

# 高效液相色谱法测定雨水中溶解态氨基酸的含量

龙超君<sup>1,2</sup>, 肖化云<sup>1,\*</sup>, 徐宇<sup>1,2</sup>, 赵晶晶<sup>1,2</sup>

(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:** 本研究采用邻苯二甲醛/9-芴甲基氯甲酸酯-高效液相色谱-荧光检测器(OPA/FMOC-HPLC-FLD)联用技术,测定雨水中主要游离态氨基酸(DFAA)和结合态氨基酸(DCAA)的含量。雨水中的DFAA经阳离子交换树脂柱富集纯化后,可直接上机测定;类似地,经浓缩、酸解、再浓缩后,直接上机测定雨水中的DCAA。不同氨基酸的保留时间和峰面积的平均相对标准偏差分别为0.053%(0.014%~0.254%)和1.219%(0.223%~3.846%)。除赖氨酸外,其余氨基酸的检出限和定量限都较低,分别为0.90 μmol/L(0.19~1.42 μmol/L)和2.95 μmol/L(0.39~4.74 μmol/L)。样品加标回收率为59.87%~125.72%,均值为89.58%,空白回收率为57.47%~118.74%,均值为90.60%,保证了样品测定的准确性。利用本方法测得贵阳地区雨水中结合态氨基酸的浓度为27.25~493.87 nmol/L(均值为182.44 nmol/L),其中含量最多的是蛋氨酸,占总DCAA的24.61%;游离氨基酸的浓度为3.94~126.45 nmol/L(均值24.59 nmol/L),其中丝氨酸含量最高,占总DFAA的30.25%。本研究确立了最优的雨水溶解态氨基酸的提取和测定条件,并保证了雨水氨基酸在低浓度范围内定量的准确可靠性。

**关键词:** 高效液相色谱; 溶解态氨基酸; 雨水; 富集

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-9250(2019)01-0105-08 doi: 10.14050/j.cnki.1672-9250.2019.47.003

大气氮沉降是氮素生物地球化学循环的重要环节之一。氮肥的过度使用、化学燃料的燃烧、禽畜养殖等人为活动导致活性氮排放的增加,过量的氮以干湿沉降的方式介入水生和陆地生态系统,改变了氮素的循环。Zhao等<sup>[1]</sup>使用GEOS-Chem模型分析了中国无机氮沉降现状,表明从2008~2012年,无机氮平均沉降量为16.4 Tg,其中62%来源于还原态氮,38%源于氧化态氮,而国内人为源的排放占总氮沉降量的86%。Zhang等<sup>[2]</sup>对全国32个点的降水样品分析表明,从2005~2009年,全国可溶性有机氮(DON)的平均沉降量为6.84 kg N/(ha·a),占总氮沉降的28%。

雨水中的氨基酸是雨水有机质的重要组成部分,其来源除了生物源的直接释放以及蛋白质的降解外,还包括生物质燃烧排放<sup>[3-4]</sup>、火山喷发<sup>[5]</sup>、海洋泡沫破裂<sup>[6-7]</sup>等。另外,有研究表明陆源的长距离运输也是海洋气溶胶中DFAA的来源之一<sup>[8]</sup>。云水中的DFAA浓度可占溶解性有机碳(DOC)的4.4%~21.6%(均值为9.1%)<sup>[9]</sup>。游离态和结合

态氨基酸可作为植物和微生物的可利用氮源,在生态过程和植物营养中扮演重要角色<sup>[10-11]</sup>。再者,氨基酸可与过渡金属如铜铁等发生反应形成配位化合物从而会影响其参与化学反应的能力<sup>[12]</sup>。如,铜的一些氨基化合物可较其他组分吸收更多的太阳光,从而通过直接的光化学反应形成O<sub>2</sub>和HOOH<sup>[13]</sup>。一些氨基酸(如色氨酸和酪氨酸)可直接吸收太阳光,并敏化其他化合物包括氨基酸的氧化,它们也可直接与臭氧反应形成铵、有机酸、硝基或亚硝基化合物、羟胺等产物。诸如此类的反应会改变大气中气溶胶和有机物的组成,影响大气颗粒和雨水的性质<sup>[14-16]</sup>。另外,由于某些氨基酸的稳定性,如甘氨酸和丙氨酸,可作为大气长距离运输过程中气溶胶老化的生物指示因子<sup>[17-18]</sup>。

目前常见测定氨基酸的方法有高效阳离子交换色谱-柱后茚三酮衍生分光光度法,这是最早测定氨基酸的方法。利用酸性条件下,氨基酸变成阳离子形式,在离子交换柱的作用下分离,用茚三酮发生显色反应,最后用紫外检测器检测,这种方法

收稿日期: 2018-03-23; 改回日期: 2018-07-25

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目(41425014)。

第一作者简介: 龙超君(1993-)女,硕士研究生,主要研究方向为大气氮沉降。E-mail: longchaojun@mail.gyig.ac.cn.

\* 通讯作者: 肖化云(1970-)男,博士,研究员,从事环境地球化学研究。E-mail: xiaohuayun@vip.skleg.cn.

适用于大多数氨基酸测定,但灵敏度低、检测限高且不稳定;气相色谱法是以气体作为流动相,将氨基酸衍生为易挥发但又容易发生分解的衍生物,柱效高,分离时间短,易与质谱仪连用,但与羟基、吡啶基反应不彻底;毛细管电泳法是利用石英毛细管在电场的作用下,利用不同样品迁移速度的不同而达到分离的目的,微量、灵敏、柱效高,无须梯度洗脱,可用于氨基酸手性分离的分析;阴离子交换色谱-积分脉冲安培法主要是利用氨基酸转化为阴离子,被金属电极所氧化,检测产生的电流,对氨基酸进行定量,可不发生生化反应直接测定,但电极难以清理,难以重复利用;柱前高效液相色谱法采用 $C_{18}$ 键合硅胶为固定相,非极性溶剂、弱酸盐缓冲液为流动相,通过选择适当的衍生剂,调节pH、流速、柱温以达到分离氨基酸的效果。由于氨基酸极性高、挥发性低,且大多数氨基酸并没有紫外吸收和发射荧光的特性,通常氨基酸是通过生化反应将其转化为有紫外吸收或者荧光特性的衍生物,通过测定衍生物的紫外或者荧光吸收来测定氨基酸含量。Fonselius<sup>[19]</sup>早期进行了关于雨水中氨基酸的研究,利用纸层析的方法检测到了雨水中的精氨酸和丙氨酸;后来Sidle<sup>[20]</sup>采用相同的方法,并在前者的基础上检测到了丙氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸等氨基酸。但是纸层析的方法并不准确且检出限较高,需要建立一种有效可靠的测定方法。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

高效液相色谱:安捷伦HPLC1260型,四元泵G1311B,自动进样器G1329B,荧光检测器G1321B。

试剂:17种混合标准氨基酸:天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、丝氨酸(Ser)、组氨酸(His)、甘氨酸(Gly)、苏氨酸(Thr)、精氨酸(Arg)、丙氨酸(Ala)、 $\gamma$ -氨基丁酸(Gaba)、酪氨酸(Tyr)、缬氨酸(Val)、蛋氨酸(Met)、苯丙氨酸(Phe)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、赖氨酸(Lys)、脯氨酸(Pro);3种补充氨基酸:天门冬酰胺(Asn)、谷氨酰胺(Gln)、色氨酸(Trp);二种内标氨基酸:Aaba( $\alpha$ -氨基丁酸)、肌氨酸(Sar)均购于美国Sigma-Aldrich公司(纯度>99.0%);陶氏阳离子树脂(H型)购于Sigma;甲醇和乙腈均为色谱纯;氨水和盐酸均为优级纯;本研究所用水均由Millipore智能超纯水净化仪净化

而来。

### 1.2 标准氨基酸配置

混合标准氨基酸:准确称取17种标准氨基酸,溶于0.1 mol/L HCl中,配置成1 nmol/ $\mu$ L的氨基酸混合液。

补充氨基酸:准确称取3种补充氨基酸,溶于超纯水中,配置成18 nmol/ $\mu$ L的氨基酸混合液。

内标溶液:准确称取2种内标氨基酸,溶于超纯水中,配置成5 nmol/ $\mu$ L的氨基酸内标溶液。

将配好的混合标准和补充氨基酸混合,配成浓度梯度为2.25、4.5、9、22.5、45 pmol/ $\mu$ L,内标浓度为10 pmol/ $\mu$ L的22种氨基酸混合液。

### 1.3 实验条件

HPLC氨基酸分析采用自动在线衍生化与HPLC相结合,一级氨基酸用邻苯二甲醛(OPA)、二级氨基酸用9-芴甲基氯甲酸酯(FMOC)进行衍生。固定相和流动相分别为 $C_{18}$ 键合硅胶和弱酸盐缓冲液/非极性溶剂,通过调节pH、流速等条件,选择荧光检测器(FLD)进行氨基酸衍生物的检测。

(1) 色谱柱:Agilent Zorbax Eclipse-AAA柱,150 mm $\times$ 4.6 mm,3.5  $\mu$ m;

(2) 流动相A:配制40 mmol/L的 $Na_2HPO_4$ 溶液,用NaOH溶液将PH调节至7.8;

(3) 流动相B:乙腈:甲醇:水=45:45:10(V:V:V);

(4) 自动衍生程序;

(5) 梯度洗脱程序(表1)。

表1 梯度洗脱程序

Table 1 Conditions of gradient separation

时间 /min	流动相 A /%	流动相 B /%	柱温 /°C	流速 /(mL/min)
0	100	0	40	2
1.9	100	0	40	2
18.1	43	57	40	2
18.6	0	100	40	2
22.3	0	100	40	2
23.2	100	0	40	2
26	100	0	40	2

### 1.4 采样及回收率的测定

#### 1.4.1 样品采集

雨水采集点设置于中国科学院地球化学研究所学生公寓楼顶,周围没有明显的高楼阻挡及污染源。采样器为570 mm $\times$ 425 mm $\times$ 325 mm的聚丙烯塑料收纳箱,在使用前,用超纯水反复冲洗,并自然晾干。下雨时,将雨水收集在洗净的纯净水瓶内,用0.45  $\mu$ m的混合膜过滤后存放于-18 °C的冰箱中备用。

### 1.4.2 氨基酸富集方法

研究发现不同浓度的氨水和氨水的洗脱量都会造成氨基酸回收率的不同。我们对比了不同实验条件对氨基酸的回收率以及分离效果的影响,从中筛选出最优的氨基酸纯化和富集方法。

DFAA 在测试前,需经过陶氏阳离子树脂富集纯化后,经氨水洗脱后冷冻干燥,再用 0.1 mol/L 的 HCl 溶解,可直接上机测定。步骤如下:

(1) 取 2 mL 活化好的陶氏阳离子树脂,采用湿法装柱,待流出液至中性时,将加入 10 pmol/ $\mu$ L 内标的 0.5~1 L 雨水 pH 调至 1 后加入层析柱中,让其缓慢通过树脂层;

(2) 当样品全部流过树脂层后,用适量超纯水淋洗,后用氨水洗脱被吸附的氨基酸。本实验分别用 10 mL 2 mol/L、4 mol/L、6 mol/L 的氨水洗脱氨基酸混标,测定其洗脱液汇总氨基酸的回收率。为优化洗脱液的用量,本实验还测定了用 6、10、12、16 mL 6 mol/L 的氨水洗脱氨基酸混标后洗脱液中氨基酸的回收率;

(3) 洗脱后的样品置于烧杯中,冷冻后再次用冷冻干燥机冻干;

(4) 冻干后用 1 mL 0.1 mol/L 的稀盐酸溶解完全,直接进样即可。

类似地,经浓缩、酸解、再浓缩后,直接上机测定雨水中的 DCAA。具体步骤如下:

(1) 取 50 mL 雨水,加入 10 pmol/ $\mu$ L 内标,冷冻

后置于冷冻干燥机中冻干;

(2) 用 5 mL 0.1 mol/L 的稀盐酸溶解后,再加 5 mL 12 mol/L 的浓盐酸于 10 mL 消解管中,加入 100  $\mu$ L 0.2% 抗坏血酸,通  $N_2$  约 2 min,封口;

(3) 将样品放入 110  $^{\circ}$ C 的恒温烘箱中连续水解 24 h;

(4) 水解后的样品置于烧杯中,冷冻后再次用冷冻干燥机冻干;

(5) 冻干后用 1 mL 0.1 mol/L 的稀盐酸溶解完全,直接进样即可。

## 2 结果与讨论

### 2.1 线性关系、准确度

线性关系: 分别取浓度为 2.25、4.50、9.00、22.50、45.00 pmol/ $\mu$ L 的标准氨基酸(内标浓度为 10 pmol/ $\mu$ L),按照 1.3 部分的实验条件测定,以各标准氨基酸峰面积/内标峰面积为纵坐标,氨基酸浓度为横坐标得到线性回归方程。如表 2 所示,20 种氨基酸的相关系数均在 0.991~0.999 之间,这表明在 2.25~45 pmol/ $\mu$ L 的浓度范围内氨基酸的峰面积和其浓度呈现非常好的线性关系。

准确度: 平行测定 6 次 9 pmol/ $\mu$ L 标准氨基酸,计算其峰面积及保留时间的相对标准偏差,结果如表 2 所示。保留时间和峰面积的相对标准偏差分别为 0.014%~0.254%(均值为 0.053%)和 0.223%~3.846%(均值为 1.219%),表明仪器精密度高、准确性好、重现性良好。因此该方法可用于测量雨水中氨基酸的浓度。

表 2 20 种氨基酸线性关系、相关系数、检出限和定量限

Table 2 Linearity, correlation coefficient, LOD and LOQ of 20 amino acids standards

氨基酸	线性方程	相关系数 $R^2$	保留时间相对标准偏差 /%	峰面积相对标准偏差 /%	检出限 /( $\mu$ mol/L)	定量限 /( $\mu$ mol/L)
Asp	$y=0.1001x+0.0868$	0.999 2	0.254	0.514	0.19	0.64
Glu	$y=0.1154x+0.1664$	0.999 8	0.137	0.602	0.12	0.39
Asn	$y=0.0385x+0.0275$	0.999 9	0.053	0.613	0.49	1.61
Ser	$y=0.0769x+0.071$	0.999 7	0.056	0.702	0.42	1.40
Gln	$y=0.0451x+0.0325$	0.999 2	0.042	0.586	0.50	1.67
His	$y=0.0505x+0.0143$	0.999 3	0.055	2.739	1.00	3.33
Gly	$y=0.1043x+0.0568$	0.999 5	0.046	0.658	0.35	1.17
Thr	$y=0.0978x+0.059$	0.999 5	0.041	0.686	0.60	1.99
Arg	$y=0.103x+0.0389$	0.999 8	0.036	0.607	0.58	1.93
Ala	$y=0.0998x+0.0702$	0.999 1	0.048	0.741	0.50	1.67
Gaba	$y=0.0975x+0.0835$	0.999 4	0.055	1.393	0.56	1.87
Tyr	$y=0.1064x+0.0871$	0.999 5	0.056	0.223	0.59	1.96
Val	$y=0.1537x+1.5453$	0.999 8	0.023	3.846	0.92	3.06
Met	$y=0.1175x+0.0562$	0.999 9	0.029	0.778	1.22	4.05
Trp	$y=0.0804x+0.0092$	0.999 8	0.017	0.507	1.41	4.69
Phe	$y=0.1217x+0.2477$	0.999 5	0.014	1.482	1.21	4.02
Ile	$y=0.1218x+0.0587$	0.999 2	0.016	0.668	1.19	3.98
Leu	$y=0.1213x+0.0949$	0.999	0.035	0.965	1.41	4.69
Lys	$y=0.0168x+0.0014$	0.999 8	0.029	2.409	3.44	11.4
Pro	$y=0.0814x+0.213$	0.999 7	0.023	3.667	1.42	4.74

检出限和定量限: 本研究中的检出限(LOD)和定量限(LOQ)分别用信噪比 $S/N=3$ 和 $S/N=10$ 来计算。该方法测定20种氨基酸能得到分离较好的色谱图。除Lys较高外,其余氨基酸的检出限和定量限都较低。

## 2.2 雨水氨基酸的空白回收率和加标回收率

样品加标回收率: 取4份相同的样品,其中两份加入1 mL 45 pmol/ $\mu$ L的标准,真空冻干后加入5 mL 6 mol/L的HCl于110 °C消解24 h,冻干后溶解于1 mL 0.1 mol/L的HCl中,过滤,待测。

空白加标回收率: 取1 mL 45 pmol/ $\mu$ L的标准2份,加入4 mL水,再加入5 mL 6 mol/L的HCl于110 °C消解24 h,冻干后溶解于1 mL 0.1 mol/L的HCl中,过滤,待测。

本研究中除了Trp和Met,其他氨基酸的回收

率均在85%以上,其中空白回收率为57.47%~118.74%,均值为90.60%;加标回收率为59.87%~125.72%,均值为89.575%。如图1所示,表明这种方法在低浓度时也能保留大部分的氨基酸。另外,雨水中的氨氮会干扰氨基酸的测定,导致Met和Val的回收率偏低。

## 2.3 不同实验条件的回收率

用2、4、6 mol/L氨水洗脱树脂的回收率如图2所示,分别为69.85%~133.77%(平均为87.67%)、43.51%~185.71%(平均为89.32%)、79.85%~146.10%(平均为94.21%),由此可见,用6 mol/L氨水洗脱树脂的回收率最高,故最适合的氨水浓度为6 mol/L。这可能是因为氨水浓度过低导致氨基酸无法完全被 $\text{NH}_4^+$ 置换洗脱。

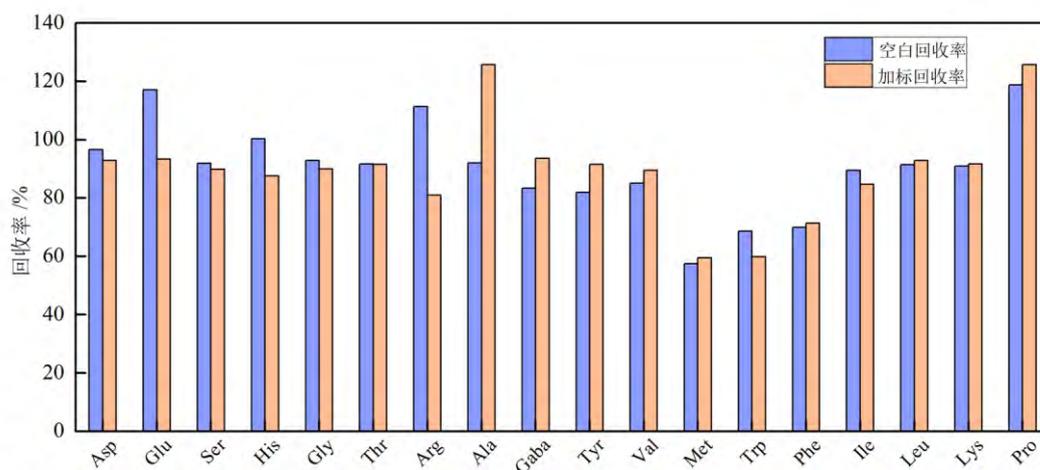


图1 雨水氨基酸的空白回收率和加标回收率

Fig.1 The blank recovery and spike recovery of amino acid in rainwater

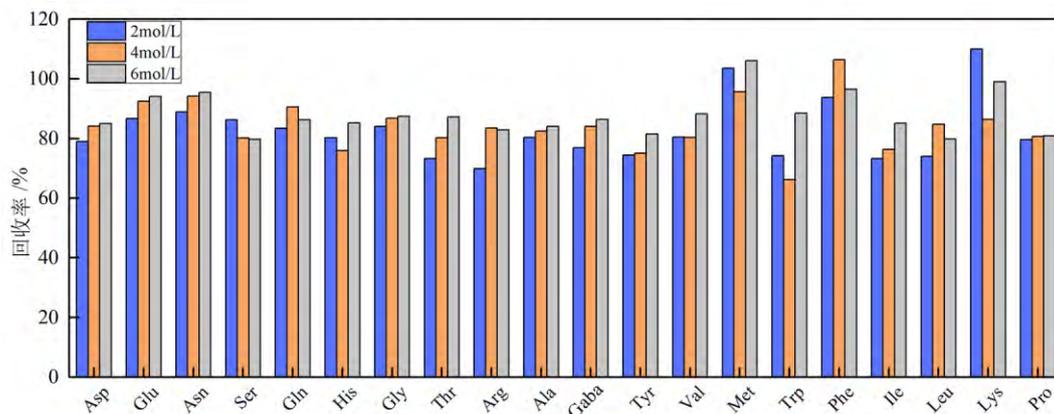


图2 不同浓度氨水洗脱氨基酸的回收率

Fig.2 The recovery rates of different concentrations of ammonium hydroxide

如图 3 所示, 分别用 6、10、12、16 mL 6 mol/L 氨水洗脱 20 种标准氨基酸的平均回收率分别为 90.58%、93.63%、91.29%、91.15% , 四者没有显著性差异 ( $P < 0.05$ ) 。综合来看, 选用 10 mL 的氨水洗脱最为合适, 这考虑到氨水量过少可能导致氨基酸无法被  $\text{NH}_4^+$  完全置换洗脱, 而过多会随洗脱液混于

样品中, 影响氨基酸的测定, 且费时费力。

根据上述雨水中游离态氨基酸和结合态氨基酸的富集和提取方法, 所得标样和氨基酸谱图如图 4 所示, 横纵坐标分别表示出峰时间和峰高, 其中 a 为 45 pmol/ $\mu\text{L}$  混合标准氨基酸所得的标准图谱, b 和 c 分别为雨水中 DCAA 和 DFAA 的图谱。

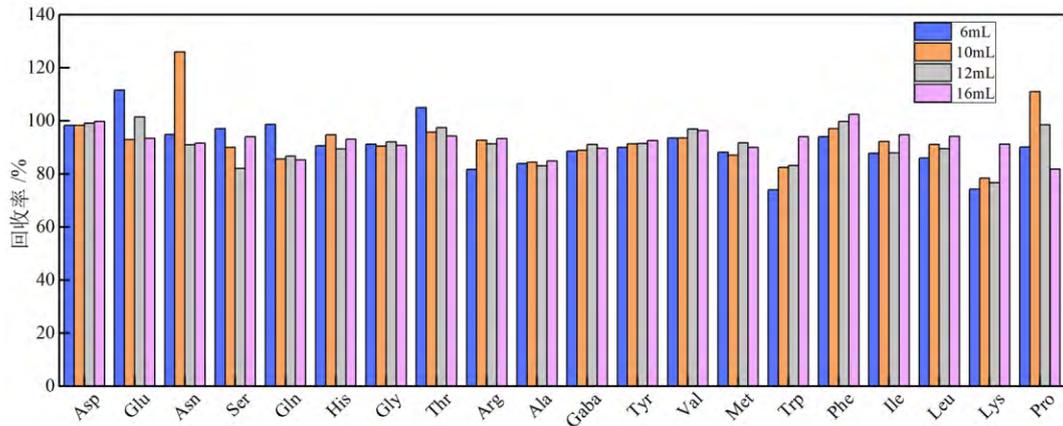
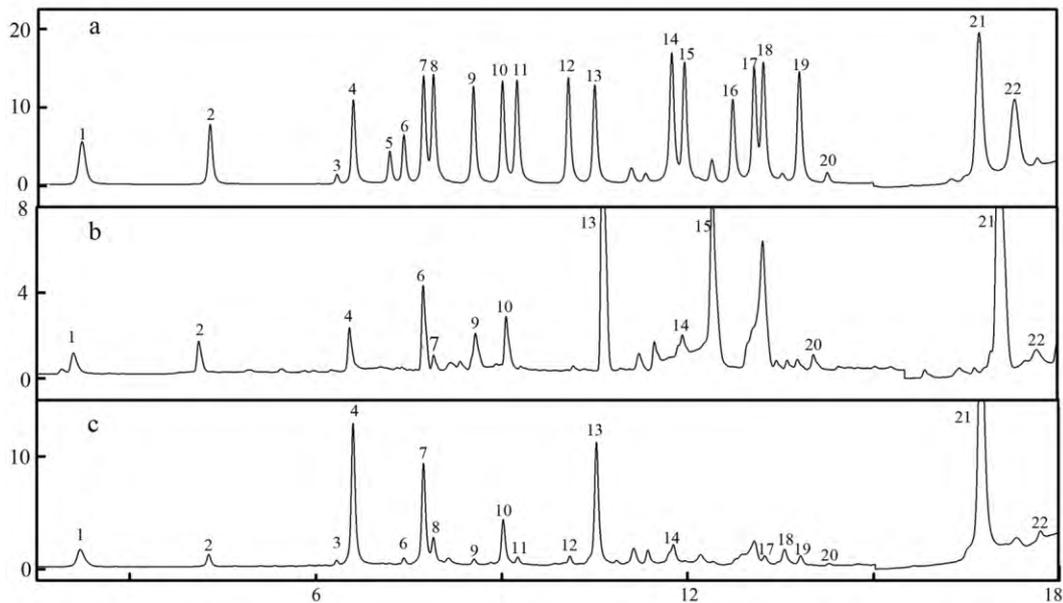


图 3 不同体积氨水洗脱氨基酸的回收率

Fig.3 The recovery rates of different volumes of ammonium hydroxide



a: 45 pmol/L 氨基酸混合标准; b: 雨水中 DCAA 谱图; c: 雨水中 DFAA 谱图。

峰: 1-天冬氨酸( Asp) 2-谷氨酸( Glu) 3-天冬酰胺( Asn) ,  
4-丝氨酸( Ser) 5-谷氨酰胺( Gln) 6-组氨酸( His) 7-甘氨酸( Gly) 8-苏氨酸( Thr) 9-精氨酸( Arg) 10-丙氨酸( Ala) ,  
11- $\gamma$ -氨基丁酸( Gaba) 12-酪氨酸( Tyr) 13- $\alpha$ -氨基丁酸( Aaba) 14-缬氨酸( Val) 15-蛋氨酸( Met) 16-色氨酸( Trp) ,  
17-苯丙氨酸( Phe) 18-异亮氨酸( Ile) 19-亮氨酸( Leu) 20-赖氨酸( Lys) 21-肌氨酸( Sar) 22-脯氨酸( Pro)

图 4 氨基酸衍生物的 HPLC 色谱图

Fig.4 Analysis spectra of amino acid derivatives by HPLC

## 2.4 雨水中结合氨基酸含量测定

经过 1.4 的富集和提纯 结合最佳的实验条件 , 检测出了雨水中 11 种结合态氨基酸 ,如表 3 所示 , 其浓度范围为 27.25 ~ 493.87 nmol/L (均值为 182.44 nmol/L) ,其中 Met 含量最高 ,占总 DCAA 的 24.61% ,接着是 Gly 和 Asp ,分别占总 DCAA 的 10.63%和 9.96%。

表 3 雨水中结合氨基酸的含量

Table 3 The concentration of combined amino acids in rainwater

DCAA	Asp	Glu	Ser	Gly	Thr	Arg
浓度/(nmol/L)	199.99	167.79	157.71	213.42	27.25	173.33
DCAA	Ala	Val	Met	Lys	Pro	
浓度/(nmol/L)	182.03	56.91	493.87	184.53	150.04	

## 2.5 雨水中游离氨基酸含量测定

经过 1.4 部分的富集和提纯 结合最佳的实验条件 检测出了雨水中 17 种游离态氨基酸。如表 4 所示 ,其浓度范围为 3.94 ~ 126.45 nmol/L (均值为 24.59 nmol/L) ,其中 Ser 含量最高 ,占总 DFAA 的 30.25% ,其次是 Gly 和 Asp ,分别占总 DFAA 的 15.24%和 9.23%。

表 4 雨水中游离氨基酸的含量

Table 4 The concentration of dissolved free amino acids in rainwater

DFAA	Asp	Glu	Asn	Ser	His	Gly	Thr	Arg	Ala
浓度(nmol/L)	38.59	16.37	16.98	126.45	8.39	63.73	15.00	5.75	32.85
DFAA	Gaba	Tyr	Val	Phe	Ile	Leu	Lys	Pro	
浓度(nmol/L)	7.01	3.94	12.96	26.70	7.64	6.05	17.71	11.86	

表 5 不同地区雨水和气溶胶中氨基酸的含量

Table 5 The concentrations of amino acids in particles and rainwater of different districts

环境类型	年份	采样点	类型	数目	季节	DFAA/(ng/m <sup>3</sup> )	DCAA/(ng/m <sup>3</sup> )	参考文献
农村	2001	济州岛	PM <sub>2.5</sub>	20	春	25.8(14.6~48.5)	110(62.4~207)	[21]
郊区	2001	南京大学	PM <sub>2.5</sub>	21	冬	129(81.9~188)	-	[22]
					秋	84.9(39.3~162)	-	
海洋	2003	大西洋	TSP	10	春	1.83(0.27~9.13)	9.13(1.83~36.5)	[23]
海洋	2000	太平洋西部	TSP	18	春	0.98(0.14~2.81)	-	[24]
城市		萨卡圣比亚乔岛,威尼斯	TSP	20	春秋	45.7(nd~179)	-	[25]
农村	1988	弗尼亚州	雨水	13	全年	0.01~0.368*	-	[26]
海洋	2007	地中海东部	TSP	19	夏	23.54(0.82~88.7)	98.43(37.44~215.206)	[27]
森林	2014	多姆山,法国	云水	16	春冬	183.6*(33~563)	-	[28]
					全年	58.5(8.62~235.5)	280.6(139.6~439.4)	[29]
	1997	加利福尼亚北部	雾水	9	全年	97.7(32.7~210.8)	388.8(187.5~699.6)	
海洋	1985	墨西哥湾	雨水	30	全年	6.5(1.1~15.2)*	-	[30]
农村	1996	佛罗里达	露水	16	全年	22.5(0.5~110.0)*	52.98(3.9~201.3)	[32]
城市	2017	贵阳	雨水	17	全年	0.25(0.11~0.52)*	0.25(0.22~0.34)	本研究

注: \* 代表的单位是  $\mu\text{mol/L}$ ; - 表示无此数据。

## 3 讨论

表 5 总结了大气中气溶胶和降水中氨基酸的浓度。在大多数研究中,主要的氨基酸均为 Arg<sup>[19-20,26,32]</sup>、Gly<sup>[24-25,27,29-30]</sup>。Arg 碳氮比为 1.5,是含氮量最高的氨基酸,由谷氨酸通过中间产物鸟氨酸和瓜氨酸形成而来,是尿素循环的中间产物,其中的氨基由天冬氨酸和谷氨酸转化而来<sup>[31]</sup>。Gly 被认为是最稳定的氨基酸,可存活数月<sup>[33]</sup>。Barbaro 等<sup>[25]</sup>在对北极冰芯游离氨基酸的研究发现,Gly 含量最高,为 0.19 ng/mL,占总氨基酸的 55%。

总氨基酸的含量,可定义为单个氨基酸浓度均值的总和。贵阳雨水中 DFAA 浓度比云水(1~4  $\mu\text{mol/L}$ )<sup>[28]</sup>、雾水(2.6~99  $\mu\text{mol/L}$ ,均值为 20  $\mu\text{mol/L}$ )<sup>[29]</sup>和露水(0.5~110  $\mu\text{mol/L}$ ,均值为 22.5  $\mu\text{mol/L}$ )<sup>[31]</sup>的低,也比 Gorzelska 等<sup>[26]</sup>和 Mopper 等<sup>[30]</sup>所报道的雨水中的低(分别为 0.4  $\mu\text{mol/L}$ 和 6.5  $\mu\text{mol/L}$ )。这可能是由于贵阳离海洋较远,且降水量丰富,对大气颗粒物的冲刷较频繁,以致其含量较低。

## 4 结论

雨水中的氨基酸由于其含量低, 难度在于样品的富集与纯化。本实验以贵阳雨水为研究材料, 充分考虑了实验过程中每一个步骤的回收率, 样品经

过多次富集之后达到了仪器的检出限, 通过对实验条件的讨论, 说明本方法可以有效测量雨水中的游离态氨基酸(DFAA)和结合态氨基酸(DCAA)的含量。

## 参 考 文 献

- [1] Zhao Y, Zhang L, Chen Y, et al. Atmospheric nitrogen deposition to China: A model analysis on nitrogen budget and critical load exceedance [C]. AGU Fall Meeting. AGU Fall Meeting Abstracts, 2016.
- [2] Zhang Y, Song L, Liu X J, et al. Atmospheric organic nitrogen deposition in China [J]. Atmospheric Environment, 2012, 46(3): 195-204.
- [3] Chan M N, Choi M Y, Ng N L, et al. Hygroscopicity of water-soluble organic compounds in atmospheric aerosols: Amino acids and biomass burning derived organic species [J]. Environmental Science & Technology, 2005, 39(6): 1555.
- [4] Mace K A, Artaxo P, Duce R A. Water-soluble organic nitrogen in amazon basin aerosols during the dry (biomass burning) and wet seasons [J]. Journal of Geophysical Research Atmospheres, 2003, 108.
- [5] Scalabrin E, Zangrando R, Barbaro E, et al. Amino acids in arctic aerosols [J]. Atmospheric Chemistry & Physics, 2012, 12(21): 10453-10463.
- [6] Wedyan M A, Preston M R. The coupling of surface seawater organic nitrogen and the marine aerosol as inferred from enantiomer-specific amino acid analysis [J]. Atmospheric Environment, 2008, 42(37): 8698-8705.
- [7] Kuznetsova M, Lee C, Aller J. Characterization of the proteinaceous matter in marine aerosols [J]. Marine Chemistry, 2005, 96(3-4): 359-377.
- [8] Bernsen R M D, Aardoom H A, Nagelkerke N J D, et al. Challenges in the identification and characterization of free amino acids and proteinaceous compounds in atmospheric aerosols: A critical review [J]. Trac Trends in Analytical Chemistry, 2016, 75: 97-107.
- [9] Bianco A, Voyard G, Deguillaume L, et al. Improving the characterization of dissolved organic carbon in cloud water: Amino acids and their impact on the oxidant capacity [J]. Scientific Reports, 2017, 6: 37420.
- [10] Rice M. Uptake of dissolved free amino acids by northern quahogs, mercenaria mercenaria and its relative importance to organic nitrogen deposition in Narragansett Bay, Rhode Island [J]. Journal of Shellfish Research, 1999, 18(2): 547-553.
- [11] Rosenstock B, Simon M. Use of dissolved combined and free amino acids by planktonic bacteria in lake constance [J]. Limnology & Oceanography, 1993, 38(7): 1521-1531.
- [12] Martell A E, Smith R M. Critical stability constants. Volume 1: Amino acids [M]. New York: Plenum Press, 1974.
- [13] Hayase K, Zepp R G. Photolysis of copper(II)-amino acid complexes in water [J]. Environmental Science and Technology; (United States), 1991, 25(7): 1273-1279.
- [14] Berger P, Leitner N K V, Doré M, et al. Ozone and hydroxyl radicals induced oxidation of glycine [J]. Water Research, 1999, 33(2): 433-441.
- [15] Mcgregor K G, Anastasio C. Chemistry of fog waters in California's Central Valley: 2. Photochemical transformations of amino acids and alkyl amines [J]. Atmospheric Environment, 2001, 35(6): 1091-1104.
- [16] Milne P J, Zika R G. Amino acid nitrogen in atmospheric aerosols: Occurrence, sources and photochemical modification [J]. Journal of Atmospheric Chemistry, 1993, 16(4): 361-398.
- [17] Barbaro E, Zangrando R, Vecchiato M, et al. Free amino acids in Antarctic aerosol: Potential markers for the evolution and fate of marine aerosol [J]. Atmospheric Chemistry & Physics Discussions, 2015, 15(10): 1269-1305.
- [18] Scalabrin E, Zangrando R, Barbaro E, et al. Amino acids in arctic aerosols [J]. Atmospheric Chemistry & Physics, 2012, 12(21): 10453-10463.
- [19] Fonselius S. Amino acids in rainwater [J]. Tellus, 1954, 6(1): 90-90.
- [20] Sidle A B. Amino acid content of atmospheric precipitation [J]. Tellus, 1967, 19(1): 128-135.
- [21] Yang H, Xu J, Wu W S, et al. Chemical characterization of water-soluble organic aerosols at Jeju island collected during ACE-Asia [J]. Environmental Chemistry, 2004, 1(1): 13-17.
- [22] Yang H, Yu J Z, Ho S S H, et al. The chemical composition of inorganic and carbonaceous materials in PM<sub>2.5</sub> in Nanjing, China [J]. Atmospheric Environment, 2005, 39(20): 3735-3749.
- [23] Wedyan M A, Preston M R. The coupling of surface seawater organic nitrogen and the marine aerosol as inferred from enantiomer-specific amino acid analysis [J]. Atmospheric Environment, 2008, 42(37): 8698-8705.
- [24] Matsumoto K, Uematsu M. Free amino acids in marine aerosols over the western North Pacific Ocean [J]. Atmospheric Environment, 2005, 39

- (11) : 2163–2170.
- [25] Barbaro E , Zangrando R , Moret I , et al. Free amino acids in atmospheric particulate matter of Venice , Italy [J]. *Atmospheric Environment* , 2011 , 45( 28) : 5050–5057.
- [26] Gorzelska K , Galloway J N , Watterson K , et al. Water-soluble primary amine compounds in rural continental precipitation [J]. *Atmospheric Environment. Part A. General Topics* , 1992 , 26( 6) : 1005–1018.
- [27] Mandalakis M , Apostolaki M , Tziaras T , et al. Free and combined amino acids in marine background atmospheric aerosols over the eastern mediterranean [J]. *Atmospheric Environment* , 2011 , 45( 4) : 1003–1009.
- [28] Bianco A , Vuyard G , Deguillaume L , et al. Improving the characterization of dissolved organic carbon in cloud water: Amino acids and their impact on the oxidant capacity [J]. *Scientific Reports* , 2016 , 6: 37420.
- [29] Qi Z , Anastasio C. Free and combined amino compounds in atmospheric fine particles (  $PM_{2.5}$  ) and fog waters from Northern California [J]. *Atmospheric Environment* , 2003 , 37( 16) : 2247–2258.
- [30] Mopper K , Zika R G. Free amino acids in marine rains: Evidence for oxidation and potential role in nitrogen cycling [J]. *Nature* , 1987 , 325( 6101) : 246–249.
- [31] Hoischen C. Kurzes lehrbuch der biochemie für mediziner und naturwissenschaftler: Peter Karlson , Detlef Doenecke and Jan Koolman , Georg Thieme Verlag , Stuttgart , 1994 , xv + 580pp + accompanying leaflet , DM69. 00 ISBN: 3–13–357814–6 [J]. *Bioelectrochemistry & Bioenergetics* , 1996 , 40( 1) : 73.
- [32] Scheller E. Amino acids in dew-origin and seasonal variation [J]. *Atmospheric Environment* , 2001 , 35( 12) : 2179–2192.
- [33] Megregor K G , Anastasio C. Chemistry of fog waters in California’s central valley: 2. Photochemical transformations of amino acids and alkyl amines [J]. *Atmospheric Environment* , 2001 , 35( 6) : 1091–1104.

## A High Performance Liquid Chromatography Method for Measuring Dissolved Amino Acids in Rain

LONG Chaojun<sup>1 2</sup> , XIAO Huayun<sup>1</sup> , XU Yu<sup>1 2</sup> , ZHAO Jingjing<sup>1 2</sup>

( 1. State Key Laboratory of Environmental Geochemistry , Institute of Geochemistry , Chinese Academy of Sciences , Guiyang 550081 , China; 2. University of Chinese Academy of Sciences , Beijing 100049 , China)

**Abstract:** The dissolved free amino acids ( DFAA ) and the dissolved combined amino acids ( DCAA ) in rainwater were determined by the OPA/FMOC-HPLC-FLD method ( phthalaldehyde/9-fluorene methyl chloroformate-high performance liquid chromatography-fluorescence detector ) . Rainwater samples were acidified and then experienced following processes of adding internal standard , enriching by cation exchange resin column , eluting , lyophilizing and redissolving , then DFAA could be measured on HPLC; similarly , after concentrated , digested , lyophilized , and redissolved , DCAA could be measured on HPLC. The average relative standard deviations of retention times and peak areas for different amino acids were 0. 053% ( 0. 014%–0. 254% ) and 1. 219% ( 0. 223%–3. 846% ) , respectively. Except lysine , the limit of detection ( LOD ) and the limit of quantitation ( LOQ ) of other amino acids were 0. 90  $\mu\text{mol/L}$  ( 0. 19–1. 42  $\mu\text{mol/L}$  ) and 2. 95  $\mu\text{mol/L}$  ( 0. 39–4. 74  $\mu\text{mol/L}$  ) , respectively. The recoveries of spiked samples were 59. 87%–125. 72% with an average of 89. 58%. The blank recovery rates were 57. 47%–118. 74% with an average of 90. 60% , which ensured the accuracy of sample determination. The concentration of DCAA in rainwater of Guiyang measured by this method was 182. 44 nmol/L ( 27. 25–493. 87 nmol/L ) , of which methionine accounted for 24. 61%. The average concentration of DFAA in rainwater was 24. 59 nmol/L ( 3. 94–126. 45 nmol/L ) , the minimum content was tyrosine and the maximum content was serine. Our extraction and analysis methods can ensure the accurate and reliable quantification of amino acids in low concentration ranges and can be used for determining concentrations of amino acids in rainwater.

**Key words:** high performance liquid chromatography; dissolved amino acids; rainwater; extraction