

文章编号: 1000-8551(2016)04-0792-05

# 样品前处理对斑头雁组织稳定同位素碳、氮比值的影 响

杨 乐<sup>1</sup> 李继荣<sup>1,2</sup> 曹 建<sup>2</sup> 仓决卓玛<sup>1</sup> 李来兴<sup>2</sup>( <sup>1</sup> 西藏自治区高原生物研究所, 西藏 拉萨 850000; <sup>2</sup> 中国科学院西北高原生物研究所 / 中国科学院高原生物适应与进化重点实验室, 青海 西宁 810001)

**摘 要:** 为了更好地确定不同处理方法对样品稳定同位素分析的影响, 以斑头雁(*Anser indicus*) 为研究对象, 对比了不同酸化条件、干燥方法和粉碎形式对组织材料稳定同位素碳、氮比值的影响。结果表明, 不同温度和盐酸浓度对卵壳  $\delta^{13}\text{C}$  值有影响,  $80^\circ\text{C}$  较  $40^\circ\text{C}$ 、 $60^\circ\text{C}$  条件下得到的卵壳  $\delta^{13}\text{C}$  值富集  $3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl 较  $1.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl 浓度条件下得到的卵壳  $\delta^{13}\text{C}$  值贫化; 冷冻干燥和烘干 2 种干燥方法对肌肉稳定同位素  $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$  的影响均未达到显著水平, 液氮研磨和直接剪碎 2 种粉碎形式下测得的羽毛  $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$  值差异不显著。本研究为使用稳定同位素技术开展鸟类学相关研究提供了参考依据。

**关键词:** 稳定同位素; 斑头雁; 样品前处理; 组织

DOI: 10.11869/j.issn.100-8551.2016.04.0792

样品的前处理是稳定同位素分析样品测定值准确与否的关键, 不同的处理方法可能会对结果造成一定的影响<sup>[1-2]</sup>。由于卵壳有机物中稳定同位素碳的测量需要去除无机碳的影响, 样品需先进行酸化处理, 但不同的研究中使用的盐酸 (HCl) 浓度不同。Hobson 等<sup>[3]</sup> 使用  $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl 处理白颊鸭 (*Bucephala islandica*) 卵壳中的碳酸盐; Emslie 等<sup>[4]</sup> 使用  $2.87\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl 处理阿德利企鹅 (*Pygoscelis adeliae*) 卵壳中的碳酸盐; Polito 等<sup>[5]</sup> 使用  $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl 处理巴布亚企鹅 (*Pygoscelis papua*) 卵壳中的碳酸盐。目前, 不同浓度盐酸处理所得卵壳的稳定同位素比值是否存在差异鲜见报道。干燥是样品进行稳定同位素测定的必要过程, 通常有冷冻干燥和烘干 2 种方法<sup>[6-8]</sup>, 其中冷冻干燥被认为是对组织成分破坏最少的方法<sup>[9-10]</sup>, 而烘干具有简单易行的特点<sup>[11]</sup>。有关干燥方法对稳定同位素测值的影响, 国内外仅有少量报道<sup>[6,11]</sup>, 不同干燥方法之间的优劣也未有定论。粉碎也是分析样品稳定同位素测值之前的重要环节, 羽毛样品前期通行的做法是直接剪刀剪碎<sup>[12-13]</sup>, 但随着仪器设备的日趋精密, 直接剪碎的样品由于均质性较差的问题而逐

渐无法满足仪器测定的要求。其中 Roscales 等<sup>[14]</sup> 在研究大西洋东北部水鸟迁徙时使用液氮研磨方法对羽毛进行了处理。然而这 2 种粉碎方法测量得到的羽毛  $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$  值是否存在差异尚不得而知。

目前国内有关稳定同位素样品前处理方法的报道多集中在海洋生物<sup>[6,10,15-17]</sup>、植物样品<sup>[1]</sup> 和牛肉组织样品<sup>[18]</sup> 等方面, 对水鸟组织前处理方法的报道尚不多见。本研究对经不同酸化条件、干燥方法和粉碎形式处理的斑头雁卵壳、肌肉和羽毛组织的稳定同位素碳、氮比值情况进行了比较, 以期确定不同处理方法的差异, 推动鸟类组织前处理方法的标准化, 为进一步使用稳定同位素技术开展鸟类学相关研究提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、仪器及试剂

1.1.1 材料 斑头雁的卵壳、羽毛均来自青海湖国家级自然保护区, 肌肉采自西宁野生动物园。

1.1.2 仪器 稳定同位素比率质谱仪 (MAT253, Thermo Fisher, 德国); 元素分析仪 (EA2000, Thermo

收稿日期: 2015-08-19 接受日期: 2015-12-16

基金项目: 国家自然科学基金 (31360141, 31071936)

作者简介: 杨乐, 男, 助理研究员, 主要从事生态学与生物多样性研究。E-mail: yangletibet@126.com

通讯作者: 李来兴, 男, 副研究员, 主要从事动物生态研究。E-mail: lxli@nwipb.cas.cn

Fisher Flash, 德国); 万分之一天平 (BSA124S, Sartorius, 德国); 冷冻干燥机 (FDU-1200, EYELA, 日本); 离心机 (5430R, Eppendorf, 德国); 电热鼓风干燥箱 (康恒, 广州); 多功能粉碎机 (哈瑞斯, 上海)。

1.1.3 标准物 IAEA-600 (Thermo 质谱仪自配, 德国)

## 1.2 组织材料的前处理方法

1.2.1 酸化 采集斑头雁卵壳, 参照 Herzka 等<sup>[19]</sup> 的方法进行清洗后研磨均匀, 设定反应条件为温度 (40、60、80℃) 和 HCl 浓度 (1、3、5 mol·L<sup>-1</sup>), 分别组合, 以酸化去除卵壳中的无机碳。剩余有机物用去离子水清洗, 离心去酸液, 重复 6 次, 直到有机样品 pH 达到中性。水洗后的剩余物质放入 60℃ 烘箱中 48 h 烘干, 烘干后的样品再次研磨过 100 目筛, 所得样品用于稳定同位素碳、氮的测定。

1.2.2 干燥 采集斑头雁同样部位的肌肉, 使用冷冻干燥和烘干 2 种方法进行对比。

冷冻干燥法: 用陶瓷刀把样品切成 2~4 mm 薄片置于低温冰箱, 冻实后取出; 使用冷冻干燥机干燥约 24 h, 使样品完全干燥。把干燥后的样品用陶瓷研钵磨碎后过 60 目筛脱脂测定。

烘干法: 烘干法参考文献 [20] 中肌肉样品的干燥方法。肌肉样品经绞肉机绞碎, 在 70℃ 烘箱中 48 h 干燥至恒重, 用粉碎机粉碎后过 60 目筛脱脂测定。

1.2.3 粉碎 羽毛样品经清洗、干燥后采用液氮研磨和直接剪碎 2 种方法进行处理。

液氮研磨: 将干燥羽毛置于陶瓷研钵中, 不断倒入液氮进行研磨, 研磨完成后将材料过 60 目筛备用<sup>[21]</sup>。

直接剪碎: 使用不锈钢剪刀剪成碎片过 60 目筛备用。

## 1.3 稳定同位素比值的测定

1.3.1 仪器条件 氧气、二氧化碳、氮气和氦气压力均为 0.4 MPa, 反应管温度为 960℃, 载气流速为 90 mL·min<sup>-1</sup>, 氧气流速 250 mL·min<sup>-1</sup>, 参考气体流速 200 mL·min<sup>-1</sup>, 仪器的测量精度 δ<sup>13</sup>C、δ<sup>15</sup>N 分别为 0.1‰、0.2‰。

1.3.2 测值计算 测定值稳定同位素比值用 δ 值表示, 为样品与标准之间偏差的千分数<sup>[22]</sup>:

$$\delta X = [(R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}} - 1)] \times 1000\text{‰}$$

式中 X 指 <sup>15</sup>N 或 <sup>13</sup>C; R = <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N 或 <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C; R<sub>sample</sub> 为被测样品的同位素比值; R<sub>standard</sub> 为标准品的同位素比值。

## 1.4 数据分析

使用软件 Excel 2007 对数据进行整理, 不同温度和盐酸浓度条件下测量的卵壳稳定同位素数据分析使

用软件 SPSS 20 进行两因素两元方差分析。不同干燥方法得到的肌肉组织和不同粉碎方法得到的羽毛稳定同位素比值采用配对数据 t 检验, 数据表示方式为平均数 ± 标准差 (Mean ± SD)。

## 2 结果与分析

### 2.1 酸化条件的影响

由表 1 可知, 不同处理条件下得到的卵壳 δ<sup>13</sup>C、δ<sup>15</sup>N 值不同, 方差分析结果表明, 不同处理条件下氮 (δ<sup>15</sup>N) 的校正模型 P = 0.06 > 0.05, 说明反应温度和 HCl 浓度的整体对 δ<sup>15</sup>N 值无显著影响; 不同处理条件下稳定同位素碳 (δ<sup>13</sup>C) 校正模型 P < 0.01, 说明反应温度和 HCl 浓度对斑头雁卵壳 δ<sup>13</sup>C 值影响极其显著; 反应温度和 HCl 浓度对斑头雁卵壳 δ<sup>13</sup>C 值有显著影响 (P < 0.05)。对不同反应温度和 HCl 浓度条件下的斑头雁卵壳 δ<sup>13</sup>C 值做 LSD 多重比较, 结果表明 80℃ 与 40、60℃ 条件下得到的卵壳 δ<sup>13</sup>C 值差异极其显著, 80℃ 较 40、60℃ 条件下得到的卵壳 δ<sup>13</sup>C 值富集; 3 mol·L<sup>-1</sup> HCl 与 1 mol·L<sup>-1</sup> HCl, 3 mol·L<sup>-1</sup> HCl 与 5 mol·L<sup>-1</sup> HCl 条件下所得的结果差异显著, 3 mol·L<sup>-1</sup> HCl 较 1 mol·L<sup>-1</sup>、5 mol·L<sup>-1</sup> HCl 浓度条件下得到的斑头雁卵壳 δ<sup>13</sup>C 值贫化。

### 2.2 干燥方法的影响

烘干肌肉 δ<sup>13</sup>C 为 -18.29‰ ± 0.44‰, δ<sup>15</sup>N 为 8.02‰ ± 0.46‰; 冷冻干燥肌肉 δ<sup>13</sup>C 为 -18.17‰ ± 0.36‰, δ<sup>15</sup>N 为 8.01‰ ± 0.56‰ (图 1)。2 种处理方法经配对数据 t 检验, 测得的肌肉 δ<sup>13</sup>C (t<sub>3</sub> = 2.00, P = 0.14 > 0.05)、δ<sup>15</sup>N (t<sub>3</sub> = 0.20, P = 0.86 > 0.05) 值无显著差异。

### 2.3 粉碎形式的影响

2 种粉碎形式处理的羽毛, 其 δ<sup>13</sup>C、δ<sup>15</sup>N 值范围有很大的重叠 (图 2)。配对数据 t 检验结果表明, 2 种处理方法测得的羽毛 δ<sup>13</sup>C (t<sub>7</sub> = 0.67, P = 0.53 > 0.05) 和 δ<sup>15</sup>N (t<sub>7</sub> = 0.24, P = 0.82 > 0.05) 值无显著差异。

## 3 讨论

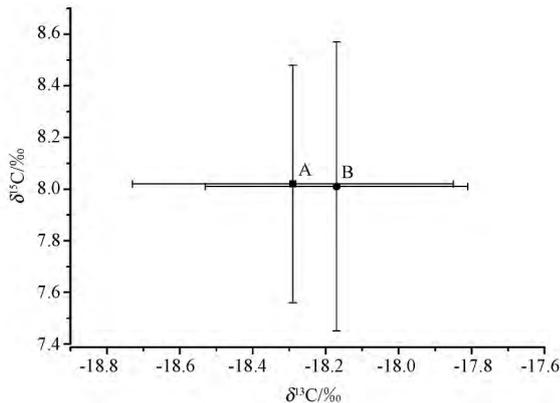
### 3.1 鸟卵样品的酸化处理

鸟卵是稳定性同位素区域特征分析的理想材料, 因其中的元素成分直接来自产卵雌鸟的食物, 而且大部分的水禽和一些陆禽卵孵化后将蛋壳留在巢中, 卵壳可以在不影响鸟类孵化的前提下进行收集, 这对于研究濒危物种具有重要的意义<sup>[23-24]</sup>。

表1 不同处理条件下卵壳稳定同位素比值

Table 1 The stable isotope ratios of egg shell under different processing conditions

编号 Number	浓度 Concentration/(mol·L <sup>-1</sup> )	温度 Temperature/°C	样本量 Sample size	$\delta^{13}\text{C}/\text{‰}$	$\delta^{15}\text{N}/\text{‰}$
1	1	40	4	-21.21 ± 0.32	9.83 ± 0.39
2	1	60	4	-18.73 ± 0.92	9.31 ± 0.16
3	1	80	4	-20.64 ± 0.52	9.45 ± 0.29
4	3	40	4	-23.76 ± 0.34	9.95 ± 0.26
5	3	60	4	-22.85 ± 0.27	9.76 ± 0.41
6	3	80	4	-17.93 ± 0.26	9.89 ± 0.32
7	5	40	4	-18.56 ± 0.07	9.69 ± 0.26
8	5	60	4	-22.67 ± 0.16	9.86 ± 0.26
9	5	80	4	-19.38 ± 0.12	9.80 ± 0.12



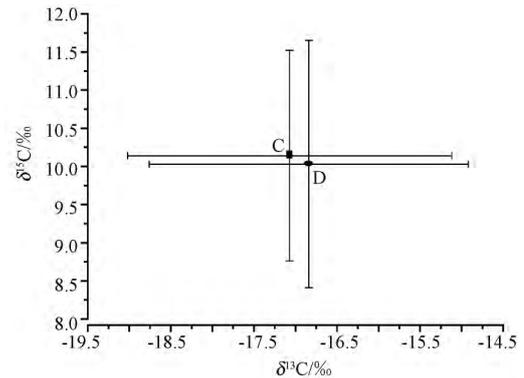
注: A: 烘箱干燥; B: 冷冻干燥。

Note: A: Oven drying. B: Freeze drying.

图1 不同干燥方法处理肌肉稳定碳、氮同位素比值

Fig. 1 The stable carbon and nitrogen isotope ratios of muscle under different drying methods

本研究表明,80℃较40℃、60℃温度条件下酸化得到的卵壳 $\delta^{13}\text{C}$ 值富集,可能与盐酸的物理化学性质有关。盐酸沸点为-84.9℃,在常温常压条件下易挥发,且随着温度的升高其溶解度明显下降,如23℃时盐酸的溶解度为41.54%(重量百分比),60℃时盐酸的溶解度下降为35.94%(重量百分比)<sup>[25]</sup>。这意味着随着温度的升高,盐酸的挥发将会加剧,导致体系中盐酸浓度下降,不利于反应的进行;且无机碳酸盐与盐酸的反应过程为放热反应,即反应在任何温度条件下都是自发进行的<sup>[26]</sup>。因此从提高该反应的速率与效率的角度出发,升高反应温度是不必要的。结合本研究结果可知,低浓度HCl(1mol·L<sup>-1</sup>)和高浓度HCl(5mol·L<sup>-1</sup>)导致卵壳稳定同位素碳( $\delta^{13}\text{C}$ )相对于3



注: C: 直接剪碎; D: 液氮研磨。

Note: C: Directly cutting up. D: Liquid nitrogen grinding.

图2 不同粉碎方法处理羽毛稳定碳、氮同位素比值

Fig. 2 The stable carbon and nitrogen isotope ratios of feathers under different crushing methods

mol·L<sup>-1</sup>HCl富集,可能与卵壳有机物水解所得的氨基酸在不同的pH溶液中溶解度不同有关<sup>[27]</sup>。建议在常温对卵壳进行酸化处理,并通过预试验来选择特定样品酸化的盐酸浓度。

### 3.2 肌肉组织的干燥处理

本文采用烘干和冷冻干燥2种干燥方法得到的斑头雁肌肉组织 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值无差异,这一结果与Hobson等<sup>[28]</sup>在研究不同干燥方法对羊血 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值的影响时发现的烘干和冷冻干燥对羊血 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值无影响的结果相一致。因此2种干燥方法均可用于样品前处理。但2种方法各有利弊:烘干相对于冷冻干燥而言操作简单;冷冻干燥的程序较烘干繁琐,但冷冻干燥所得的样品,能够最大限度地保持原有物质成分,有效地防止干燥过程中物质的氧化、转化和状

态变化<sup>[6]</sup> ,因此 在样品充足的条件下 ,建议使用烘干法;当样品较为稀缺时 ,为了最大程度地保持样品原有的物质成分 ,建议采用冷冻干燥方法。

### 3.3 羽毛组织的粉碎处理

直接剪碎和液氮研磨 2 种方法处理的样品无显著差异 ,直接剪碎操作相对简单 ,液氮研磨得到的样品粒度较小 ,相对更能满足仪器精密测定的要求 ,但样品处理费用较直接剪碎法高。综合考虑样品处理费用和粒度要求 ,建议先剪碎再进行液氮研磨。

## 4 结论

针对鸟类组织稳定同位素样品的前处理方法进行了探索性的研究 ,结果表明 ,样品前处理中的酸化条件的选择会对鸟类卵壳的  $\delta^{13}\text{C}$  值产生影响 ,而不同干燥方法和粉碎形式对于斑头雁肌肉和羽毛的稳定同位素值并无影响。随着稳定同位素生态学的发展 ,试验方法标准化的需求将更为迫切 ,今后应对其进行更深入的探索与研究。

### 参考文献:

[1] 王周锋,刘卫国,王政. 样品前处理对氮同位素组成测试的影响 [J]. 水土保持研究, 2008, 15(6): 250-251

[2] 蔡先峰,郭波莉,魏益民,孙淑敏,魏帅. 基于动物组织器官中稳定性同位素组成变化的溯源研究进展 [J]. 核农学报, 2011, 25(2): 302-307

[3] Hobson K A, Thompson J E, Evans M R, Boyd S. Tracing nutrient allocation to reproduction in Barrow's goldeneye [J]. Journal of Wildlife Management, 2005, 69(3): 1221-1228

[4] Emslie S D, Patterson W P. Abrupt recent shift in delta C-13 and delta N-15 values in Adelie penguin eggshell in Antarctica [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(28): 11666-11669

[5] Polito M J, Fisher S, Tobias C R, Emslie S D. Tissue-specific isotopic discrimination factors in gentoo penguin (*Pygoscelis papua*) egg components: Implications for dietary reconstruction using stable isotopes [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2009, 372(1/2): 106-112

[6] 刘瑀,刘保占,李颖,王海霞,刘苓,鲍惠铭. 样品前处理方法对海洋食物网稳定同位素组成分析的影响 [J]. 海洋环境科学, 2013, 32(2): 295-299

[7] 孙丰梅,石光雨,王慧文,杨曙明. 牛不同组织中稳定性同位素氢、氧、硫组成探讨 [J]. 核农学报, 2012, 26(8): 1148-1153

[8] 刘晓玲,郭波莉,魏益民,师俊玲,孙淑敏. 不同地域牛尾毛中稳定同位素指纹差异分析 [J]. 核农学报, 2012, 26(2): 329-334

[9] 王慧文,杨曙明,程永友. 鸡肉中稳定同位素组成与饲料和饮水关系的研究 [J]. 分析科学学报, 2008, 24(1): 47-50

[10] 郭波莉,魏益民, Kelly D S, 潘家荣,魏帅. 稳定性氢同位素分析在牛肉产地溯源中的应用 [J]. 分析化学, 2009, 37(9): 1333-1336

[11] 陈立雷,张媛媛,贺行良,张培玉,朱志刚,李小琳. 海洋沉积物有机碳和稳定氮同位素分析的前处理影响 [J]. 沉积学报, 2014, 32(6): 1046-1051

[12] Gow E A, Stutchbury B J M, Done T, Kyser T K. An examination of stable hydrogen isotope ( $\delta\text{D}$ ) variation in adult and juvenile feathers from a migratory songbird [J]. Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie, 2012, 90(5): 585-594

[13] Kouwenberg A L, Hipfner J M, McKay D W, Storey A E. Corticosterone and stable isotopes in feathers predict egg size in Atlantic Puffins *Fratercula arctica* [J]. Ibis the International Journal of Avian Science, 2013, 155(2): 413-418

[14] Roscales J L, Gomez-Diaz E, Neves V, Gonzalez-Solis J. Trophic versus geographic structure in stable isotope signatures of pelagic seabirds breeding in the northeast Atlantic [J]. Marine Ecology Progress Series, 2011, 434(12): 1-13

[15] 李祥忠,刘卫国,张玲,张彭熹. 介形虫碳氧同位素测定样品处理方法对比研究 [J]. 盐湖研究, 2007, 15(1): 5-11

[16] 韩龙,刘正文. 预处理及保存方法对浮游动物碳、氮稳定同位素比值的影响 [J]. 生态科学, 2011, 30(2): 195-200

[17] 吴夏,涂林玲,杨会,王华,朱晓燕,张美良. 水样中溶解性无机碳同位素测试前处理方法对比研究 [J]. 岩矿测试, 2013, 32(4): 659-664

[18] 周九庆,郭波莉,魏益民,张国权,魏帅,赵海燕,张磊. 加工对牛肉稳定碳同位素组成的影响 [J]. 中国农业科学, 2014, 47(5): 977-983

[19] Herzka S Z, Mellink E, Talley D M, Huxel G R, Dayton P K. Stable isotope ratios of egg albumen of three waterbird species nesting in the Colorado River Delta indicate differences in foraging ground and isotopic niche breadth [J]. Aquatic Conservation-Marine and Freshwater Ecosystems, 2013, 23(4): 546-563

[20] Ehrich D, Tarroux A, Stien J, Lecomte N, Killengreen S, Berteaux D, Yoccoz N G. Stable isotope analysis: modelling lipid normalization for muscle and eggs from arctic mammals and birds [J]. Methods in Ecology and Evolution, 2011, 2(1): 66-76

[21] Chérel Y, Phillips R A, Hobson K A, McGill R. Stable isotope evidence of diverse species-specific and individual wintering strategies in seabirds [J]. Biology Letters, 2006, 2(2): 301-303

[22] Yurkowski D J, Hussey N E, Semeniuk C, Ferguson S H, Fisk A T. Effects of lipid extraction and the utility of lipid normalization models on delta C-13 and delta N-15 values in Arctic marine mammal tissues [J]. Polar Biology, 2015, 38(2): 131-143

[23] Mabee T J. Using eggshell evidence to determine nest fate of shorebirds [J]. Wilson Bulletin, 1997, 109(2): 307-313

[24] Oppel S, Powell A N, O'Brien D M. Using eggshell membranes as a non-invasive tool to investigate the source of nutrients in avian eggs [J]. Journal of Ornithology, 2009, 150(1): 109-115

[25] 喻涛,李春园. 盐酸、温度、时间及粒径对海洋沉积物碳酸盐去除的影响 [J]. 热带海洋学报, 2006, 25(6): 33-38

[26] 叶大伦,胡建华. 实用无机物热力学数据手册 [M]. 第 2 版.

- 北京: 冶金工业出版社, 2002
- [27] 宋金耀, 郝涤非. 有机及生物化学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2009
- [28] Hobson K A, Gibbs H L, Gloutney M L. Preservation of blood and

tissue samples for stable-carbon and stable-nitrogen isotope analysis [J]. Canadian Journal of Zoology-*Revue Canadienne De Zoologie*, 1997, 75(10): 1720 - 1723

## The Effect of Sample Pretreatment on Stable Carbon and Nitrogen Isotope Ratios of Bar-headed Goose Tissues

YANG Le<sup>1</sup> LI Jirong<sup>1,2</sup> CAO Jian<sup>2</sup> CANGJUE Zhuoma<sup>1</sup> LI Laixing<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Tibet Plateau Institute of Biology, Lhasa, Xizang 850001; <sup>2</sup>Key Laboratory of Adaptive and Evolution of Plateau Biology/Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Science, Xining, Qinghai 810001)

**Abstract:** In order to better understand the effect of different processing methods on stable isotope analysis, this research used Bar-headed Goose (*Anser indicus*) as an object, compared the influence of stable carbon and nitrogen isotopes ratios by different acidic conditions, drying and crushing methods. The results showed that different temperature and concentrations of hydrochloric acid affect  $\delta^{13}\text{C}$  ratio in egg shell. The  $\delta^{13}\text{C}$  in egg shell under the condition of 80 °C was more positive than that under 40 °C and 60 °C. HCl solution of 3 mol·L<sup>-1</sup> was more negative than HCl of 1 mol·L<sup>-1</sup> and 5 mol·L<sup>-1</sup>. The two methods of freeze drying and oven drying had not reached significant level on  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  of muscle tissue, liquid nitrogen grinding and directly cutting up had no significant effect on  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  of feathers. The results provide a reference basis for stable isotope technique applied in the research of Ornithology.

**Keywords:** stable isotope, bar-headed Goose (*Anser indicus*), sample pretreatment, tissue