

УДК 546.26

## ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОТОПОВ УГЛЕРОДА КАК КРИТЕРИЙ БИОЛОГИЧЕСКОГО ИЛИ НЕБИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

А. П. ВИНОГРАДОВ, Э. М. ГАЛИМОВ, Л. А. КОДИНА, В. Н. ГЕНЕРАЛОВА

*Институт геохимии и аналитической химии им. В. И. Вернадского АН СССР, Москва*

Установлено принципиальное различие во внутримолекулярном распределении изотопов углерода в биогенных и абиогенно синтезированных органических соединениях. В первом случае имеет место упорядоченное и предсказуемое в соответствии с величинами термодинамических изотопных факторов распределение изотопов углерода. Во втором случае изотопные эффекты не упорядочены по величине и по знаку.

Проблема распознавания природы органических соединений обычно возникает в ситуациях, где, с одной стороны, отсутствуют явные указания на их возможную биологическую предысторию, а с другой — имеются условия для абиогенного синтеза органических молекул из простых соединений (высокая температура, природные катализаторы или инициаторы реакций, восстановительная среда).

Достаточно сложные органические соединения обнаружены в настоящее время во многих магматических породах. Они встречаются в различных гидротермальных образованиях, вулканических пеплах и т. п. Вопрос о том, какого происхождения эти органические соединения, интересен как с точки зрения понимания тех условий, в которых возможен абиогенный синтез, так и с точки зрения оценки роли осадочного вещества в том или ином эндогенном процессе.

С проблемой идентификации биогенности органического вещества мы встречаемся также при попытках установить геологическую границу возникновения живого в наиболее древних осадочных отложениях.

Наконец, мы должны быть готовы к тому, чтобы при помощи аналитических методов распознать следы внеземных форм жизни.

Существует несколько подходов к оценке биологической или небιοлогической природы органических соединений, основанных на специфике биосинтеза.

1. *Оптическая активность.* В процессе биосинтеза молекулы, имеющие хиральные центры, как правило, образуются в виде одного энантиомера и, следовательно, обладают оптической активностью. Абиогенно синтезированные хиральные соединения всегда образуют рацематы.

2. *Типоморфные биологические соединения.* Существует ряд соединений, имеющих структуру, характерную для биологических систем. К числу их относятся, например, изопреноиды, порфирины и др.

3. *Неодинаковая распространенность термодинамических равноценных структурных форм в биологических системах.* Из бесчисленного разнообразия органических соединений в процессе биосинтеза образуется относительно ограниченное число молекулярных структур, существенно преобладающих над другими возможными формами. В качестве примера можно привести преобладание нормальных алифатических

структур над разветвленными, преобладание четных жирных кислот над нечетными. В продуктах биосинтеза подобного характерного распределения структур не наблюдается.

Однако по мере превращения органического вещества его характерные биологические признаки сравнительно быстро утрачиваются. Происходит рацемизация оптически активных форм. Выравнивается содержание термодинамически равноценных структур. Например, в нефтях

Таблица 1

Внутримолекулярное распределение изотопов углерода в биогенных соединениях и их синтетических аналогах

Название	Структура	Синтетическое		Биогенное	
		$\delta C^{13}, \%$	$\delta C^{13} OCH_3 - \delta C^{13} \text{ в целом}$	$\delta C^{13}, \%$	$\delta C^{13} OCH_3 - \delta C^{13} \text{ в целом}$
Транс-анетол OCH <sub>3</sub> -группа	<chem>CC(=C)C1=CC=C(OC)C=C1</chem>	-3,22 -6,87	-3,65	-2,80 -3,09	-0,29
Изоэвгенол OCH <sub>3</sub> -группа	<chem>CC(=C)C1=CC=C(OC)C=C1</chem>	-2,77 -4,97	-2,20	-3,08 -3,40	-0,32
Ванилин OCH <sub>3</sub> -группа	<chem>CC(=O)C1=CC=C(OC)C=C1O</chem>	-2,90 -4,44	-1,54	-2,99 -3,27	-0,28
Анисовая кислота OCH <sub>3</sub> -группа	<chem>CC(=O)OCC1=CC=C(OC)C=C1</chem>	-3,07 -9,33	-6,26		

содержание четных и нечетных алканов уже одинаково. Что касается так называемых типоморфных биогенных соединений, то многие из них, включая порфирины, синтезированы в лаборатории. Поэтому для веществ, прошедших длительную или жесткую химическую эволюцию, т. е. в случаях, представляющих наибольший интерес, проблема остается открытой.

В настоящей работе приводятся экспериментальные данные, показывающие, что существуют принципиальные различия во внутримолекулярном распределении изотопов углерода в биогенных и абиогенно синтезированных органических соединениях.

Это может обеспечить новый критерий для распознавания природы органических соединений.

Ранее было показано, что в биомолекулах изотопы углерода распределены упорядоченно [1—5]. Сущность обнаруженного явления состоит в том, что наблюдаемое распределение изотопов углерода в биомолекулах оказалось в тесной корреляции с величинами термодинамических изотопных факторов ( $\beta$ -факторов). Последние характеризуют вероятность концентрирования изотопа  $C^{13}$  в данной молекуле по сравнению с

Таблица 2  
Термодинамические изотопные факторы углерода в некоторых структурных группах

Структурная группа		$\beta_1$ -фактор
название	формула	
Метильная	$-\text{CH}_3$	1,131
Метеновая	$-\text{CH}_2-$	1,149
Метиновая	$=\text{CH}-$	1,166
Альдегидная	$-\text{CHO}$	1,170
Карбоксильная	$-\text{COOH}$	1,197
Метоксильная	$-\text{OCH}_3$	1,141

другими ( $\beta_x$ -фактор) или в различных структурных положениях углерода в одной молекуле ( $\beta_i$ -факторы) в состоянии равновесия изотопного обмена.

Важно отметить, что прямой изотопный обмен углерода между органическими соединениями вне биологических систем при нормальных температурах практически не происходит. Например, экспериментальное изучение изотопного обмена в системе  $\text{CH}_4-\text{C}_2\text{H}_6-\text{C}_3\text{H}_8-\text{C}_4\text{H}_{10}$  при температурах 20, 150, 300 и 500°С показало, что едва за-

метное изменение изотопного состава компонентов в течение 4-часового опыта фиксируется только при температуре выше 300°С [6]. Такое же изменение при 50°С было бы достигнуто за время более  $350 \cdot 10^6$  лет. Поэтому наблюдаемое распределение изотопов углерода в биомолекулах, отвечающее изотопно-обменному равновесию, может быть обусловлено только каталитическим характером биологических реакций. Иначе говоря, изотопный обмен осуществляется ферментами. При этом он должен быть локализован в пределах фермент-субстратного комплекса, отвечающего данной энзиматической реакции [5, 7, 8].

Биологическая специфичность механизма упорядоченного распределения изотопов в биомолекулах предполагает, что в соответствующих продуктах абиогенного синтеза такое упорядоченное распределение не должно иметь места.

С целью экспериментальной проверки этого положения мы провели исследование внутримолекулярного распределения изотопов углерода в ряде биологических соединений и их абиогенно синтезированных аналогов.

Исследовался ряд соединений, выделенных из растений, а именно транс-анетол, изоэвгенол, ванилин и анисовая кислота. Они содержат функциональную группу  $-\text{OCH}_3$  (метоксильную), которая является общей для всех этих соединений.

В синтетических аналогах метоксильная группа присоединялась химически, путем обработки соответствующего фенольного соединения диметилсульфатом, полученным из метилового спирта.

Исследовался изотопный состав углерода каждого соединения в целом и его метоксильной группы. Метоксильная группа отщеплялась при помощи иодистоводородной кислоты. При температуре кипения  $\text{HI}$  углерод метоксильной группы выделяется количественно в виде иодистого метила [9]. Иодистый метил выносился из реакционного сосуда током аргона и собирался в ловушке, охлаждаемой пентаном при температуре его плавления ( $-130^\circ\text{C}$ ). По окончании реакции иодистый метил размо- раживался и перепускался через кварцевую трубку с окисью меди, нагретой до 800°С. Полученная  $\text{CO}_2$  очищалась на ловушках с жидким азотом и пентаном при температуре плавления.

Изотопный анализ производился на масс-спектрометре МИ-1309, переоборудованном для прецизионных измерений изотопного состава. Точность анализа  $\pm 0,02\%$ . Изотопные отношения отнесены к стандарту

PDB ( $C^{13}/C^{12}=0,0112372$ ). Результаты измерений представлены в табл. 1.

В биогенных соединениях наблюдается небольшое устойчивое обогащение легким изотопом углерода  $ОСН_3$ -группы, отвечающее несколько меньшему значению  $\beta_1$ -фактора  $ОСН_3$ -группы ( $\beta_1=1,141$ , табл. 2) по сравнению с  $\beta_2$ -фактором соответствующих соединений. Последние составляют приблизительно 1,155—1,160.

В синтетических аналогах углерод метоксильной группы резко обогащен изотопом  $C^{12}$ , причем в существенно различной степени в отдельных соединениях. Исходный для углерода метоксильных групп синтетических соединений углерод метилового спирта имел  $\delta C^{13} = -3,45\%$ . Обогащенность углерода  $ОСН_3$ -группы изотопом  $C^{12}$  сверх этой величины в исследованных синтетических соединениях обусловле-

Таблица 3

Изотопный состав углерода карбоксильной группы и декарбоксилированного остатка аминокислот *Chlorella pyrenoidosa* [10]

Аминокислота	$\delta C^{13}, \%$		$\delta C^{13}_{COOH-}$ $\delta C^{13}_{остаток}$	Аминокислота	$\delta C^{13}, \%$		$\delta C^{13}_{COOH-}$ $\delta C^{13}_{остаток}$
	декар-бок-силро-ванный остаток	карбок-сил-ная группа			декарбок-силро-ванный остаток	карбок-сил-ная группа	
Глутаминовая	-2,11	-0,88	+1,23	Аланин	-1,18	-0,73	+0,45
Аспарагиновая	-1,56	+0,22	+1,78	Изолейцин	-2,20	-0,74	+1,46
Серин	-0,99	+0,25	+1,24	Лейцин	-2,60	-1,63	+0,97
Треонин	-1,92	-0,05	+1,87	Лизин	-2,09	+0,25	+1,84
Глицин	-2,33	-0,53	+1,80	Аргинин	-2,26	-0,27	+1,99
				Тирозин	-2,28	+0,41	+1,87

на, очевидно, кинетическим изотопным эффектом на метиловом спирте или диметилсульфате, т. е. преимущественным реагированием  $C^{12}H_5OH$  и  $(C^{12}H_5)_2SO_4$  в процессе метилирования.

В общем случае из кинетических соображений следует ожидать обогащения легким изотопом углерода структурной группы, присоединяемой к органической молекуле в процессе абиогенного синтеза. В то же время в биомолекулах углерод структурной группы может быть как обогащен, так и обеднен легким изотопом в зависимости от соотношения величин термодинамических изотопных факторов ( $\beta_1$ -факторов) углеродных структур, входящих в состав молекулы.

Как видно из табл. 2, метоксильная группа обладает относительно низкой величиной  $\beta_1$ -фактора. Поэтому в исследованных нами биомолекулах углерод метоксильной группы обогащен легким изотопом относительно соответствующего соединения в целом.

Из той же таблицы видно, что другая важная кислородсодержащая группа — карбоксильная — характеризуется весьма высоким значением  $\beta_1$ -фактора. Следовательно, в составе биомолекул углерод ее должен быть обогащен тяжелым изотопом. Действительно, еще со времени работы Ф. Абелсона и Т. Хоринга [10] известно, что карбоксильные группы аминокислот обогащены изотопом  $C^{13}$  (табл. 3).

Это наблюдение получило теперь объяснение в рамках представлений о термодинамически упорядоченном распределении изотопов углерода в биомолекулах.

В рассматриваемой связи приобрели новый смысл опубликованные в одной из давних работ [11] результаты измерений изотопного состава карбоксильного углерода нескольких образцов коммерческой уксусной кислоты, синтез которой осуществлялся путем окисления углеводородов. В табл. 4 представлены данные из этой работы, пересчитанные к стандарту PDB.

Таблица 4

Внутримолекулярное распределение изотопов углерода  
в синтетической уксусной кислоте [11]

Способ получения	$\delta C^{13}$		$\delta C_{COOH}^{13}$ $\delta C_{CH_3}^{13}$
	CH <sub>3</sub>	COOH	
Окисление этилена	-3,95	-4,05	-0,08
Окисление пропана+бутана	-3,54	-4,06	-1,02

Как видно из табл. 4, углерод карбоксильной группы, образовавшейся в результате химического окисления углеводородов, обогащен легким изотопом в противоположность карбоксильному углероду в биомолекулах. К этому следует добавить, что в биогенной уксусной кислоте, выделенной из продуктов брожения, как сообщил нам Д. Хейес [12], им было установлено следующее распределение изотопов углерода:  $\delta C_{CH_3}^{13} = -3,49\%$  и  $\delta C_{COOH}^{13} = -1,65\%$ , т. е. углерод карбоксильной группы, как и следовало ожидать, оказался обогащен тяжелым изотопом ( $\Delta C^{13} = +1,84\%$ ).

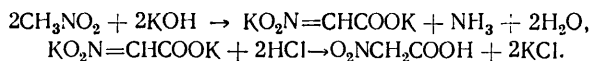
Следующий эксперимент, поставленный нами в связи с рассматриваемой проблемой, заключался в контролируемом синтезе абиогенного соединения. В качестве такового была выбрана аминокислота — глицин ( $CH_2NH_2COOH$ ).

Путь синтеза был выбран таким образом, чтобы как карбоксильный, так и метильный углерод имели один и тот же исходный углерод.

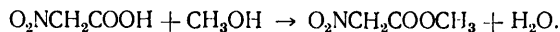
Второе условие состояло в том, чтобы в процессе синтеза не возникло каких-либо кинетических преимуществ при образовании одной из этих структур, т. е. по возможности избежать кинетического изотопного эффекта и, таким образом, проверить возможность возникновения внутримолекулярного термодинамического (изотопно-обменного) эффекта при абиогенном синтезе.

Искусственно приготовленный препарат глицина был получен следующим образом.

В качестве исходного продукта использовался нитрометан, из которого была получена нитроуксусная кислота в соответствии со следующей схемой:



Выход нитроуксусной кислоты из ее дикалиевой соли составляет 60—70%. С целью стабилизации препарата продукт получали в виде эфира:



Выход метилового эфира составляет ~60%. Далее метиловый эфир нитроуксусной кислоты восстанавливали водородом в присутствии никелевого катализатора



Полученный продукт очищали на катионитной колонке Дауэкс-50. Аминокислота вымывалась 3—5%-ным водным раствором аммиака. Фракция упаривалась на роторном испарителе при 60°С и препарат перекристаллизовывался из воды.

Синтетический глицин далее подвергался декарбоксилированию путем реакции с нингидрином и на масс-спектрометре МИ-1309 произво-

дился изотопный анализ глицина и его карбоксильной группы. Результаты внутримолекулярного распределения изотопов углерода в искусственно синтезированном глицине приведены ниже.

Глицин в целом $\delta C^{13}$ , %	Карбоксильная группа $\delta C^{13}$ , %
—0,64	—0,65

Провоцируемый внутримолекулярный изотопный эффект мог возникнуть на стадии образования дикалиевой соли нитроуксусной кислоты в момент включения углерода нитрометана в состав двух различных структурных групп:  $N=CH-$  ( $\beta_i=1,156$ ) и  $-COO$  ( $\beta_i=1,197$ ).

Результаты анализа показывают, что разделения изотопов в процессе абиогенного синтеза глицина не произошло. Таким образом, выявляется принципиальное различие во внутримолекулярном распределении изотопов углерода в биологических и абиогенно синтезированных органических соединениях. В первом случае имеет место упорядоченное и предсказуемое распределение изотопов в соответствии с величинами термодинамических изотопных факторов. Во втором случае изотопные эффекты не упорядочены по величине и по знаку. Они зависят от частных условий и способа синтеза данного соединения.

Имея в виду возможность использования этого явления в качестве критерия для распознавания биогенных и абиогенных органических соединений, следует подчеркнуть два обстоятельства.

Это, во-первых, консервативность изотопного распределения. Из химии и геохимии изотопов углерода известно, что изотопное распределение в органических соединениях сохраняется подчас при глубоких превращениях вещества, когда первоначальный химический облик соединения бывает в значительной степени утрачен.

Во-вторых, что особенно важно для распознавания примитивных древних форм жизни, а также, возможно, внеземных форм жизни, упорядоченное внутримолекулярное распределение изотопов в биологических системах связано с наиболее глубоким и универсальным биологическим механизмом — механизмом действия ферментов. Поэтому внутримолекулярное распределение изотопов представляется наиболее универсальным признаком, который может быть положен в основу распознавания биологических и небιологических соединений.

Поступила в редакцию  
26 декабря 1975 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Галимов Э. М. Тез. докл. IV Всес. совещ. по стабильным изотопам. Изд. ГЕОХИ АН СССР, М., 1972.
2. Галимов Э. М. Изотопы углерода в нефтегазовой геологии. «Недра», М., 1973.
3. Galimov E. M. Organic geochemistry of carbon isotopes. *Advanc. Org. Geochemistry*, Edit. Technip, p. 439, 1973.
4. Galimov E. M. Biogenic intramolecular and intermolecular carbon isotope effects. Method of isotopic numbers of bindings. *Biochemical and geochemical applications. Intern. Meet. Isotope effects. Phys. Chem. Processes*, Cluj, June, 1973.
5. Galimov E. M. Intramolecular carbon isotope effects. *Gordon Res. Confer. Phys. Chem. Isotopes, Asilomar, U. S. A.*, 1—5 July, 1974.
6. Галимов Э. М., Посягин В. И., Прохоров В. С. *Геохимия*, № 8, 1972.
7. Галимов Э. М., Ширинский В. Г. *Геохимия*, № 4, 1975.
8. Galimov E. M. A method of identification of biogeneus and nonbiogeneus organic molecules by study of intramolecular carbon isotope distribution. *Intern. Lunar Conference, Royal Soc., London*, 9—12 June 1975.
9. Губен-Вейль. *Методы органической химии*, т. 3. Методы анализа. «Мир», М., 1963.
10. Abelson P. H., Hoering T. C. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 47, p. 623, 1961.
11. Yankwich P. E., Promislov A. L. *J. Amer. Soc.*, v. 75, p. 4881, 1953.
12. Meinschein W. G., Rinaldi G. G., Hayes J. M., Schoeller D. A. Intramolecular isotopic order in biological produced acetic acid. *Science*, 1975.

INTRAMOLECULAR DISTRIBUTION OF CARBON ISOTOPES  
AS A CRITERION OF THE BIOLOGICAL AND NON-BIOLOGICAL  
ORIGIN OF ORGANIC COMPOUNDS

A. P. VINOGRADOV, E. M. GALIMOV, L. A. KODINA, V. N. GENERALOVA

*V. I. Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry,  
USSR Academy of Sciences, Moscow*

A difference of principle in the intramolecular distribution of carbon isotopes in biogenic and abiogenetically synthesized organic compounds has been established. In the first case an ordered and predictable distribution of carbon isotopes according to the values of thermodynamical isotopic factors is taking place. In the second case the isotopic effects do not correspond to that and are not ordered according to the magnitude and to the sign.

---