

УДК 546.26

## УПОРЯДОЧЕННОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОТОПОВ УГЛЕРОДА В ИНДИВИДУАЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЯХ И КОМПОНЕНТАХ ЛИПИДНОЙ ФРАКЦИИ ОРГАНИЗМОВ

Э. М. ГАЛИМОВ, В. Г. ШИРИНСКИЙ

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

Исследован изотопный состав углерода узких фракций и индивидуальных соединений липидов, выделенных из образцов растений и зооплankтона. Показано наличие тесной связи изотопного состава углерода и величин  $\beta$ -факторов исследованных липидов, что приводит к выводу о изотопно-обменном равновесии углерода в исследованной системе. Предполагается теоретически возможная модель реализации термодинамических изотопных эффектов в биологических системах на основе изотопно-обменного равновесия между ферментным комплексом и синтезируемой углеродной структурой.

В работах [1—3] было высказано утверждение, что в биологических системах существует упорядоченное внутримолекулярное и межмолекулярное распределение изотопов углерода, природа которого такова, что это распределение может быть описано в терминах изотопной термодинамики.

Фракционирование изотопов углерода живыми организмами было установлено давно и составляет одну из определяющих черт всей геохимии стабильных изотопов углерода. Биологический изотопный эффект заключается прежде всего в том, что углерод живых организмов обогащен изотопом  $C^{12}$  по сравнению с исходной  $CO_2$  и бикарбонатом. Помимо того, установлены различия в изотопном составе углерода отдельных биохимических фракций (липидов, белков, углеводов [4—6]), индивидуальных соединений (аминокислот [5], жирных кислот [7]), а также различия между изотопным составом углерода карбоксильных групп, аминокислот и декарбоксилированного остатка [5]. Считалось, что биологические изотопные эффекты имеют кинетическую природу, т. е. так или иначе обусловлены большей подвижностью  $C^{12}$ -форм по сравнению с  $C^{13}$ -формами и большей лабильностью  $C^{12}$ -X связей по сравнению с  $C^{13}$ -X связями.

После того как был разработан метод оценки термодинамических изотопных факторов сложных органических соединений [1—3, 8—11], выяснилось, что отмечающиеся ранее различия в изотопном составе углерода отдельных биохимических фракций имеют закономерный характер и находятся в тесной связи с величинами термодинамических изотопных факторов ( $\beta$ -факторов) соответствующих соединений (рис. 1).

Это привело к представлению об изотопно-обменном характере всей системы биологических изотопных эффектов, включая изотопный эффект фотосинтеза. При этом был сделан вывод, что имеет место не только упорядоченное межмолекулярное (в соответствии с  $\beta_x$ -факторами), но также упорядоченное и теоретически предсказуемое (в соответствии с  $\beta$ -факторами) внутримолекулярное распределение изотопов в биоорганических соединениях.

Если биогенные органические молекулы сохраняют присущий им «рисунок» внутримолекулярного распределения изотопов в ходе диагенетических превращений, что весьма вероятно, то возникает уникальная возможность идентификации конкретных биомолекулярных предшественников ископаемых органических соединений, например углеводородов нефти и любых других продуктов преобразования органического вещества. Становится ясно также, что обогащенность тяжелым или лег-

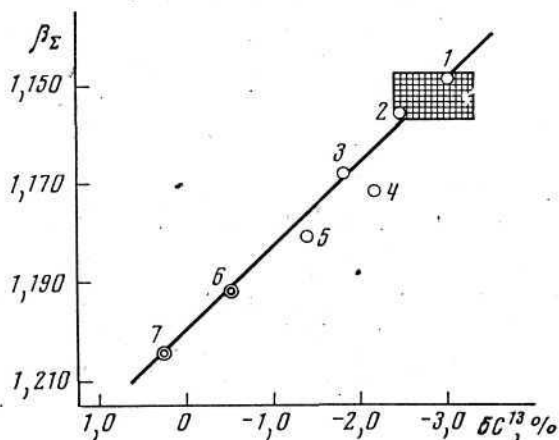


Рис. 1. Зависимость изотопных составов биохимических компонентов и исходного для биосинтеза неорганического углерода с величинами  $\beta_{\Sigma}$ -факторов соответствующих соединений

Заштрихованный прямоугольник ограничивает диапазон колебаний величин  $\delta C^{13}$  и  $\beta_{\Sigma}$ -факторов в исследованных компонентах липидной фракции. 1 — воска; 2 — хлорфилл; 3 — фенолы; 4 — аминокислоты; 5 — пектины; 6 —  $CO_2$ ; 7 — карбонат

ким изотопом продуктов превращения органического вещества, например углеводородов или углекислоты, обусловлена не только кинетическим изотопным эффектом, имеющим место в момент образования этих соединений, но и вследствие неравномерного внутримолекулярного распределения изотопов в значительной мере predetermined генетической принадлежностью углерода этих продуктов преимущественно к тем или иным структурным группам в составе исходного органического вещества. Это заставляет совершенно иначе взглянуть на те факторы, которые следует считать определяющими геохимическое поведение изотопов углерода, и позволяет использовать изотопный анализ углерода для решения принципиальных вопросов органической геохимии и в особенности нефтегазовой геохимии и геологии [3, 12].

Возникшие перспективы поставили на повестку дня необходимость гораздо более подробного, чем это имело место до сих пор, изучения изотопного состава углерода нативных биохимических компонентов и индивидуальных соединений, а также изучения внутримолекулярного распределения изотопов, механизмов его возникновения и условий, при которых это распределение может изменяться или метастабильно сохраняться вне организма.

Мы поставили целью в этой работе изучить распределение изотопов углерода в индивидуальных соединениях и узких, химически идентифицируемых фракциях, принадлежащих одному классу биохимических соединений, а именно липидам, с тем чтобы установить, насколько глубока установленная связь изотопного состава биогенных соединений с величинами термодинамических изотопных факторов, удастся ли обнаружить ее на уровне соединений, родственных по химическому строению, составу и механизму биосинтеза. В масштабе рис. 1 диапазон вариаций как величин  $\delta C^{13}$ , так и величин  $\beta$ -факторов, с которыми мы имели дело в этой работе, ограничен заштрихованным участком в правом верхнем углу графика.

Чтобы добиться необходимой для геохимических целей общности выводов, важно было подвергнуть сравнительному исследованию одноименные липидные фракции морских и пресноводных организмов, авто-

трофов и гетеротрофов, примитивных и более высокоорганизованных форм, водорослей и наземных растений. Мы попытались совместить эти требования, отобрав для изучения следующие четыре объекта: морские растения (ламинарию), морских рачков (крыль), речные синезеленые водоросли и луговой люпин.

Выбор липидов в качестве объекта исследования был предопределен особой геохимической ролью липидов как наиболее вероятных предшественников углеводов нефти.

#### ОБРАЗЦЫ И АНАЛИТИЧЕСКАЯ ПРОЦЕДУРА

Образцы морской водоросли (*Laminaria saccharina*) были собраны на Белом море в шельфовой зоне со среднегодовой температурой воды +5°С. Крыль — макрозоопланктон, представленный рачками вида *Euphausia superba* D., выловлен научно-исследовательским судном

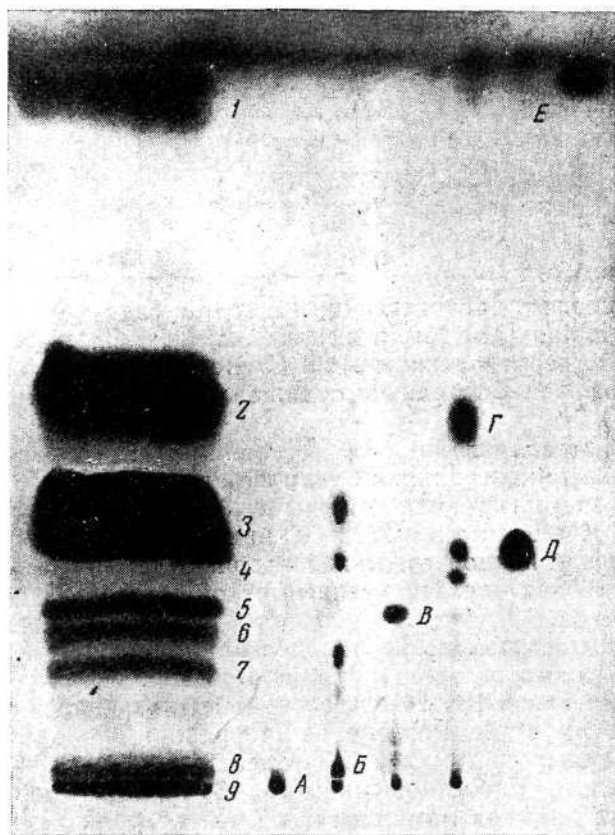


Рис. 2. Хроматограмма общих суммарных липидов крыля гексан-эфир-уксусная кислота (45 : 10 : 0,5)

1 — воска, углеводороды, эфиры стериннов; 2 — триглицериды; 3 — жирные кислоты; 4 — каротиноид (эхиненон); 5 — стерины; 6 — диглицериды; 7 — каротиноид (астацин); 8 — моноглицериды; 9 — полярные липиды. Свидетели: А — смесь фосфолипидов; Б — моноглицериды; В — стерины; Г — триглицериды; Д — жирные кислоты; Е — воска, эфиры стериннов

ВНИРО в летний период в антарктических водах моря Скоттия\*. Растения люпина (люпин желтый быстрорастущий — 4, *Lupinus luteus* L.) собраны на подмосковном опытном поле Института физиологии растений АН СССР. Синезеленые водоросли, широко распространенный прес-

\* Образцы крыля предоставлены К. А. Мрачковым.

## Результаты анализа липидной фракции синезеленых водорослей

Порядок расположения на хроматограмме	Компонент	Содержание, %	$\delta S^2$ , %	$\Sigma$
<i>Общие липиды</i>				
12	Полярные липиды	23,6	-3,16	—
11	Моноглицериды	6,8	-3,00	1,153
10	Каротиноид (миксоксантофилл)	4,8	-2,94	1,156
9	Диглицериды	8,1	-3,01	1,152
8	Хлорофилл	27,7	-2,84	1,157
7	Неидентифицировано	—	-3,00	—
6	Стерины ( $\beta$ -ситостерин)	2,7	-2,95	1,154
5	Каротиноид (эхиноенон)	—	-2,95	1,153
4	Жирные кислоты	4,9	-3,19	1,150
3	Каротиноид ( $\beta$ -каротин)	2,2	-3,15	1,151
2	Триглицериды	17,7	-3,05	1,152
1	Воска, углеводороды, эфиры стерinov	1,5	-3,23	1,149
<i>Полярные липиды</i>				
5	Кефалин	—	-3,03	1,152
4	Лецитин	—	-3,06	1,151
3	Фосфатидилинозит	—	-2,91	1,155
2	Сфингомиелин	—	-3,08	1,150
1	Фосфатидилсерин	—	-3,19	1,151

новодный микрофит, представленный в нашем случае на 96—98% родом *Апабаена variabilis* [13], были выловлены на р. Десне в жаркое лето 1972 г. при температуре воды +28°С. Все образцы до употребления были лиофилизированы. Крыль замораживался до -40°С и затем хранился при -18°С.

Липиды экстрагировали из объектов смесью хлороформ — метанол (2:1). Для каждой экстракции брали 20 г вещества и 100 мл экстрагента. Вещество экстрагировали дважды по 3 час при интенсивном перемешивании в гомогенизаторе [26]. Нелипидные гидрофильные примеси удалялись диффузионной отмывкой водой. Затем фильтрат упаривали на ротаторном испарителе. Полученный сухой остаток представляет собой сумму липидов.

Препаративное разделение липидов на фракции проводили методом тонкослойной хроматографии на силикагеле марки ЛС 5/40  $\mu$ +13% гипса (размер пластинок 18×24). Адсорбент активировался в течение 1 час при 105°С в термостате. Разделение на фракции проводилось в эмпирически подобранных системах растворителей: гексан-диэтиловый эфир — уксусная кислота в соотношении: 44:13:4 для липидов люпина; 44:11:1,5 для липидов ламинарии; 44:11:0,5 для липидов синезеленых водорослей; 45:10:0,5 для липидов крыля [14—16].

Пример разделения малополярных липидов показан на рис. 2. Порядок выхода фракций, на которые удалось разделить липиды исследованных образцов, приведен в табл. 1—4. Идентификация зон хроматограмм проводилась с помощью индивидуальных свидетелей и величин  $R_f$ . Хлорофилл и  $\beta$ -каротин были дополнительно идентифицированы по спектрам поглощения в различных растворителях. Состав стериновой фракции был определен по молекулярным спектрам на масс-спектрометре МИ-1309 при 100—110°С и энергии ионизации 70 э. в. (рис. 3).\*

При расчетах  $\beta$ -факторов применялись структурные формулы тех стерinov, молекулярные ионы которых преобладали в данных масс-

\* Авторы считают долгом выразить признательность В. Г. Заикину (ИНХС АН СССР) за помощь в получении и интерпретации масс-спектров.

Таблица 2

## Результаты анализа липидной фракции крыля

Порядок расположения на хроматограмме	Компонент	Содержание, %	$\delta C^{13}$ , %	$\Sigma$
<i>Общие липиды</i>				
9	Полярные липиды	2,6	-2,73	—
8	Моноглицериды	1,4	-2,70	1,153
7	Каротиноид (астацин)	1,8	-2,57	1,156
6	Диглицериды	1,7	-2,71	1,152
5	Стерины (холестерин)	8,0	-2,70	1,154
4	Пигмент (эхиненон)	1,9	-2,69	1,153
3	Жирные кислоты	64,5	-2,81	1,150
2	Триглицериды	12,6	-2,73	1,152
1	Воска, углеводороды, эфиры стеринов	5,5	-2,98	1,149
<i>Полярные липиды</i>				
3	Кардиолипин	—	-2,78	1,153
2	Лецитин	—	-2,84	1,151
1	Сфингомиелин	—	-2,86	1,150

Таблица 3

## Результаты анализа липидной фракции люпина

Порядок расположения на хроматограмме	Компонент	Содержание, %	$\delta C^{13}$ , %	$\Sigma$
<i>Общие липиды</i>				
12	Полярные липиды	36,1	-3,20	—
11	Моноглицериды	3,0	-3,14	1,153
10	Пигмент (лютеин)	6,6	-3,11	1,154
9	Диглицериды	3,6	-3,21	1,152
8	Хлорофилл + ксантофилл	24,3	-2,97	1,155
7	Хлорофилл	10,2	-2,90	1,157
6	Неидентифицировано	0,7	-2,92	—
5	»	0,9	-3,14	—
4	Стерины ( $\beta$ -ситостерин)	7,1	-2,96	1,154
3	Жирные кислоты	1,2	-3,27	1,150
2	Триглицериды	0,3	-3,23	1,152
1	Воска, углеводороды, эфиры стеринов	6,0	-3,35	1,149
<i>Полярные липиды</i>				
7	Моногалактозилглицерид	—	-3,20	1,155
6	Кефалин	—	-3,27	1,152
5	Лецитин	—	-3,28	1,151
3	Фосфатидилсерин	—	-3,31	1,151

Таблица 4

## Результаты анализа липидной фракции ламинарии

Порядок расположения на хроматограмме	Компонент	Содержание, %	$\delta C^{13}$ , %	$\Sigma$
<i>Общие липиды</i>				
8	Полярные липиды	45,6	-2,26	—
7	Моноглицериды	6,6	-2,50	1,153
6	Каротиноид (фукоксантин)	14,9	-2,37	1,154
5	Хлорофилл	20,8	-2,16	1,157
4	Стерины (фукостерин)	3,8	-2,45	1,154
3	Жирные кислоты	3,8	-2,56	1,150
2	Триглицериды	1,1	-2,48	1,152
1	Воска, углеводороды, эфиры стеринов	3,4	-2,78	1,149

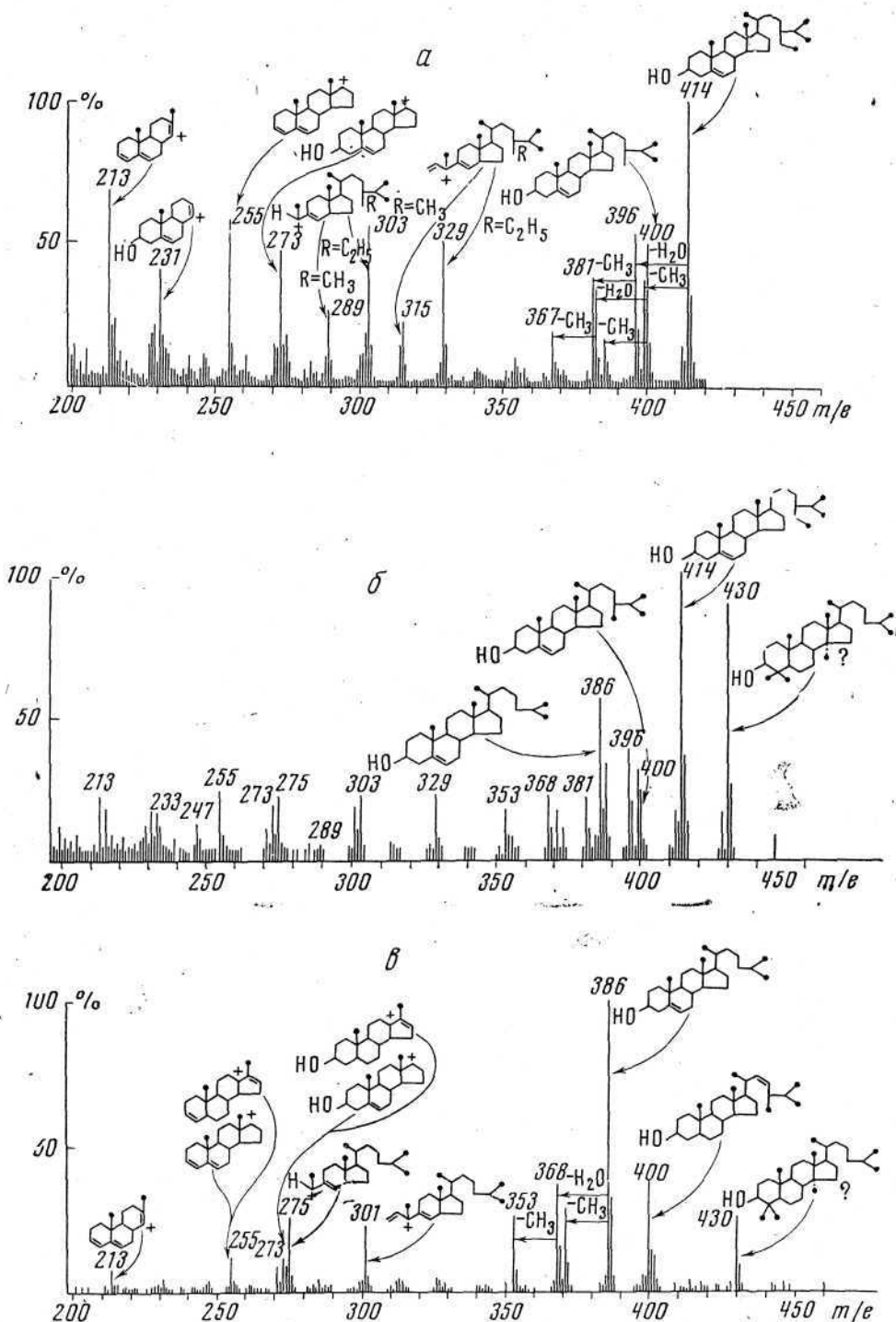


Рис. 3. Масс-спектры стероидов и характер фрагментации основных молекулярных ионов  
 а — стероиды люцина; б — стероиды синезеленых водорослей; в — стероиды криля

спектрах [19, 20]. Для ламинарии принят фукостерин как характерный стерин бурых водорослей [17].

Фракции каротиноидов предположительно идентифицировались по наиболее характерным каротиноидам данного вида, а их положение на хроматограмме — по степени полярности этих каротиноидов [18].

В липидах синезеленых водорослей помимо  $\beta$ -каротина специфическими каротиноидами являются миксоксантофилл и эхиненон [18]. В применяющейся системе растворителей каротиноиды занимают на хроматограмме положение № 10, 5, 3 (табл. 1). Каротиноид № 3 идентифицирован по его спектрам поглощения как  $\beta$ -каротин. Поскольку

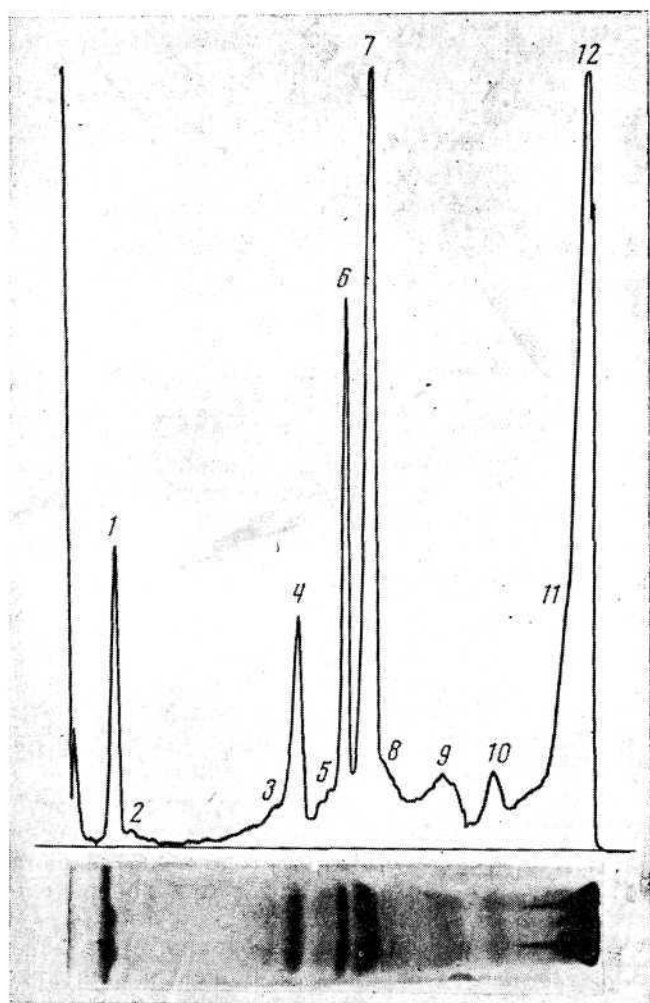


Рис. 4. Хроматограмма общих суммарных липидов люпина, полученная методом фотоденситометрии на «Silufol». Гексан — эфир — уксусная кислота (44:13:4)

0 — фронт растворителя; 12 — полярные липиды; 11 — моноглицериды; 10 — каротиноид; 9 — диглицерид; 8 — хлорофилл + ксантофиллы; 7 — хлорофилл; 6 — неидентифицировано; 5 — неидентифицировано; 4 — стерины; 3 — жирные кислоты; 2 — триглицериды; 1 — воска, углеводороды, эфиры стерина

миксоксантофилл — сильно полярное соединение, то его с очевидностью можно отнести к положению № 10. В положении № 5 должен находиться эхиненон.

Отдельные фракции элюировали системами растворителей различной степени полярности. Элюаты упаривались на роторном испарителе. Количественный анализ фракционного состава липидов проводился на универсальном автоматическом интегрирующем денситометре с использованием хроматографии на пластинках «Silufol» (системы растворителей, названы выше). Результаты представлены в табл. 1—4. Пример

денситометрии приведен на рис. 4. Фосфолипиды выделялись из отдельной навески липидов [25]. Для удаления нелипидных включений фильтрат липидов обрабатывали 0,29-ным раствором NaCl, отстаивали в темноте в течение суток и липидную часть отделяли в колбу. Фосфолипиды осаждали холодным ацетоном ( $t = -5 - 6^\circ$ ), центрифугировали и взвешивали. Для разделения фосфолипидов

использовались пластинки размером  $13 \times 18$  с силикагелем марки ЛС 5/40  $\mu + 13\%$  гипса в системе растворителей хлороформ — метанол — аммиак (65:25:5) [21—24]. В качестве универсальных проявителей использовали пары иода или фосфорномолибденовую кислоту. Идентификацию фосфолипидов проводили с помощью индивидуальных свидетелей: фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин, фосфатидилинозит, сфингомиелин\*. Кроме того, для идентификации применяли цветные реакции на фосфолипиды [21].

Пример разделения полярных липидов показан на рис. 5. Для сведения к минимуму возможных артефактных явлений все процедуры тонкослойной хроматографии проводились в мягких условиях.

Для сжигания липидов до  $\text{CO}_2$  сухие фракции растворяли в небольшом объеме растворителей и переносили в кварцевый тигель, который помещали в безградиентный реактор универсальной системы сжигания [27]. После тщательного удаления растворителя (что контролировалось по показанию вакуумметра) фракции были сожжены и ампулы с  $\text{CO}_2$  направлены на анализ  $\text{C}^{13}/\text{C}^{12}$ .

Измерения отношения изотопов углерода проводились на масс-спектрометре МИ-1305 методом компенсации. Точность метода  $\pm 0,02\%$  при доверительной вероятности 0,95.

Помимо изотопного анализа выделенных липидных компонентов для каждого исследованного организма проводилось определение изотопного состава суммарного углерода биомассы, остаточного органического

вещества после экстрагирования, суммарного углерода липидной фракции, а также изотопного состава суммы аминокислот. Эти данные представлены в табл. 5.

#### РАСЧЕТ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ ИЗОТОПНЫХ ФАКТОРОВ ИССЛЕДОВАННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Методический принцип, который мы осуществляем в этой работе, состоит в сравнительном анализе измеренных значений изотопного состава углерода выделенных биохимических компонентов с расчетными величинами ( $\beta$ -факторами) термодинамических изотопных факторов соответствующих соединений. Последние получены, исходя из концепции

\* Авторы благодарны Г. В. Новицкой (ИФР АН СССР) за предоставление свидетелей фосфолипидов.



Изотопный состав суммарного углерода фракций исследованных организмов

Исследованный объект	$\delta^{13}C, \%$			
	общий углерод биомассы	суммарный углерод липидной фракции	углерод суммы аминокислот	остаточный углерод после экстрагирования липидов
Ламинария	-1,84	-2,51	—	-1,70
Люпин	-2,76	-3,30	-2,60	-2,65
Крыль	-2,52	-2,87	-2,40	-2,43
Синезеленые водоросли	-2,75	-3,22	-2,64	-2,68

термодинамических внутримолекулярных изотопных эффектов и метода изотопических чисел связей, которые, как упоминалось, были введены и развиты недавно одним из авторов статьи.

Известно, что термодинамический изотопный эффект молекулярной системы определяется отношением термодинамических изотопных факторов ( $\beta$ -факторов), которые в свою очередь являются функциями температур и колебательных частот. Было показано, что для многоатомных органических соединений, содержащих атомы углерода, неэквивалентные в отношении обмена, каждая молекула должна быть охарактеризована числом  $\beta$ -факторов, равным числу групп эквивалентных атомов в молекуле [3].

Коэффициент разделения изотопов между соединениями, содержащими неэквивалентные атомы, можно выразить через отношения их  $\beta_2$ -факторов, которые получаются суммированием  $\beta_1$ -факторов, представляющих отношения статистических сумм монозамещенных изотопных форм по каждому обменивающемуся атому.

Ключевым стало предположение, что  $\beta_1$ -факторы представляют собой не просто формальные величины, служащие для определения  $\beta$ -фактора соединений как целого (т. е., как мы его теперь называем  $\beta_2$ -фактора), а отражают реальную вероятность накопления изотопа углерода в той структурной позиции, замещение по которой данная изотопная форма представляет. Это привело к введению понятия внутримолекулярных термодинамических изотопных эффектов.

Классический путь расчета  $\beta$ -фактора состоит в использовании известного квантовомеханического соотношения:

$$\beta = \prod_i^{3N-6} \frac{v_i^*}{v_i} \exp(-hv_i^*/2KT) \exp hv_i/2KT [1 - \exp(-hv_i/KT)] \times \\ \times [1 - \exp(-hv_i^*/KT)]^{-1},$$

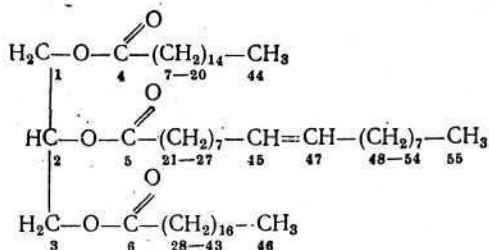
где  $v_i$  и  $v_i^*$  — колебательные частоты основной и замещенной тяжелым изотопом форм молекулы. Частоты связаны соотношением  $v = \sqrt{\lambda}/2\pi c$  с корнями  $\lambda$  векового уравнения:  $|GF - \lambda| = 0$ , где  $G$  и  $F$  — матрицы соответственно кинематических и силовых элементов. Сложность решения уравнения движения молекулы возрастает с увеличением числа атомов в молекуле. Достаточно сказать, что даже при расчете такого сравнительно простого соединения, как гексан, речь идет о решении уравнения 54 степени (без снижения порядка путем симметрирования). Но дело не только в технических трудностях, которые современная техника ЭВМ способна преодолеть. Экспериментальная спектральная характеристика сложных молекул, как правило, неполна и недостаточно точна. Между тем степень совпадения расчетного и экспериментального спектра служит критерием правильности подбора силовых постоянных матрицы  $F$ . Кроме того, число силовых постоянных всегда больше, чем число уравнений, которые можно составить при решении обратной спектральной

Термодинамические изотопные факторы исследованных соединений

Таблица 6

Соединение	Структурная формула	Обозначение $\beta$ -факторов	Набор изотопических чисел связей	$\beta_i$ -факторы	$\beta_{\Sigma}$ -факторы
1	2	3	4	5	6
Пальмитиновая кислота	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$ <p style="text-align: center;">1            2-15            16</p>	$\beta_1$ $\beta_{2-15}$ $\beta_{16}$	$3L_{\text{C-H}}, L_{\text{C-C}}$ $2L_{\text{C-H}}, 2L_{\text{C-C}}$ $L_{\text{C-C}}, L_{\text{C=O}}, L_{\text{C-O}}$	1,131 1,149 1,197	1,150
Олеиновая кислота	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-(\text{CH}=\text{CH})-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$ <p style="text-align: center;">1            2-15            16    17            18</p>	$\beta_1$ $\beta_{2-15}$ $\beta_{16,17}$ $\beta_{18}$	$3L_{\text{C-H}}, L_{\text{C-C}}$ $2L_{\text{C-H}}, 2L_{\text{C-C}}$ $L_{\text{C-H}}, L_{\text{C-C}}, L_{\text{C=C}}$ $L_{\text{C-H}}, L_{\text{C-O}}, L_{\text{C=O}}$	1,131 1,149 1,153 1,197	1,150
Моноглицериды	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}_1-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CH}_3 \\   \\ \text{HCOH} \\   \\ \text{H}_2\text{COH} \\   \\ 3 \end{array}$ <p style="text-align: center;">1            4    5-18            19</p>	$\beta_{1,3}$ $\beta_2$ $\beta_4$ $\beta_{5-18}$ $\beta_{19}$	$2L_{\text{C-H}}, L_{\text{C-O}}, L_{\text{C-C}}$ $L_{\text{C-H}}, L_{\text{C-O}}, 2L_{\text{C-C}}$ $L_{\text{C-O}}, L_{\text{C=O}}, L_{\text{C-C}}$ $2L_{\text{C-H}}, 2L_{\text{C-C}}$ $3L_{\text{C-H}}, L_{\text{C-C}}$	1,158 1,176 1,196 1,149 1,131	1,153
Диглицериды	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CH}_3 \\   \\ \text{HC}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CH}_3 \\   \\ \text{H}_2\text{C}-\text{OH} \\   \\ 3 \end{array}$ <p style="text-align: center;">1            4    8-19            31</p> <p style="text-align: center;">2            5    20-33            35</p>	$\beta_{1,3}$ $\beta_2$ $\beta_{4,5}$ $\beta_{6-33}$ $\beta_{34-35}$	$2L_{\text{C-H}}, L_{\text{C-O}}, L_{\text{C-C}}$ $2L_{\text{C-C}}, L_{\text{C-H}}, L_{\text{C-O}}$ $L_{\text{C-O}}, L_{\text{C=O}}, L_{\text{C-C}}$ $2L_{\text{C-H}}, 2L_{\text{C-C}}$ $3L_{\text{C-H}}, L_{\text{C-C}}$	1,158 1,176 1,196 1,149 1,131	1,152

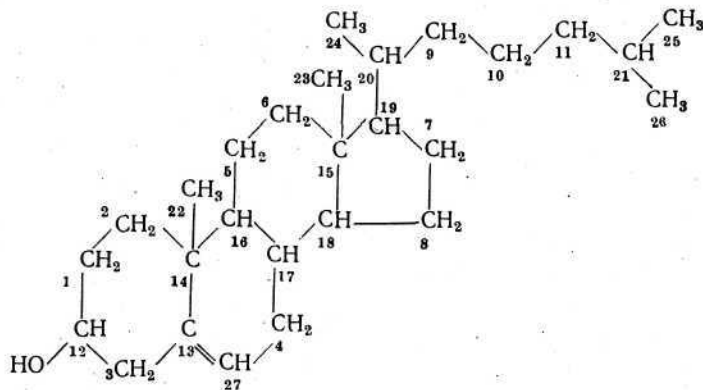
## Триглицериды



$\beta_{1,3}$	$2L_{C-H}, L_{C-O}, L_{C-C}$	1,153
$\beta_2$	$L_{C-H}, L_{C-O}, 2L_{C-C}$	1,176
$\beta_{4-6}$	$L_{C-O}, L_{C=O}, L_{C-C}$	1,196
$\beta_{7-43, 48-54}$	$2L_{C-H}, 2L_{C-C}$	1,149
$\beta_{45-47}$	$L_{C-H}, L_{C=C}, L_{C-C}$	1,153
$\beta_{44, 46, 55}$	$3L_{C-H}, L_{C-C}$	1,131

1,152

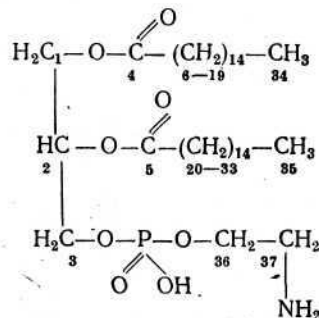
## Холестерин



$\beta_{1-11}$	$2L_{C-H}, 2L_{C-C}$	1,149
$\beta_{13}$	$2L_{C-C}, L_{C-H}, L_{C-O}$	1,176
$\beta_{13}$	$2L_{C-C}, L_{C=C}$	1,170
$\beta_{14,15}$	$4L_{C-C}$	1,184
$\beta_{16-21}$	$3L_{C-C}, L_{C-H}$	1,167
$\beta_{22-26}$	$3L_{C-H}, L_{C-C}$	1,131
$\beta_{27}$	$L_{C-H}, L_{C=C}, L_{C-C}$	1,153

1,154

## Кефалин



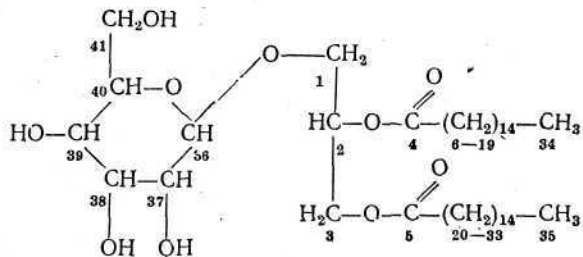
$\beta_{1,2,36}$	$2L_{C-H}, L_{C-O}, L_{C-C}$	1,153
$\beta_2$	$2L_{C-C}, L_{C-H}, L_{C-O}$	1,176
$\beta_{4,5}$	$L_{C-O}, L_{C=O}, L_{C-C}$	1,196
$\beta_{6-33}$	$2L_{C-H}, 2L_{C-C}$	1,149
$\beta_{37}$	$2L_{C-H}, L_{C-C}, L_{C-N}$	1,155

1,152

Таблица 6 (продолжение)

Соединение	Структурная формула	Обозначение β-факторов	Набор изотопических чисел связи	β <sub>1</sub> -факторы	β <sub>2</sub> -факторы
Фосфатидилсерин		$\beta_{1,3,36}$ $\beta_2$ $\beta_{4,5}$ $\beta_{6-33}$ $\beta_{34-35}$ $\beta_{37}$ $\beta_{38}$	$2L_{C-H}, L_{C-O}, L_{C-C}$ $2L_{C-C}, L_{C-H}, L_{C-O}$ $L_{C-O}, L_{C=O}, L_{C-C}$ $2L_{C-H}, 2L_{C-C}$ $3L_{C-H}, L_{C-C}$ $2L_{C-C}, L_{C-H}, L_{C-N}$ $L_{C-C}, L_{C=O}, L_{C-O}$	1,153 1,176 1,196 1,149 1,131 1,173 1,196	1,151
Фосфатидилнозит		$\beta_{1,3}$ $\beta_2$ $\beta_{4,5}$ $\beta_{6-33}$ $\beta_{34,35}$ $\beta_{36-41}$	$2L_{C-H}, L_{C-C}, L_{C-O}$ $2L_{C-C}, L_{C-H}, L_{C-O}$ $L_{C-O}, L_{C=O}, L_{C-C}$ $2L_{C-H}, 2L_{C-C}$ $3L_{C-H}, L_{C-C}$ $2L_{C-C}, L_{C-O}, L_{C-H}$	1,153 1,176 1,196 1,149 1,131 1,176	1,155
Сфингомиелин		$\beta_{1,2}$ $\beta_{3-28}$ $\beta_{23,30}$ $\beta_{31}$ $\beta_{32}$ $\beta_{33,34}$ $\beta_{35}$ $\beta_{36-38}$ $\beta_{39}$	$3L_{C-H}, L_{C-C}$ $2L_{C-H}, 2L_{C-C}$ $L_{C-H}, L_{C-C}, L_{C=C}$ $L_{C-H}, L_{C-O}, 2L_{C-C}$ $L_{C-H}, L_{C-N}, 2L_{C-C}$ $2L_{C-H}, L_{C-C}, L_{C-O}$ $2L_{C-H}, L_{C-C}, L_{C-N}$ $3L_{C-H}, L_{C-N}$ $L_{C-N}, L_{C-C}, L_{C=O}$	1,131 1,149 1,153 1,176 1,173 1,153 1,155 1,138 1,193	1,150

Монолактозилглицерид

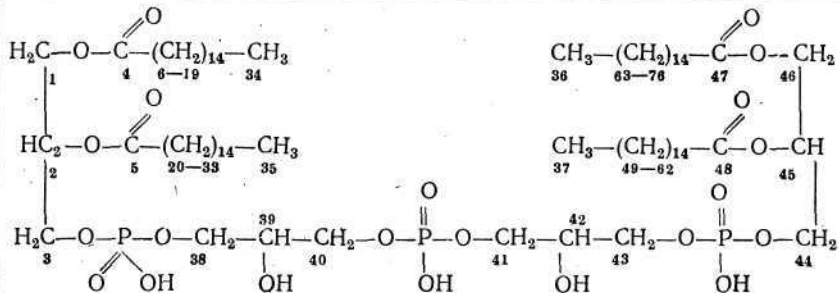


$\beta_{1,3,41}$   
 $\beta_2$   
 $\beta_{4,5}$   
 $\beta_{6-33}$   
 $\beta_{34-35}$   
 $\beta_{36}$   
 $\beta_{37-40}$

$2L_{C-H}, L_{C-C}, L_{C-O}$  1,158  
 $2L_{C-C}, L_{C-O}, L_{C-H}$  1,176  
 $L_{C-O}, L_{C=O}, L_{C-C}$  1,196  
 $2L_{C-H}, 2L_{C-C}$  1,149  
 $3L_{C-H}, L_{C-C}$  1,131  
 $2L_{C-O}, L_{C-H}, L_{C-C}$  1,185  
 $2L_{C-C}, L_{C-H}, L_{C-O}$  1,176

1,155

Кардиолипин

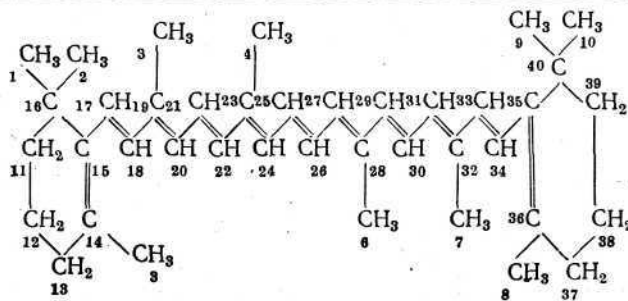


$\beta_{1,3,44,46,38,41,40,43}$   
 $\beta_{2,45,35,43}$   
 $\beta_{4,5,47,48}$   
 $\beta_{6-33,49-76}$   
 $\beta_{34-37}$

$2L_{C-H}, L_{C-C}, L_{C-O}$  1,158  
 $2L_{C-C}, L_{C-O}, L_{C-H}$  1,176  
 $L_{C-O}, L_{C=O}, L_{C-C}$  1,196  
 $2L_{C-H}, 2L_{C-C}$  1,149  
 $3L_{C-H}, L_{C-C}$  1,131

1,155

$\beta$ -каротин



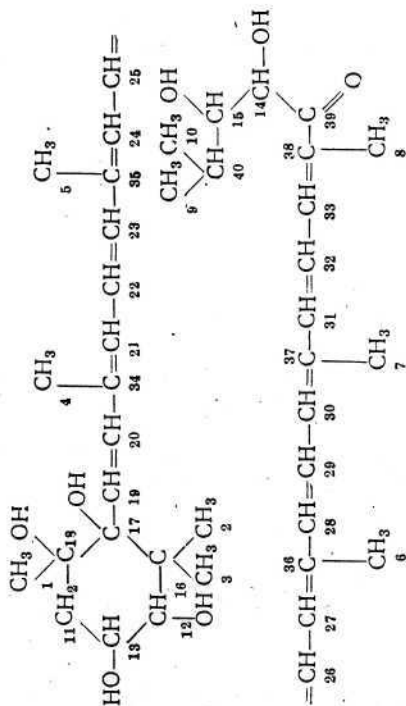
$\beta_{1-10}$   
 $\beta_{11-13,37-39}$   
 $\beta_{14,15,35,36}$   
 $\beta_{16,40}$   
 $\beta_{17,18,22-20,24-27,29-31,33,34}$   
 $\beta_{19,23,28,32}$

$3L_{C-H}, L_{C-C}$  1,131  
 $2L_{C-H}, 2L_{C-C}$  1,149  
 $L_{C=C}, 2L_{C-C}$  1,170  
 $4L_{C-C}$  1,184  
 $L_{C-C}, L_{C=C}, L_{C-H}$  1,153  
 $2L_{C-C}, L_{C=C}$  1,170

1,151

Таблица 6 (продолжение)

Соединение	Структурная формула	Обозначение β-факторов	Набор изотопических чисел связей	β <sub>1</sub> -факторы	β <sub>2</sub> -факторы
Воска (цетилпальмитат)	$\text{CH}_3\text{---}(\text{CH}_2)_{15}\text{---O---}\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}\text{---}(\text{CH}_2)_{14}\text{---CH}_3$ <p style="text-align: center;">1            4-18            3            19-32            2</p>	β <sub>1,2</sub> β <sub>3</sub> β <sub>4-32</sub>	3L <sub>C-H</sub> , L <sub>C-C</sub> L <sub>C=O</sub> , L <sub>C-O</sub> , L <sub>C-C</sub> 2L <sub>C-C</sub>	1,131 1,196 1,149	1,149
β-ситостерин		β <sub>1-10,28</sub> β <sub>12-18</sub> β <sub>19-20</sub> β <sub>21</sub> β <sub>22</sub> β <sub>23-27,29</sub> β <sub>11</sub>	2L <sub>C-H</sub> , 2L <sub>C-C</sub> L <sub>C-H</sub> , 3L <sub>C-C</sub> 4L <sub>C-C</sub> 2L <sub>C-C</sub> , L <sub>C=C</sub> L <sub>C=C</sub> , L <sub>C-C</sub> , L <sub>C-H</sub> 3L <sub>C-H</sub> , L <sub>C-C</sub> 2L <sub>C-C</sub> , L <sub>C-H</sub> , L <sub>C-O</sub>	1,149 1,167 1,184 1,170 1,153 1,131 1,176	1,154
Лецитин		β <sub>1,3,36</sub> β <sub>2</sub> β <sub>4,5</sub> β <sub>6-33</sub> β <sub>34-35</sub> β <sub>37</sub> β <sub>38-40</sub>	2L <sub>C-H</sub> , L <sub>C-C</sub> , L <sub>C-O</sub> 2L <sub>C-C</sub> , L <sub>C-H</sub> , L <sub>C-O</sub> L <sub>C-O</sub> , L <sub>C=O</sub> , L <sub>C-C</sub> 2L <sub>C-H</sub> , 2L <sub>C-C</sub> 3L <sub>C-H</sub> , L <sub>C-C</sub> 2L <sub>C-H</sub> , L <sub>C-C</sub> , L <sub>C-N</sub> 3L <sub>C-H</sub> , L <sub>C-N</sub>	1,158 1,176 1,196 1,149 1,131 1,155 1,138	1,151



$3L_{C-H}, L_{C-C}$	1,131
$2L_{C-C}, 2L_{C-H}$	1,149
$2L_{C-C}, L_{C-H}, L_{C-O}$	1,176
$4L_{C-C}$	1,184
$3L_{C-C}, L_{C-O}$	1,193
$L_{C-C}, L_{C=C}, L_{C-H}$	1,153
$2L_{C-C}, L_{C=C}$	1,170
$2L_{C-C}, L_{C=O}$	1,187
$3L_{C-C}, L_{C-H}$	1,167

$\beta_{1-10}$	
$\beta_{11}$	
$\beta_{12-15}$	
$\beta_{16}$	
$\beta_{17,18}$	
$\beta_{19-33}$	
$\beta_{34-38}$	
$\beta_{39}$	
$\beta_{40}$	

задачи. Поэтому расчет частот неизбежно связан с допущениями, число которых возрастает по мере усложнения молекулы. В результате, несмотря на весьма громоздкую вычислительную процедуру, расчет не дает точных значений  $\beta$ -факторов.

Другая сторона проблемы состоит в огромном многообразии соединений углерода. Даже если представить, что мы существенно усовершенствуем метод расчета и будем рассчитывать все новые и новые соединения, то перед нами всегда будет оставаться необозримое множество все еще неизученных соединений углерода.

Требовалось, следовательно, какое-то более общее решение задачи. Оно было найдено в форме так называемого метода изотопических чисел связей [1—3,9]. Сущность его состоит в том, что разность следов матриц векового уравнения изотопных форм молекул,

т. е.  $\sum_i^n \Delta \lambda_i$ , представляется в виде

$\sum_j^m L'_j$ , где  $L'_j$  собирает элементы, относящиеся к одной из связей данного атома углерода в молекуле. Далее можно использовать любой принцип приближенного представления  $\beta$ -фактора через величины  $\Delta \lambda$ , например, удобно это сделать в виде четных степеней разложения  $\ln \beta \approx \frac{\sqrt{24}}{24} \sum_i \delta u_i^2$  [28, 29], от-

сюда  $\ln \beta = \frac{\sqrt{24}}{24} \sum \Delta \lambda$  и в конечном счете

$\beta = 1 + \sum_j^m L_j$ , где  $L_j$  — изотопическое число связи.

При температуре 300° К изотопические числа имеют следующие значения для различных типов связей, образуемых углеродом:

$$L_{C-H} = 0,0285; L_{C-C} = 0,046;$$

$$L_{C-N} = 0,052; L_{C-O} = 0,055;$$

$$L_{C-F} = 0,056; L_{C=C} = 0,078;$$

$$L_{C \equiv C} = 0,088; L_{C \equiv N} = 0,091;$$

$$L_{C=O} = 0,095$$

В табл. 6 приведены величины  $\beta_1$ -факторов и  $\beta_2$ -факторов исследованных в настоящей работе соединений, полученные методом чисел связей.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате измерений изотопного состава выделенных компонентов и оценки их термодинамических изотопных факторов установлено следующее.

1. Изотопный состав отдельных компонентов липидной фракции различен. Различия эти не выходят за пределы 0,4—0,6% и имеют систематический характер. Наиболее изотопически легкие компоненты — воски, углеводороды, фосфолипиды, жирные кислоты. Несколько тяжелее угле-

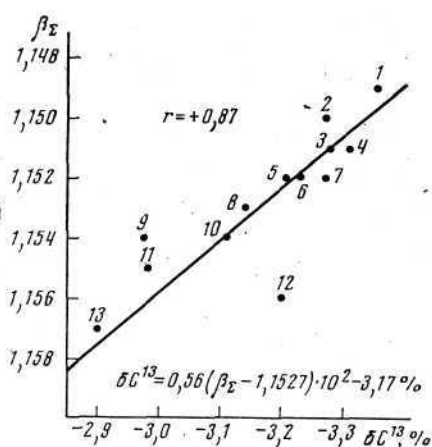


Рис. 6

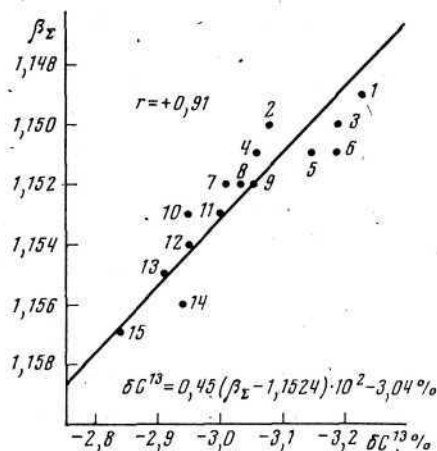


Рис. 7

Рис. 6. Связь измеренных значений  $\delta C^{13}$  липидных компонентов люпина с теоретически вычисленными величинами термодинамических изотопных факторов ( $\beta_2$ -факторами) одноименных компонентов

1 — воска, углеводороды, эфиры стероинов; 2 — жирные кислоты; 3 — лецитин; 4 — фосфатидилсерин; 5 — диглицериды; 6 — триглицериды; 7 — кефалин; 8 — моноглицериды; 9 — стерины ( $\beta$ -ситостерин); 10 — пигмент (лютеин); 11 — хлорофилл + ксантофиллы; 12 — моногалактозилглицерид; 13 — хлорофилл

Рис. 7. Связь измеренных значений  $\delta C^{13}$  липидных компонентов синезеленых водорослей с теоретически вычисленными величинами термодинамических изотопных факторов ( $\beta_2$ -факторами) одноименных компонентов

1 — воска, углеводороды, эфиры стероинов; 2 — сфингомиелин; 3 — жирные кислоты; 4 — лецитин; 5 — каротиноид ( $\beta$ -каротин); 6 — фосфатидилсерин; 7 — диглицериды; 8 — кефалин; 9 — триглицериды; 10 — каротиноид (эхиненон); 11 — моноглицериды; 12 — стерины ( $\beta$ -ситостерин); 13 — фосфатидилинозит; 14 — картоноид (миксоксантофилл); 15 — хлорофилл

род моно-, ди- и триглицеридов. Еще сильнее обеднен легким изотопом углерод каротиноидов, стероинов и хлорофиллов (табл. 1—4).

2. Между расчетными величинами  $\beta_2$ -факторов и измеренными значениями  $\delta C^{13}$  имеется прямая связь, характеризующаяся во всех исследованных случаях высокими коэффициентами корреляции. В соответствии со знаком термодинамических изотопных эффектов соединения, которым отвечают большие величины  $\beta_2$ -факторов, обладают повышенным содержанием изотопа  $C^{13}$  (рис. 6—9).

3. Для всех четырех исследованных объектов, среди которых, как отмечалось, имеются представители растений и животных, водных и наземных организмов, характер распределения изотопов углерода в выделенных компонентах липидной фракции и характер связи между величинами  $\beta_2$ -факторов и величинами  $\delta C^{13}$  принципиально одинаков.

4. Изотопные составы компонентов липидной фракции разных исследованных организмов характеризуются несколько различными интер-



валами значений  $\delta C^{13}$ : кривые  $\beta_{\Sigma}$ -фактор —  $\delta C^{13}$  смещены по оси абсцисс. Это естественное следствие различного изотопного состава исходного углерода в среде обитания изученных организмов. Как известно, пресноводные организмы, а также наземные организмы всегда обогащены изотопом  $C^{12}$  относительно морских организмов [12], поскольку исходный углерод углекислоты в континентальных условиях изотопически легче морского.

5. Угол наклона линий регрессии для связи  $\beta_{\Sigma}$  и  $\delta C^{13}$  для разных организмов несколько отличен. В частности, для ламинарии в данной систе-

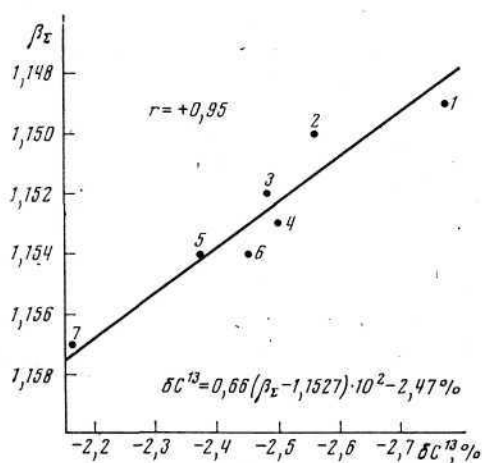


Рис. 8

Рис. 8. Связь измеренных значений  $\delta C^{13}$  липидных компонентов ламинарии с теоретически вычисленными величинами термодинамических изотопных факторов ( $\beta_{\Sigma}$ -факторами) одноименных компонентов

1 — воска, углеводороды, эфиры стеринов; 2 — жирные кислоты; 3 — триглицериды; 4 — моноглицериды; 5 — каротиноиды (фукоксантин); 6 — стерины (фукостерин); 7 — хлорофилл

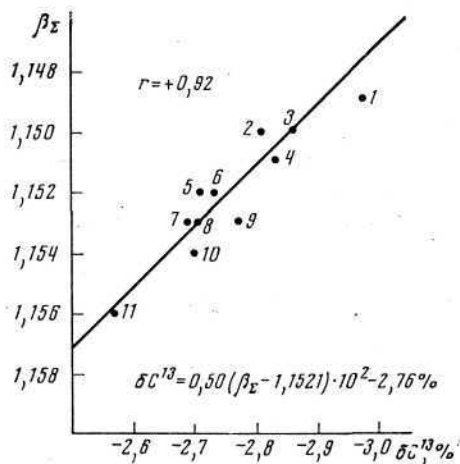


Рис. 9

Рис. 9. Связь измеренных значений  $\delta C^{13}$  липидных компонентов кроля с теоретически вычисленными величинами термодинамических изотопных факторов ( $\beta_{\Sigma}$ -факторами) одноименных компонентов

1 — воска, углеводороды, эфиры стеринов; 2 — жирные кислоты; 3 — сфингомиелин; 4 — лецитин; 5 — диглицериды; 6 — триглицериды; 7 — пигмент (эхиненон); 8 — моноглицериды; 9 — кардиолипин; 10 — стерины (холестерин); 11 — каротиноид (астацин)

ме координат линия регрессии идет заметно более полого, а для сине-зеленых водорослей круче, чем для остальных организмов.

6. Величина наблюдаемых изотопных эффектов составляет только часть величины, определяемой отношением соответствующих термодинамических изотопных факторов. Так, крайние значения термодинамических изотопных факторов исследованных компонентов составляют  $\beta_{\Sigma} = 1,149$  (воска и углеводороды) и  $\beta_{\Sigma} = 1,157$  (хлорофилл), что отвечает теоретическому различию  $\Delta C_{\text{теор}}^{13} = (\beta_{\Sigma_1}/\beta_{\Sigma_2} - 1) \cdot 10^3 \%$  в изотопном составе этих компонентов приблизительно  $\Delta C_{\text{теор}}^{13} = -0,8 \%$ . Между тем измеренное различие  $\Delta C_{\text{измер}}^{13} = \delta C_1^{13} - \delta C_2^{13}$  составляет в среднем для тех же компонентов исследованных организмов  $\Delta C_{\text{измер}}^{13} \approx -0,4 \%$ . Для описания этого явления был введен ранее коэффициент биохимического изотопного равновесия  $\kappa = \Delta C_{\text{измер}}^{13} / \Delta C_{\text{теор}}^{13}$  [3], который в данном случае составляет приблизительно  $\kappa = 0,5$ .

По-видимому, наиболее существенный результат нашей работы состоит в подтверждении тесной связи между изотопным составом исследованных компонентов липидной фракции и термодинамическими свой-

ствами ( $\beta_x$ -факторами) соответствующих соединений. При этом надо принять в расчет, что полученные данные относятся к очень узкому диапазону значений  $\delta C^{13}$  и  $\beta_x$ -факторов, в пределах которого одна только ошибка масс-спектрометрических измерений, составляющая  $\pm 0,02$ — $0,03\%$ , способна обусловить заметную долю наблюдаемого на графиках (рис. 6—9) разброса данных относительно линий регрессий. К этому следует добавить возможную неточность оценки  $\beta_x$ -факторов при помощи изотопических чисел, а также погрешности, обусловленные не вполне четким выделением и недостаточно точной идентификацией компонента. Тем не менее связь между величинами  $\beta_x$  и  $\delta C^{13}$  характеризуется весьма высокими значениями коэффициентов корреляции.

Если эта связь изотопного состава и термодинамических изотопных факторов не случайна и носит причинный характер, то это означает существование межмолекулярных термодинамических изотопных эффектов в исследованной системе биологических компонентов и, следовательно, осуществление в какой-то форме равновесного изотопного обмена углерода в биомолекулах. Заметим также, что наблюдаемое соответствие между теоретическими величинами  $\beta_x$  и измеренными значениями  $\delta C^{13}$  подтверждает надежность оценки  $\beta_x$ -факторов сложных органических соединений при помощи метода изотопических чисел связей.

Существование термодинамических межмолекулярных изотопных эффектов означает существование в многоатомных органических соединениях внутримолекулярных термодинамических изотопных эффектов углерода [1—3]. Термодинамический изотопный фактор ( $\beta_x$ -фактор), характеризующий данное соединение в целом, получается, как было показано выше, путем суммирования  $\beta_i$ -факторов, характеризующих атомы углерода в различных структурных положениях данной молекулы. В той степени, в какой осуществляется корреляция между  $\beta_x$ -фактором и величиной  $\delta C^{13}$  соединения в целом, должна иметь место корреляция между величинами  $\beta_i$ -факторов и изотопными составами углеродных атомов внутри молекулы.

На рис. 10, а приведен пример внутримолекулярного распределения изотопов в одном из исследованных соединений — молекуле холестерина. Диаметр кружков, отвечающих атомам углерода, пропорционален расчетной величине  $\beta_i$ -фактора, т. е. вероятности концентрации изотопа  $C^{13}$  в этом положении.

Если отвлечься от природы изотопных эффектов, то более общее утверждение состоит в том, что наблюдаемый порядок в изотопных составах исследованных компонентов есть отражение и прямое следствие упорядоченного внутримолекулярного распределения изотопов углерода.

Следует подчеркнуть принципиальное отличие внутримолекулярной изотопической неоднородности, имеющей термодинамическую природу,

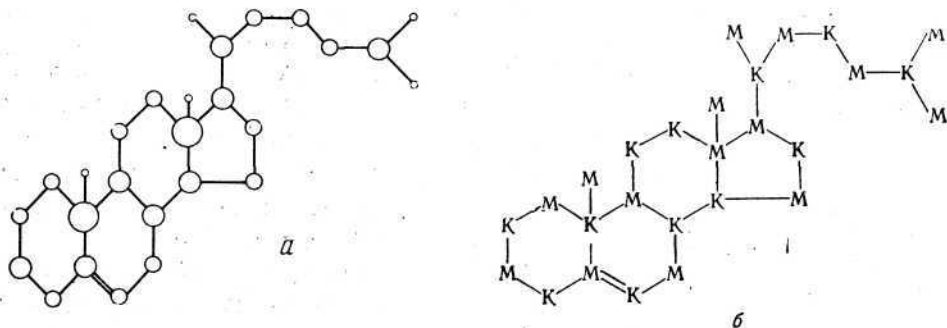


Рис. 10. Внутримолекулярное распределение изотопов углерода в молекуле холестерина (а) и распределение метильного (М) и карбоксильного (К) углерода ацетата в молекуле холестерина (б)

Диаметр кружков пропорционален величине  $\beta_i$ -фактора, т. е. соответствует относительной обогащенности изотопам  $C^{13}$  углерода в данном структурном положении

от возможной внутримолекулярной неоднородности, обусловленной особенностями биосинтеза различных атомных группировок в биомолекуле. В первом случае изотопный состав атома зависит от его конечного положения в молекуле и определяется величиной  $\beta_1$ -фактора, а изотопный состав молекулы в целом — величиной  $\beta_2$ -фактора. Атом «забывает» полностью или частично (это предстоит выяснить) то, каким путем и от каких предшественников он пришел в данное соединение. Во втором случае внутримолекулярная изотопическая неоднородность возможна как результат того, что различные атомы углерода данного соединения имеют отличные пути биосинтеза и происходят от разных предшественников.

Альтернативу здесь можно разрешить, пользуясь тем, что биосинтез липидов осуществляется преимущественно из единого субстрата — ацетил-КоА.

Два атома углерода в ацетате, метильный и карбоксильный, характеризуются существенно различными  $\beta_1$ -факторами ( $\beta_{CH_3} = 1,131$ ,  $\beta_{COOH} = 1,197$ ). Метильный углерод должен быть изотопически легким, а карбоксильный — тяжелым. Недавно мы получили сообщение от Дж. Хейса [30], что в ацетате, выделенном из винного уксуса, действительно наблюдался ожидаемый внутримолекулярный изотопный эффект ( $\delta C^{13}_{CH_3} = -3,49\%$ ,  $\delta C^{13}_{COOH} = -1,65\%$ ).

Благодаря многочисленным работам по исследованию путей биосинтеза при помощи меченого углерода  $C^{14}$ , вводящегося в карбоксильную или метильную группу исходного ацетата, в настоящее время для многих соединений установлено, в каких конкретно положениях углерод данного соединения происходит за счет карбоксильного, а в каких — за счет метильного углерода ацетата. Пример такого распределения в молекуле холестерина показан на рис. 10, б. Если изотопный состав углеродных атомов определяется их происхождением, то изотопный состав соединения в целом должен определяться соотношением м/к, т. е. отношением числа изотопически легких атомов углерода, унаследованных от метильной группы к числу изотопически тяжелых атомов, унаследованных от карбоксильной группы ацетата.

В табл. 7 приведены м/к соединений, углеродные атомы которых происходят только из ацетата. В жирных кислотах атомы м- и к-происхождения чередуются [31, 32]. Аналогичное чередующееся распределение атомов м- и к-типа имеет место в скваленах и происходящих от них каротиноидах. Углерод боковых  $CH_3$ -групп в каротиноидах имеет метил-ацетатное происхождение [32, 34]. Распределение атомов м- и к-типов в  $\beta$ -ситостерине аналогично распределению в холестерине [33]. Не все исследованные липиды имеют ацетат в качестве единственного низкомолекулярного предшественника. В триглицеридах и фосфоглицеридах остаток глицерина происходит из  $\alpha$ -глицерофосфата, образующегося за счет промежуточных продуктов гликолиза [32, 35]. В сфинголипидах 1-й и 2-й атом сфингозина образуются за счет 2 и 3-го углеродного атома серина [36]. В хлорофилле восемь углеродных атомов порфиринового ядра происходят из  $\alpha$ -углерода глицина, остальные из ацетата [37].

Таблица 7

Сопоставление изотопного состава углерода некоторых исследованных компонентов синезеленых водорослей с  $\beta_2$ -факторами и соотношением в них атомов углерода, происходящих от метильных и карбоксильных групп ацетата

Соединение	$\beta_2$ -фактор	$\delta C^{13}$ , %	м/к	Соединение	$\beta_2$ -фактор	$\delta C^{13}$ , %	м/к
Пальмитиновая кислота	1,150	-3,19	1,00	$\beta$ -ситостерин	1,154	-2,95	1,25
$\beta$ -каротин	1,151	-3,15	1,50	Миксоксантофилл	1,156	-2,94	1,50

Причем м-атомы в хлорофилле заметно преобладают ( $m/k=1,62$ ), если отождествлять  $\alpha$ -углеродные атомы глицина с метильными атомами ацетата. Между тем хлорофилл относится к числу наиболее изотопически тяжелых компонентов липидной фракции.

Для того чтобы избежать дополнительных предположений и оговорок в табл. 7 взяты лишь те соединения, для которых величина  $m/k$  определяется отношением только метильных и карбоксильных атомов ацетата. Эти величины сопоставлены с изотопным составом соответствующих соединений в конкретном исследованном организме. Видно, что между величинами  $m/k$  и  $\delta C^{13}$  связь отсутствует. Так, жирные кислоты должны были бы быть изотопически тяжелее каротиноидов, в то время как на самом деле это наиболее изотопически легкие соединения. Показательно сопоставление двух каротиноидов, выделенных из синезеленой водоросли:  $\beta$ -каротина и миксоксантофилла. Оба каротиноида имеют практически одинаковый углеродный скелет, в котором атомы, происходящие от метильной и карбоксильной группы ацетата, чередуются: м—к—м—к... Разница состоит в том, что в миксоксантофилле к 12—15, 17, 18-му углеродным атомам присоединены гидроксильные группы, а 39-й атом образует карбонильную группу. Наличие С—О-связей, характеризующихся в соответствии с нашей теорией чисел связей повышенными значениями изотопических чисел ( $L_{C-O}=0,055$ ,  $L_{C=O}=0,095$ ), должно привести к увеличению  $\beta_i$ -факторов соответствующих атомов углерода, а отсюда и  $\beta_x$ -фактора соединения в целом. Расчет дает для  $\beta_x$ -фактора миксоксантофилла величину 1,156, а для  $\beta_x$ -фактора  $\beta$ -каротина — величину 1,151. (табл. 7). Результаты исследования изотопного состава этих компонентов показывают, что миксоксантофилл ( $\delta C^{13} = -2,94\%$ ) действительно изотопически тяжелее  $\beta$ -каротина ( $\delta C^{13} = -3,15\%$ ). В то же время отношения  $m/k$  у обоих соединений одинаковы, т. е. с этой точки зрения они должны были бы иметь одинаковый изотопный состав.

Сказанное выше позволяет считать, что изотопный состав биохимических компонентов и внутримолекулярное распределение изотопов в них зависит не столько от изотопного состава предшественников и способа включения углерода предшественников в состав данного соединения, а сколько определяется изотопно-обменными процессами в ходе биосинтеза, приводящими к перераспределению изотопов в соответствии с термодинамическими изотопными факторами синтезируемых структур.

Следует сказать несколько слов о том, как мы представляем себе способ реализации термодинамических изотопных эффектов в биологических системах и одновременно попытаться ответить на вопрос, почему при наличии весьма тесной связи между величинами  $\beta_x$ -факторов и изотопным составом соответствующих соединений наблюдаемые изотопные эффекты ( $\Delta C^{13}_{изм}$ ) оказываются приблизительно на половину меньше, чем это должно быть, если взять просто отношение соответствующих  $\beta_x$ -факторов, т. е. ( $\Delta C^{13}_{теор}$ ). В уравнениях регрессий рис. 6—9 это выражается в появлении коэффициентов, близких к 0,5 (перед членом, содержащим  $\beta_x$ ), а именно 0,45 — для синезеленых водорослей; 0,50 — для криля; 0,56 — для люпина; 0,66 — для ламинарии.

Мы не претендуем на то, чтобы указать действительный механизм изотопного обмена, но можно, очевидно, попытаться установить минимальные физические предпосылки возникновения изотопных эффектов наблюдаемого характера.

Можно показать, что распределение изотопных составов в равновесной изотопно-обменной системе при произвольном соотношении концентраций компонентов выразится соотношением

$$\delta C_k^{13} = \delta C_0^{13} + \sum_i^{n-1} a_i \Delta_{ki}^{теор} \quad (i \neq k),$$

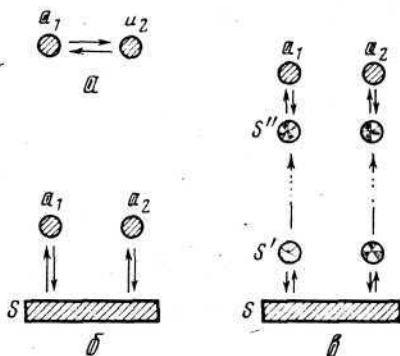
где  $\delta C_k^{13}$  — изотопный состав  $k$ -го компонента,  $\delta C_0^{13}$  — средний изотопный состав углерода всей системы;  $a_i$  — концентрация  $i$ -го компонента;  $\Delta_{ki}$  — теоретический коэффициент разделения, равный  $(\beta_{\Sigma k}/\beta_{\Sigma i} - 1) \cdot 10^2$ .

Рассмотрим для простоты двухкомпонентную систему, где  $a_1$  и  $a_2$  — атомы углерода данного соединения.

Первый случай (рис. 11, а) отвечает прямому внутримолекулярному изотопному обмену между атомами  $a_1$  и  $a_2$ . Такой тип обмена, несомненно, не реализуется в живых организмах, поскольку установлению изотопного равновесия, определяющего внутримолекулярный термодинами-

Рис. 11. К анализу происхождения внутримолекулярных термодинамических изотопных эффектов:

**а** — прямой межатомный внутримолекулярный изотопный обмен (нереализующийся); **б** — изотопный обмен через общий субстрат (нереализующийся); **в** — изотопный обмен в ферментсубстратном комплексе (вероятный)



ческий изотопный эффект, в этом случае предшествовало бы равновесие химическое (элементное), чего, конечно, нет в живых организмах. Отсутствие прямого междуатомного изотопного обмена вытекает также из опыта использования меченых атомов. Если бы такой обмен имел место, это приводило бы к размытию радиоактивных  $C^{14}$ -меток и сделало бы невозможным использование метода меченых атомов для изучения путей биосинтеза. Поэтому было высказано предположение, что изотопный обмен осуществляется посредством ферментов [3].

Кстати заметим, что в соответствии с выписанным выше соотношением

$$\delta C_1^{13} = \delta C_0^{13} + a_2 \Delta_{12},$$

$$\delta C_2^{13} = \delta C_0^{13} + a_1 \Delta_{21},$$

учитывая, что  $a_1 + a_2 = 1$  и  $\Delta_{12} = -\Delta_{21}$ , получим  $\delta C_1^{13} - \delta C_2^{13} = \Delta_{12}$ . Следовательно, при прямом междуатомном изотопном обмене в состоянии равновесия измеряемый изотопный эффект должен был бы быть равен теоретическому.

Второй тип возможного изотопного обмена — обмен через общий субстрат (рис. 11, б). Концентрацию субстрата обозначим  $S$ . В этом случае

$$\delta C_1^{13} = \delta_0^{13} + a_2 \Delta_{12} + S \Delta_{1S}$$

$$\delta C_2^{13} = \delta_0^{13} + a_1 \Delta_{21} + S \Delta_{2S}$$

$$\delta C_S^{13} = \delta_0^{13} + a_2 \Delta_{S2} + a_1 \Delta_{S1}.$$

Различие в изотопном составе рассматриваемых компонентов составит

$$\delta C_1^{13} - \delta C_2^{13} = a_2 \Delta_{12} + S \Delta_{1S} - a_1 \Delta_{21} - S \Delta_{2S}$$

и учитывая соотношения  $\Delta_{12} = -\Delta_{21}$  и  $\Delta_{1S} = \Delta_{1S} - \Delta_{2S}$ , а также  $a_1 + a_2 + S = 1$ ,

вновь получим  $\delta C_1^{13} - \delta C_2^{13} = \Delta_{12}$ . Таким образом, и в этом случае измеряемый изотопный эффект не зависит от концентрации компонентов и должен быть равен в состоянии равновесия теоретическому коэффициенту разделения между  $a_1$  и  $a_2$ .

Третий тип обмена, который может привести к распределению изотопов между  $a_1$  и  $a_2$  в соответствии с их термодинамическими изотопными факторами, показан на рис. 11, в. Здесь существенно то, что между стадией образования продукта, т. е. фиксацией данного атома углерода в синтезируемом соединении  $S'' \rightleftharpoons a$ , и стадией мобилизации субстрата в ферментном комплексе  $S \rightleftharpoons S'$  содержится необратимо протекающая стадия. Если при этом лишь часть углерода ферментного комплекса  $S'$  утилизируется в продукте, а оставшаяся часть  $S''$  сбрасывается, то распределение изотопов между  $a_1$  и  $a_2$  будет носить следующий характер:

$$\delta C_1^{13} = \delta C_{S'}^{13} + \Delta_{1S''} S'',$$

$$\delta C_2^{13} = \delta C_{S'}^{13} + \Delta_{2S''} S'',$$

и отсюда

$$\delta C_1^{13} - \delta C_2^{13} = S'' \Delta_{12}.$$

Различие в изотопном составе углеродных атомов при изотопном обмене этого типа будет пропорционально величине, определяемой отношением термодинамических изотопных факторов компонентов, причем составит только часть ее.

Эта модель в принципе отвечает наблюдаемому характеру зависимости между величинами  $\beta_x$  и  $\delta C^{13}$  в исследованных объектах. Если  $a = S''$ , т. е. утилизируется половина углерода, несомого ферментным комплексом, то  $S'' = 0,5$ , что соответствует приблизительно половинной величине термодинамических изотопных эффектов.

Таким образом, согласованное внутримолекулярное распределение изотопов при наличии общего субстрата может, по-видимому, возникнуть как результат изотопно-обменного равновесия между ферментным комплексом и синтезируемой углеродной структурой в момент фиксации последней. При этом непосредственный межатомный изотопный обмен в синтезируемом соединении полностью предотвращен ввиду необратимого характера суммарного акта биосинтеза каждой углеродной структуры. В то же время ферментативные реакции представляют собой биокатализ обратимых реакций и, вероятно, способны на отдельных стадиях биосинтеза обеспечить равновесие изотопного обмена углерода.

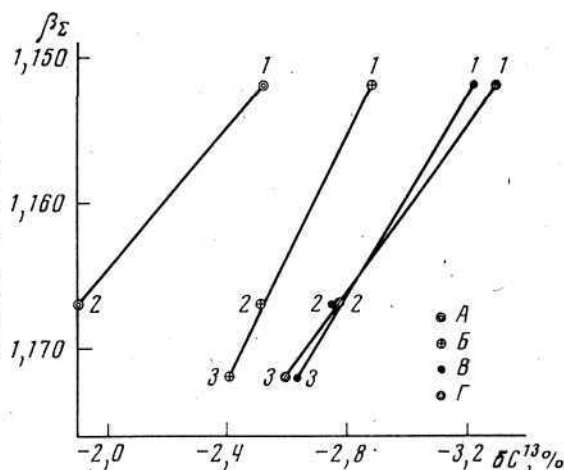
Согласованное распределение изотопов существует, очевидно, не только на внутримолекулярном уровне или на уровне близких по происхождению соединений, например исследованных липидных компонентов, но и между биохимически далекими фракциями организма. В табл. 5 приведены для каждого исследованного организма результаты изотопного анализа его общего углерода, суммарного углерода липидов, а также углерода аминокислот. В общем случае величины  $\beta_x$ -факторов биохимических фракций должны зависеть от их состава — от преобладания в них тех или иных компонентов. Но для приближенной оценки можно воспользоваться следующими значениями: для липидной фракции —  $\beta_x = 1,152$ ; для суммарного органического углерода —  $\beta_x = 1,167$ ; для аминокислот в среднем —  $\beta_x = 1,172$ . Как видно из рис. 12, и здесь наблюдается отчетливая связь между измеренным значением изотопного состава фракций и характеризующими их величинами  $\beta_x$ -факторов.

Подобное согласованное распределение изотопов на уровне организма в целом, по-видимому, определяется тем, что наиболее распространенными субстратами на всех путях биосинтеза служит сравнительно небольшое число простых молекул, способных к обратимым превращениям. Как известно, на начальных стадиях катаболизма крупные молеку-

ды, разрушаясь, образуют ограниченное число небольших органических молекул (не считая  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ ). При разрушении углеводов образуются пируват и триозофосфаты, при разрушении жиров — ацетил-КоА, пропионил-КоА, глицерин, при разрушении белков — ацетил-КоА, оксалацетат,  $\alpha$ -кетоглутарат, фумарат, сукцинат. На центральных метаболических путях происходит обратимое превращение триозофосфат  $\rightleftharpoons$  пи-

Рис. 12. Сопоставление связи измеренных величин  $\delta\text{C}^{13}$  биохимических компонентов с теоретически вычисленными значениями термодинамических изотопных факторов ( $\beta_2$ -факторами) соответствующих компонентов

А — для ламинарии; Б — для крыля; В — для синезеленых водорослей; Г — для люпина. Изотопный состав углерода: 1 — липидов; 2 — общего углерода биомассы; 3 — углерод суммы аминокислот



руват, пируват  $\rightleftharpoons$  ацетил-КоА, оксалоацетат  $\rightleftharpoons$  аспарат;  $\alpha$ -кето(оксо)-глутарат  $\rightleftharpoons$  глутамат, а также реакции (цикла Кребса), в ходе которых ацетил-КоА окисляется до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  [31, 32, 38].

Образование небольшого числа низкомолекулярных соединений в процессе катаболизма, использование этих же соединений в качестве исходных или промежуточных в процессе биосинтеза (анаболизма) и, наконец, обратимое превращение этих соединений на центральных путях, по-видимому, и создает принципиальную основу для согласованного распределения изотопов углерода в различных биохимических компонентах.

Это дает основание распространить обсуждавшуюся выше схему внутримолекулярного распределения изотопов на межкомпонентное распределение, имея в виду осуществление изотопного обмена на уровне низкомолекулярных субстратов (рис. 13).

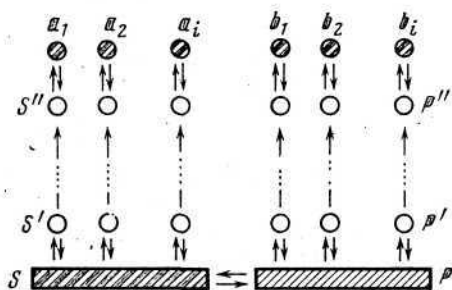


Рис. 13. Предполагаемая схема возникновения внутримолекулярных ( $a_1, a_2, \dots, a_i$ ) и межмолекулярных ( $a, b$ ) термодинамических изотопных эффектов в биологических системах

Таким образом, характер биохимических процессов создает предпосылки для реализации внутримолекулярных и межмолекулярных термодинамических изотопных эффектов в биологических системах.

Одно из перечисленных выше экспериментальных наблюдений состояло в том, что линии регрессии, описывающие связь измеренных величин  $\delta\text{C}^{13}$  и вычисленных величин  $\beta_2$ -факторов разных организмов, имеют неодинаковый наклон. В работе [3] было показано, что явление биогенного изотопного равновесия углерода должно проявляться в температурной

зависимости изотопных составов биомолекул. Рассмотрим под этим углом зрения полученные нами экспериментальные данные.

Как известно, термодинамические изотопные факторы зависят от температуры. С понижением температуры  $\beta$ -факторы возрастают. Одновременно возрастают термодинамические изотопные эффекты, т. е. отношения между  $\beta$ -факторами различных соединений. Ниже сопоставлены величины  $L_j$  для  $T=300^\circ\text{K}$  и  $T=273^\circ15'\text{K}$

$T, ^\circ\text{K}$	$L_{\text{C-H}}$	$L_{\text{C-C}}$	$L_{\text{C-N}}$	$L_{\text{C-O}}$	$L_{\text{C-F}}$	$L_{\text{C=C}}$	$L_{\text{C}\equiv\text{C}}$	$L_{\text{C}\equiv\text{N}}$	$L_{\text{C=O}}$
300	0,0285	0,046	0,052	0,055	0,056	0,078	0,088	0,091	0,095
273°15	0,033	0,056	0,061	0,064	0,065	0,095	0,100	0,103	0,108

Температурные зависимости разных чисел связей различны, так же как различные температурные зависимости  $\beta$ -факторов разных молекул. Кроме того, зависимости эти нелинейны — они носят экспоненциальный характер. Поэтому, строго говоря,  $\beta$ -фактор для каждой температуры следует определять, пользуясь системой изотопических чисел  $L_j$  для этой температуры.

В большинстве случаев, однако, достаточно приближенной оценки температурной зависимости. В сравнительно узком температурном диапазоне  $0-25^\circ\text{C}$ , характерном для развития живых организмов зависимость  $L_j$  от  $T$  практически линейна. Кроме того, в достаточно сложных органических соединениях существует определенная статистика связей, образуемых атомами углерода, что делает температурную зависимость в известной мере инвариантной для различных соединений.

Можно, показать, что зависящий от температуры коэффициент удовлетворительно аппроксимируется следующим выражением:

$$\Psi_t = 1 + \frac{2}{3} (27 - t^\circ) \cdot 10^{-2}, \quad (a)$$

где  $t^\circ$  — температура биогенеза в  $^\circ\text{C}$ . Величина  $\beta$ -фактора при данной температуре определится так:

$$\beta_t \approx 1 + \Psi_t (\beta_{300^\circ\text{K}} - 1). \quad (б)$$

Для молекул, содержащих небольшое число связей углерода, например для одноуглеродных молекул, эта формула может давать заметные отклонения от истинных величин. Однако для многоатомных органических соединений, представляющих интерес при рассмотрении биологических систем, приближение получается вполне удовлетворительным. Уже для молекулы аланина, содержащей три атома углерода, величина  $\beta_{273}$ -фактора, полученная с использованием коэффициента  $\Psi_t$ , составляет 1,197 при действительном значении  $\beta_{273} = 1,196$ .

Если наблюдаемые межмолекулярные и внутримолекулярные изотопные эффекты в биологических системах имеют термодинамическую природу, то должна наблюдаться их температурная зависимость. В нашем случае температурная зависимость проявится в различном наклоне линий регрессии на графиках (рис. 6—9), т. е. скажется на величинах коэффициентов  $\kappa$  в уравнении  $\delta\text{C}^{13} = \kappa (\beta_{x_{300}} - \beta_0) + \delta\text{C}_0^{13}$ . Так как числа связей, которыми мы оперировали при оценке  $\beta_i$  и  $\beta_x$ -факторов, вычислены для  $300^\circ\text{K}$  ( $27^\circ\text{C}$ ), то для организмов, развивающихся при температурах, меньших чем  $27^\circ\text{C}$ , коэффициент  $\kappa$  окажется несколько завышенным, а соответствующая линия регрессии на графиках пойдет более полого, и наоборот, если биосинтез происходил в среде с температурой выше  $27^\circ\text{C}$ , линия регрессии пойдет с меньшим коэффициентом  $\kappa$ .

Действительно, наиболее пологой линией регрессии характеризуется связь между величинами  $\delta\text{C}^{13}$  и  $\beta_x$ -факторами липидных компонентов ламинарии ( $\kappa = 0,66$ ), которая из числа исследованных организмов развивалась при самых низких температурах ( $t = 5^\circ\text{C}$ ). Воспользовавшись выражениями



(а) и (б), приведем уравнение регрессии для ламинарии (рис. 8)  $\delta C_{\text{ламинария}}^{13} = 0,66 (\beta_{\Sigma_{27^{\circ}\text{C}}} - 1,1527) \cdot 10^2 - 2,47 \%$  к действительным температурным условиям. Получим  $\delta C_{\text{ламинария}}^{13} = 0,57 (\beta_{\Sigma_{5^{\circ}\text{C}}} - 1,1751) \cdot 10^2 - 2,47 \%$ , т. е.  $\kappa_t = 0,57$ . В самой теплой среде из числа исследованных нами организмов развивались синезеленые водоросли ( $t = 30^{\circ}\text{C}$ ). Соответственно более круто идет линия регрессии на графике зависимости  $\delta C^{13}$  от  $\beta_{\Sigma}$ -фактора липидных компонентов синезеленых водорослей (рис. 7) ( $\kappa = 0,45$ ). Приведенное уравнение имеет вид  $\delta C_{\text{с.-з. вод}}^{13} = 0,46 (\beta_{\Sigma_{30^{\circ}\text{C}}} - 1,1693) \cdot 10^2 - 3,04 \%$ , т. е.  $\kappa_t = 0,46$ . Оценка температурных условий развития люпина менее достоверна. Если принять в качестве температуры, характеризующей условия биосинтеза, среднесуточную летнюю температуру на широте Москвы ( $t = 18^{\circ}\text{C}$ ), то приведение уравнения, представленного на графике рис. 6, к этой температуре даст  $\delta C_{\text{люпина}}^{13} = 0,53 (\beta_{\Sigma_{18^{\circ}\text{C}}} - 1,1619) \cdot 10^2 - 3,17 \%$ , т. е.  $\kappa_t = 0,53$ . От оценки температурных условий биосинтеза липидов крыла мы воздержимся, поскольку в отношении гетеротрофов пока не ясно, в каких случаях следует принимать в расчет температурные условия обитания самого гетеротрофа, а в каких случаях имеют значения условия биосинтеза служащих ему пищей автотрофов.

Таким образом, приведение к реальным температурным условиям ведет к выравниванию коэффициентов  $\kappa_t$  для липидных фракций исследованных автотрофов, а наблюдаемое на графиках (рис. 6—9) различие наклонов линий регрессий находится в согласии с различием температурных условий биогенеза соответствующих организмов. Иначе говоря, изотопные составы липидных компонентов обнаруживают такую же температурную зависимость, которая характерна для термодинамических изотопных факторов, что является еще одним признаком термодинамического контроля распределения изотопов углерода в биологических системах.

Поступила в редакцию  
8 июня 1974 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Галимов Э. М. Метод изотопических чисел связей. Применение в биохимии и геохимии. Тез. докл. на Всес. симпоз. по применению стабил. изотопов в геохимии. М., 1972.
2. Galimov E. M. Biogenic intermolecular and intramolecular carbon isotope effects. Method of «isotopic numbers of bindings». Biochemical and geochemical applications. Intern. Meeting on Isotope effects in Physical and Chemical Processes, Cluj, Romania, 1973.
3. Галимов Э. М. Изотопы углерода в нефтегазовой геологии. «Недра», М., 1973.
4. Degens E., Behrend M., Gottardt B., Repmann E. Metabolic fractionation of carbon isotopes in marine plankton. Part II: data on samples collected off the coast of Peru and Ecuador.— Deep-Sea Res., v. 15, № 1, 1968.
5. Abelson P., Hoering T. Carbon isotope fractionation in formation of amino acids by photosynthetic organisms.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 47, № 5, 1961.
6. Park R., Epstein S. Carbon isotope fractionation during photosynthesis.— Geochim. et cosmochim. acta, v. 21, № 1/2, 1960.
7. Parker P. L. The isotopic composition of the carbon of fatty acids. YB Carnegie Inst. Washington, v. 61, 1962.
8. Галимов Э. М. О связи коэффициента разделения изотопов с константами равновесия реакций изотопного обмена углерода в углеводородных системах.— Ж. физ. химии, т. 45, № 5, 1971.
9. Галимов Э. М. Приближенный способ оценки термодинамических изотопных факторов.— Ж. физ. химии, т. 47, № 2, 1974.
10. Галимов Э. М. Особенности проявления кинетического изотопного эффекта при деградации органических макромолекул.— Ж. физ. химии, т. 47, № 5, 1974.
11. Галимов Э. М. Об оценке кинетического изотопного эффекта радикальных реакций.— Ж. физ. химии, т. 46, № 11, 1972.
12. Galimov E. M. Organic geochemistry of carbon isotopes. Proceed 6th Intern. Congress Organ. Geochemistry, Ruel-Malmaison, Edition Technip, 1974.
13. Топачевский А. В., Сиренко Л. А., Сакевич А. И. Роль летучих выделений синезеленых водорослей в формировании биоценоза цветения.— Гидробиол. ж., т. 4, № 2, 1968.

14. Мангольд Х. Алифатические липиды.— В сб.: Хроматография в тонких слоях, «Мир», М., 1965.
15. Kritchevsky D., Malhotra S. Recovery of lipids from thin-layer chromatography for radioassay.— J. Chromatogr., v. 52, № 3, 1970.
16. Freeman C. P., West D. Complete separation of lipids classes on single thin-layer plate.— J. Lipid. Res., v. 7, № 3, 1966.
17. Deyle P. J., Patterson G. W. Sterols of some Chesapeake Bay algae.— Comp. Biochim. and Physiol., № 2, 1972.
18. Гудвин Т. Сравнительная биохимия картоиноидов. Изд-во иностр. лит., М., 1954.
19. Физер Л., Физер М. Стероиды. «Мир», М., 1964.
20. Зарецкий В. И., Вульфсон Н. С., Заикин В. Г., Паперная И. Б. Масс-спектрометрия стероидных систем. XII. Определение положения двойной связи в некоторых стероидных системах методом осколочной масс-спектрометрии.— Хим. природн. соед., № 6, 1967.
21. Новицкая Г. В. Методическое руководство по тонкослойной хроматографии фосфолипидов. «Наука», М., 1972.
22. Bohner de L. S., Soto E. F., de Cohan T. Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography.— J. Chromatogr., v. 17, 1965.
23. Nichols B. W. Separation of the lipids of photosynthetic tissues: improvements in analysis by thin — layer chromatography.— Biochem. et Biophys. acta, v. 70, 1963.
24. Clayton T. A., MacMurray T. A., Morrison W. R. Identification of wheat flour lipids by thin-layer chromatography.— J. Chromatogr., v. 47, № 2, 1970.
25. Folch J. M. Preparation of lipid extracts from brain tissue.— J. Biol. Chem., v. 191, 1951.
26. Folch J. M., Lees M., Sloam-Stanley G. H. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues.— J. Biol. Chem., v. 226, № 1, 1957.
27. Галимов Э. М. Геохимия стабильных изотопов углерода. «Недра», М., 1968.
28. Bigeleisen J., Ishida T., Spindel W. Theoretical analysis of chemical isotope fractionation by orthogonal polynomial methods.— Advances Chem., v. 89, 1969.
29. Bigeleisen J., Ishida T., Spindel W. Isotope chemistry and molecular structure. Intern. Meet. Isotope effects in phys. chem. proc., cluj., 1973.
30. Meinshein W. G., Rinaldi G. G. L., Hayes J. M., Schoeller D. A. Intramolecular isotopic order in biologically produced acetic acid.— Science, 1974.
31. Малер Г., Кордес Ю. Основы биологической химии. «Мир», М., 1970. (H. Mahler, E. Cordes. Basic biological chemistry, Harper a. Row, New York, 1968).
32. Биогенез природных соединений, «Мир», М., 1965.
33. Clayton R. B. Biosynthesis of sterols, steroids and terpenoids.— Quart. Rev., v. 19, 1965.
34. Grob E. C., Baller R. Über die Biosynthese des  $\beta$ -Carotis bei *Mucor hiemalis* Wehmer.— Helv. Chim. acta, v. 39, p. 1975, 1956.
35. Buell G. C., Reiser R. Glucuride — glucerol precursors in the Intestinal mucosa.— J. Biol. Chem., v. 234, № 2, 1959.
36. Sprinson D. B., Coulon A. The precursors of sphingosine in brain tissue.— J. Biol. Chem., v. 207, № 2, 1951.
37. Shemin D., Wittenberg J. The mechanism of porphyrin formation.— J. Biol. Chem., v. 192, p. 315, 1951.
38. Дегли С., Никольсон Д. Метаболические пути. «Мир», М., 1973.

## ORDERED DISTRIBUTION OF CARBON ISOTOPES IN INDIVIDUAL COMPOUNDS AND COMPONENTS OF THE LIPID FRACTION OF ORGANISMS

E. M. GALIMOV, V. G. SHIRINSKY

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

The carbon isotopic composition of narrow fractions and individual compounds of lipids isolated from plant and zooplankton samples has been investigated. The close correlation between the carbon isotopic composition and the values of  $\beta$ -factors of the investigated lipids is shown, what leads to the conclusion about the carbon isotopic-exchange equilibrium in the investigated system. A theoretically possible model of the realization of thermodynamical isotopic effects in biological systems is suggested on the basis of the isotopic-exchange equilibrium between the enzyme-substrate complex and the carbon structure being synthesized.