

基于氨基酸的古代食谱重建

马颖¹, 董瑞瑞¹, Benjamin T. Fuller², 魏书亚¹

1. 北京科技大学, 北京 100083

2. Department of Archaeology and Heritage Studies, School of Culture and Society, Aarhus University, Moesgård Allé 20, DK-8270, Højbjerg, Denmark

摘要 古代食谱重建是目前国际考古学研究的热点之一。随着研究的深入,传统基于骨骼提取出骨胶原蛋白进行分析的方法逐渐凸显出一定的局限性。尤其是在考察先民食物结构和营养等级等方面,针对蛋白质大分子获得的同位素信息,无法排除一些内在或外在因素的影响,因而常会引导我们做出错误的判断。因此,发展一种能进一步提高古代食谱研究准确率和分辨率的新方法,是当前科技考古研究的迫切需求。不同于大分子蛋白,氨基酸能在更细微的层面提供有机体和生态环境中有机代谢过程中多方面的信息,在生物考古领域内具有极大的应用潜力。以北非突尼斯迦太基凡达里奇墓地出土的人和动物样品为例(遗址年代约在公元5世纪中期至6世纪早期),进行基于骨胶原和单分子氨基酸的稳定同位素分析工作。对10个人和4具动物考古样品提取骨胶原,并进一步进行酸水解、衍生化等操作,通过气相色谱(GC)与同位素质谱(IRMS)串联技术,开展特定化合物同位素分析。研究结果揭示了该遗址先民的食谱特征,以C₃类食物为主。重点考察了该遗址先民饮食中的蛋白摄入情况,结果表明该遗址先民饮食摄入有大量的动物蛋白,且不同个体存在较大差异。最后,通过对骨胶原和氨基酸分析结果所得结论的比较,证实基于单分子氨基酸的氮同位素分析对个体营养级位置的准确判断具有较大的优势。研究结果为深入研究我国古代先民食物结构差异和人群分化等问题提供了新的思路和依据。研究证实基于单分子氨基酸的同位素分析,将是显著提高古代食谱重建分辨率的有力手段,呼吁未来在我国考古材料中开展大量相关研究。

关键词 古食谱;骨胶原;氨基酸;同位素

中图分类号: O657.63 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2021)02-0395-05

引言

近年来,考古遗址出土的人和动物骨骼逐渐得到了越来越多考古学家的重视。除了传统体质人类学、形态学等工作的开展,更多自然学科,包括古DNA、古蛋白学、地球化学等方法的介入,极大的丰富了考古学相关研究。这其中,针对人和动物骨骼提取的骨胶原进行的稳定同位素分析是重建古代先民食谱,古营养以及古环境的重要手段^[1]。

在考古学中,一般以人骨胶原的 $\delta^{15}\text{N}$ 值高于同一个考古学地点的草食性动物骨胶原的 $\delta^{15}\text{N}$ 值的程度,来估算人类营养位置或动物蛋白在人类饮食中的比例^[2]。这些基于骨胶原的稳定同位素分析,整合了样品中所有含氮实体,尽管可以提供很多信息,但也存在一定的问题。这些大分子的 $\delta^{15}\text{N}$ 值常受到多种因素的影响。例如,当研究个体受到疾病、

创伤、生长过快、饥饿、怀孕等各种生理压力的影响时,其氮的代谢会出现异常,因此会导致我们做出错误的判断^[3]。

在一些特殊的环境下,如干旱地区,动植物的 $\delta^{15}\text{N}$ 含量异常丰富,这就使得基于氮同位素的营养位置解释变得模棱两可^[4]。同时,农作物的施肥也会对动植物的 $\delta^{15}\text{N}$ 值产生极大影响^[5]。这种对农作物 $\delta^{15}\text{N}$ 值的影响会导致食用施肥作物的人的骨胶原 $\delta^{15}\text{N}$ 值远高于食用未经施肥农作物的草食动物的骨胶原 $\delta^{15}\text{N}$ 值,从而导致对饮食中动物蛋白摄入的高估。

鉴于此,对考古学而言,目前急需一种更有力的手段精细对古代食谱的研究。而基于单分子氨基酸的同位素分析技术可在分子水平上对胶原蛋白进行分析,并能克服大分子同位素固有的不确定性,对古代先民营养级位置进行准确评估,展现了极大的潜力可用于古代食谱的重建研究。

本研究对考古遗址出土的人和动物骨骼开展基于单分子

收稿日期: 2020-09-18, 修订日期: 2020-11-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(51802017), 中国博士后科学基金项目(2018M641181)资助

作者简介: 马颖, 女, 1983年生, 北京科技大学科技史与文化遗产研究院讲师 e-mail: ying_ma@ustb.edu.cn

氨基酸氮同位素分析的尝试性研究,以期能获取古代先民精确的营养级信息,了解古代先民食物结构差异,从而为进一步讨论人类等级分化,社会阶层出现等考古学问题提供新的见解。

1 实验部分

1.1 样品及考古遗址背景

选取突尼斯迦太基城凡达里奇墓地出土的人和动物骨

骼,共计 14 例样品,其中人骨骨骼 10 具,动物样品 4 具,详细取样信息见表 1。该遗址位于北非突尼斯迦太基城北城墙外向西 200 m 处,根据墓葬出土陶器和钱币特征,推测该墓地的使用年代在 5 世纪中期至 6 世纪早期,为迦太基汪达尔时期的墓葬群^[6]。

样品的年龄估计和性别判定由体质人类学的标准方法确定^[7]。实验选择肋骨和长骨碎片进行胶原蛋白提取和同位素分析。动物遗骸,包括牛,猪,羊等种属,用作同位素基线,便于与人类结果进行比较。

表 1 突尼斯迦太基城凡达里奇墓地出土人和动物样品信息

Table 1 Sampling information of human and faunal skeletons excavated from Vandalic cemetery in Carthage, Tunisia

实验编号	墓葬编号	种属	骨骼类型	性别	年龄	取样重量/mg	骨胶原质量/mg	骨胶原提取率/%
AUS01	MC90 1	人	颅骨碎片	未知	12~25	257.8	3.3	1.3
AUS05	MC89 21	人	左锁骨	未知	3~5	265.7	21.6	8.1
AUS11	MC88 7	人	左肱骨	男性	35+	254.5	17.1	6.7
AUS16	MC88 23	人	左腓骨	女性	17~25	251.2	5.7	2.3
AUS23	MC88 6	人	右腓骨	未知	18+	255.6	19.9	7.8
AUS25	MC88 11	人	左胫骨	未知	9~16	246	0.6	0.2
AUS27	MC89 7	人	右胫骨	女性	17~25	245.5	1.3	0.5
AUS36	MC89 2	人	右腓骨	男性	15~20	278.8	5.9	2.1
AUS37	MC89 5	人	左肱骨	女性	26~35	247.6	5.3	2.1
AUS41	MC90 18	人	右腓骨	女性	25+	257.1	5.3	2.1
AUS103	MC88 5	羊	腓骨	—	—	358.8	24.4	6.8
AUS105	MC88 7	羊	胫骨	—	—	373.2	15.5	4.2
AUS117	MC88 7	牛	掌骨	—	—	371.2	2.8	0.8
AUS121	MC88 12	猪	趾骨	—	—	386	3.8	1.0

1.2 样品处理

每个个体称取 300~500 mg 骨样,喷砂枪去除骨样表面污染后,5 °C 下置于 0.5 mol·L⁻¹ HCl 溶液浸泡,每隔 2~3 d 换新鲜酸液,直至骨样松软、无明显气泡为止。再用去离子水洗至中性,在 0.01 mol·L⁻¹ 的 HCl 溶液下 70 °C 明胶化 48 h,热滤,经过 Millipore Amicon Ultra filter 超滤后收集分子量>30 K 的溶液,冷冻干燥,收集明胶化的骨胶原。最后称重,计算胶原蛋白提取率。

骨胶原水解根据文献中描述的方法进行改进^[8]。称取约 1.0 mg 胶原蛋白并加入 0.5 mL 6N HCl,110 °C 加热 20 h,将胶原蛋白水解成单个氨基酸。水解后,将溶液在 60 °C 氮气下吹干,加入 200 μL 0.1 N HCl,-60 °C 下保存。我们在 Corr 等提出的 N-乙酰基异丙基酯(NAIP)衍生化方法上进行了较小的修改^[9]。用 1.8 mL 乙酸乙酯将样品提取到 GC 样品瓶中,并在冰箱(4 °C)中放置过夜。室温下吹干后,将 NAIP 重新溶解在二氯甲烷中并调节至所需体积。每个样品中加入正亮氨酸(500 μL,0.2 mg·mL⁻¹)作为内标。

1.3 方法

样品骨胶原 C 和 N 元素含量及稳定同位素的测试仪器为 Flash EA 2112 元素分析仪串联 Thermo-Finnigan Delta XP 稳定同位素质谱仪。

单分子氨基酸氮同位素比值在通过 GC Combustion III 接口与 Delta V Plus 同位素比质谱仪(Thermo Scientific)

(GC-C-IRMS)连接的 Agilent 6890N 气相色谱仪上进行^[10]。

测样采用序列样品,由一个标准样品,两个质量控制样品和四至五个样品组成。每个样品的报告值是一式三份测定的平均 δ¹⁵N 值。与这些三次重复分析相关的平均误差为 0.6σ。衍生氨基酸标准品的平均误差为 ±0.9‰。

2 结果与讨论

所有样品的骨胶原蛋白提取率均>1%,原子 C:N 在 2.9~3.6 之间,保存质量良好。样品骨胶原稳定碳、氮同位素与单分子氨基酸氮同位素分析结果详见表 2。对样品骨胶原 δ¹³C 和 δ¹⁵N 绘制散点图,如图 1 所示。

四个陆生动物的 δ¹³C 值在 -20.7‰~-21.9‰ 之间,δ¹⁵N 值在 6.1‰~8.3‰,相差不大。牛和羊的 δ¹⁵N 值较为接近,体现了较为明显的食草类动物特性。猪的 δ¹⁵N 值较牛和羊高近 2‰,猪是杂食性动物,其可能摄入了一定量动物蛋白而导致其氮同位素值有所富集。10 个人的 δ¹³C 值均值为 -19.6‰±0.5‰,分布在 -18.8‰~-20.9‰ 之间,这说明该遗址居民主要以 C₃ 类食物为主。人的 δ¹⁵N 值平均值为 11.1‰±1.3‰,较高的 δ¹⁵N 值表明该遗址先民饮食摄入有大量的动物蛋白。δ¹⁵N 值在 8.7‰~13‰ 之间,表明不同个体存在较大差异,最高的个体与最低的个体 δ¹⁵N 值相差 3.3‰,显示先民在肉食资源的获取方式上显著不同。个体

Aus01 具有明显最高 $\delta^{15}N$ 值 13‰，有可能摄取了一定比例 地区迁徙而来的可能的水生/海洋蛋白，但也无法排除是否由其他高 N 背景值的

表 2 骨胶原稳定同位素及单分子氨基酸同位素测试结果

Table 2 Bulk isotopic information and amino acids nitrogen isotopic results of human and faunal samples

实验编号	种属	%C	%N	C/N	$\delta^{13}C/‰$	$\delta^{15}N/‰$	$\delta^{15}N_{Phe}/‰$	$\delta^{15}N_{Glu}/‰$	TP _{AA}
AUS01	人	33.0	11.4	3.4	-19.6	13.0	9.9	16.5	3.0
AUS05	人	43.8	15.3	3.3	-20.4	11.2	10	15.8	2.9
AUS11	人	44.8	15.9	3.3	-18.9	11.6	10.7	15.7	2.6
AUS16	人	43.8	14.3	3.6	-20.9	8.7	10.7	11.0	2.1
AUS23	人	41.0	14.3	3.3	-18.9	8.9	10.3	14.1	2.6
AUS25	人	45.0	15.5	3.4	-19.9	9.7	10.1	14.3	2.7
AUS27	人	43.7	15.4	3.3	-19.5	12.1	9.8	16	2.9
AUS36	人	42.8	14.8	3.4	-19.2	10.6	10.1	16.7	3.0
AUS37	人	44.1	15.6	3.3	-19.8	12.1	9.5	16.4	3.0
AUS41	人	43.6	15.6	3.3	-18.8	12.6	10.4	16.2	2.9
AUS103	羊	48.1	16.4	3.3	-21.7	6.1	—	—	—
AUS105	羊	42.5	14.9	3.3	-20.7	6.6	11.2	8.8	1.8
AUS117	牛	8.5	16.3	3.3	-21.9	6.3	9.4	9.2	2.0
AUS121	猪	6.8	23.3	3.3	-21.9	8.3	10.8	11.3	2.1

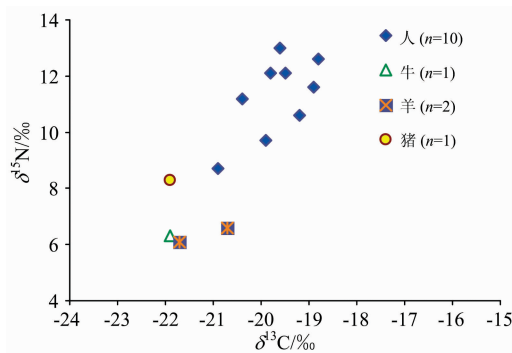


图 1 狄奥多西墓地出土人和动物样品骨胶原碳、氮同位素值散点图

Fig. 1 Bulk collagen $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ results from the Carthage Vandalic cemetery, Tunisia

在骨胶原的 20 种氨基酸中，我们获得了 4 种必要氨基酸（苯丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和赖氨酸）(Phe, Val, Leu,

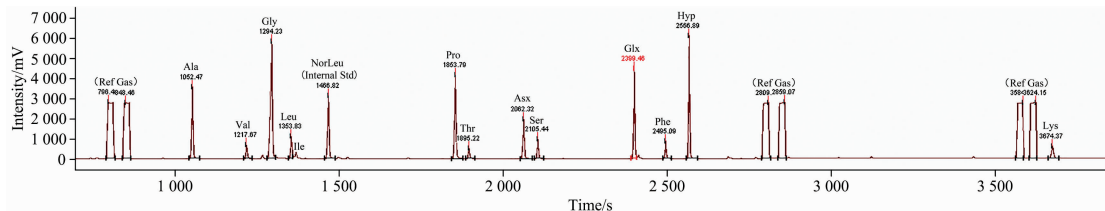


图 2 代表性 (Aus105: 羊) 样品的色谱分离及保留时间图

Fig. 2 Representative GC-C-IRMS chromatogram showing the individual bone collagen amino acids separated and retention times (Sample: Aus 105, sheep)

$$TP_{AA} = ((\delta^{15}N_{Glu} - \delta^{15}N_{Phe} + 8.4) / 7.6) + 1^{[13]}$$

基于上述公式对个体营养级的判断相比于全组分骨胶原氮同位素比值具有更大的优势，因为他们无需利用初级生产

Lys) 和 7 种非必要氨基酸 (丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸、脯氨酸、羟脯氨酸、天冬氨酸和谷氨酸) (Ala, Gly, Ser, Pro, Hyp, Asx, Glx)。图 2 所示具有代表性的样品 (Aus105: 羊) 的色谱保留时间图。所有氨基酸均通过气相色谱进行基线分离，由于本研究主要考察两种氨基酸 (苯丙氨酸和谷氨酸) 的氮同位素值，所以仅在此报道 $\delta^{15}N_{Phe}$ 和 $\delta^{15}N_{Glu}$ 值。

人和动物的 $\delta^{15}N_{Phe}$ 在 9.4‰~10.7‰ 之间，平均值为 10.5‰±0.7‰，并不存在明显不同。这表明，人和陆生动物的食物源相似，因为苯丙氨酸的 $\delta^{15}N$ 值在食物和消费者间的富集非常小，仅 0.4‰。而 $\delta^{15}N_{Glu}$ 值差异显著，在 8.8‰~16.7‰ 间，均值为 14‰±2.5‰。根据实验室饲料和田间生态研究的结果， $\delta^{15}N_{Glu}$ 值随着营养级升高而递增^[11]。在陆地生态系统中，C₃ 类植物和 C₄ 类植物 $\Delta^{15}N_{Glu-Phe}$ 值具有显著差异，一般 C₃ 类植物在 -8.4‰ 左右，而 C₄ 类植物在 0.4‰ 左右。不同生态系统中有机体的营养级位置可基于特定的方程而进行量化^[12]。其中，陆地 C₃ 类生态系统的计算方程式可表达为

者，即食物网基底的植物的 $\delta^{15}N$ 进行表征，而是利用了单个生物体内两个氨基酸之间的同位素间距。因此，通过关注这些特殊的氨基酸，即可更精确的估算每种生物营养级位置并

重建食物网结构。根据陆地 C_3 类生态系统的计算方程式, 对本遗址样品进行营养级位置估算, 并对每个样本绘制 $\delta^{15}N_{Phe}$ 和 $\delta^{15}N_{Glu}$ 交叉参数分布图。详见图 3。

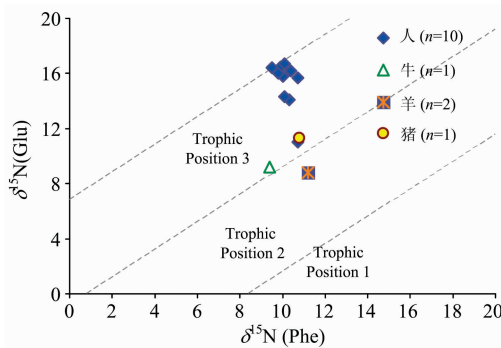


图 3 人和动物样品苯丙氨酸和谷氨酸的氮同位素值散点图

Fig. 3 Scatter plot of $\delta^{15}N_{Glu}$ and $\delta^{15}N_{Phe}$ values for the human and fauna samples

可以看出, 食草类动物牛和羊的营养级位置在 2 左右 (牛为 2.0, 羊稍低为 1.8), 符合生物学预期的营养级位置。猪的营养级位置在 2.1, 仅微高于食草类动物, 表明猪的饮食中蛋白的成分应该非常少。人的营养级位置从 2.0 到 3.0, 个体间差异较大。1 个个体 (Aus 16) 具有最低的数值 2.1, 落于食草动物和猪的数值间, 表明该个体应处于营养级的最低端, 基本没有动物性蛋白的摄入。绝大多数个体营养级位于 2.9 左右, 表明这群个体摄入了相当高的肉食资源,

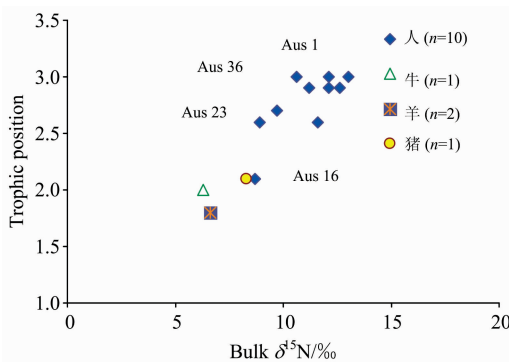


图 4 人和动物样品营养级位置与骨胶原氮同位素值散点图

Fig. 4 Bulk $\delta^{15}N$ values vs. trophic position for the human and fauna samples

位于陆生生态系统食物链的顶端。有 2~3 个个体在 2.6~2.7 间, 表明这些个体摄入的肉食蛋白比例相对较低于其他个体 (除 Aus16)。

将利用 $\delta^{15}N_{Phe}$ 和 $\delta^{15}N_{Glu}$ 值计算出的营养级位置与应到个体骨胶原稳定氮同位素值进行对比 (见图 4)。以个体 Aus1 和 Aus36 为例, 其 $\delta^{15}N$ 值分别为 13‰ 和 10.6‰, 相差近 2.4‰。若仅用骨胶原 $\delta^{15}N$ 值对其蛋白摄入情况进行判断, 会认为这两个个体对肉食资源的摄取可能存在一定的差异。然而其苯丙氨酸和谷氨酸的氮同位素值表明其在营养级中都处于相同的位置 2.9。而 Aus16 和 Aus23 两个个体则存在正好相反的情况。这两个个体具有非常接近的骨胶原 $\delta^{15}N$ 值, 分别为 8.7‰ 和 8.9‰, 暗示其应该有着相似的蛋白摄入。然而单分子氨基酸氮同位素 $\delta^{15}N_{Phe}$ 和 $\delta^{15}N_{Glu}$ 值表明, 其处于营养级的不同位置, 2.0 和 2.6, 即对肉食蛋白的摄入存在显著差异。Aus16 个体为单纯的素食者, 而 Aus23 个体摄入了相当量的动物性蛋白。

根据骨胶原 $\delta^{15}N$ 值对营养级情况进行的判断与由单分子氨基酸 $\delta^{15}N_{Phe}$ 和 $\delta^{15}N_{Glu}$ 值得出的结果存在一定程度的差异。前文所讲, 骨胶原 $\delta^{15}N$ 值是个体组成所有氨基酸 $\delta^{15}N$ 值的整合, 而个体间由于生理代谢或其他原因造成的差异往往被抵消, 得不到应有的体现^[14]。因此, 仅利用骨胶原 $\delta^{15}N$ 值分析个体蛋白摄入情况及判断其营养级位置可能会与个体真实的情况有较大的出入。以往的研究中, 很多不同社会等级或不同性别、贫富差距的人群间, 其骨胶原 $\delta^{15}N$ 值并没有发现显著不同^[15]。而本研究结果表明, 仅利用骨胶原 $\delta^{15}N$ 值可能在一定程度上忽略了个体食谱结构的差异, 从而导致先民食谱的均一性。本研究结果对探寻人群食谱差异的研究提供了新的思路和证据, 利用基于单分子氨基酸的同位素分析将提供个体更为准确的营养级位置信息, 进一步提高对不人群食谱结构差异研究的分辨率。

3 结论

通过对突尼斯迦太基凡达里奇墓地出土人和动物骨骼进行骨胶原稳定碳氮同位素和单分子氨基酸同位素分析。研究表明, 利用单分子氨基酸氮同位素比值对古代先民所处营养级位置能做出更为准确的判断, 在揭示古代人类食谱差异上具有不可比拟的优势。对考古遗址出土人和动物骨骼开展该分析将极大提高古代食谱重建工作的分辨率, 为精细化研究古代人群及社会提供重要依据。

References

- [1] Makarewicz C A, Sealy J. *Journal of Archaeological Science*, 2015, 56: 146.
- [2] Reitsem L J. *American Journal of Human Biology*, 2013, 25: 445.
- [3] Styring A K, Fraser R A, Arbogast R M, et al. *Journal of Archaeological Science*, 2015, 53: 504.
- [4] Chikaraishi Y, Steffan S A, Ogawa N O, et al. *Ecology and Evolution*, 2014, 4: 2423.
- [5] Ohkouchi N, Chikaraishi Y, Close H G, et al. *Organic Geochemistry*, 2017, 113: 150.
- [6] Stevens S T, Garrison M B, Freed J. *A Cemetery of Vandalic Date at Carthage (Journal of Roman Archaeology: Supplementary Series Number 75)*. Rhode Island: Portsmouth, 2009.

- [7] Brickley M, McKinley J L. Guidelines to the Standards for Recording Human Remains IFA: BABAO, 2004.
- [8] Honch N V, McCullagh J S O, Hedges R E M. *American Journal of Physical Anthropology*, 2012, 148: 495.
- [9] Corr L T, Berstan R, Evershed R P. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007, 21: 3759.
- [10] Jochmann M A, Schmidt T C. *Compound-Specific Stable Isotope Analysis*. London: Royal Society of Chemistry, 2012.
- [11] McClelland J W, Montoya J P. *Ecology*, 2002, 83: 2173.
- [12] Jaouen K, Richards M P, Le Cabec A, et al. *PNAS*, 2019, 116: 4928.
- [13] Naito Y I, Chikaraishi Y, Ohkouchi N, et al. *Journal of Archaeological Science*, 2013, 40: 2913.
- [14] Naito Y I, Chikaraishi Y, Drucker D G, et al. *Journal of Human Evolution*, 2016, 93: 82.
- [15] Ma Y, Fuller B T, Wei D, et al. *American Journal of Physical Anthropology*, 2016, 160: 433.

Refining Paleodietary Reconstruction by Using Compound-Specific Amino Acid Isotope Analysis

MA Ying¹, DONG Rui-rui¹, Benjamin T. Fuller², WEI Shu-ya¹

1. Institute for Cultural Heritage and History of Science and Technology, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China
2. Department of Archaeology and Heritage Studies, School of Culture and Society, Aarhus University, Moesgård Allé 20, DK-8270, Højbjerg, Denmark

Abstract Palaeodiet is one of the most important topics in modern archaeological research. The bulk isotopic analysis of archaeological human and faunal remains have made great contributions in palaeodietary reconstruction for decades, but gradually it shows the limits of palaeodietary interpretation, of particular, in the way to detect the nutritional quality and food pattern of ancient human. Compound-specific amino acid composition method (CSIA) has shown huge potential to elucidating dietary behaviors in a complex archaeological context and may able to mitigate the influences of many of the limitations inherent to palaeodietary reconstructions. Here we carried out both bulk collagen isotope analysis and the compound-specific amino acid isotope analysis on 10 humans and 4 faunal skeletons which excavated from a Vandalic cemetery at Carthage in Tunisia, North Africa (5th—6th AD). The result reveals that the population from Vandal Cemetery had an overall dietary pattern that was predominately based on terrestrial C₃ resources, and the majority of the individuals having a significant amount of terrestrial protein in their diets. Further, this study focuses on determining the difference in the contribution of protein to the human diet and comparing the interpretation variance given by these two different methods. The individual amino acid isotope result shows the great advances in trophic position estimation for both archaeological human and animal's samples. It may shed new light on the exploring identity dietary difference and the social stratification research in Chinese archaeological research. Our studies indicated that the CSIA has a huge potential for refining human paleodietary reconstruction, and should be widely applied into Chinese Archaeology.

Keywords Palaeodiet; Collagen; Amino acids; Stable isotopes

(Received Sep. 18, 2020; accepted Nov. 12, 2020)