

进样量和信号强度对气相色谱-燃烧-同位素 比值质谱测定 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 的影响

杜屹原^{1,2}, 孟宪菁³, 杨 斌^{1,4}, 宋 亮^{1,4},
朱光旭⁵, 周 晓⁶, 张媛萍⁶, 潘 洁⁷, 江琳琳⁷

(1. 中国科学院西双版纳热带植物园热带森林生态学重点实验室, 云南 勐仑 666303;
2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 赛默飞世尔科技(中国)有限公司, 上海 201206;
4. 中国科学院核心植物园, 云南 勐仑 666303; 5. 贵阳学院生物与环境工程学院, 贵州 贵阳 550005;
6. 普洱学院, 云南 普洱 665000; 7. 沈阳农业大学, 辽宁 沈阳 110866)

摘要:采用气相色谱-燃烧-同位素比值质谱(GC-C-IRMS)法对咖啡因化合物和混合体系中特定氨基酸的 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 进行测定,在保证高测定精度和准确度的前提下,探讨 GC-C-IRMS 对进样量和信号强度变化的响应特征。分析结果表明,当 C 质量 $\geq 1\text{ ng}$ 或 $m/z\ 44$ 信号 $\geq 100\text{ mV}$ 时,以及 N 质量 $\geq 5\text{ ng}$ 或 $m/z\ 28$ 信号 $\geq 100\text{ mV}$ 时,咖啡因 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 测定结果的精度($<0.3\%$)和准确度($<0.2\%$)均能够满足实验室测试要求。针对混合体系中氨基酸 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 的测定,GC-C-IRMS 可以在极少的进样量下实现对特定氨基酸色谱峰的有效分离。12 种氨基酸 $\delta^{13}\text{C}$ 测定结果未表现出对 $m/z\ 44$ 信号强度的依赖性(斜率接近 0),其 $\delta^{13}\text{C}$ 平均测定精度为 0.56% ;而 $\delta^{15}\text{N}$ 测定结果表现出良好的时间稳定性(4 天),与元素分析-稳定同位素比值质谱(EA-IRMS)单独测定结果的平均偏差为 0.77% 。

关键词:同位素比值质谱(IRMS);咖啡因;氨基酸;进样量;信号强度

中图分类号:O657.63 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-2997(2022)04-0512-10

doi:10.7538/zpxb.2021.0168

Effect of Sample Size and Signal Intensity on $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ Measurements by GC-C-IRMS

DU Yi-yuan^{1,2}, MENG Xian-jing³, YANG Bin^{1,4}, SONG Liang^{1,4}, ZHU Guang-xu⁵,
ZHOU Xiao⁶, ZHANG Ai-ping⁶, PAN Jie⁷, JIANG Lin-lin⁷

(1. CAS Key Laboratory of Tropical Forest Ecology, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden,
Chinese Academy of Sciences, Menglun 666303, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. Thermo Fisher Scientific, Shanghai 201206, China;

4. Core Botanical Gardens, Chinese Academy of Sciences, Menglun 666303, China;

5. College of Biotechnology and Environmental Engineering, Guiyang University, Guiyang 550005, China;

6. Puer University, Puer 665000, China; 7. Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: The $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of specific compounds can be determined successfully by

国家自然科学基金(32171557,32171529,41803018);中国科学院“青年创新促进会”(2021397)项目

本文通信作者孟宪菁,杨斌

gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometer (GC-C-IRMS). Precision and accuracy of the measurement processes are two key indicators for evaluating the performance of GC-C-IRMS, which are also of great significance for defining the detection ability of GC-C-IRMS. However, the uncertainty of the detection capability of GC-C-IRMS limits the application of isotopic tracing technology for specific compounds. Therefore, there is an urgent need to comprehensively evaluate the effects of sample size and signal intensity on the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ measurements by GC-C-IRMS. In this study, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of caffeine compounds and specific amino acids were analyzed under the premise of ensuring high determination precision and accuracy based on GC-C-IRMS. The results showed that GC-C-IRMS had good accuracy in determination of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ under the condition of extremely small sample size and extremely low signal intensity. Specifically, the carbon and nitrogen isotope compositions of caffeine could be determined successful when m/z 44 and m/z 28 signals were higher than 100 mV. The recommended sample size of GC-C-IRMS should be more than 1 ng C and 5 ng N for caffeine $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ measurements, respectively. The measurement precision and accuracy were better than 0.3‰ and 0.2‰ for both caffeine $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, which could meet the practical demands in the laboratory. Meanwhile, GC-C-IRMS could ensure sufficient m/z 44 and m/z 28 signals for amino acids, and avoid peak-to-peak interference during the determination of amino acids $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in the mixed systems. For the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ measurements of amino acids in a complex compound, the chromatographic peaks acquired by GC-C-IRMS were well separated and presented under minimal injection amounts. The $\delta^{13}\text{C}$ measured values of 12 specific amino acids ranged from -29.56‰ to -6.89‰ with a mean measurement accuracy of 0.56‰. For the $\delta^{15}\text{N}$ of specific amino acids, the measurement results of GC-C-IRMS were further compared with those of elemental analyzer-isotope ratio mass spectrometry (EA-IRMS) to explore the performance of GC-C-IRMS in determination of compounds $\delta^{15}\text{N}$ in the complex system. The measurement results of GC-C-IRMS had good compatibility with EA-IRMS of an average deviation around $(0.77 \pm 0.34)\%$. In addition, there was no significant time drift (4 days) for the amino acid $\delta^{15}\text{N}$ measurement in both systems. Taking into account the advantages of GC-C-IRMS, such as high sensitivity, wide detection range, and extremely low sample consumption, it will play an important role in the application of compound-specific isotope technology in the fields of geochemistry and life sciences.

Key words: isotope ratio mass spectrometry (IRMS); caffeine; amino acid; sample size; signal intensity

具备连续流进样技术的同位素比值质谱(isotope ratio mass spectrometry, IRMS)具有自动化程度高、分析速度快和稳定性好等特点,已被广泛应用于地球化学^[1-2]、环境科学^[3-4]和食品科学^[5-6]等领域。以往研究大多数基于元素分析(elemental analyzer)-同位素比值质谱(EA-IRMS)联机系统的快速燃烧原理,可对样品总体碳($\delta^{13}\text{C}$)、氮($\delta^{15}\text{N}$)同位素进行

测定,极大地拓展了同位素技术的指示、示踪和整合功能^[7-8]。但是,由于研究对象在物种、时间和空间上的变化,导致了其体系内部不同化合物代谢过程的差异性与复杂性,仅依赖总体同位素分析往往缺乏代表性和可信性,甚至可能造成分析过程的误判。体系内特定化合物通常具有较固定或明确的生物化学过程,针对特定化合物的同位素

分析具有更好的指向性。尽管如此,目前的EA-IRMS无法检测复杂体系中特定化合物的同位素组成。

气相色谱-燃烧-同位素比值质谱仪(GC-C-IRMS)联机系统可对复杂体系中的不同化合物进行色谱分离,依次燃烧转化为气态的 CO_2 或 N_2 ,实现特定化合物 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 的测定^[5,9-10],具有灵敏度高、检测范围宽和重现性好等优点^[9,11-14]。精度和准确度是评价GC-C-IRMS性能的关键指标,对于评价GC-C-IRMS对特定化合物的检测能力具有重要意义^[7,15-17]。考虑到节省成本或待测样品稀缺,目标化合物浓度(或C、N元素含量)较低时,会导致分析测试时进样量也较低。此外,某些化学结构相似的化合物在色谱柱上的保留时间接近,即使优化色谱条件也可能无法使相邻色谱峰间实现完全的基线分离,峰-峰交互干扰会影响测定结果的准确性。为实现完全的基线分离,样品进样量或由其转化的 CO_2 或 N_2 信号强度应尽量低。

GC-C-IRMS对微量化合物检测的不确定性限制了特定化合物同位素分析技术的应用。咖啡因($\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$)是一种黄嘌呤生物碱有机化合物,因其化学成分和结构简单,在GC-C-IRMS中可以完全地气化、洗脱和燃烧转化,可作为大多数特定化合物C、N同位素质谱测定的公认标准^[18]。氨基酸($\text{RCHNH}_2\text{COOH}$)是构成蛋白质的基本单元,也是联系生物界和非生物界的重要枢纽物质,利用特定氨基酸C、N同位素技术可以精准识别生态系统中不同生物的营养级位置^[19-20]。生物体内氨基酸种类繁多、浓度差异大,过高进样量会导致出峰时间接近的氨基酸化合物无法实现峰-峰完全分离,过低进样量会降低信噪比而影响 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 测量的精度。

基于此,迫切需要综合评价进样量和信号强度对GC-C-IRMS测定 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 的影响。本工作拟以咖啡因化合物为研究对象,在保证 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 测定精度的前提下,探讨GC-C-IRMS对进样量和信号强度变化的响应特征,并结合多种氨基酸衍生物测定,揭示GC-C-IRMS测定复杂体系内特定化合物 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 的性能表现。

1 实验部分

1.1 仪器与装置

GC-C-IRMS联机系统:美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品,主要由 TriPlus RSH 自动进样器、Trace 1310 GC 气相色谱仪、GC IsoLink II 燃烧转化单元、ConFlo IV 连续流通用接口和 DELTA V Advantage 同位素比值质谱仪 5 部分组成。特定化合物通过 TriPlus RSH 自动进样器自动注入 Trace 1310 GC,色谱分离后进入 GC IsoLink II 燃烧转化单元,经过填充 Ni 和 Cu 的微型氧化管燃烧转化为 CO_2 或 N_2 气体后进入 ConFlo IV 连续流通用接口,再经开口分流器引入 DELTA V Advantage 同位素比值质谱仪。DELTA V Advantage 可将 CO_2 气体电离为 $[\text{C}^{16}\text{O}_2]^+$ 、 $[\text{C}^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2]^+$ 和 $[\text{C}^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}]^+$,或将 N_2 气体电离为 $[\text{N}_2]^+$ 、 $[\text{N}^{15}\text{N}]^+$ 和 $[\text{N}_2]^+$,经由通用三杯接收器采集和不同电阻值的放大器转化为电压信号后实现 $\delta^{13}\text{C}$ 或 $\delta^{15}\text{N}$ 的测定。

1.2 材料与试剂

将 IAEA-600 咖啡因标准物质(国际原子能机构产品)溶解于丙酮溶剂待测;丙氨酸(Ala)、甘氨酸(Gly)、 α -氨基丁酸(α -ABA)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)、天冬氨酸(Asp)、苏氨酸(Thr)、丝氨酸(Ser)、蛋氨酸(Met)、谷氨酸(Glu)和苯丙氨酸(Phe)共 12 种氨基酸及其混合物:纯度 $\geq 99.9\%$,均为美国 Sigma-Aldrich 公司产品。氨基酸衍生化过程:首先将上述氨基酸混合物充分干燥后溶解于 1 mL 亚硫酸氯-异丙醇溶液(1:4,V/V)中,于 110 °C 酯化 2 h;经氮气吹干后,再加入 1 mL 新戊酰氯-二氯甲烷溶液(1:4,V/V),于 110 °C 酰化 2 h;氮吹仪去除多余的衍生化试剂,最后将生成的 O-异丙醇酯(NPP)衍生物溶解于 0.5 mL 二氯甲烷溶剂中待测^[17,20]。使用 USGS-40 和 USGS-41 标准物质(美国地质调查局产品)对 CO_2 (纯度 99.995%)和 N_2 (纯度 99.999%)工作标气(液化空气上海有限公司产品)进行标定。标准物质信息列于表 1。

1.3 实验条件

1.3.1 色谱条件 咖啡因和氨基酸混合物均采用 TG-5MS 毛细管色谱柱(30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm)进行分离,以高纯氮气(99.999%)为载气。

表 1 标准物质的同位素信息
Table 1 Isotopic information of the standards

名称 Name	成分 Component	化学式 Formula	标准值 Standard value/‰	
			$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$	$\delta^{15}\text{N}_{\text{Air-N}_2}$
IAEA-600	咖啡因	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$	-27.77 ± 0.04	1.00 ± 0.13
USGS-40	左旋谷氨酸	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$	-26.39 ± 0.04	-4.52 ± 0.06
USGS-41	左旋谷氨酸	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$	37.63 ± 0.05	47.60 ± 0.11

咖啡因分析的色谱参数:载气流速 1.2 mL/min;进样口温度 260 ℃;程序升温:起始温度 50 ℃,保持 1 min,以 10 ℃/min 升温至 260 ℃,保持 3 min,总时长 25 min。

氨基酸分析的色谱参数:载气流速 2 mL/min;进样口温度 250 ℃;程序升温:起始温度 60 ℃,保持 2.5 min,以 15 ℃/min 升温至 110 ℃后,立即以 3 ℃/min 升温至 150 ℃,再立即以 6 ℃/min 升温至 230 ℃,保持 6 min,最后以 25 ℃/min 升温至 300 ℃,保持 1 min,总时长 42.3 min。为保证不同氨基酸的色谱分离效果,每隔 24 h 进行 200~300 ℃ 梯度升温烘烤约 2 h 以活化色谱柱。

1.3.2 燃烧转化单元 燃烧转化温度为 1 000 ℃。为确保待测化合物充分燃烧转化,分析咖啡因时,每隔 7~10 天注入 O_2 约 1 h 以活化氧化管;分析氨基酸混合物时,每隔 24 h 注入 O_2 约 1 h 以活化氧化管。测定 $\delta^{15}\text{N}$ 时,须使用液态氮冷冻去除样品燃烧产生的 CO_2 气体,防止 $[\text{CO}]^+$ 碎片离子对相同质荷比的 $[\text{N}_2]^+$ 分子离子造成干扰。

1.3.3 质谱条件 电子轰击离子源(EI);加速电压 2.98 kV;发射电流 1.50 mA;电子能量 123.95 eV;引出电压大于 80%;质谱真空度 1.6×10^{-4} Pa;识别起、止色谱峰的斜率 0.2、0.4 mV/s;最小检出信号 20 mV;咖啡因 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 分析的本底值扣除方法采用 Calc Mean BGD,即取出峰前 5 s 内所有本底值(BGD)信号数据点的平均值;氨基酸 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 分析的本底值扣除方法采用 Individual BGD,即取出峰前 5 s 内最小的连续 5 个 BGD 信号数据点的移动平均值。

1.4 实验方法

1.4.1 咖啡因测定 称取 IAEA-600 咖啡因标准物质,配制成 14 种浓度(0.5~150 mg/L)

的咖啡因-丙酮溶液,用于测定 $\delta^{13}\text{C}$ 。采用不分流进样模式,进样体积 1 μL 。咖啡因($\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$) C 含量为 49.44%,可以实现不同 C 质量(0.25~74.16 ng)的柱上进样量。用同样方法配制 14 种浓度(5~350 mg/L)的咖啡因-丙酮溶液用于 $\delta^{15}\text{N}$ 测定,咖啡因 N 含量为 28.86%,可以实现不同 N 质量(1.44~101.01 ng)的柱上进样量。咖啡因标准物质浓度梯度信息列于表 2。

表 2 咖啡因标准物质浓度梯度信息
Table 2 Concentration gradient of the caffeine standards

编号 No.	浓度 Concentration/(mg/L)		进样量 Sample size/ng	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
1	0.5	5	0.25	1.44
2	1	10	0.49	2.89
3	2	15	0.99	4.33
4	3	20	1.48	5.77
5	4	40	1.98	11.54
6	6	80	2.97	23.09
7	8	120	3.96	34.63
8	10	140	4.94	40.40
9	15	180	7.42	51.95
10	25	200*	12.36	57.72
11	40	220	19.78	63.49
12	80	250	39.55	72.15
13	100	300	49.44	86.58
14	150*	350	74.16	101.01

注: * 表示样品重复测定 6 次,其余样品均重复测定 3 次

1.4.2 氨基酸测定 为检验信号强度对混合体系内特定化合物 $\delta^{13}\text{C}$ 测定的影响,以 12 种氨基酸混合物为研究对象,采用 5 种模式进样,即进样体积 1 μL ,不分流;进样体积 0.2 μL ,不分流;进样体积 0.1 μL ,不分流;进样体积 0.5 μL ,分流比 10:1;进样体积 0.1 μL ,分流

比 10 : 1。前 3 种模式测试 1 次,后 2 种模式测试 2 次。

由于氨基酸 N 含量较低,且 IRMS 对 N_2 的离子化效率较低^[21],若进样体积小于 1 μL 或采用分流模式,将导致 N_2 信号强度过低而无法检出。因此,本研究仅采用进样体积为 1 μL 且不分流模式,每隔 12 h 测试 1 次上述氨基酸 $\delta^{15}\text{N}$,共测试 8 次,以评价 GC-C-IRMS 对混合体系内特定氨基酸 $\delta^{15}\text{N}$ 测定的时间稳定性。每种氨基酸的分子结构由气相色谱-同位素比值质谱(GC-IRMS)^[22]分析得到。

EA-IRMS 是目前精准测定样品总体同位素最重要的系统之一,其测定结果常被作为公认结果。EA-IRMS 对 $\delta^{15}\text{N}$ 的测定基于快速燃烧原理,将样品在 1 000 $^{\circ}\text{C}$ 高温和过氧环境下瞬间燃烧,经 Cu 还原形成 N_2 等气体,并通过除卤除硫剂及 H_2O 和 CO_2 吸附剂,纯化后的 N_2 进入 IRMS 测定。作为对比,基于 EA-IRMS^[15] 对 12 种氨基酸 $\delta^{15}\text{N}$ 进行单独测定,主要参数设定参考文献^[15,21],每种氨基酸重复测定 6 次,交叉验证 GC-C-IRMS 与 EA-IRMS 对混合体系内特定氨基酸 $\delta^{15}\text{N}$ 测定结果的一致性。

1.5 数据处理

采用 GC-C-IRMS 和 EA-IRMS 测量 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 时,需要使用 CO_2 和 N_2 工作标气进行标定,溯源至国际标准,计算公式如下:

$$\delta_{\text{Spl-ST}}(\text{‰}) = \delta_{\text{Spl-WG}} + \delta_{\text{WG-ST}} + \delta_{\text{Spl-WG}} \times \delta_{\text{WG-ST}} \times 10^{-3}$$

式中,Spl 表示咖啡因或氨基酸;WG 表示工作标气;ST 表示国际标准,如 VPDB 或 Air- N_2 。工作标气 $\delta_{\text{WG-ST}}$ 采用两点线性内插法进行校准;使用 USGS-40 和 USGS-41 同位素标准物质,通过 EA-IRMS 测量后建立标准值与测量值的线性方程,将工作标气初始值代入该方程后得到校准后的 $\delta_{\text{WG-ST}}$,其 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 校准值分别为 $(-30.36 \pm 0.03)\text{‰}$ 和 $(-1.27 \pm 0.05)\text{‰}$ ($n=5$)。以上数据处理通过同位素比值质谱仪专用软件 Isodat 3.0(美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品)完成。

2 结果与讨论

2.1 GC-C-IRMS 测定咖啡因 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$

GC-C-IRMS 测定 IAEA-600 咖啡因标准

物质 $\delta^{13}\text{C}$ 的进样量和信号强度响应特征示于图 1。随着进样 C 质量从 0.25 ng 增加到 74.16 ng 时, CO_2 的信号强度由 23 mV 逐渐增大到 7 706 mV。较低且稳定的 CO_2 本底值是保证小样品量样品 $\delta^{13}\text{C}$ 测定精度和准确度的重要前提^[7]。本研究中,咖啡因 $\delta^{13}\text{C}$ 产生的 CO_2 本底值(BGD 44)平均为 (3.8 ± 0.4) mV。测定结果表明,当 C 质量 < 1 ng 或 m/z 44 信号 < 100 mV 时,能够实现对样品的检测,但是过低的信噪比会导致咖啡因 $\delta^{13}\text{C}$ 测定值精度较差;当 C 质量 ≥ 1 ng 或 m/z 44 信号 ≥ 100 mV 时,咖啡因 $\delta^{13}\text{C}$ 的测定精度和准确度可达到实验室分析要求^[5,12-13],其平均精度为 0.16‰,平均分析误差为 0.09‰。值得注意的是,即使 C 质量高达 70 ng 或 m/z 44 信号高达 7 800 mV 以上,该系统仍能保证 $\delta^{13}\text{C}$ 的测定精准度,表明在进样量较大时,GC-C-IRMS 仍可将目标化合物完全燃烧转化。

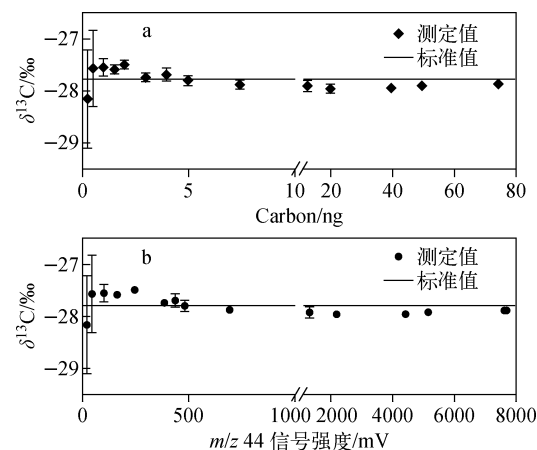


图 1 GC-C-IRMS 测定咖啡因 $\delta^{13}\text{C}$ 的进样量(a)和信号强度(b)响应特征

Fig. 1 Response of GC-C-IRMS on caffeine $\delta^{13}\text{C}$ measurement to sample size (a) and signal intensity (b)

GC-C-IRMS 测定 IAEA-600 咖啡因标准物质 $\delta^{15}\text{N}$ 的进样量和信号强度响应特征示于图 2。随着进样 N 质量从 1.44 ng 增加到 101.01 ng, N_2 信号强度由 18 mV 逐渐增大到 1 926 mV。本研究测定 $\delta^{15}\text{N}$ 时,本底值(BGD 28)平均为 (38 ± 4) mV。由于本底效应的影响较大,而且 IRMS 对 N_2 的离子化效率较低^[21,23],GC-C-IRMS 在小样品量条件下测定咖啡因 $\delta^{15}\text{N}$ 时的

精准度相对 $\delta^{13}\text{C}$ 略低。测定结果表明,只有当N质量 $\geq 5\text{ ng}$ 或 $m/z\ 28$ 信号 $\geq 100\text{ mV}$ 时,该系统对咖啡因 $\delta^{15}\text{N}$ 的测定精度和准确度才能满足实验室测试要求^[7,14-15],其平均精度为 0.27‰ ,平均分析误差为 0.13‰ 。当进样量较大(N质量 $\geq 100\text{ ng}$)时,该系统仍然可以将目标化合物中的N完全转化为 N_2 ,并能够保证 $\delta^{15}\text{N}$ 的精准度。

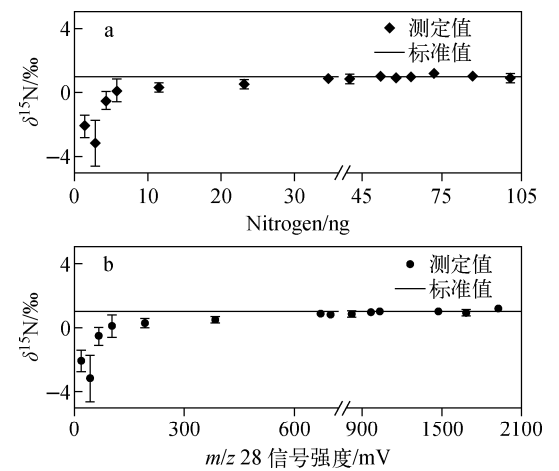


图2 GC-C-IRMS测定咖啡因 $\delta^{15}\text{N}$ 的进样量(a)和信号强度(b)响应特征

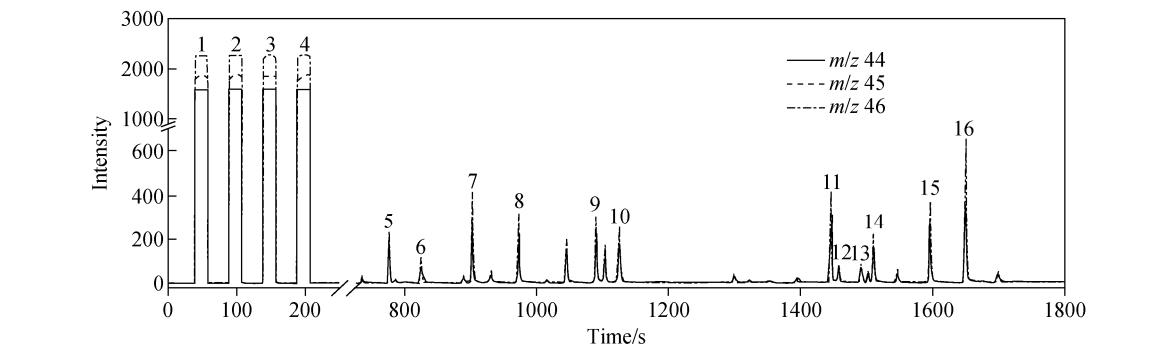
Fig. 2 Response of GC-C-IRMS on caffeine $\delta^{15}\text{N}$ measurement to sample size (a) and signal intensity (b)

2.2 GC-C-IRMS测定氨基酸混合体系 $\delta^{13}\text{C}$

GC-C-IRMS测定12种氨基酸混合体系中 $\delta^{13}\text{C}$ 的色谱图示于图3。由于氨基酸极性、不易挥发、热稳定性差,在进行GC-C-IRMS分析

之前需要将其衍生化为弱极性、易挥发、热稳定性好的氨基酸衍生物。测定结果表明,12种氨基酸的出峰时间在 $750\sim 1\,700\text{ s}$ 之间,峰宽一般在 $10\sim 15\text{ s}$ 之间。每种特定氨基酸重复测量的出峰时间漂移一般不超过 1 s ,每种氨基酸 $m/z\ 44$ 的信号强度在 $100\sim 1\,000\text{ mV}$ 之间,根据2.1节分析结果,上述12种氨基酸 $\delta^{13}\text{C}$ 的测定精度和准确度均可达到实验室分析要求。增加进样量有助于提高单一体系氨基酸 $\delta^{13}\text{C}$ 的测定精准度,但进样量过高会导致混合体系内色谱保留时间相近的氨基酸不能实现完全的峰-峰分离。为确保每个特定化合物的色谱峰能够完全基线分离,在满足GC-C-IRMS实验室测试精准度要求的前提下,由待测化合物转化的 CO_2 信号强度应尽量低^[5,10]。

GC-C-IRMS测定12种氨基酸混合体系中 $\delta^{13}\text{C}$ 的信号强度依赖性特征示于图4。氨基酸 $\delta^{13}\text{C}$ 测定过程中 CO_2 本底(BGD 44)值较低,其平均值为 $(7.0\pm 7.5)\text{ mV}$ 。在不同进样模式下,12种氨基酸的 $m/z\ 44$ 信号强度主要在 $50\sim 5\,000\text{ mV}$ 范围内呈梯度变化。其中,甘氨酸、苏氨酸和丝氨酸的 $m/z\ 44$ 信号强度出现低于 50 mV 的情况, α -氨基丁酸、天冬氨酸、谷氨酸和苯丙氨酸的 $m/z\ 44$ 信号强度可达 $3\,000\text{ mV}$ 以上。当 $m/z\ 44$ 信号强度 $\geq 100\text{ mV}$,上述12种氨基酸 $\delta^{13}\text{C}$ 的测定值依次为 $(-22.73\pm 0.85)\text{‰}$ 、 $(-29.56\pm 0.85)\text{‰}$ 、 $(-25.44\pm 0.99)\text{‰}$ 、 $(-21.37\pm 0.32)\text{‰}$ 、 $(-21.44\pm 0.73)\text{‰}$ 、 $(-21.96\pm 0.31)\text{‰}$ 、 $(-24.28\pm 0.35)\text{‰}$ 、



注:1~4为 CO_2 参比峰,5~16分别为丙氨酸、甘氨酸、 α -氨基丁酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、蛋氨酸、谷氨酸和苯丙氨酸的 CO_2 样品峰

图3 GC-C-IRMS测定混合体系中特定氨基酸 $\delta^{13}\text{C}$ 的色谱图

Fig. 3 Chromatogram of specific amino acid $\delta^{13}\text{C}$ by GC-C-IRMS

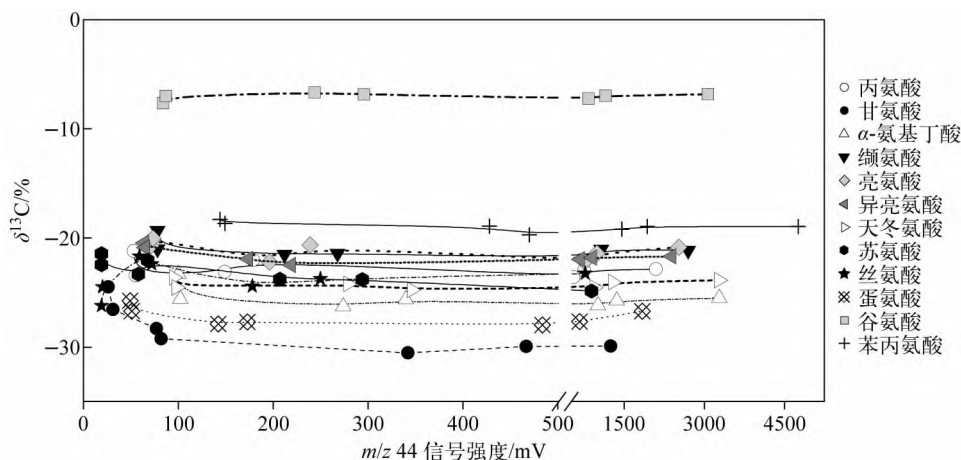


图4 GC-C-IRMS 测定混合体系中特定氨基酸 $\delta^{13}\text{C}$ 的信号强度依赖性特征

Fig. 4 Signal intensity dependence of specific amino acid $\delta^{13}\text{C}$ by GC-C-IRMS

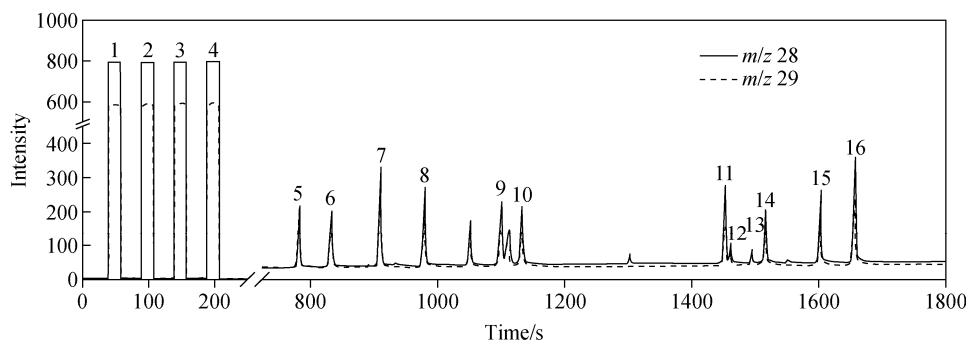
(-24.14 ± 0.62)‰、(-23.80 ± 0.58)‰、(-27.56 ± 0.50)‰、(-6.89 ± 0.21)‰和(-18.94 ± 0.44)‰, $\delta^{13}\text{C}$ 测定结果的平均精度为0.56‰, 且未表现出对 m/z 44 信号强度的依赖性(斜率接近0)。可见, GC-C-IRMS 可以实现对混合体系中特定氨基酸 $\delta^{13}\text{C}$ 的有效测定。需要注意的是, 氨基酸衍生化过程中会引入新的碳源, GC-C-IRMS 测定氨基酸衍生物 $\delta^{13}\text{C}$ 后, 可依据同位素质量守恒原理扣除外源碳 $\delta^{13}\text{C}$ 所占权重, 得到氨基酸 $\delta^{13}\text{C}$ 校准值^[22]。

2.3 GC-C-IRMS 测定氨基酸混合体系 $\delta^{15}\text{N}$

GC-C-IRMS 测定 12 种氨基酸混合体系中 $\delta^{15}\text{N}$ 的色谱图示于图 5。12 种氨基酸的出峰时间在 750~1700 s 之间, 峰宽一般在 15~25 s 之间。每种特定氨基酸重复测量的出峰时间漂

移为 3 s 左右, 每种氨基酸样品峰对应的本底值(BGD 28)约为 50 mV。仅丝氨酸产生的 m/z 28 信号强度略低于 100 mV, 其余 11 种氨基酸的 m/z 28 信号强度均在 100~400 mV 之间, 能够保证氨基酸 $\delta^{15}\text{N}$ 的分析精准度。为实现氨基酸峰-峰之间的最佳基线分离, 由样品转化的 N_2 信号强度同样不应过高。需要指出的是, 氨基酸 $\delta^{15}\text{N}$ 测定过程中, m/z 28 信号强度会受到 GC-C-IRMS 使用年限以及衍生化方式等因素影响^[9-10, 16, 20]。

GC-C-IRMS 测定 12 种氨基酸混合体系中 $\delta^{15}\text{N}$ 与 EA-IRMS 单独测定的一致性特征示于图 6。GC-C-IRMS 在较低检测信号(即较低柱上进样量)条件下对特定氨基酸 $\delta^{15}\text{N}$ 测定结果表明, 12 种氨基酸 $\delta^{15}\text{N}$ 连续 4 天(间隔 12 h)的



注: 1~4 为 N_2 参比峰, 5~16 分别为丙氨酸、甘氨酸、 α -氨基丁酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、蛋氨酸、谷氨酸和苯丙氨酸的 N_2 样品峰

图5 GC-C-IRMS 测定混合体系中特定氨基酸 $\delta^{15}\text{N}$ 的色谱图

Fig. 5 Chromatogram of amino acid $\delta^{15}\text{N}$ by GC-C-IRMS

测定值依次为 $(40.52 \pm 1.04)\%$ 、 $(-25.51 \pm 1.05)\%$ 、 $(8.17 \pm 0.57)\%$ 、 $(0.46 \pm 0.91)\%$ 、 $(1.90 \pm 0.89)\%$ 、 $(-1.99 \pm 0.97)\%$ 、 $(-0.92 \pm 1.13)\%$ 、 $(1.86 \pm 1.50)\%$ 、 $(4.31 \pm 1.33)\%$ 、 $(-2.48 \pm 0.92)\%$ 、 $(43.63 \pm 0.63)\%$ 和 $(3.15 \pm 0.57)\%$,平均精度为 0.96% 。GC-C-IRMS对混合体系内12种氨基酸 $\delta^{15}\text{N}$ 测定结果与EA-IRMS单独测定结果相当,平均偏差仅为 $(0.77 \pm 0.34)\%$,2种方法的氨基酸 $\delta^{15}\text{N}$ 测定值具有较高的一致性($R^2 = 0.997$),验证了GC-C-IRMS测定混合体系中氨基酸 $\delta^{15}\text{N}$ 的可信性。GC-C-IRMS具有高灵敏度、宽检测范围和极低耗样量等优势^[5,9,12],将为特定化合物同位素技术在地球化学和生命科学等领域的应用发挥重要作用。

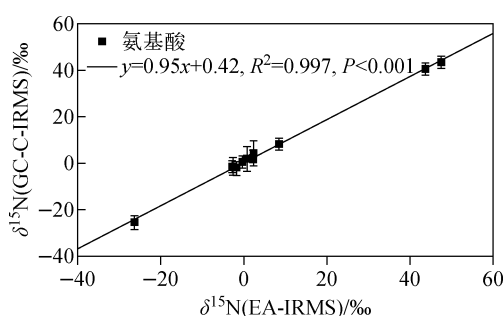


图6 GC-C-IRMS与EA-IRMS
测定氨基酸 $\delta^{15}\text{N}$ 的对比

Fig. 6 Comparison of amino acid $\delta^{15}\text{N}$
by GC-C-IRMS and EA-IRMS

3 结论

本研究基于GC-C-IRMS系统测定了咖啡因化合物和氨基酸混合体系中 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 。结果表明,在极小进样量和极低信号强度的情况下,该系统对于测定 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 具有良好的精准度。在对氨基酸混合体系 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 的测定过程中,GC-C-IRMS可保证 m/z 44和 m/z 28具有足够的信号强度并避免了峰-峰交互干扰现象。在不同进样模式下,12种特定氨基酸 $\delta^{13}\text{C}$ 测定值为 -29.56% ~ -6.89% ,平均测定精度为 0.56% 。在较低检测信号条件下,GC-C-IRMS可以保证氨基酸 $\delta^{15}\text{N}$ 测定结果具有良好的时间重现性,与EA-IRMS测定结果的平均偏差为 0.77% 。

致谢:感谢中国科学技术大学张忠义博士对本研究中氨基酸样品前处理及其同位素测定提供的帮助。

参考文献:

- [1] BAHLMANN E, BERNASCONI S M, BOUIL-LON S, HOUTEKAMER M, KORNTHEUER M, LANGENBERG F, MAYR C, METZKE M, MIDDELBURG J J, NAGEL B, STRUCK U, VOSS M, EMEIS K C. Performance evaluation of nitrogen isotope ratio determination in marine and lacustrine sediments; an inter-laboratory comparison[J]. *Organic Geochemistry*, 2010, 41(1): 3-12.
- [2] 张媛媛,贺行良,孙书文,朱志刚. 元素分析仪-同位素比值质谱仪测定海洋沉积物有机碳稳定同位素方法初探[J]. *岩矿测试*, 2012, 31(4): 627-631.
ZHANG Yuanyuan, HE Xingliang, SUN Shuwen, ZHU Zhigang. Elemental analyzer-a preliminary study on determination of stable isotope of organic C carbon in min marine sediments by isotope ration mass spectrometer[J]. *Rock and Mineral Ansllysis*, 2012, 31(4): 627-631(in Chinese).
- [3] 王政,刘卫国,文启彬. 土壤样品中氮同位素组成的元素分析仪-同位素质谱分析方法[J]. *质谱学报*, 2005, 26(2): 71-75.
WANG Zheng, LIU Weiguo, WEN Qibin. Measurement of nitrogen isotopic composition of soil samples by element analysis-isotope mass spectrometry[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2005, 26(2): 71-75 (in Chinese).
- [4] HAN W N, FENG L J, LI H W, LIU W. Bulk $\delta^{13}\text{C}$ measurements of organic-rich rock samples by elemental analyzer/isotope ratio mass spectrometry with enhanced oxidation ability[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2017, 31(1): 16-20.
- [5] 钟其顶,王道兵,孟镇,熊正河,王敏. 有机溶剂稀释与气象色谱-燃烧-同位素质谱(GC-C-IRMS)联用测定食醋中乙酸的 $\delta^{13}\text{C}$ [J]. *质谱学报*, 2014, 35(4): 372-377.
ZHONG Qiding, WANG Daobing, MENG Zhen, XIONG Zhenghe, WANG Min. Determination of $\delta^{13}\text{C}$ of acetic acid in vinegar by organic

- solvent dilution and gas chromatography-combustion-isotopic mass spectrometry (GC-C-IRMS) [J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2014, 35(4): 372-377(in Chinese).
- [6] 赵娅鸿. 稳定同位素比质谱技术在食品检验中的应用研究进展[J]. 食品工程, 2020(3): 5-8.
ZHAO Yahong. Progress in the application of stable isotope ratio mass spectrometry in food inspection[J]. Food Engineering, 2020(3): 5-8 (in Chinese).
- [7] 曹亚澄, 张金波, 温腾. 稳定同位素示踪技术与质谱分析: 在土壤、生态、环境研究中的应用[M]. 北京: 科学出版社, 2018.
- [8] 温学发. 新技术和新方法推动生态系统生态学研究[J]. 植物生态学报, 2020, 44(4): 287-290.
WEN Xuefa. New technologies and methods promote ecosystem ecology research[J]. Chinese Journal of Plant Ecology, 2020, 44(4): 287-290 (in Chinese).
- [9] 徐春英, 梅旭荣, 李玉中, 钟秀丽. GC-C-IRMS 分析氨基酸碳氮同位素的衍生化方法及其展望[J]. 中国农学通报, 2008, 24(4): 151-156.
XU Chunying, MEI Xurong, LI Yuzhong, ZHONG Xiuli. GC-C-IRMS analysis of amino acid carbon and nitrogen isotope derivatization method and its prospect[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2008, 24(4): 151-156(in Chinese).
- [10] 徐春英, 李玉中, 梅旭荣, 钟秀丽. 小麦籽粒氨基酸碳氮稳定同位素的测定分析[J]. 中国农业科学, 2009, 42(2): 151-156.
XU Chunying, LI Yuzhong, MEI Xurong, ZHONG Xiuli. Determination and analysis of stable amino acid carbon and nitrogen isotope of wheat grain[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009, 42(2): 151-156(in Chinese).
- [11] YUAN Y, YANG T H, HEINZLE E. ^{13}C Metabolic flux analysis for larger scale cultivation using gas chromatography-combustion isotope ratio mass spectrometry[J]. Metabolic Engineering, 2010, 12(4): 392-400.
- [12] 赵孔祥, 高健会, 宓捷波, 刘旸, 葛宝坤, 郑文杰. GC-C-IRMS 测定葡萄酒 6 种风味物质的碳同位素比值[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(4): 137-141.
ZHAO Kongxiang, GAO Jianhui, BI Jiebo, LIU Yang, GE Baokun, ZHENG Wenjie. Determination of carbon isotope ratios of six flavor substances in wine by GC-C-IRMS[J]. Food Research and Development, 2019, 40(4): 137-141 (in Chinese).
- [13] 吴浩, 谢丽琪, 靳保辉, 颜治, 陈波, 华红慧, 林光辉. 气相色谱-燃烧-同位素比率质谱法测定葡萄酒中 5 种挥发性组分的碳同位素比值及其在产地溯源中的应用[J]. 分析化学, 2015, 43(3): 344-349.
WU Hao, XIE Liqi, JIN Baohui, YAN Zhi, CHEN Bo, HUA Honghui, LIN Guanghui. Determination of carbon isotope ratios of five volatile components in wine by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry and its application in origin traceability[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2015, 43(3): 344-349(in Chinese).
- [14] 孟靖, 张姗姗, 喻文娟, 刘玉敏, 高羽, 张莉. 气相色谱-燃烧-同位素比值质谱法测定枸杞氨基酸 $\delta^{15}\text{N}$ Air 值[J]. 分析试验室, 2019, 38(9): 1 080-1 084.
MENG Jing, ZHANG Shanshan, YU Wenjuan, LIU Yumin, GAO Yu, ZHANG Li. Determination of amino acid $\delta^{15}\text{N}$ air value in lycium barbarum by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2019, 38(9): 1 080-1 084 (in Chinese).
- [15] 孟宪菁, 杨斌, 马潇, 张宏博, 徐波, 王旭, 尹松. 基于程序升温 GC 的 EA-IRMS 联机系统在氮、碳和硫同位素组成测定中的应用[J]. 质谱学报, 2018, 39(5): 630-638.
MENG Xianjing, YANG Bin, MA Xiao, ZHANG Hongbo, XU Bo, WANG Xu, YIN Song. Application of EA-IRMS on-line system based on temperature programmed GC in nitrogen, carbon and sulfur isotope composition determination[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2018, 39(5): 630-638(in Chinese).
- [16] 贺习文, 雷浩, 高勤叶, 赵雪宁, 温卉, 马川. 液相色谱-串联质谱法测定饲料中 16 种氨基酸[J]. 现代畜牧兽医, 2021(6): 27-30.
HE Xiwen, LEI Hao, GAO Qinye, ZHAO Xuening, WEN Hui, MA Chuan. Determination of 16 amino acids in feed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary

- Medicine, 2021(6): 27-30(in Chinese).
- [17] 史永刚,冯新沪. 化学中的检测限[J]. 云南大学学报(自然科学版),1994(S2):154-155.
SHI Yonggang, FENG Xinhui. Limit of detection in chemistry[J]. Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition), 1994(S2): 154-155 (in Chinese).
- [18] HOSNY E N, SAWIE H G, ELHADIDY M E, KHADRAWY Y A. Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory efficacy of caffeine in rat model of neurotoxicity[J]. Nutritional Neuroscience, 2019, 22(11): 789-796.
- [19] GUPTA S S, MISHRA V, DAS Mukherjee M, SAINI P, RANJAN K R. Amino acid derived biopolymers: recent advances and biomedical applications[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 188: 542-567.
- [20] 赵晶晶,张忠义,郑能建,田晶,朱光旭,肖化云. 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[J]. 分析化学,2017,45(3):309-315.
ZHAO Jingjing, ZHANG Zhongyi, ZHENG Nengjian, TIAN Jing, ZHU Guangxu, XIAO Huayun. Analysis of stable amino acid nitrogen isotopes by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry and preliminary evaluation of nutrient levels in aquatic organisms [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2017, 45(3): 309-315(in Chinese).
- [21] 孟宪菁,杨斌,李安,贾晓艺,朱湘,马潇,尹松. 具有动态稀释功能的 EA-IRMS 联机系统在 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 测定中的应用[J]. 质谱学报,2018,39(6): 746-753.
MENG Xianjing, YANG Bin, LI An, JIA Xiaoyi, ZHU Xiang, MA Xiao, YIN Song. Application of EA-IRMS on-line system with dynamic dilution function in the determination of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ [J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2018, 39(6): 746-753(in Chinese).
- [22] SAUDAN C, AUGSBURGER M, KINTZ P, SAUGY M, MANGIN P. Detection of exogenous GHB in blood by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry: implications in postmortem toxicology[J]. Journal of Analytical Toxicology, 2005(8): 777-781.
- [23] 贺珍,王久荣,童瑶瑶,张丽萍,耿梅梅,许丽卫,陈闻,彭灿,袁红朝. 土壤铵态氮中氮稳定同位素封堵测定的两种前处理方法比较[J]. 质谱学报,2019,40(4):349-355.
HE Zhen, WANG Jiurong, TONG Yaoyao, ZHANG Liping, GENG Meimei, XU Liwei, CHEN Wen, PENG Can, YUAN Hongzhao. Comparison of two pretreatment methods for determination of nitrogen stable isotope abundance in soil ammonium nitrogen[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2019, 40(4): 349-355(in Chinese).
- (收稿日期:2021-09-30;修回日期:2022-02-18)