 测定模式, 自动调用 *m/z* 28, 29, 30 的离子源参数。

2.3 数据处理

数据处理运用 ISODAT 软件(Thermo, Fisher), $\delta^{15}\text{N}$ 峰开始和结束的斜度分别设为 0.2 和 0.4 mV/s, $\delta^{15}\text{N}$ 值的计算如下:

$$\delta^{15}\text{N}(\text{‰}) = [(R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}}) - 1] \times 1000 \quad (2)$$

其中, R_{sample} 表示所测样品中 ¹⁵N 丰度与 ¹⁴N 丰度之比, R_{standard} 表示标准样品中 ¹⁵N 丰度与 ¹⁴N 丰度之比。

3 结果与讨论

3.1 衍生条件及 GC-C-IRMS 系统

氨基酸是两性离子, 其羧基、氨基以及侧链官能团被完全衍生化前并不适合用气相色谱分离。在本研究中, 氨基酸通过衍生成功转化为 NPP 酯。该方法的主要优点: 所有的衍生化试剂不含氮原子, 因此不需要对氮同位素进行进一步校正; 相较乙酰基而言, 新戊酰基的引入进一步减小了氨基酸的极性, 增加了色谱的分离效果。另外, 氨基酸 NPP 衍生物产生的背景噪音更小^[12]。对于气体同位素质谱系统而言, 毛细管柱和燃烧系统是非常重要的, 任一系统表面失活, 都可能会导致灵敏度的下降, 伴随着保留时间的漂移, 信号强度显著下降以及同位素比值不稳定等现象。因此, 每隔 20 ~ 25 个样

品, GC-IsoLink 燃烧炉都有必要进行重新氧化。通氧后, 氮信号强度是判断仪器是否恢复稳定的最好评判标准。本研究在 GC-C-IRMS 通氧后连续测定丙氨酸 NPP 酯衍生物 20 次。如图 1 所示, 丙氨酸氮信号值在第 6 次进样后达到稳定。GC-C-IRMS 通氧、反吹后, 为保证测定值的准确性, 至少需测定标准样品 5 次(活化), 待信号值稳定后才能进行样品的测定。实际过程中, 利用氨基酸混标进行活化。GC-C-IRMS 每批次能测定的样品数量与、样品性质及通氧时间等因素有关。实验时应注意插入氨基酸标准来检测 Isolink 的氧化性能, 一旦发现氧化效率降低, 立即停止测样进行通氧氧化。通过氧化、活化, 氨基酸保留时间和氮信号强度会恢复正常。

3.2 氨基酸在 GC-C-IRMS 中的色谱行为

GC 的分离度取决于分析物的挥发性以及与固定相的相互作用。本研究使用非极性气相色谱柱 (DB-5ms) 对氨基酸 NPP 衍生物进行分离。与其它极性色谱柱相比, 该色谱柱可承受更宽的温度范围, 并可以得到氨基酸峰之间的最佳基线分离(如图 2a 和图 2b)。目标化合物峰的基线分离是准确测定同位素值的首要条件, 尤其对于复杂的生物样品而言。氨基酸衍生物保留时间与引入的烷基的长度相关, 其次还与气相色谱柱的极性相关。在本研究中, 13 种氨基酸可以得到基线分离(如图 2a 和图 2b), 低分子量、非极性的氨基酸, 例如丙氨酸、甘氨酸, 与固定相作用不强烈, 所以首先被洗脱出来。其次被洗脱出来的是较高分子量的中性氨基酸(例如缬氨酸, 亮氨酸)以及低分子量的极性氨基酸。最后被洗脱出来的是更高分子量的极性、芳香族氨基酸, 因为它们能与固定相发生强烈作用(图 2b)。样品水解过程中, 天冬酰胺和谷氨酰胺会转化为天冬氨酸和谷氨酸, 因此 GC-C-IRMS 测量得到的天冬氨酸的 $\delta^{15}\text{N}$ 值代表了天冬氨酸中的氮和天冬酰胺中的氨基氮的 $\delta^{15}\text{N}$ 值, 谷氨酸的 $\delta^{15}\text{N}$ 值代表了谷氨酸中的氮和谷氨酰胺中的氨基氮的 $\delta^{15}\text{N}$ 值。

3.3 GC-C-IRMS 测定氨基酸氮同位素比值的精密度和准确度

为了评估测定结果的精确度以及检验本系统是否适用于自然丰度的氨基酸氮同位素比值的测定, 6 个同样浓度的氨基酸混合标准溶液分别衍生化, 并用 GC-C-IRMS 测定其 $\delta^{15}\text{N}$ 值。GC-C-IRMS 测定的氨基酸 $\delta^{15}\text{N}$ 值与 EA-IRMS 测定的值相比, 评估测定结果的准确性(表 1)。结果表明, GC-C-IRMS 测定值具有较高的精密度和准确度, 所有氨基酸的 $\delta^{15}\text{N}$ 值精密度和准确度都在 1‰ 以内。EA-IRMS 和 GC-C-IRMS 测定结果高度相关, 回归斜率接近 1, 相关系数为 0.98(图 3)。经过校正, 这两种仪器的测量值之间的差异小于 1‰。另外, 采用 Bland-Altman 法评估 EA-IRMS 和 GC-C-IRMS 测定结果的一致性。结果表明, GC-C-IRMS 测定结果的平均偏差接近 0.0‰, 明显位于仪器精确度范围内(图 4)。因此, GC-C-IRMS 测定

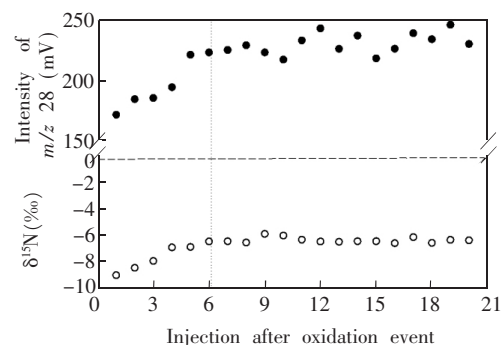


图 1 氧化后, 连续测定 20 次丙氨酸单标的峰面积及 $\delta^{15}\text{N}$ 值
Fig.1 $\delta^{15}\text{N}$ values and amplitudes of alanine derivative in 20 successive determinations after oxidation event

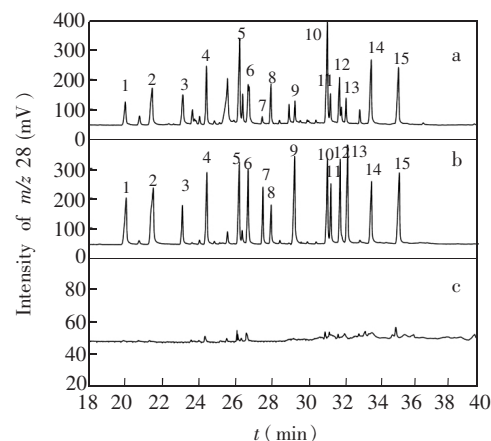


图 2 氨基酸 NPP 酯衍生物的 GC-C-IRMS 色谱图
a: 黄颡鱼的肌肉组织样品; b: 氨基酸混合标准; c: 经过阳离子交换树脂后的空白程序

Fig. 2 Gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectra (GC-C-IRMS) of amino acid N-pivaloyl-isopropyl (NPP) ester derivatives

a: muscle tissue sample of Pelteobagrus fulvidraco; b: amino acid standard mixture; c: blank procedure after passing through cation-exchange resin Peaks: 1. Ala, 2. Gly, 3. α -ABA, 4. Val, 5. Leu, 6. Ile, 7. Nle, 8. GABA, 9. Pro, 10. Asx, 11. Thr, 12. Ser, 13. Met, 14. Glx, 15. Phe

表 1 标准氨基酸的氮同位素值($\delta^{15}\text{N}$, ‰) 及其回收率($n=6$)Table 1 Recovery and isotopic composition of N ($\delta^{15}\text{N}$, ‰) of standard amino acids ($n=6$)

Amino acid Name	Recovery(%)	GC-C-IRMS		EA-IRMS	Δ^*	Δ^{**}
		After resin	Before resin			
丙氨酸 Alanine, Ala	102.9±1.1	-5.66±1.01	-6.29±0.82	-6.63±0.07	-0.63	0.31
甘氨酸 Glycine, Gly	96.5±0.7	1.06±0.72	1.93±0.61	1.36±0.04	0.88	0.57
缬氨酸 Valine, Val	98.3±0.4	-0.08±0.42	0.01±0.72	-0.33±0.04	0.09	0.34
亮氨酸 Leucine, Leu	95.5±1.4	1.68±0.84	2.40±0.71	2.10±0.04	0.72	0.30
异亮氨酸 Isoleucine, Ile	94.3±0.6	-2.66±0.61	-3.22±0.62	-2.63±0.06	-0.56	-0.59
脯氨酸 Proline, Pro	101.4±0.7	3.11±0.72	3.08±0.64	3.30±0.07	-0.03	-0.22
蛋氨酸 Methionine, Met	98.7±1.8	-1.02±0.82	-1.95±0.93	-1.72±0.05	-0.94	-0.23
丝氨酸 Serine, Ser	100.9±0.9	2.23±0.91	1.69±0.72	2.26±0.08	-0.54	-0.57
苏氨酸 Threonine, Thr	93.4±0.6	0.11±0.64	-0.03±0.81	0.70±0.05	-0.14	-0.73
苯丙氨酸 Phenylalanine, Phe	92.1±0.2	2.54±0.21	2.64±0.51	2.28±0.06	0.10	0.36
天冬氨酸 Aspartate, Asp	96.4±0.8	-1.89±0.31	-2.15±0.92	-2.32±0.07	-0.25	0.17
谷氨酸 Glutamate, Glu	98.4±2.5	-4.20±0.62	-3.89±0.73	-4.52±0.04	0.31	0.63

Δ^* : 阳离子交换树脂纯化前后的氨基酸混标 $\delta^{15}\text{N}$ 的差值; Δ^{**} : 由 EA-IRMS 和 GC-C-IRMS 测得的 $\delta^{15}\text{N}$ 的差值。

Δ^* : Difference in $\delta^{15}\text{N}$ values of amino acids standard mixture directly analyzed and passed through cation-exchange chromatography;

Δ^{**} : Difference in $\delta^{15}\text{N}$ values determined by elemental analysis (EA) -IRMS and GC-C-IRMS.

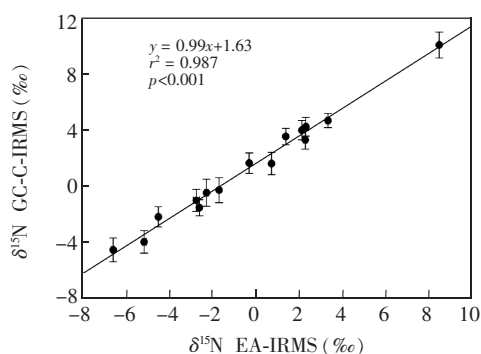


图 3 GC-C-IRMS 与 EA-IRMS 测定的氨基酸标准的 $\delta^{15}\text{N}$ 值的相关性

Fig.3 Correlation between $\delta^{15}\text{N}$ values of amino acid standards determined by EA-IRMS and GC-C-IRMS

氨基酸氮同位素没有造成明显的同位素分馏, 并且本方法得到的 $\delta^{15}\text{N}$ 值 EA-IRMS 具有同等的准确度。

3.4 氨基酸 $\delta^{15}\text{N}$ 分析所需样品量

GC-C-IRMS 分析氨基酸氮同位素所需的样品量是优化 $\delta^{15}\text{N}$ 测定结果的准确度和精确度必须考

虑的另一个重要参数。Merritt 等^[13]认为 $\delta^{15}\text{N}$ 的测定值和进样量之间存在一定的相关性。Takano 等^[14]发现当氨基酸峰高 (m/z 28) 大于 100 mV 时, $\delta^{15}\text{N}$ 测定值的精确度较高 ($1\sigma = 0.5\%$), 约相当于 30 ng N 的进样量。同样的, Styring 等^[15]发现在 100~1200 mV 的信号强度范围内, 氨基酸 $\delta^{15}\text{N}$ 测定值重复性最佳。本研究同样证实了这种现象, 0.3~4.5 nmol 氨基酸标准经过衍生后测得的信号值与对应的 $\delta^{15}\text{N}$ 值具有一定的相关性, 如图 5 所示。为得到准确可靠的 $\delta^{15}\text{N}$ 值, 本实验中进样量为不少于 20 ng N, 大致相当于 200 mV (m/z 28) 信号强度。与文献 [14, 16] 相比, 可能是由于同位素质谱仪以及燃烧炉性能的提高, 因此本研究所需进样量减少。

3.5 阳离子交换树脂对于氨基酸 $\delta^{15}\text{N}$ 测定的影响

利用阳离子交换树脂纯化氨基酸样品被认为是一种有效方法, 可以去除一部分无机化合物, 并且

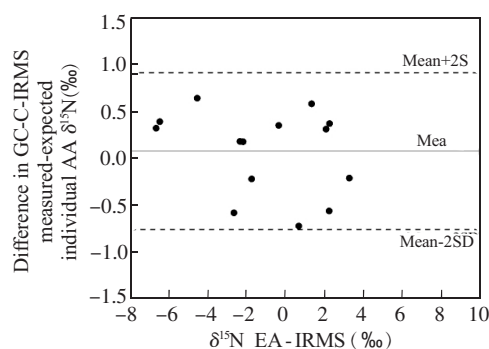


图 4 Bland-Altman 法评估 EA-IRMS 和 GC-C-IRMS 测定的单个氨基酸 $\delta^{15}\text{N}$ 值的一致性。实线代表差值平均值, 虚线限定了置信区间的范围; 所有 GC-C-IRMS 测量值都经过经验校正。

Fig.4 Bland-Altman plots for comparing the expected individual amino acid $\delta^{15}\text{N}$ values determined by EA-IRMS and GC-C-IRMS, respectively. The solid line denoted the bias and the two dotted lines suggested the 95% limits of the agreement. All GC-C-IRMS determinations were empirically corrected. AA, amino acid

将氨基酸从复杂的亲水化合物中分离出来,如糖、有机酸等。这些干扰化合物会大量消耗衍生剂,也可能对 GC-C-IRMS 系统的燃烧和还原炉造成损害^[14-15]。尤其是,当样品中的目标化合物和其它含氮化合物不能基线分离时,会导致目标化合物的 $\delta^{15}\text{N}$ 测定值与真实值偏差较大^[17]。因此,为了得到准确可信的 $\delta^{15}\text{N}$ 值,样品纯化是非常必要的。

如图 6 所示,过柱前后氨基酸 $\delta^{15}\text{N}$ 值具有较好的相关性,即使使用氨水洗脱树脂中富集的氨基酸, $\delta^{15}\text{N}$ 值差异也不明显。这说明使用此方法能够有效排除非氨基酸类物质对检测结果的干扰。

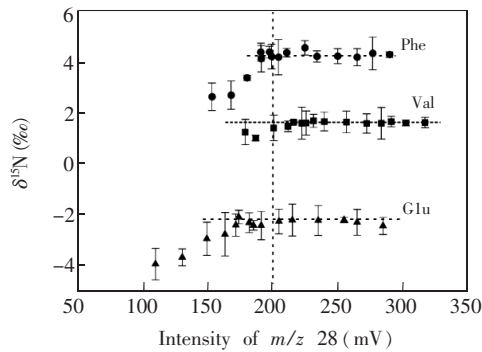


图 5 进样量与谷氨酸、缬氨酸和苯丙氨酸的 NPP 酯的 $\delta^{15}\text{N}$ 值的对应关系,虚线代表由 EA-IRMS 测定的 3 个氨基酸各自的 $\delta^{15}\text{N}$ 值

Fig.5 Detection values of $\delta^{15}\text{N}$ of NPP ester derivatives of Glu, Val and Phe for various sample amounts
Dashed lines represent $\delta^{15}\text{N}$ values of three amino acids measured by EA-IRMS independently.

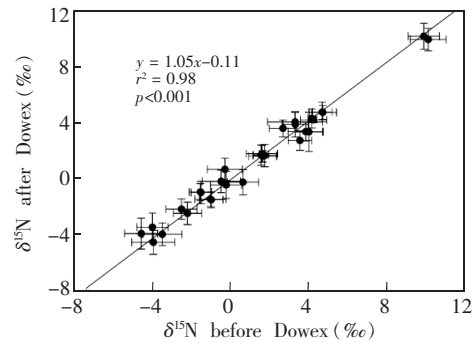


图 6 氨基酸标样过阳离子交换树脂前后的 GC-C-IRMS 的 $\delta^{15}\text{N}$ 测量值的相关性

Fig.6 Correlation between $\delta^{15}\text{N}$ values of amino acid standards determined by GC-C-IRMS before and after Dowex cation-exchange resin treatment

为了验证阳离子交换树脂可能带来的杂质化合物,空白溶液经完整的前处理过程后衍生并用 GC-C-IRMS 分析。如图 2c 所示,色谱图中没有明显的背景化合物,因此使用阳离子交换树脂对生物样品进行纯化是非常有效的手段。

3.6 氨基酸氮同位素方法初步评估阿哈湖淡水生态系统常见物种营养级

本研究通过对自然界生物个体中氨基酸氮同位素的测定评估该有机体的营养级。氨基酸的氮同位素组成以及 $\text{TL}_{\text{Glu/Phe}}$ 值如表 2 所示。根据所得 $\text{TL}_{\text{Glu/Phe}}$ 值,可以有效确定淡水生态系统的有机体营养级。大部分淡水生态系统中的食物链始于初级生产者 ($\text{TL} = 1$, 例如藻类和植物)。一般认为食草动物的营养级为 2, 杂食性动物处于 2~3 之间, 而肉食性动物则处于 3 以上。在本研究中,以白鲢和草鱼为代表的草食性鱼的 $\text{TL}_{\text{Glu/Phe}} \approx 2$, 分别为 1.9 和 2.1。初级生产者水绵和黑藻的 $\text{TL}_{\text{Glu/Phe}}$ 值分别为 1.0 和 1.2。黄颡鱼是一种被公认的凶残的食肉型鱼类,其 $\text{TL}_{\text{Glu/Phe}} = 3.2$ 。包括花鲢、鲫鱼、鲤鱼以及日本沼虾在内的水生生物被认为是杂食性动物, $\text{TL}_{\text{Glu/Phe}}$ 值处于 2.3~2.4 之间。表 2 中的 $\text{TL}_{\text{Glu/Phe}}$ 值和个体预期的营养级高度符合。因此,氨基酸氮同位素法能准确反映有机体在自然淡水生态系统中的营养级。

4 结论

本研究采用氨基酸 NPP 酯衍生方法对前处理、衍生以及 GC 条件进行优化,有效分离了 13 种氨基酸,通过 GC-C-IRMS 测定得到准确可靠的 $\delta^{15}\text{N}$ 值。阳离子交换树脂纯化氨基酸是一种有效的方式,氨基酸标准经纯化后其 $\delta^{15}\text{N}$ 值变化幅度低于 1‰。在进样量不低于 20 ng N 时,GC-C-IRMS 测定氨基酸 $\delta^{15}\text{N}$ 值精度较高。本方法可以广泛应用于大部分生物样品中氨基酸 $\delta^{15}\text{N}$ 值的测定。另外,应用本方法测定阿哈湖水生生态系统中生物个体的氨基酸的 $\delta^{15}\text{N}$ 值,进而计算对应的营养级,所得结果与预期值高度相符,说明本方法可以有效估计自然生态中的某特定生物体的营养级。

表2 淡水生态系统有机体氨基酸的氮同位素组成以及 $TL_{Glu/Phe}$ 值
Table 2 Nitrogen isotopic composition of individual amino acid in freshwater organisms

样品 Sample	食性 Feed habit	$\delta^{15}N$ (‰, n=3)										$TL_{Glu/Phe}^*$
		Ala	Gly	Val	Leu	Ile	Pro	Ser	Met	Glu	Phe	
水棉属绿藻 <i>Spirogyra</i>	初级生产者 Primary producers	0.8	1.3	7.0	5.6	6.4	4.9	-3.0	8.9	11.4	7.9	1.0
黑藻 <i>Hydrilla verticillata</i>	初级生产者 Primary producers	3.6	14.1	18.0	12.6	-4.1	3.7	2.9	-7.9	3.3	-1.3	1.2
白鲢 <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	植食动物 Herbivores	21.7	12.3	24.7	25.2	19.5	23.2	14.4	11.9	23.9	12.2	2.1
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	植食动物 Herbivores	15.4	7.6	15.9	15.2	9.3	14.5	7.0	3.8	19.7	9.8	1.9
黄颡鱼 <i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	肉食动物 Carnivorous	31.1	13.0	32.7	30.9	24.8	29.6	17.3	15.7	32.4	14.2	2.9
花鲢 <i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	杂食动物 Omnivores	23.1	11.2	24.8	23.7	18.2	24.8	15.1	9.3	24.2	11.2	2.3
鲫鱼 <i>Carassius auratus</i>	杂食动物 Omnivores	22.3	9.4	26.7	24.3	16.9	22.8	11.8	10.8	23.8	9.8	2.4
鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>	杂食动物 Omnivores	14.9	5.6	15.9	15.8	10.5	17.8	6.4	2.9	20.4	7.2	2.3
日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	杂食动物 Omnivores	31.8	18.5	31.4	25.7	24.2	28.4	19.3	17.7	32.9	16.5	2.7

* : $TL_{Glu/Phe} = 1 + (\delta^{15}N_{Glu} - \delta^{15}N_{Phe} - 3.4) / 7.6$

References

- Fry B. *Stable Isotope Ecology*, New York: Springer Science & Business Media, **2007**: 1-2
- Hobson K A. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **1992**, 84: 9-18
- DeNiro M J, Epstein S. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **1981**, 45(3): 341-351
- Bronk D A, Glibert P M. *Marine Biology*, **1993**, 115(3): 501-508
- Chikaraishi Y, Steffan S A, Ogawa N O, Ishikawa N F, Sasaki Y, Tsuchiya M, Ohkouchi N. *Ecol. Evol.*, **2014**, 4(12): 2423-2449
- Naito Y I, Bocherens H, Chikaraishi Y, Drucker D G, Wißing C, Yoneda M, Ohkouchi N. *J. Archaeol. Sci.*, **2016**, 6: 720-732
- Chikaraishi Y, Ogawa N O, Doi H, Ohkouchi N. *Ecol. Res.*, **2011**, 26(4): 835-844
- Dore J E, Brum J R, Tupas L M, Karl D M. *Limnol. Oceanogr.*, **2002**, 47(6): 1595-1607
- Ohkouchi N, Tsuda R, Chikaraishi Y, Tanabe K. *Mar. Biol.*, **2012**, 160(4): 773-779
- Corr L T, Berstan R, Evershed R P. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2007**, 21(23): 3759-3771
- LI Guo-Hui, ZHONG Qi-Ding, WANG Dao-Bing, SHEN Shi-Gang. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, **2016**, 37(1): 60-67
李国辉, 钟其顶, 王道兵, 申世刚. *质谱学报*, **2016**, 37(1): 60-67
- XU Chun-Ying, MEI Xu-Rong, LI Yu-Zhong, ZHONG Xiu-Li. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, **2008**, 24(4): 151-156
徐春英, 梅旭荣, 李玉中, 钟秀丽. *中国农学通报*, **2008**, 24(4): 151-156
- Merritt D A, Hayes J. *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.*, **1994**, 5(5): 387-397
- Takano Y, Kashiyama Y, Ogawa N O, Chikaraishi Y, Ohkouchi N. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2010**, 24(16): 2317-2323
- Styring A K, Kuhl A, Knowles T D, Fraser R A, Bogaard A, Evershed R P. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2012**, 26(19): 2328-2334
- Molero G, Aranjuelo I, Teixidor P, Araus J L, Nogues S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2011**, 25(5): 599-607
- Ricci M P, Merritt D A, Freeman K H, Hayes J. *Org. Geochem.*, **1994**, 21(6-7): 561-571

Stable Nitrogen Isotope Analysis of Amino Acids by Gas Chromatography-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry for High-Resolution Trophic Level Estimation

ZHAO Jing-Jing^{1,2}, ZHANG Zhong-Yi^{1,2}, ZHENG Neng-Jian^{1,2}, TIAN Jing^{1,2}, ZHU Guang-Xu^{1,2}, XIAO Hua-Yun^{*1}

¹(State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550001, China)

²(University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract The analysis of stable nitrogen isotopic composition ($\delta^{15}\text{N}$) of individual amino acid was recognized as an effective method for estimating the trophic level of organisms and detecting the nitrogen flow in food webs. In this study, we evaluated a two-stage procedure of esterification followed by acylation, in which biological samples underwent hydrolysis in acid and the released individual amino acids were derivative into the corresponding *N*-pivaloyl-iso-propyl (NPP) esters for gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometric (GC-C-IRMS) analysis. A total of 13 kinds of individual amino acid derivatives were baseline separated on a nonpolar gas chromatography column (DB-5ms). The amount of sample for each test was not less than 20 ng N on column. High correlations were observed between the $\delta^{15}\text{N}$ values respectively obtained by GC-C-IRMS and element analysis-isotope ratio mass spectrometry (EA-IRMS). Furthermore, the mean precision of this method was better than 1‰. Cation-exchange chromatograph was used to purify the samples, and the difference of the detection $\delta^{15}\text{N}$ values before and after purification by the resin was within 1‰. This method was applied to estimate the trophic level of various natural freshwater organisms from Aha Lake. The present study provided a new idea for the application of stable nitrogen isotope ($\delta^{15}\text{N}$) in the trophic level estimation of organisms and metabolism analysis of amino acid.

Keywords *N*-pivaloyl-iso-propyl esters; Amino acid; Gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry; Trophic level

(Received 9 August 2016; accepted 20 December 2016)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 41425014, 2016YFA0601000)