

氨基酸单体氮稳定同位素分析测试方法研究

梁建鑫, 尹希杰*, 李玉红, 林锡煌

(自然资源部第三海洋研究所 分析测试中心, 福建 厦门 361005)

摘要: 该研究建立了一种精准测定不同样品中氨基酸含量及其氮同位素组成的方法。首先利用 N-新戊酰基-O-异丙酯(NPP)对氨基酸进行衍生化, 使其更适用于气相色谱分析。随后, 采用气相色谱-质谱(GC-MS)对大豆、土壤以及标准样品中的 15 种氨基酸单体进行定量分析, 所有目标氨基酸均获得良好的分离效果, 且在 1.0~16.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内呈线性关系($r^2 > 0.98$)。此外, 利用气相色谱-燃烧-同位素比值质谱(GC-C-IRMS)对上述样品中氨基酸的氮同位素组成($\delta^{15}\text{N}$)进行了测定。结果表明, 当进样量超过 20 ng N ($[\text{N}_2^+] m/z$ 28 信号强度约为 150 mV) 时, 该方法可以获得稳定可靠的 $\delta^{15}\text{N}$ 值, 平均精度可达 0.36‰。通过与元素分析-同位素比值质谱(EA-IRMS)的结果进行比较, 两种方法的测定结果高度一致($r^2 = 0.9954$), 表明 NPP 衍生化过程未引入明显的氮同位素分馏。最终测得大豆和土壤样品中各氨基酸的 $\delta^{15}\text{N}$ 值分别分布在 10.90‰~22.32‰ 和 -1.92‰~12.82‰ 之间, 标准偏差分别为 0.23‰~0.88‰ 和 0.08‰~0.79‰, 符合样品分析的精度要求。

关键词: 气相色谱-燃烧-同位素比值质谱(GC-C-IRMS); N-新戊酰基-O-异丙酯(NPP); 氨基酸; 氮稳定同位素

中图分类号: O657.63; O562.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2025)02-0334-08

Study on the Compound Specific Nitrogen Stable Isotope Determination of Amino Acids

LIANG Jian-xin, YIN Xi-jie*, LI Yu-hong, LIN Xi-huang

(Information and Testing Support Center, Third Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Xiamen 361005, China)

Abstract: This study investigated a method for determining the content and nitrogen isotopic composition of amino acids in different samples. Amino acids were derivatized using N-pivaloyl-O-isopropyl ester(NPP) and analyzed via gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS). Results showed effective separation of 15 amino acid standards after NPP derivatization on GC-MS, with good linearity ($r^2 > 0.98$) between concentration and peak area in the range of 1.0~16.0 $\mu\text{mol/L}$. The GC-C-IRMS analysis yielded $\delta^{15}\text{N}$ values for the 15 amino acid standards with a precision of 0.22‰~0.76‰ ($n=8$), comparable to those obtained by elemental analysis-isotope ratio mass spectrometry (EA-IRMS), with a difference ranging from 0.15‰ to 1.14‰. The strong correlation ($r^2=0.9954$) between the two methods suggests that the derivatization process did not introduce significant isotopic fractionation. Stable and accurate $\delta^{15}\text{N}$ values were achieved with an injection amount greater than 20 ng N (corresponding to a $[\text{N}_2^+] m/z$ 28 signal intensity of approximately 150 mV), resulting in an average precision of 0.36‰. Analysis of soybean and soil samples revealed $\delta^{15}\text{N}$ values ranging from 10.90‰ to 22.32‰ and -1.92‰ to 12.82‰, respectively, with standard deviations of 0.23‰~0.88‰ and 0.08‰~0.79‰, respectively, meeting the accuracy requirements for sample analysis.

Key words: gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS); N-pivaloyl-O-isopropyl (NPP); amino acid; nitrogen stable isotope

作为构成生命体不可或缺的元素, 氮在各种生物过程中均发挥着至关重要的作用。近年来, 稳定同位素质谱技术的快速发展为我们深入探究氮的生物地球化学循环提供了强大的工具。相较于传统的

收稿日期: 2024-05-28; 修回日期: 2024-08-21

基金项目: 中国地质调查局舟山海地地质灾害野外科学观测研究站开放基金资助项目(ZSORS-22-10); 自然资源部第三海洋研究所基本科研业务费项目(海三科2024010, 2024014)

* 通讯作者: 尹希杰, 博士, 研究员, 研究方向: 稳定同位素技术与方法研究, E-mail: yinxijie@tio.org.cn

全样品稳定同位素分析(BSIA),对单体化合物进行氮同位素比值分析能够揭示出更精细、更丰富的信息,因此在多个领域展现出巨大的应用潜力^[1]。蛋白质是生命体的基本组成部分,而氨基酸作为构成蛋白质的基本单元,其氮同位素组成蕴藏着关于环境和生物的宝贵信息。例如,可以通过分析氨基酸的氮同位素组成来研究气候变化^[2]、生物代谢途径^[3]等科学问题。利用氨基酸单体同位素技术,科学家们能够追踪氮元素在环境中的来源、迁移转化过程以及最终归宿,使其成为生物地球化学^[4]、生态学^[5-6]和考古^[5]等众多研究领域中不可或缺的技术手段。

精准测定氨基酸单体氮同位素组成对于深入理解生物地球化学过程至关重要。然而,相较于BSIA,单体稳定同位素分析(CSIA)需要更为复杂的前处理步骤,其中高效的分离技术是获得高精度数据的关键^[7]。目前,科学家们已开发了多种用于测定氨基酸单体氮同位素组成的方法。如利用高效液相色谱(HPLC)分离纯化目标氨基酸,再结合元素分析-同位素比值质谱(EA-IRMS)测定其氮同位素组成。虽然液相色谱(LC)与IRMS联用技术已成功应用于氨基酸单体碳同位素分析,但化学湿氧化法存在一定的局限性,难以将氨基酸中的氮元素完全转化为可供IRMS分析的 N_2 ^[8]。当前,气相色谱-燃烧-同位素比值质谱法(GC-C-IRMS)被认为是最有效的氨基酸单体氮同位素分析手段。该方法利用气相色谱(GC)分离目标氨基酸,然后通过燃烧-还原过程将氮元素完全转化为 N_2 ,最后利用IRMS测定其同位素组成。GC-C-IRMS技术具有分析速度快、灵敏度高、重现性好以及检测范围宽等诸多优势。

相较于碳同位素分析,氨基酸单体氮同位素分析需要关注以下两个关键因素。完全转化:氨基酸中的氮元素需经过氧化和还原两个步骤才能完全转化为 N_2 ,确保转化过程的效率对于获得准确的 $\delta^{15}N$ 值至关重要。消除干扰:在IRMS分析过程中, CO_2 会产生与 N_2 质荷比相同的离子碎片($[CO^+]$ m/z 28和29),从而干扰 $\delta^{15}N$ 的测定。因此,需要采取有效措施(例如液氮冷阱)去除 CO_2 ,避免其对 N_2 信号造成干扰^[9]。

氨基酸分子由于具有极性、热稳定性差的特点,难以直接用于气相色谱等分析测试。因此需要进行衍生化处理,将其转化为更易挥发、热稳定性更高的氨基酸酯^[10]。这种预处理步骤能够有效提高氨基酸的分离效果和同位素测定精度,因此衍生化方法的选择对最终的分析结果至关重要。目前,科研人员开发了多种氨基酸衍生化方法^[1,11-12],但都存在着各自的优缺点。例如,硅烷化反应^[13]虽具有反应速度快、条件温和的优势,但其衍生化试剂中的硅元素会在高温下与氧化管反应生成碳化硅,降低氧化效率,并可能污染质谱仪的离子源,增加仪器维护成本。含氟基团衍生化法^[14]同样操作简便,且不会产生副产物,但其衍生物会在氧化管中生成氟化物,对氧化管和铂催化剂造成损害,甚至可能腐蚀气相系统下游的部件。相比之下,N-新戊酰基-O-异丙酯(NPP)法具有诸多优势^[15-16]:衍生产物稳定,适用范围广,色谱分离效果好,且不会引入额外的氮原子,是进行氨基酸氮稳定同位素分析的理想选择。然而,NPP衍生化过程中引入的大型基团会对GC-C-IRMS系统的氧化还原能力造成一定影响,进而影响氮同位素测定的精确度。

本研究利用GC-C-IRMS技术,对标准样品以及不同类型样品中的氨基酸单体进行了含量和氮同位素组成的测定。通过对实验流程和方法进行系统评估,验证了其平行性、精密度和准确性,并优化了相关实验参数。本研究旨在建立一种适用于环境样品中氨基酸单体氮同位素分析的高效、可靠且准确的方法,以为氨基酸单体氮同位素在生物地球化学、生态学和地质学等领域的应用提供技术支撑。

1 实验部分

1.1 仪器与装置

GC-MS QP2010气相色谱-质谱联用仪(日本岛津公司),用于分离和鉴定氨基酸衍生物;DeltaV同位素比值质谱仪(美国Thermo Fisher公司),用于氮同位素组成测定,该仪器与美国Thermo Scientific公司生产的Trace GC Ultra气相色谱仪、Thermo AI 1310自动进样器以及Finnigan GC-Combustion III燃烧接口联用,构成完整的GC-C-IRMS系统;ISOprime100元素分析仪(德国Elementar公司),用于氨基酸标准品的氮同位素组成测定;MGS-2200氮吹仪(日本Eyela公司),用于样品浓缩和溶剂挥发。上述仪器的使用保证了本研究数据的准确性和可靠性^[17]。

1.2 材料与试剂

15种氨基酸(见表1)及 γ -氨基丁酸(GABA)购自上海阿拉丁公司;新戊酰氯、盐酸、氨水、氯化亚砷、吡啶为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司;二氯甲烷、异丙醇、乙酸乙酯、正己烷为色谱纯,购自Sigma-Aldrich公司。

1.3 色谱与质谱条件

本研究采用两种气相色谱方法分析氨基酸衍生物:

(1)气相色谱-质谱法:色谱柱为DB-5MS(60 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m)。载气为氦气,流速为1 mL/min,吹扫流速为3 mL/min。进样口温度为250 $^{\circ}$ C,采用分流进样模式,分流比为1:10,进样量为1 μ L。升温程序如下:初始温度60 $^{\circ}$ C保持5 min,以3 $^{\circ}$ C/min升温至220 $^{\circ}$ C,再以10 $^{\circ}$ C/min升温至300 $^{\circ}$ C并保持20 min。质谱分析采用EI离子源,离子源温度和接口温度分别为250 $^{\circ}$ C和280 $^{\circ}$ C。溶剂延迟时间为12 min,并在Scan模式下进行质量扫描,扫描范围 m/z 50~450^[17]。

(2)气相色谱-燃烧-同位素比值质谱法:色谱柱为DB-5MS(60 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25 μ m)。载气为氦气,流速为1.5 mL/min。进样口温度为280 $^{\circ}$ C,采用不分流进样模式,进样量为1 μ L。升温程序如下:初始温度60 $^{\circ}$ C,以15 $^{\circ}$ C/min升温至130 $^{\circ}$ C,然后以3 $^{\circ}$ C/min升温至220 $^{\circ}$ C,最后以10 $^{\circ}$ C/min升温至300 $^{\circ}$ C并保持25 min。

流程:在GC-C-IRMS系统中,氨基酸衍生物首先进入Trace GC Ultra气相色谱仪进行分离。分离后的各氨基酸单体依次进入Combustion III系统,该系统由氧化炉和还原炉组成。在960 $^{\circ}$ C的高温下,氧化炉中的氧化铜和铂-镍催化剂将氨基酸单体中的碳和氮元素分别转化为CO₂和NO_x。随后,这些气体进入640 $^{\circ}$ C的还原炉,炉内填充的铜丝将NO_x还原成N₂。为避免CO₂对N₂测定的干扰,将连接燃烧管和质谱仪的毛细管置于液氮冷阱中,以捕集CO₂。此外,为防止CO₂在毛细管中过度积聚导致堵塞,每分析约10个样品后,需要将毛细管从冷阱中抬起,释放积聚的CO₂^[17]。

1.4 样品处理

1.4.1 氨基酸单体提取与纯化 采用酸水解法提取大豆、土壤和标准样品中的氨基酸。首先将样品研磨至粉末状,称取适量样品置于聚四氟乙烯(PTFE)储罐中,加入3 mL 6 mol/L盐酸,混合均匀。随后,对储罐进行氮气吹扫以保持惰性环境,防止氨基酸氧化。密封储罐并在110 $^{\circ}$ C下水解24 h,使样品中的蛋白质降解为氨基酸单体。水解完成后,将储罐冷却至室温,并将水解液转移至加热板上,在100 $^{\circ}$ C下蒸发至干。干燥残留物用0.1 mol/L盐酸重新溶解,并通过离心(10 min)去除不溶性杂质。最后,将含有氨基酸的上清液通过预处理过的强阳离子交换柱(CNWBOND SCX SPE Cartridge, 上海安谱),使用4 mol/L氨水进行洗脱,得到纯化的氨基酸组分^[17]。

1.4.2 氨基酸单体衍生化流程 氨基酸提取纯化后,需进行两步衍生化反应以制备适用于GC-MS和GC-C-IRMS分析的挥发性衍生物。

首先,将纯化的氨基酸溶于2 mL 1 mol/L氯化亚砷异丙醇溶液中,在100 $^{\circ}$ C下反应1 h,完成氨基酸的酯化反应。反应完成后,将产物置于60 $^{\circ}$ C氮气流下吹干,去除残留的溶剂和试剂。

随后,将干燥的酯化产物溶于200 μ L吡啶中,加入等体积的新戊酰氯,并在60 $^{\circ}$ C下反应30 min,进行酰胺化反应,最终生成N-新戊酰基-O-异丙酯衍生物。将反应产物溶于2 mL二氯甲烷,并用3 mL超纯水进行3次萃取,以去除水溶性杂质,每次萃取后均保留有机相。

为进一步纯化目标产物,向有机相中加入无水硫酸钠,振荡混匀后静置1 h,以去除残留的水分。然后,将混合物离心分离,收集上层有机相并在室温氮气流下吹干。

最后,将干燥的样品溶于正己烷中,并通过硅胶柱(硅胶200~400目,内径4 mm)进行纯化。使用乙酸乙酯作为洗脱剂,将过量的酰化试剂和其他杂质从硅胶柱上洗脱,收集含有目标产物的洗脱液,并在室温氮气流下吹干。将干燥的N-新戊酰基-O-异丙酯衍生物重新溶于正己烷中,待分析。

1.4.3 内标溶液与混合标准溶液的配制 以 γ -氨基丁酸作为内标,将其溶于0.1 mol/L盐酸中,配制成0.1 mmol/L的储存液。实际应用时,根据需要将内标储存液稀释至合适的浓度。

将各氨基酸标准品分别用0.1 mol/L盐酸溶解,配制成1 mmol/L的标准溶液,使用前按需稀释成系列不同浓度的氨基酸混合标准溶液。

1.4.4 氨基酸单体标准品及衍生试剂氮同位素标定 单个氨基酸标准品氮同位素 $\delta^{15}\text{N}$ 用EA-IRMS测定,称取适量的氨基酸标准品用锡箔杯包好,利用EA-IRM(ISOprime100)进行分析,每个样品平行测定3次,其氮稳定同位素值 $\delta^{15}\text{N}$ 见表2。

2 结果与讨论

2.1 氨基酸单体衍生物的色谱分离及质谱学性质

尽管NPP衍生化方法应用广泛,但也存在局限性。例如,精氨酸无法进行该衍生化反应,组氨酸的衍生物不稳定,而半胱氨酸和胱氨酸的反应则不完全^[11]。因此,本实验未对上述4种氨基酸进行分析。此外,本研究采用的酸水解条件(6 mol/L HCl, 110 °C, 24 h)会导致谷氨酰胺和天冬酰胺分别水解为谷氨酸(Glu)和天冬氨酸(Asp),因此实际测得的谷氨酸和天冬氨酸含量及其氮同位素组成包含了其酰胺形式。

为建立氨基酸衍生物的标准图谱,将单个标准氨基酸单体衍生物分别进行GC-MS分析,确定其保留时间并根据表1选择特征离子碎片进行定量分析。最终获得氨基酸衍生物的标准图谱如图1所示。分离效果良好的氨基酸包括甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)、脯氨酸(Pro)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、赖氨酸(Lys)、异亮氨酸(Ile)、天冬氨酸(Asp)、苏氨酸(Thr)、谷氨酸(Glu)、苯丙氨酸(Phe)、丝氨酸(Ser)、酪氨酸(Tyr)、蛋氨酸(Met)、色氨酸(Trp),方法能有效分离和分析多种重要的氨基酸^[17]。

将氨基酸单体标准溶液稀释至以下浓度:1.0、2.0、4.0、8.0、16.0 mmol/L,按照“1.3”的色谱条件进行测定,以氨基酸标准品浓度(x , mmol/L)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标进行线性回归。由表1可见,15种氨基酸在1.0~16.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系,相关系数(r^2)均大于0.98,表明方法可以满足单个样品中各氨基酸含量差距较大的测试需求^[17]。

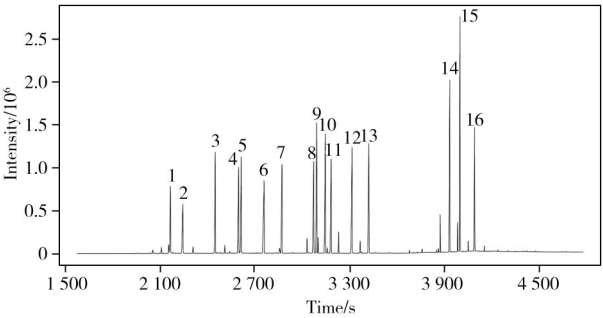


图1 Scan模式下氨基酸衍生物的GC-MS色谱图

Fig. 1 GC-MS chromatogram of amino acid derivatives under scan mode

1: Ala; 2: Gly; 3: Val; 4: Leu; 5: Ile; 6: GABA(internal standard); 7: Pro; 8: Asp; 9: Thr; 10: Ser; 11: Met; 12: Glu; 13: Phe; 14: Lys; 15: Tyr; 16: Trp

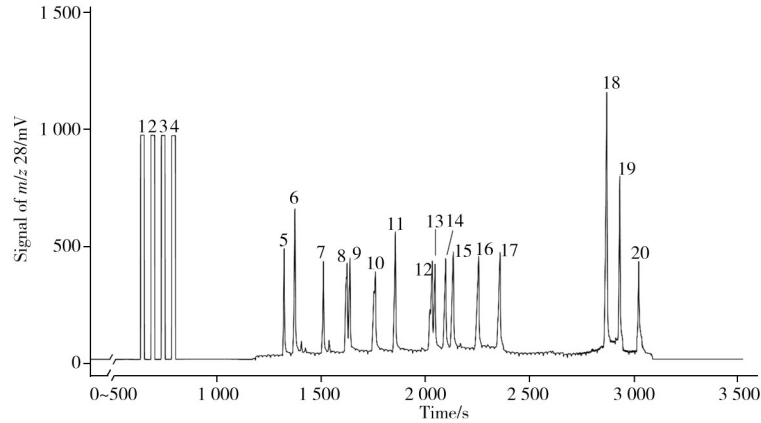
表1 氨基酸衍生物的质谱学性质及其线性关系

Table 1 MS properties and linear relations of amino acid derivatives

Amino acid	Time/s	Molecular weight	Main ion fragment	Regression equation	r^2
Ala	2 068. 8	215	128, 129, 156, 172	$y = 0. 068x - 3. 154$	0. 997
Gly	2 148. 6	201	102, 114, 142, 159	$y = 0. 091x - 3. 793$	0. 997
Val	2 365. 2	243	116, 156, 184, 201	$y = 0. 038x - 3. 546$	0. 999
Leu	2 515. 8	257	86, 170, 198, 201	$y = 0. 053x - 4. 606$	0. 995
Ile	2 534. 4	257	85, 141, 170, 198	$y = 0. 058x - 4. 610$	0. 999
Pro	2 802. 0	241	70, 114, 154, 182	$y = 0. 069x - 3. 010$	0. 995
Asp	3 010. 8	258	85, 88, 130, 214	$y = 0. 087x - 8. 570$	0. 988
Thr	3 032. 4	245	102, 159, 183, 201	$y = 0. 018x - 3. 159$	0. 99
Ser	3 088. 2	231	126, 144, 171, 228	$y = 0. 046x - 1. 641$	0. 994
Met	3 120. 6	275	141, 159, 201, 214	$y = 0. 018x - 1. 899$	0. 995
Glu	3 264. 6	272	126, 146, 186, 228	$y = 0. 079x - 1. 828$	0. 990
Phe	3 375. 0	291	148, 190, 204, 232	$y = 0. 055x - 1. 799$	0. 993
Lys	3 912. 6	356	168, 183, 269, 296	$y = 0. 010x - 1. 289$	0. 991
Tyr	3 982. 2	307	107, 206, 220, 290	$y = 0. 015x - 0. 971$	0. 987
Trp	4 081. 2	330	143, 187, 229, 243	$y = 0. 023x - 2. 673$	0. 993

2.2 氨基酸单体标样及其衍生物氮同位素值

为评估方法的精密度,对15种氨基酸单体标样的衍生物溶液进行重复测定($n=8$),色谱图见图2。结果显示,GC-C-IRMS方法测定 $\delta^{15}\text{N}$ 值具有良好的精密度,所有氨基酸的标准偏差均在0.22‰~0.76‰之间(表2),平均标准偏差为0.39‰。

图2 NPP氨基酸酯的GC-C-IRMS 色谱图($\delta^{15}\text{N}$)Fig. 2 Chromatogram of NPP amino acid ester by GC-C-IRMS($\delta^{15}\text{N}$)

1-4: standard N_2 ; 5: Ala; 6: Gly; 7: Val; 8: Leu; 9: Ile; 10: GABA(internal standard); 11: Pro; 12: Asp; 13: Thr; 14: Ser; 15: Met; 16: Glu; 17: Phe; 18: Lys; 19: Tyr; 20: Trp

表2 氨基酸标样及其衍生物的氮同位素值($\delta^{15}\text{N}$)Table 2 Nitrogen isotopic composition($\delta^{15}\text{N}$) of standard amino acids and their derivatives

Amino acid	EA-IRMS		GC-C-IRMS		
	Mean/‰	σ /‰	Mean/‰	σ /‰	$\Delta^*/\text{‰}$
Ala	6.05	0.48	5.78	0.22	0.27
Gly	-0.77	0.03	0.37	0.35	1.14
Val	-6.85	0.03	-6.70	0.36	0.15
Leu	7.13	0.17	6.03	0.62	1.10
Ile	-0.93	0.03	-1.56	0.44	0.63
Pro	-4.88	0.06	-4.69	0.31	0.19
Asp	-6.57	0.02	-6.33	0.24	0.24
Thr	5.60	0.08	5.21	0.76	0.39
Ser	1.16	0.04	0.37	0.55	0.79
Met	-0.29	0.02	-0.50	0.23	0.21
Glu	-7.86	0.12	-7.41	0.55	0.45
Phe	2.97	0.02	2.71	0.28	0.26
Lys	-0.32	0.04	-0.03	0.37	0.29
Tyr	4.28	0.04	4.01	0.37	0.27
Trp	4.38	0.09	3.51	0.22	0.87

*: $\Delta = |\delta^{15}\text{N}_{\text{EA}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{GC}}|$

NPP 衍生化方法未引入额外的氮原子, 因此理论上不会出现氮同位素分馏情况, 即原氨基酸的 EA-IRMS 测定值与衍生化后 NPP 酯的 GC-C-IRMS 测定值应一致。作为对比, 使用 EA-IRMS 对原氨基酸进行单独分析, 每种氨基酸重复测定 3 次(表 2)。

结果显示, GC-C-IRMS 对混合体系内氨基酸单体衍生物 $\delta^{15}\text{N}$ 的测定数据与 EA-IRMS 单独测定原氨基酸的数据基本相同, 其差值范围为 0.15‰~1.14‰, 平均差值为 0.48‰, 而两种方法对甘氨酸和亮氨酸的测定值略有差异, 可能是色谱分离效果所致。将两种测试方法对丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、脯氨酸、丝氨酸、甲硫氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、酪氨酸和色氨酸 $\delta^{15}\text{N}$ 的测定结果做线性方程(见图 3), 相关系数(r^2)为 0.995 4, 具有较高的一致性, 说明前处理过程未引起显著的氮同位素分馏, 验证了 GC-C-IRMS 进行单体氨基酸氮同位素分析的可靠性。

2.3 氨基酸单体进样量对氮同位素值的影响

衍生化的氨基酸经色谱柱分离后, 氧化管将氨基酸中的氮元素氧化为氮氧化物(NO_x), 随后经还原管还原为 N_2 , 进入质谱离子源离子化并测试其氮同位素组成。氨基酸单体的含氮量较低, 且离子源对氮气的离子化效率较 CO_2 差^[18], 因此氨基酸氮同位素测定的进样量需高于碳同位素。氨基酸进样量对色谱柱分离效果和氧化还原管的氧化还原效率影响较大, 大进样量更容易导致氧化还原管失去活性, 出现氨基酸单体的保留时间漂移以及同位素分馏等现象。在保证氮同位素测定值稳定的情况下, 为提高分离效率和延长氧化还原管的寿命, 需尽可能降低进样量, 进行测定时需要插入氨基酸标准品检验

氧化管和还原管的性能。还原管的还原效率下降会产生大量的 NO ($[\text{NO}^+]$ m/z 30, 可通过色谱图中此离子流强度判断), 导致氮元素无法完全转化为 N_2 。同时需用液氮冷阱去除氧化产生的 CO_2 , 防止 CO_2 在离子源中产生的 $[\text{CO}]^+$ 离子碎片对具有相同质荷比的 $[\text{N}_2]^+$ 离子造成干扰, 影响氮同位素测试精度。另外, 还需定期释放捕集在毛细管中的 CO_2 , 以防止其管路堵塞。

为确定氨基酸单体氮同位素分析时最合适的进样量, 将氨基酸衍生物标准品以不同浓度梯度进样测试, 从图 4 可以看出, 当 m/z 28 信号在 150 mV 以上时, 7 种氨基酸单体的测定值为: Ala (5.65 ± 0.22)‰、Gly (0.97 ± 0.36)‰、Val (-6.64 ± 0.73)‰、内标 GABA (-1.01 ± 0.32)‰、Pro (-4.72 ± 0.29)‰、Glu (-7.42 ± 0.29)‰、Phe (2.88 ± 0.28)‰ (以出峰时间为序), 其中测试误差最大值为 Val (± 0.73 ‰), 最小值为 Ala (± 0.22 ‰), 平均误差为 ± 0.36 ‰。可见 GC-C-IRMS 系统在 $[\text{N}_2^+]$ m/z 28 信号大于 150 mV 以上时, 进样量不少于 20 ng N 就能够实现对混合体系中氨基酸单体 $\delta^{15}\text{N}$ 值的准确测定。

2.4 大豆和土壤样品中氨基酸单体的 $\delta^{15}\text{N}$ 值

将大豆和土壤两种样品按照“1.4.1”和“1.4.2”进行氨基酸的提取、纯化和衍生化, 氨基酸 NPP 衍生物通过 GC-MS 进行定量分析, 得到各氨基酸的含量如表 3 所示。同时利用 GC-C-IRMS 对氨基酸单体衍生物的氮同位素组成进行了测试(表 3), 色谱图见图 5。结果显示, 大豆中各氨基酸单体的 $\delta^{15}\text{N}$ 值在 10.90‰~22.32‰之间, 标准偏差为 0.23‰~0.88‰, 平均偏差为 0.52‰; 沉积物中各氨基酸单体的 $\delta^{15}\text{N}$ 值在 -1.92‰~12.82‰之间, 标准偏差为 0.08‰~0.79‰, 平均偏差为 0.38‰。两种样品中氨基酸单体氮同位素值的测试结果均在正常范围内^[19-23], 低于绝大多数同类型研究的偏差范围(表 4), 满足其测试准确度的要求。

表 3 大豆及土壤样品的氨基酸含量和氮稳定同位素值($\delta^{15}\text{N}$)

Table 3 Amino acid contents and nitrogen stable isotope values ($\delta^{15}\text{N}$) of soybean and soil samples

Amino acid	Soybean			Soil		
	Content/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	$\delta^{15}\text{N}/\text{‰}$	$\sigma/\text{‰}$	Content/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	$\delta^{15}\text{N}/\text{‰}$	$\sigma/\text{‰}$
Ala	29.5	18.41	0.82	37.41	2.86	0.23
Gly	17.6	17.18	0.27	37.86	7.85	0.55
Val	54.1	20.60	0.88	50.65	9.74	0.63
Leu	96.5	16.57	0.48	89.41	8.29	0.79
Ile	34.5	17.13	0.87	33.27	2.78	0.56
Pro	31.5	22.20	0.23	56.70	10.73	0.35
Asp	21.9	15.96	0.70	24.61	5.50	0.43
Thr	7.9	12.98	0.50	16.08	-1.92	0.30
Ser	1.0	11.83	0.54	31.18	6.16	0.24
Met	33.1	10.90	0.36	22.88	12.77	0.32
Glu	40.1	17.23	0.69	36.09	5.24	0.08
Phe	86.0	22.32	0.41	63.34	11.21	0.29
Lys	194.0	17.04	0.29	69.39	12.82	0.21
Tyr	2.3	14.15	0.41	33.23	7.58	0.41
Trp	29.5	17.26	0.28	37.41	8.78	0.34

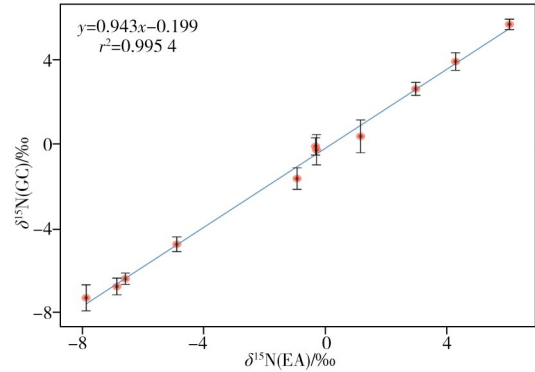


图 3 GC-C-IRMS 与 EA-IRMS 测定值的线性关系
Fig. 3 Regression relation between GC-C-IRMS and EA-IRMS measured values

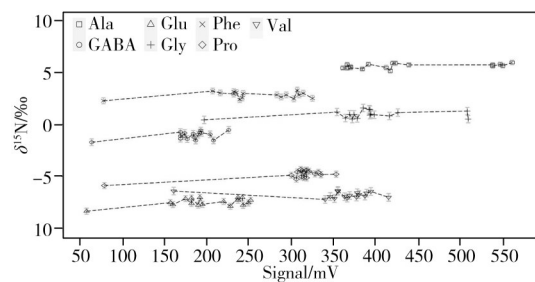


图 4 GC-C-IRMS 测定氨基酸氮同位素 m/z 28(mV) 与 $\delta^{15}\text{N}$ 值的相关性
Fig. 4 Correlation between amino acid nitrogen isotope signal (m/z 28) measured by GC-C-IRMS and $\delta^{15}\text{N}$ values

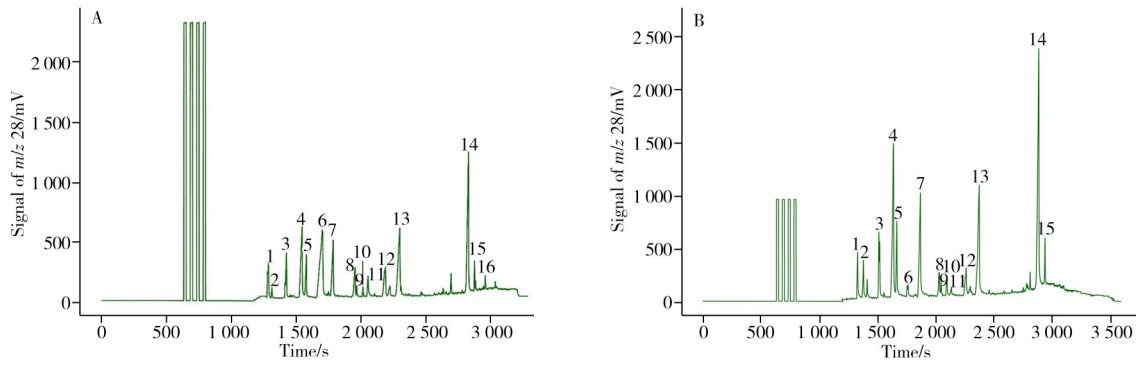


图5 土壤(A)与大豆(B)样品的GC-C-IRMS 色谱图($\delta^{15}\text{N}$)

Fig. 5 Chromatograms of soil (A) and soybean (B) samples by GC-C-IRMS($\delta^{15}\text{N}$)

1. Ala; 2. Gly; 3. Val; 4. Leu; 5. Ile; 6. GABA(internal standard); 7. Pro; 8. Asp; 9. Thr; 10. Ser; 11. Met; 12. Glu; 13. Phe; 14. Lys; 15. Tyr; 16. Trp

表4 环境中氨基酸氮同位素的研究汇总

Table 4 Summary of research on amino acid nitrogen isotopes in the environment

Sample	Amino acid	Application	$\delta^{15}\text{N}/\text{‰}$	$\sigma/\text{‰}$
浮游生物	14 种	浮游生物的营养级关系 ^[24]	-11.0~12.3	0.2~1.4
海洋生物(虾、蟹等)	15 种	能量流动和物质循环 ^[6]	-7.6~28.7	0.1~0.5
小麦	14 种	物种鉴别 ^[25]	-4.4~5.6	0.1~0.6
自养种群、浮游动物	Glu、Phe	以食物链长度评估生态结构 ^[26]	-1.4~6.9	0.4~1.7
浮游生物、颗粒/溶解有机物	12 种	氮源、氮的转化和食物网结构 ^[27]	-0.9~17.2	0.2~1.7
9 种水生生物	15 种	水生生物体营养级 ^[28]	-5.7~3.1	0.2~1.0
鱼类肝脏、肌肉和饲料	11 种	追踪能量流动 ^[29]	-1.9~32.3	0.3~2.5
贝壳	16 种	食物网中氮的来源和去向 ^[30]	-4.0~21.7	0.3~1.0

从分析结果可以看出,不同样品及不同氨基酸单体的氮同位素值存在明显差异。这些差异可以进一步用于各种研究方向,例如生态系统中氮循环和食物网研究、生物代谢和营养生态学研究、全球气候变化和古饮食重建研究等。

3 结 论

本文对标样、大豆和土壤样品的氨基酸进行提取、纯化、衍生并分析其含量和氮同位素组成,15 种氨基酸单体的色谱分离效果良好,衍生过程未发生明显的氮同位素分馏现象;在氨基酸单体较低进样量的条件下,氮同位素测试精度良好,结果可靠。该方法可以准确、高效地测试环境中各类样品的氨基酸单体氮同位素组成,可为氨基酸单体氮同位素在生物地球化学、生态学和地质学等领域的应用提供技术支持。

参考文献:

- [1] Tea I, Tcherkez G. *Method Enzymol.*, **2017**, 596: 113-147.
- [2] Altieri K E, Fawcett S E, Peters A J, Sigman D M, Hastings M G. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2016**, 113(4): 925-930.
- [3] McCarthy M D, Lehman J, Kudela R. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **2013**, 103: 104-120.
- [4] Batista F C, Ravelo A C, Crusius J, Casso M A, McCarthy M D. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **2014**, 142: 553-569.
- [5] Itahashi Y, Ananyevskaya E, Yoneda M, Miller A R V, Nishiaki Y, Matuzeviciute G M. *J. Archaeol. Sci. -Rep.*, **2020**, 33: 102565.
- [6] Yun H Y, Larsen T, Choi B, Won E J, Shin K H. *Ecol. Evol.*, **2022**, 12(6): e8929.
- [7] Liu H Y, Nie J, Liu Y, Wadood S A, Rogers K M, Yuan Y W, Gan R Y. *Food Chem.*, **2023**, 415: 135791.
- [8] Silverman S N, Phillips A A, Weiss G M, Wilkes E B, Eiler J M, Sessions A L. *Org. Geochem.*, **2022**, 164: 104345.
- [9] Du Y Y, Meng X J, Yang B, Song L, Zhu G X, Zhou X, Zhang Y P, Pan J, Jiang L L. *J. Chin. Mass Spectrom. Soc.* (杜屹原, 孟宪菁, 杨斌, 宋亮, 朱光旭, 周晓, 张媛萍, 潘洁, 江琳琳. 质谱学报), **2022**, 43(4): 512-521.
- [10] Corr L T, Berstan R, Evershed R P. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2007**, 21: 3759-3771.
- [11] Xu C Y, Mei X R, Li Y Z, Zhong X L. *Chin. Agric. Sci. Bull.* (徐春英, 梅旭荣, 李玉中, 钟秀丽. 中国农学通报), **2008**, (4): 151-156.

- [12] Styring A K, Kuhl A, Knowles T D J, Fraser R A, Bogaard A, Evershed R P. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2012**, 26(19): 2328–2334.
- [13] Shinebarger S R, Haisch M, Matthews D E. *Anal. Chem.*, **2002**, 74(24): 6244–6251.
- [14] Ohkouchi N, Chikaraishi Y, Close H G, Fry B, Larsen T, Madigan D J, McCarthy M D, McMahon K W, Nagata T, Naito Y I, Ogawa N O, Popp B N, Steffan S, Takano Y, Tayasu I, Wyatt A S J, Yamaguchi Y T, Yokoyama Y. *Org. Geochem.*, **2017**, 113: 150–174.
- [15] Metges C C, Daenzer M. *Anal. Biochem.*, **2000**, 278, (2): 156–164.
- [16] Chikaraishi Y, Kashiyama Y, Ogawa N O, Kitazato H, Satoh M, Nomoto S, Ohkouchi N. *Org. Geochem.*, **2008**, 39 (5): 510–520.
- [17] Liang J X, Yin X J, Su J, Lin X H, Li Y H. *J. Instrum. Anal.* (梁建鑫, 尹希杰, 苏静, 林锡煌, 李玉红. 分析测试学报), **2024**, 43(3): 447–454.
- [18] Meng X J, Yang B, Li A, Jia X Y, Zhu X, Ma X, Yin S. *J. Chin. Mass Spectrom. Soc.* (孟宪菁, 杨斌, 李安, 贾晓艺, 朱湘, 马潇, 尹松. 质谱学报), **2018**, 39(6): 746–753.
- [19] Minagawa M, Egawa S, Kabaya Y, Tsuru K K. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **1992**, 40(1): 47–56.
- [20] Styring A K, Fraser R A, Bogaard A, Evershed R P. *Phytochemistry*, **2014**, 97: 20–29.
- [21] Styring A K, Fraser R A, Bogaard A, Evershed R P. *Phytochemistry*, **2014**, 102: 40–45.
- [22] Wei J E, Chen Y, Wang J, Yan S B, Zhang H H, Yang G P. *Mar. Chem.*, **2021**, 230: 103931.
- [23] Bol R, Ostle N J, Chenu C C, Petzke K J, Werner R A, Balesdent J. *Isot. Environ. Healt. Stud.*, **2004**, 40(4): 243–256.
- [24] McClelland J W, Montoya J P. *Ecology*, **2002**, 83(8): 2173–2180.
- [25] Xu C Y, Li Y Z, Mei X R, Zhong X L. *Chin. Agric. Sci. Bull.* (徐春英, 李玉中, 梅旭荣, 钟秀丽. 中国农学通报), **2009**, 42(2): 446–453.
- [26] Chang N N, Lin L H, Tu T H, Jeng M S, Chikaraishi Y, Wang P L. *PLoS One*, **2018**, 13(10): e0204753.
- [27] Yamaguchi Y T, McCarthy M D. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **2018**, 220: 329–347.
- [28] Nuche-Pascual M T, Lazo J P, Ruiz-Cooley R I, Herzka S Z. *Ecol. Evol.*, **2018**, 8(18): 9192–9217.
- [29] Yarnes C T, Herszage J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2017**, 31(8): 693–704.
- [30] Huang Q, Wu H, Schöne B R. *Chem. Geol.*, **2023**, 615: 121220.

(责任编辑: 丁 岩)