

低能氮离子注入羧酸水溶液合成氨基酸

石怀彬* 邵春林 余增亮

(中国科学院等离子体物理研究所 合肥 230031)

摘 要 利用气体火花放电产生离子, 以低能氮离子注入两种羧酸的水溶液中, 利用高效液相色谱 (HPLC) 对离子注入后的样品进行分析。结果表明, 氮离子注入可使氮沉积在溶液中, 生成氨基酸及其它氨基化产物, 这一结果不仅验证了低能离子注入样品时的“质量沉积”效应, 而且还是原始地球条件下氨基酸生成的一种可能的途径。

关键词 离子注入 氨基酸 HPLC 质量沉积 前生物合成

Synthesis of Amino Acids by Low Energy N^+ Implanting into Carboxylic Acid Solutions

Shi Huaibin, Shao Chunlin, Yu Zengliang

(Center of Ion Beam Bio-engineering, Institute of Plasma Physics, the Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031)

Abstracts Low energy ions were produced by N_2 glow discharge, the positive ones were accelerated into acetic acid solution and propanoic acid solution respectively to induce chemical reactions. Samples were analyzed by a Waters 600 HPLC analyzer. It showed that N was deposited into the solution, ammonia and amino acids were produced by such kind of implantation, for acetic acid solution, glycine (Gly) was found, for propanoic acid solution, they were glycine (Gly), serine (Ser) and alanine (Ala). Mechanism of the production of ammonia and amino acids were discussed. As amino acids were synthesized in solution under oxidative atmosphere, this method overcame the defaults of the old ones which needed reducing conditions or a gaseous atmosphere. It was generally thought that life was born in oceans and there were a large amount of low energy particles near the surface of the original earth generated from thunder, lightening, volcano and emission of radioactive elements in the crust which might have played an important role in the chemical origin and evolution of life. The results we gained not only confirmed the “mass deposition effect” of low energy ion implantation, but also presented a possible way for the transferring of N from air to oceans and the production of ammonia and amino acids under primitive earth conditions.

Key words Ion implantation, Amino acids, HPLC, Mass deposition, Prebiotic synthesis

世纪 80 年代, 中国科学家率先提出低能离子注入生物样品进行遗传改良等生物效应的研究。在过去的十几年里, 低能离子束辐照生物样品作为一种崭新的辐照手段, 被成功地用于农作物及微生物诱变育种、细胞加工及基因工程等多个方面^[1~3]。但受传统注入装置的限制, 一直未能开展低能离子与溶液样品作用的研究。而水是生物体维系生命的首要因素, 本文利用新设

石怀彬 男, 30 岁, 讲师, 从事辐射生物学研究。E-mail: shihuaibin@sina.com
国家自然科学基金资助项目(29772033)
2001-06-11 收稿, 2001-07-28 修回

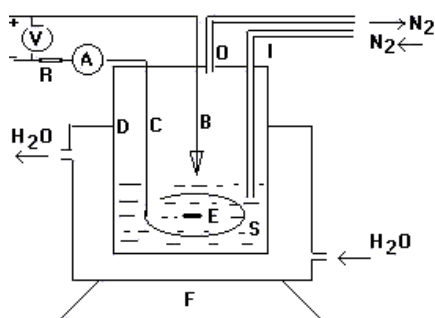
计的装置, 研究低能离子与水溶液样品的相互作用。

氨基酸的前生物合成已经进行了很多, 以往的研究大多是在强还原性的气体介质中进行的, 如果反应在非还原性介质中进行则很难产生氨基酸^[4,5], 但目前人们对原始大气的还原性及其维持的时间尚有很大分歧^[6]。一般认为生命诞生于海洋, 因而模拟原始地球条件研究水溶液中氨基酸的合成反应是很有意义的。本文在非还原性介质中将氮转入水溶液中, 形成氨基酸, 这种类型反应的研究可能对我们理解原始地球上氨基酸的产生具有重要意义。

1 实验部分

1.1 实验装置

为了模拟研究低能离子与水溶液的相互作用, 笔者设计了图 1 所示的实验装置。在图 1 中, B 为针状不锈钢阳极, C 为银丝, R 为限流电阻, 阻值 450k Ω 。当阴阳极之间的电位差达到一定值后, 其间的气体将电离产生等离子体, 其中的阳离子在阳极与水面的鞘层中得到加速后进入水溶液, 诱发水溶液中的化学反应^[7]。



1.2 实验方法

乙酸为温州市试剂化工厂产品, 化学纯; 丙酸为上海五联化工厂产品, 分析纯; 衍生试剂 AccQ.FluorTM2A、2B, AccQ.FluorTM 缓冲液, AccQ.TagTM Eluent A (流动相 A), Amino Acid Standard H (氨基酸标样) 均为 WATERS 公司产品, 光谱纯。其余试剂均为分析纯。

图 1 低能离子与水溶液的相互作用模拟装置图

B: 阳极; C: 阴极; D: 玻璃容器; E: 搅拌子;
F: 磁力搅拌器; I: 进气口; O: 出气口;
R: 电阻; S: 溶液样品

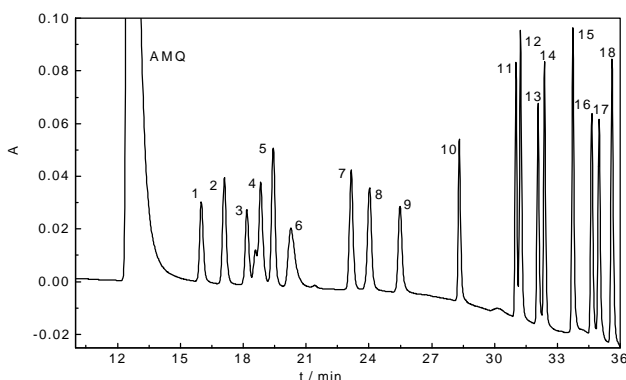


图 2 氨基酸标样的 HPLC 谱图

(半胱氨酸浓度为 $1.25 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 氮及其余氨基酸浓度均为 $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

1: 门冬氨酸; 2: 丝氨酸; 3: 谷氨酸; 4: 甘氨酸; 5: 组氨酸; 6: 氮; 7: 精氨酸; 8: 苏氨酸; 9: 丙氨酸; 10: 脯氨酸; 11: 半胱氨酸; 12: 酪氨酸; 13: 缬氨酸; 14: 甲硫氨酸; 15: 赖氨酸; 16: 异亮氨酸; 17: 亮氨酸; 18: 苯丙氨酸

用二次蒸馏水配制一定浓度乙酸、丙酸溶液, 分别取 20mL 二次蒸馏水、乙酸、丙酸加入放电室 (即图 1D)。向放电室内通入高纯氮 (>99.99%) 5~10min 后, 接通电源, 调节输入电压为 3kV, 稳定放电后电流 6mA。以冷凝水保持反应温度在 20~30°C 之间, 定时取出少量反应液, 待分析。为减少实验中的污染, 所有玻璃仪器在使用前均于 500°C 烘烤 4 h。试样用 AccQ.TagTM 方法衍生后在 Waters-600 型高效液相色谱仪(HPLC)进行分析, 色谱柱为 Waters-Pico-tag 氨基酸分析柱 (3.9mm×15cm), 流动相 A 为 waters 公司 AccQ.TagTM Eluent A 以二次蒸馏水稀释 10 倍, 加入少量磷酸精确调节 pH 至 4.95。流动相 B 为 60%乙腈与 40%二次蒸馏水混合液, 加入少量丙酮。紫外检测波长 254nm, 柱温 37°C, 梯度分离。以 waters 公司 Amino Acid Standard H 为氨基酸标样, 试样衍生方法及分离梯度参考文献[8, 9]。

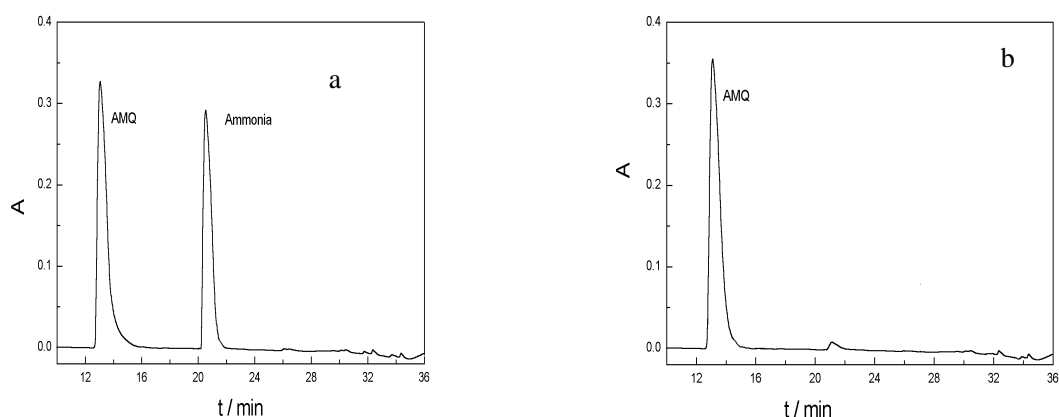


图 3 二次蒸馏水经低能 N^+ 处理 10h 样的 HPLC 谱图

a 样品; 确 b 对照

原料: 20mL 水; 电压: 3kV; 电流 6mA; 温度: 20~30°C

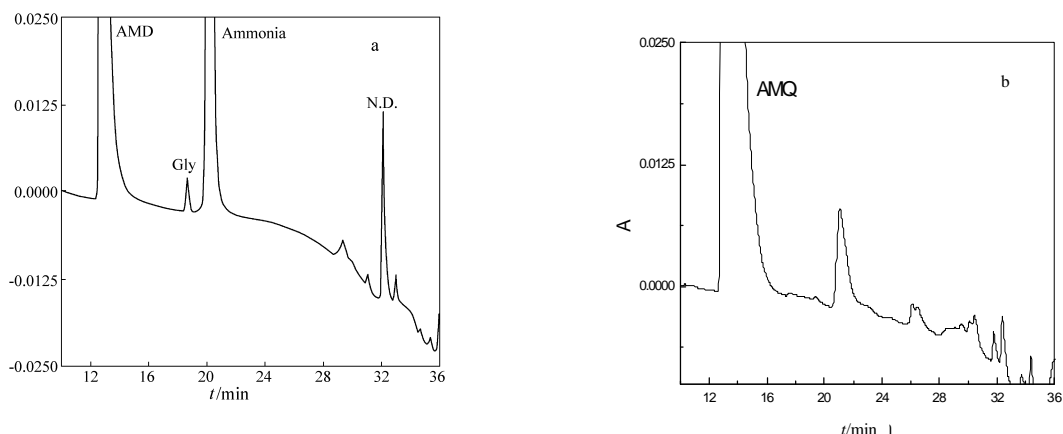


图 4 乙酸水溶液经低能 N^+ 处理 10h 样 HPLC 谱图

a 样品; b 对照

原料: 6.67mmol 乙酸/20mL 水; 电压: 3kV; 电流: 6mA; 温度: 20~30°C

2 结果与讨论

样品及标样 HPLC 分析结果如图 2~5 所示。图 2 为氨基酸标样谱图, 13.3min 为衍生试剂水解产物 AMQ 峰, 其余诸峰亦于图中标明。图 3、4、5 分别为二次蒸馏水、乙酸、丙酸水溶液经低能氮离子注入 10h 后的结果, 可见, 反应中均生成了大量的氨(NH_3), 两种羧酸经氮离子处理后均产生了甘氨酸(Gly, 19min), 丙酸溶液中还生成了丝氨酸(Ser, 17.3min)和丙氨酸(Ala, 25.3min)。

氮离子进入水溶液后发生的反应是十分复杂的, 可能诱发多种活性基团的产生, 如 $\cdot\text{OH}$, e_{aq}^- 等, 这些活性基团之间可以重新化合或进攻溶质分子, 形成产物。反应中氨及氨基酸生成的机理目前尚不清楚, 有待继续研究。

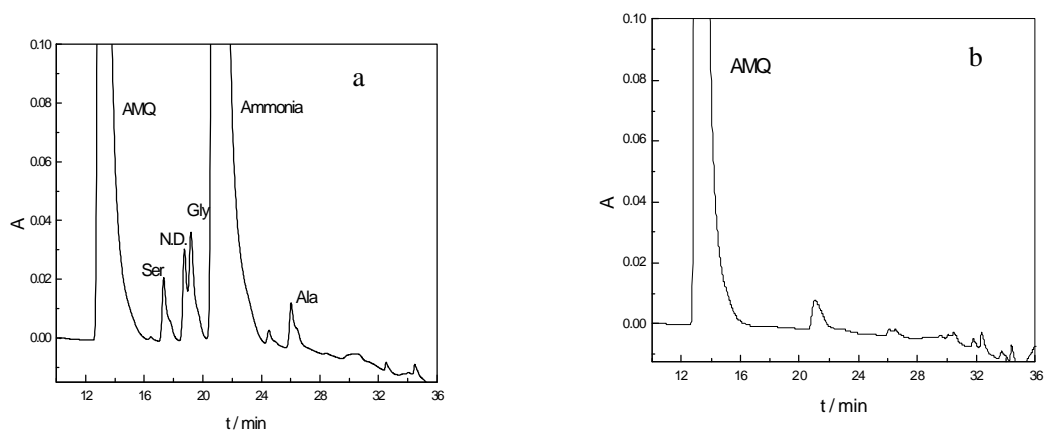


图 5 丙酸水溶液经低能 N^+ 处理 10 样 HPLC 谱图

a 样品; b 对照

原料: 6.67mmol 乙酸/20mL 水; 电压: 3kV; 电流: 6mA; 温度: 20~30°C

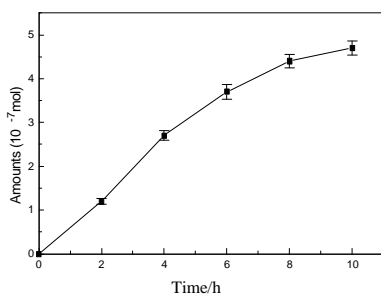


图 6 乙酸水溶液经 N^+ 注入后甘氨酸产额

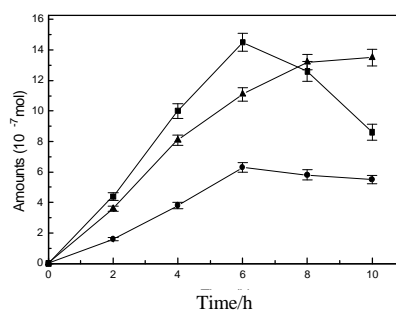


图 7 丙酸水溶液经 N^+ 注入后氨基酸产额

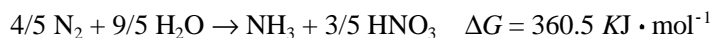
(■) 丙氨酸; (●) 丝氨酸; (▲) 甘氨酸

为了进一步确定图 4、5 中产物峰的归属, 将甘氨酸标样加入乙酸的放电产物中, 又分别将甘氨酸、丝氨酸与丙氨酸标样加入丙酸的放电产物中, 在同样条件下进行 HPLC 实验, 结果图

4 中 19min 峰、图 5 中 19min、17.3min 及 25.3min 峰的积分面积均随标样的加入而线性增加, 由此可以确认乙酸水溶液经 N^+ 注入后生成了甘氨酸, 而丙酸水溶液中还有丝氨酸及丙氨酸生成。图 4 中 32.6min 及图 5 中 18.5min 两峰可能为羧酸脱羧后的残基与溶液中氨基相结合形成的脂肪胺, 如甲胺、乙胺等, 目前尚没有确定。由此可见, 氮离子注入水溶液中的质量沉积效应是十分明显的, 而且由于注入使体系氧化性增强, 致使羧酸氧化降解。这种氧化性环境有别于以往氨基酸的前生物合成反应, 有可能是原始海洋中氨基酸产生的一种重要途径。

乙酸、丙酸水溶液经 N^+ 注入后氨基酸的产额可由标样浓度算出, 结果如图 6、7 所示。文中输入电压 3kV, 电流 6mA, 限流电阻 450k Ω , 电阻分压 2700V, 两电极间分压 300V, 为了确定溶液的分压, 将阳极接触水面, 此时电流为 6.5mA, 限流电阻分压 2925V, 溶液分压 75V, 由此算出溶液电阻为 11.5k Ω , 在实验条件下溶液分压 69V, 阳极与水面间的电位差为 231V, 即实验中 N^+ 的能量为 231eV。由于离子流通常仅占总电流的 1%^[12], 据此可估算出 N^+ 束流强度 $I^+ = 6 \times 10^{-3} \times 10^{-2} / (1.6 \times 10^{-19}) = 3.75 \times 10^{14}$ ion/s, 稳定放电时, 进入溶液的离子束斑约为 $F2mm$, 10h 内共注入的离子数 $= I^+ \times 36000 = 1.35 \times 10^{19}$, 单位时间内注入的能量为 $D = I^+ \times 231eV = 8.67 \times 10^{16} eV/s$, 10h 内共注入能量 $E = D \times 36000 = 3.1 \times 10^{21} eV$, 对于乙酸水溶液, 注入 10h 后, 甘氨酸的产额为 $9.1 \times 10^{-5} Gly/eV$, 其它氨基酸产额与注入能量的比值亦可由图 7 算出。

低能离子诱发水溶液中的反应是复杂的。氮作为空气中含量最多的一种元素, 在氢气存在时它很容易与之化合生成氨, 继而转化为其它含氮物质为生物体利用, 但若无氢气存在, 它与水的反应则非常困难^[10] :



由于氮是组成生物体的重要元素, 而氨则是许多含氮生物分子前生物合成的一种重要前体。另一方面, 以往氨基酸的前生物合成反应通常是在还原性的介质中进行的, 这对生命的起源与进化无疑是个巨大的障碍, 因为有人认为在原始地球形成不久, 由于氢的逃逸原始大气逐渐丧失了还原性, 而成为氧化性气体^[11]。本文在非还原性环境中, 通过简单的反应使氮以氨基的形式“沉积”在溶液中形成氨基酸。与以往的气体放电实验相比, 本文的特点是研究水溶液中的反应, 而水的存在对生命的起源与进化是至关重要的, 现代科学认为生命诞生于海洋, 通过长期的前生物反应, 原始海洋中已积累了大量的有机物, 如羧酸或羧酸盐等, 本文的反应有可能是原始大气中的氮在海洋中的沉积的重要方式, 对原始地球条件下氨基酸在海洋中的形成与积累具有意义。原始地球时气候条件十分恶劣, 由于太阳风、闪电、地球内部核辐射等活动频繁, 原始大气中低能离子诱发水溶液中的化学反应是普遍存在的, 这对生命的起源与进化可能产生过重要影响, 进一步的研究将在以后的文章中报道。

参考文献

- [1] Yu Z L. IEEE Trans.on Plasma Sci., 2000, 28 (1): 128~132.
- [2] Shao C L, Yao J M, Wang X Q et al. Radiat. Phys. Chem., 1998, 51 (2): 117~120.
- [3] Huang W D, Yu Z L, Zhang Y H. Nucl. Instr. Meth. Phys. Res., 1998, B134:202~208.
- [4] Miller S L. Science, 1953, 117: 528~529.
- [5] Sagan C, Bishun N K. Science, 1971, 173: 417~420.
- [6] Miller S L, 彭弈欣 译. 地球上生命的起源. 北京: 科学出版社, 1981:275~286.

- [7] Jian Y F. 静电手册翻译组译. 静电手册. 北京:科学出版社, 1981:98~106.
- [8] Cohen S, Antonis K M De. J. Chromatogr. A, 1994, 661: 25~34.
- [9] Cohn S, Michaud D. Anal. Biochem., 1993, 221: 279~287.
- [10] 余从焯, 欧育湘, 温敬铨. 物理有机化学. 北京:北京理工大学出版社, 1991, 49~78.
- [11] Wiess J G, Boynton C G. Nature, 1973, 243: 405~407.