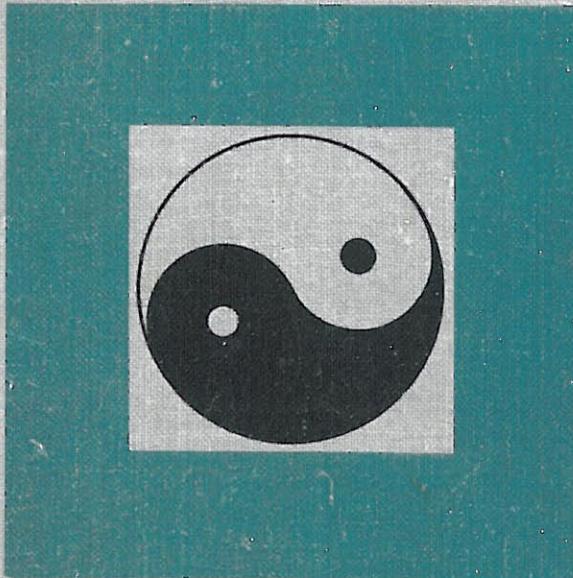


Э.М.ГАЛИМОВ

---

**ПРИРОДА  
биологического  
фракционирования  
изотопов**



ИЗДАТЕЛЬСТВО · НАУКА ·

АКАДЕМИЯ НАУК СССР  
ОРДЕНА ЛЕНИНА ИНСТИТУТ ГЕОХИМИИ И АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ  
ИМ. В.И. ВЕРНАДСКОГО

Э.М. ГАЛИМОВ

ПРИРОДА  
биологического  
фракционирования  
изотопов



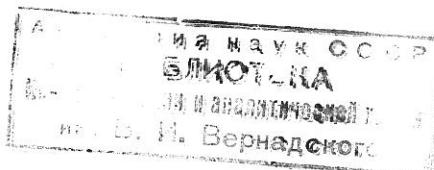
ИЗДАТЕЛЬСТВО "НАУКА"

Москва 1981

Галимов Э.М. Природа биологического фракционирования изотопов. М.: Наука, 1981.

Обобщение имеющихся данных по изотопному составу биологических соединений и результатов биохимических экспериментов показывает, что организмам присуще закономерное распределение изотопов между биомолекулами и внутри биомолекул. Эта закономерность состоит в наличии зависимости между изотопным составом углерода соединений и величинами характеризующих их термодинамических изотопных факторов. В работе изложен разработанный автором метод оценки термодинамических изотопных факторов биомолекул. Сформулирована концепция термодинамически упорядоченного распределения изотопов в биологических системах. Показано, что механизм наблюдаемого фракционирования изотопов связан с механизмом ферментативного катализа. Предлагается теория биологического фракционирования изотопов, объясняющая экспериментально установленные закономерности. Рассматриваются некоторые биохимические и геохимические следствия обсуждаемого явления термодинамически упорядоченного распределения изотопов в биосистемах.

Ответственный редактор  
академик АН СССР **А.И. ОПАРИН**



## ПРЕДИСЛОВИЕ

Согласно диалектико-материалистическим представлениям, жизнь является одной из форм движения материи, которые возникают как новые, отсутствовавшие ранее качества в процессе эволюции материи на определенной ступени ее развития.

Наша земная жизнь является результатом эволюции углеродистых соединений. Весь путь этой эволюции можно разделить на два этапа: 1) химический и 2) предбиологический. Отдельные звенья первого из них мы можем обнаружить и изучать не только на нашей планете, но и на других объектах звездного мира: в межзвездном пространстве, на поверхности планет, луны, в составе комет и метеоритов. В них, в частности, мы можем непосредственно обнаружить весьма сложные и биологически значимые органические соединения, но никаких признаков организмов здесь нет. Эволюция здесь остановилась на химической стадии, поэтому мы на этих объектах ее можем изучать в чистом виде, не усложненную биологическими процессами биосфера, в противоположность тому, что мы имеем в условиях земной поверхности.

Пути химической эволюции углеродистых соединений сейчас широко изучаются также на основании модельных опытов, вскрывающих термодинамические потенции органических веществ и возможность их реализации в тех условиях, которые можно предполагать существовавшими на поверхности примитивной Земли.

Совокупность всего уже накопленного в настоящее время громадного фактического материала является солидным основанием для утверждения, что любое органическое вещество, как мономерное, так и полимерное, было способно возникать абиотическим путем на той или иной "субвитальной территории" Земли, в тех или иных разнообразных внешних условиях. Казалось, что в отношении химической стадии эволюции углеродистых соединений на пути к возникновению жизни задача в основных чертах уже разрешена. Однако сейчас очень остро встает вопрос о первичном возникновении более тонких особенностей внутримолекулярного строения биогенных органических веществ, особенностей, отсутствующих у соединений, полученных в модельных синтезах, — оптическая изомерия и характерная лишь для мира живых существ изотопная композиция углеродных атомов.

В очень слабом выражении возникновение оптической изомерии органических веществ может быть воспроизведено на основе абиотических факторов (кристаллы кварца, циркулярно поляризованный свет). Но сейчас накапливается все больше фактов, показывающих, что высокая чистота оптической асимметрии современной протоплазмы изначально возникла только на биологическом этапе эволюции, когда на физико-

химические закономерности неорганического мира наложилась новая, характерная для жизни закономерность – естественный отбор надмолекулярных, фазовообособленных систем, основанный на их взаимодействии с окружающей внешней средой.

Наряду с оптической изомерией характерным для мира живых существ является то, что углерод организмов обогащен легким изотопом  $^{12}\text{C}$  по сравнению с углеродом неорганических источников  $\text{CO}_2$ .

Еще недавно существовало мнение, что биологическое фракционирование изотопов – процесс в основном локализованный на стадии начальной ассимиляции  $\text{CO}_2$  автотрофами, а физический смысл изотопного фракционирования трактовали чисто кинетически, видели его в том, что в ансамбле взаимодействующих частиц частицы меньшей массы обладают большей скоростью реагирования, они подвижнее. Поэтому продукты реакции обогащаются легким изотопом, а в непрореагировавшем остатке накапливается тяжелый углерод.

Вместе с тем пытались по одному только суммарному соотношению  $^{12}\text{C}$  и  $^{13}\text{C}$  судить о биотическом или абиотическом происхождении того или иного природного органического вещества.

Однако все увеличивающийся фактический материал, получаемый при изучении изотопного состава углерода как биогенных, так и абиогенных органических веществ, искусственно синтезированных или выделенных из объектов земной коры, метеоритов и пр., показал, что дело обстоит гораздо сложнее. Оказалось, что не только на стадии фотосинтеза, но и при некоторых других биохимических процессах возникают изотопные эффекты и что суммарное соотношение изотопов углерода в том или ином объекте далеко не всегда характеризует его биогенное происхождение. В этом отношении гораздо более существенно присущее организмам закономерное распределение изотопов между биомолекулами и внутри биомолекул.

Книга Э.М. Галимова "Природа биологического фракционирования изотопов" содержит обширный материал по изотопному составу углерода, накопившийся в научной литературе или полученный самим автором экспериментально. Однако ее ни в коем случае не следует рассматривать лишь как систематизированный обзор современных знаний, хотя в этом заключается большое достоинство книги. Свою задачу автор видит в том, чтобы мобилизовать весь имеющийся фактический материал на решение тех фундаментальных и принципиально новых положений, которые он отстаивает: среди них в особенности экспериментальному и теоретическому доказательству значения термодинамически упорядоченного распределения изотопов в биологических системах, которое, согласно автору, коррелирует с термодинамическим изотопным фактором ( $\beta$ -фактором). На этой основе автор разработал свой оригинальный метод исследования изотопной упорядоченности ряда биологических систем и применил его в своей экспериментальной работе над большим числом изучаемых им объектов.

Сделанные автором общие выводы в некоторых случаях носят еще дискуссионный характер, но и они представляют большой интерес для последующего изучения этой сложной проблемы.

Для меня как биолога, работающего над проблемой происхождения жизни, особый интерес представляет утверждение автора, что высшим критерием для распознания биогенных и abiогенных соединений может служить характер внутримолекулярного распределения изотопов, которое может возникнуть не просто в результате отдельной реакции (даже ферментативной), а в целом их цикле, осуществляемом в фазово-обособленной открытой системе. Как известно, термодинамика такого рода систем отличается от классической термодинамики, и это находит свое отражение и в явлении распределения изотопов.

Возникновение такого рода многомолекулярных систем в результате неспецифической самосборки органических макромолекул характеризует собой самую начальную стадию перехода от химической эволюции к ее биологическому этапу. Таким образом (так же как в отношении оптической асимметрии), пути возникновения закономерного внутримолекулярного распределения изотопов в органических соединениях нужно искать не на молекулярном уровне, а на уровне фазовообособленных многомолекулярных открытых систем, взаимодействующих с окружающей средой и эволюционирующих на основании примитивного отбора.

Конечно, предлагаемая читателю обширная работа Э.М. Галимова не является "книгой для легкого чтения", она требует серьезной критической работы над собой. Книга богата новыми фактами и идеями и, несомненно, явится значительным шагом вперед на пути изучения сложной проблемы биологического фракционирования изотопов.

Академик А.И. ОПАРИН

## ВВЕДЕНИЕ

Свойства изотопов близки. Замещение одного изотопа на другой в химическом соединении почти не влияет на течение тех процессов, в которых это соединение участвует. Поэтому изотопы могут служить почти идеальными индикаторами поведения элементов в физических и химических процессах. В то же время свойства изотопов нетождественны, причем различие между изотопами имеет иную природу, чем между элементами. Соответственно принципы химии изотопов отличны от принципов, описывающих поведение химических элементов, т.е. обычной химии. Поэтому, изучая фракционирование изотопов, т.е. результат неодинакового поведения изотопов, можно получить качественно новую информацию о содержании и механизме процессов по сравнению с той, которую дает обычная химия.

Исторически сложилось так, что первые и наиболее серьезные успехи в применении изотопных методов в биохимии были связаны с использованием изотопных индикаторов. Биохимики сразу оценили преимущества использования изотопов в качестве "меченых атомов" для исследования сложных процессов химического превращения и транспорта вещества в организмах. С применением изотопов, в частности изотопов углерода сначала радиоактивного  $^{14}\text{C}$ , а затем стабильного  $^{13}\text{C}$ , связаны выдающиеся достижения последних десятилетий в понимании химии живого. Эффектами фракционирования изотопов в методе меченых атомов в большинстве случаев можно было пренебречь либо учитывать их при помощи поправок. Ряд фундаментальных исследований, среди которых прежде всего следует назвать книгу С.З. Рогинского "Георетические основы изотопных методов изучения химических реакций" (1956), был посвящен анализу процессов фракционирования изотопов в значительной степени с точки зрения оценки величины тех поправок на фракционирование, которые должны приниматься в расчет при использовании метода изотопной метки. Успехи применения меченых атомов в биохимии привели к тому, что понятие изотопии в представлении многих биохимиков стало прочно ассоциироваться с индикаторными свойствами изотопов, с понятием искусственно вводимой изотопной метки.

Другой сферой, в которой изотопия нашла широкое применение, были геологические науки. Здесь развитие изотопных методов складывалось иначе. Понятно, что метод изотопных индикаторов для изучения геологических процессов, которые делятся миллионы лет, имеет ограниченную перспективу. Поэтому геохимики сосредоточили внимание на изучении фракционирования изотопов, пытаясь извлечь геологически полезную информацию из тех тонких изотопных эффектов, которые возникают в природных процессах. Для этого прежде всего нужно было добиться

высокой точности измерения изотопного состава элементов. В этой связи следует заметить, что поразительный прогресс в технике масс-спектрометрического изотопного анализа, достигнутый в последнее время и позволивший ныне измерять вариации изотопного состава с точностью, превышающей 0,01%, был в значительной мере инициирован интересами геохимиков и в известной степени был результатом усилий самих геохимиков-экспериментаторов. Систематическое изучение изотопного состава элементов природных соединений привело к накоплению обширного фактического материала, позволившего в весьма детальных чертах проявить картину геохимического поведения изотопов.

По мере развития этих работ становилось все более очевидно, что многие стороны распределения изотопов в природе контролируются процессами, происходящими в биосфере. Поэтому геохимические исследования все чаще стали включать подробное изучение изотопного состава биологических объектов. В результате сложилась любопытная ситуация, когда значительная часть экспериментальных данных, касающихся изотопного состава биосистем, оказалась полученной в ходе геохимических исследований. Этим, может быть, объясняется и тот факт, что многие геохимики, интересующиеся ролью живого вещества в природе, к числу которых автор причисляет и себя, обращались и обращаются к обсуждению биологического фракционирования изотопов.

Первоначально понятие биологического фракционирования изотопов связывалось исключительно с тем фактом, что изотопный состав элементов, образующих живое вещество ( $H$ ,  $C$ ,  $N$ ,  $O$ ,  $S$ ), в той или иной мере отличается от изотопного состава этих элементов в соединениях неживой природы. Подавляющая часть известных экспериментальных данных относится к углероду, что оправдано, впрочем, той ролью, которую играет этот элемент в химии биологических соединений. Углерод организмов обогащен легким изотопом  $^{12}C$  по сравнению с углеродом неорганических источников ( $CO_2$ ,  $HCO_3^-$ ). Изотопное отношение  $^{18}O/^{16}O$  тканей организмов также отлично от такового для углекислоты и воды. Биологические соединения содержат меньше дейтерия, чем внутриклеточная вода.

Существовало представление, и оно многими разделяется до сих пор, что биологическое фракционирование изотопов – процесс, в значительной степени локализованный на стадии начальной ассимиляции  $CO_2$  автотрофами. В свое время эксперименты С. Эпстайна с ферментативным карбоксилированием рибулозодифосфата *in vitro* показали, что углерод фосфоглицериновой кислоты – первичного продукта фиксации  $CO_2$  в цикле Кальвина – действительно обогащен изотопом  $^{12}C$ , причем на величину, достаточную, чтобы объяснить обогащенность этим изотопом живых организмов в целом. Поэтому интерес к теоретическому рассмотрению биологического фракционирования изотопов в значительной мере исчерпался исследованием кинетического изотопного эффекта, сопряженного с реакцией первичного карбоксилирования. Другие изотопные эффекты в организмах если и допускались, то считалось, что они имеют весьма ограниченное значение.

В начале 70-х годов было обнаружено, что растения, фотосинтезирующие по механизму Хетч-Слека ( $C_4$ -растения), в гораздо меньшей степени обогащены изотопом  $^{12}C$ , чем  $C_3$ -растения (М. Бендер, И. Смит и С. Эпстайн, Х. Лерман и др.). Еще раньше было установлено, что отдельные биохимические фракции, а в пределах их индивидуальные соединения и даже фрагменты одного соединения имеют разный изотопный состав.

По мере того как выявлялась картина все более глубокой дифференциации изотопного распределения в биосистемах, высказывались предположения, что не только на стадии фотосинтеза, но и при некоторых других биохимических процессах, например дыхании и биосинтезе липидов (С. Эпстайн), превращении сахаров (Э. Дегенс), биосинтезе аминокислот (Ф. Абельсон) и т.п., возникают изотопные эффекты. Различие фракционирования в  $C_3$ - и  $C_4$ -растениях объяснялось соответственно разными изотопными эффектами при карбоксилировании рибулозодифосфата и фосфоэнолпирофосфата (первичный акцептор  $CO_2$ ) в цикле Хетч-Слека (Т. Вилан, Дж. Кристеллер, Дж. Трафтон, Х. Лерман, М. Эстеп). Независимо от того, насколько убедительными были предлагаемые объяснения для отдельных случаев, общим для них было представление о существовании некоторого ограниченного числа узловых пунктов (барьеров), в которых совершается фракционирование изотопов в живых организмах.

Особенностью подхода, предложенного автором, было то, что биологическое фракционирование не связывалось с какими-либо отдельными путями или этапами биосинтеза, а рассматривалось как свойство, присущее всем биохимическим реакциям, протекающим в организмах. При этом предполагалось, что во всех случаях действует весьма сходный механизм фракционирования изотопов. Общность механизма и универсальность природы изотопного эффекта в разных биохимических реакциях связывалась с тем фактом, что все биохимические реакции протекают при непременном участии ферментов. Излагаемая в работе теория является развитием этого представления.

В основе всего представления лежит новый факт: существование зависимости между изотопным составом биомолекул и величиной их так называемого термодинамического изотопного фактора. Физический смысл последнего состоит в следующем. Если в каком-либо соединении один из атомов заменить на его изотоп, например изотоп  $^{12}C$  на  $^{13}C$ , свободная энергия соединения несколько изменится. Для разных соединений это изменение имеет разную величину. Мерой его служит термодинамический изотопный фактор ( $\beta$ -фактор). В равновесии свободная энергия системы должна быть минимальна. Это условие удовлетворяется, если изотопные отношения, характеризующие соединения, распределены пропорционально их  $\beta$ -факторам: чем больше величина  $\beta$ -фактора, тем выше содержание тяжелого изотопа в соответствующем соединении или структурном положении атома в молекуле.

Тенденция к такому распределению изотопов составляет, как мы увидим, характерное свойство биологических систем. Формально его следовало бы назвать равновесным. Но это не вполне отвечает физическому смыслу явления. Поэтому мы предпочитаем говорить о термодинамически упорядоченном распределении изотопов в биосистемах.

Прежде чем говорить о биологическом аспекте проблемы, нужно сказать, что определение  $\beta$ -факторов биомолекул само по себе представляет серьезную задачу. Классический метод расчета  $\beta$ -фактора требует знания колебательных частот изотопных форм молекулы. Нахождение их сопряжено с громоздкими вычислениями и обычно доступно, да и то с введением ряда допущений, для сравнительно несложных молекул. Для таких соединений, как биополимеры, необходим был иной подход. Он был предложен на основе формулировки некоторых принципов аддитивности и реализован в виде метода изотопических чисел связей. Несмотря на известные ограничения, которые содержит в себе принцип аддитивности, предложенный метод оказался весьма плодотворным для оценки  $\beta$ -факторов соединений углерода. Практически имелось в виду использовать его для интерпретации изотопных эффектов, наблюдавшихся в природных углеводородных смесях, в связи с задачами геохимии нефти и газа. Поэтому первое изложение его было сделано в книге "Изотопы углерода в нефтегазовой геологии" (1973). Однако принципиально он был применим к любым сложным соединениям, в том числе к биомолекулам. Аддитивный метод оценки  $\beta$ -факторов излагается в третьей главе. Это — не переизложение прежних публикаций. Основа метода и сами числовые величины  $\beta$ -факторов остались практически неизменными, но гораздо полнее освещены способы расчета изотопических чисел связей, их физический смысл, существующие ограничения принципов аддитивности. Рассмотрены вопросы точности метода. Введены дополнительные поправки, учитывающие дальнее окружение. Впервые вычислены изотопические числа связей соединений азота и кислорода. Приведены некоторые новые изотопические числа связей соединений углерода. На основе данных этой главы читатель может сам получить числовое значение  $\beta$ -фактора любого интересующего его соединения.

В следующей, четвертой, главе представлены результаты экспериментальных исследований межмолекулярных и внутримолекулярных изотопных эффектов. Большинство этих данных получено в лаборатории геохимии углерода Института геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского АН СССР. Сопоставление изотопного состава биологических соединений с величинами соответствующих термодинамических изотопных факторов показывает, что между ними есть значимая связь. Корреляция оказалась характерной для биологических соединений, разных как по химическому составу, так и по путям биосинтеза. Речь, таким образом, идет о проявлении тенденции, замечательное свойство которой состоит в том, что она носит общий характер для разных типов биологических соединений.

Цель настоящей работы — построить теоретическую модель и попытаться дать объяснение природы наблюдаемого явления. Следует подчеркнуть, что суть излагаемого подхода отнюдь не состоит в применении термодинамики для исследования биологического фракционирования изотопов. Полученное в главе V теоретическое выражение, описывающее фракционирование изотопов в ферментативной реакции, является достаточно общим и включает члены, определяющие как "термодинамическую", так и "кинетическую" составляющую изотопного эффекта. Тот факт,

что ферментативные реакции часто характеризуются термодинамическими изотопными эффектами, является не результатом особого подхода к их исследованию, а объективным их свойством. Это свойство, в свою очередь, определяется механизмом ферментативного катализа. Существенно, что, как показывает анализ, термодинамический характер изотопных эффектов отдельных ферментативных реакций еще не является достаточным условием возникновения термодинамически упорядоченного распределения изотопов внутри молекул и между молекулами биосистемы в целом. Иначе говоря, если бы даже все ферментативные реакции в отдельности характеризовались термодинамическими изотопными эффектами, наблюдаемая зависимость между изотопными составами и  $\beta$ -факторами могла бы не проявиться. Последняя является свойством системы более высокого порядка, чем изолированная ферментативная реакция. Существенными свойствами этой системы являются наличие прямых и обратных путей превращений и стационарный характер протекающих процессов, т.е. свойств, в известной степени характеризующие метаболическую систему. Теоретическая модель фракционирования изотопов в такой системе согласуется с экспериментально установленными зависимостями.

Таким образом, утверждается, что термодинамические изотопные эффекты при определенных условиях присущи ферментативным реакциям, а термодинамически упорядоченное распределение изотопов при определенных условиях присуще метаболическим системам. Нарушение этих условий ведет к нарушению характера изотопного распределения. Отсюда — практическая возможность диагностики состояния биосистем организма, исходя из наблюдаемого характера изотопного фракционирования. Поскольку способность к термодинамически упорядоченному распределению изотопов в сложных органических соединениях — специфическое свойство живых систем, возникает критерий для распознавания биогенных и абиогенных соединений. Более того, можно утверждать, что появление термодинамически упорядоченного распределения изотопов в ходе эволюции отмечает переход от неживого к живому.

Будучи биохимической по-существу, излагаемая концепция имеет существенные геохимические следствия. Из нее следует, что, изучая распределение изотопов в ископаемых формах углерода, можно установить происхождение органических соединений в древних отложениях; установить генетическую связь тех или иных компонентов, например углеводородов нефти, с их конкретными биологическими предшественниками; можно предсказать, как будет меняться изотопный состав природных продуктов преобразования органического вещества, например метана или углекислоты, в зависимости от условий и степени преобразования исходного органического вещества. На этой основе можно объяснить многие стороны геохимического поведения изотопов.

Я испытываю чувство глубокой признательности академику А.И. Опарину за вдохновляющие беседы и за честь, которую он оказал мне, написав предисловие к этой работе и взяв на себя труд по ее научному редактированию. К глубокому сожалению, работа выходит в свет после ухода из жизни Александра Ивановича. Посвящаю книгу его светлой памяти.

## Глава 1

### ПРИЧИНЫ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ ИЗОТОПОВ

Эта книга, как уже говорилось в предисловии, не является систематическим собранием сведений по биохимии изотопов. Изложение в ней посвящено центральной идее — экспериментальному и теоретическому доказательству явления термодинамически упорядоченного распределения изотопов в биологических системах, которое отражает, на наш взгляд, замечательную специфику изотопного фракционирования в ферментативных реакциях.

Однако начать, по-видимому, целесообразно с самых общих вещей, во-первых, для того, чтобы напомнить некоторые используемые здесь понятия химии изотопов, тем более, что в отношении части из них нет установленвшейся трактовки. Во-вторых, если предлагаемая термодинамическая концепция является новой для биохимии изотопов, то сами понятия биохимии изотопов и вообще естественного фракционирования изотопов во многих отношениях новы для биологических наук. Поэтому определенное введение в круг соответствующих идей и сведений может быть полезным.

#### ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ

##### Изотопный состав

Под изотопным составом понимают относительную распространенность изотопов данного элемента, выраженную обычно в виде отношения малораспространенного изотопа к наиболее распространенному изотопу: D/H,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  и т.п. Изотопный состав определяет величину атомного веса.

Долгое время эти величины рассматривались как константы, присущие элементу. В справочниках обычно приводятся "точные" значения атомного веса и относительного содержания изотопов химических элементов. Например, для углерода известны табличные значения атомного веса — 12,01115 и отношение изотопов  $^{12}\text{C}$  и  $^{13}\text{C}$  = 88,69 ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  = 0,011275). Однако вследствие нетождественности свойств изотопов содержание их в различных природных объектах колеблется. Атомный вес того же углерода изменяется от 12,01144 до 12,01002, а изотопный состав — от 0,010225 до 0,011574. Колебания эти невелики, но они на несколько порядков превосходят ту точность, с которой могут быть измерены. Точность современного масс-спектрометрического изотопного анализа (определения атомного веса) составляет  $\pm 0,000001$ .

## Изотопные эффекты

Конфигурация электронных оболочек изотопных атомов одинакова. Поэтому в главных чертах, характеризующих химическое поведение элемента, они сходны. Однако различия изотопов прежде всего в массе, а также величине ядерного спина приводят к тому, что изотопные формы соединения ведут себя несколько различно. В результате изотопный состав продукта реакции может отличаться от изотопного состава исходного соединения. Это различие и представляет собой изотопный эффект.

Изменение изотопного состава может быть вызвано также ядерными реакциями, в результате которых происходит синтез или превращение одного из изотопов. Интенсивность ядерных реакций в обычных земных условиях недостаточна, чтобы изменить соотношение стабильных изотопов таких элементов, как H, C, O, N, S, даже если эффект накапливается в течение сотен миллионов лет. Область практически значимых ядерных изотопных эффектов — это процессы, происходящие в недрах звезд, а также при длительном интенсивном облучении космических тел, например поверхности Луны и метеоритов. Индикаторные количества изотопов могут образовываться в атмосфере Земли в результате взаимодействия ее вещества с космическими лучами. В результате распада радиоактивных элементов и сопутствующих ядерных реакций образуются некоторые стабильные радиогенные изотопы:  $^3\text{He}$ ,  $^{40}\text{Ar}$ ,  $^{87}\text{Sr}$ , изотопы свинца и некоторые другие. Эти изотопные эффекты не имеют отношения к проблемам, рассматриваемым в этой книге.

Фракционирование изотопов в отличие от ядерных превращений изотопов состоит в том, что относительное содержание одного из изотопов в данном соединении увеличивается за счет уменьшения его содержания в другом. Фракционирование изотопов — следствие физико-химической неравнозначности изотопов, которая может сказываться либо на скоростях процессов, либо на энергетическом состоянии системы. В первом случае имеют место так называемые кинетические изотопные эффекты, во втором — термодинамические.

## Измеряемые величины

Изотопные отношения  $\text{D}/\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ,  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ,  $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$  и т.п. могут быть непосредственно измерены на масс-спектрометре. Однако с гораздо большей точностью можно определить так называемую величину  $\delta$ , представляющую собой выраженное в процентах или промилле отклонение изотопного состава исследуемого образца ( $R_x$ ) от изотопного состава некоторого вещества ( $R_{\text{станд}}$ ), принятого в качестве так называемого стандарта:

$$\delta = \left( \frac{R_x - R_{\text{станд}}}{R_{\text{станд}}} \right) \cdot 10^3, \text{ \%} \quad (1.1)$$

или

$$\delta = \left( \frac{R_x - R_{\text{станд}}}{R_{\text{станд}}} \right) \cdot 10^2, \text{ \%} \quad (1.1)$$

В этой работе все величины  $\delta$  приводятся в промилле.

Стандартом может служить в принципе любое вещество. Обычно выбирают вещество, удобное для химической подготовки его к масс-спектрометрическому анализу. Все лаборатории устанавливаются производить публикацию результатов по отношению к какому-либо одному стандарту. В настоящее время существует несколько общепринятых стандартов. Когда речь идет о конкретном элементе, значок  $\delta$  употребляется вместе с символом соответствующего изотопа.

При изотопном анализе водорода и кислорода стандартом служит образец воды, приготовленной так, что изотопный состав его соответствует среднему изотопному составу Мирового океана SMOW [12]:

$$\delta D = \frac{(D/H)_{\text{обр}} - (D/H)_{\text{SMOW}}}{(D/H)_{\text{SMOW}}} \cdot 10^3, \text{ ‰}; \quad (1.2)$$

$$\delta^{18}\text{O} = \frac{(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{\text{обр}} - (^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{\text{SMOW}}}{(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})_{\text{SMOW}}} \cdot 10^3, \text{ ‰}. \quad (1.3)$$

Результаты изотопного анализа углерода принято сообщать по отношению к стандарту PDB, представляющему собой кальцит окаменелости Belemnite americana мелового возраста. Выбор этого стандарта был сделан в свое время совершенно случайно [11]. Вещество его не сохранилось. Однако существуют стандарты, производные от первоначального, и все результаты по традиции пересчитываются к стандарту PDB:

$$\delta^{13}\text{C} = \frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{обр}} - (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{PDB}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{PDB}}} \cdot 10^3, \text{ ‰}. \quad (1.4)$$

Стандартом при изотопном анализе азота служит воздушный азот:

$$\delta^{15}\text{N} = \frac{(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{обр}} - (^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{возд}}}{(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{возд}}} \cdot 10^3, \text{ ‰}, \quad (1.5)$$

а при изотопном анализе серы — троилитная сера метеорита Каньон Дьябло (MCD) [7]:

$$\delta^{34}\text{S} = \frac{(^{34}\text{S}/^{32}\text{S})_{\text{обр}} - (^{34}\text{S}/^{32}\text{S})_{\text{MCD}}}{(^{34}\text{S}/^{32}\text{S})_{\text{MCD}}} \cdot 10^3, \text{ ‰}. \quad (1.6)$$

Точность экспериментального определения величины  $\delta$  на современных масс-спектрометрах составляет 0,1–0,2 $\text{‰}$  (для отношения D/H 0,3–0,6 $\text{‰}$ ).

Величина и знак  $\delta$  имеют относительный смысл. Они зависят от выбранного стандарта. Для последнего, понятно, величина  $\delta$  тождественно равна нулю. Знак “—” указывает на то, что исследуемый образец обеднен малораспространенным изотопом по сравнению со стандартом. Положительная величина  $\delta$  характеризует образец, в котором содержание малораспространенного изотопа выше, чем в стандарте. Для легких биогенных элементов H, C, N, O, S малораспространенным является тяжелый изотоп.

Мерой различия в изотопном составе двух веществ служит коэффи-

циент  $\alpha$ , который называют коэффициентом фракционирования (разделения) или коэффициентом распределения изотопов. Он представляет собой отношение изотопных составов данного элемента в сравниваемых веществах:

$$\alpha_{1-2} = \frac{R_{x_1}}{R_{x_2}}. \quad (1.7)$$

Через величины  $\delta$  коэффициент  $\alpha$  выражается следующим образом:

$$\alpha_{1-2} = \frac{1 + \delta_1 \cdot 10^{-3}}{1 + \delta_2 \cdot 10^{-3}}. \quad (1.8)$$

Хорошим приближением является также следующее соотношение:

$$\alpha_{1-2} \cong 1 + (\delta_1 - \delta_2) \cdot 10^{-3}. \quad (1.9)$$

Выраженную в величинах  $\delta$  разницу в изотопном составе обозначают буквой  $\Delta$ :

$$\Delta_{1-2} = \delta_1 - \delta_2. \quad (1.10)$$

Иногда используют логарифмическое приближение следующего вида:

$$\Delta_{1-2} = \delta_1 - \delta_2 \cong 10^3 \cdot \ln \alpha_{1-2}. \quad (1.11)$$

### КИНЕТИЧЕСКИЙ ИЗОТОПНЫЙ ЭФФЕКТ

Кинетический изотопный эффект обусловлен различием скоростей изотопных форм, т.е. соединений, полностью аналогичных по составу и строению, но отличающихся присутствием в одной или нескольких позициях разных изотопов данного элемента.

Теории кинетических изотопных эффектов посвящена обширная литература. Мы остановимся только на их физическом смысле. Он прост, хотя кинетические изотопные эффекты значительно труднее поддаются численной оценке, чем другие типы изотопных эффектов [1,9].

Поскольку в ансамбле взаимодействующих частиц частицы меньшей массы обладают большей скоростью, молекулы содержащие легкий изотоп, подвижнее, чем молекулы содержащие тяжелый изотоп.

Другой фактор состоит в том, что химические связи, образуемые тяжелым изотопом, прочнее, чем одноименные связи, образуемые легким изотопом. Энергия активации соответствующих реакций с участием изотопно-тяжелой формы выше, чем изотопно-легкой ( $E^* > E$ ). Знаком \* здесь и далее будем обозначать параметры, относящиеся к изотопно-тяжелой форме молекулы. Кинетический изотопный эффект химической реакции численно определяется отношением констант скоростей реакций изотопных форм:

$$\frac{k}{k^*} = \sqrt{\frac{\mu^*}{\mu}} e^{-\frac{E-E^*}{RT}}, \quad (1.12)$$

где  $\mu$  — приведенная масса молекулы;  $T$  — абсолютная температура;  $R$  — газовая постоянная.

Кинетический изотопный эффект зависит от разницы энергий активаций, но не зависит от абсолютной величины энергии активации. Иначе говоря, кинетический изотопный эффект зависит не от кинетики реакций, а только от различия кинетики реакций изотопных форм.

В силу факторов, отмеченных выше, отношение (1.12) больше единицы, т.е. продукты реакций обогащаются легким изотопом, а в непрореагировавшем остатке накапливается тяжелый изотоп. В редких случаях это правило имеет исключения, например, когда в реакции принимают участие свободные атомы. Как следует из соотношения (1.12), кинетический изотопный эффект зависит от величины различия масс изотопных молекул, температуры, разницы энергий активации изотопных форм.

С увеличением температуры кинетический изотопный эффект уменьшается. При  $T \rightarrow \infty$  (практически при  $T > 800-1000^{\circ}\text{K}$ ) экспоненциальный член приближается к единице и величина изотопного эффекта определяется лишь соотношением масс. Разница в энергиях активации изотопных форм поддается количественной оценке с большим трудом. Поэтому в общем случае теоретические расчеты кинетических изотопных эффектов носят весьма приблизительный характер.

Расчет обычно осуществляется в рамках теории переходного комплекса, которая дает для кинетического изотопного эффекта следующее общее выражение [8]:

$$\frac{k}{k^*} = \frac{s^{*\#} s}{s^* s^*} \left( \frac{\nu_L^\#}{\nu_L^{*\#}} \right)^{\frac{1}{2}} \prod_i^{3N-7} \frac{\nu_i^\# e^{-\frac{h\nu_i^\#}{2kT}} \left( 1 - e^{-\frac{h\nu_i^\#}{kT}} \right)}{\nu_i^{*\#} e^{-\frac{h\nu_i^{*\#}}{2kT}} \left( 1 - e^{-\frac{h\nu_i^{*\#}}{kT}} \right)} \times \\ \times \prod_i^{3N-6} \frac{\nu_i^* e^{-\frac{h\nu_i^*}{2kT}} \left( 1 - e^{-\frac{h\nu_i^*}{kT}} \right)}{\nu_i e^{-\frac{h\nu_i}{2kT}} \left( 1 - e^{-\frac{h\nu_i}{kT}} \right)}, \quad (1.13)$$

где  $\nu_i$  — колебательные частоты;  $s$  — число симметрии;  $\nu_L$  — мнимая частота вдоль координаты разложения переходного комплекса;  $N$  — число атомов в молекуле;  $h$  — постоянная Планка. Знакок  $\#$  относится к параметрам переходного комплекса.

Введя обозначение  $u_i = h\nu_i / kT$  с соответствующими индексами и пользуясь функцией Бигеляйзена и Гепперт-Майер, последнее выражение можно существенно упростить [10]:

$$\frac{k}{k^*} = \frac{s^{*\#} s}{s^* s^*} \left( \frac{\nu_L^\#}{\nu_L^{*\#}} \right)^{\frac{1}{2}} \left( 1 - \sum_i^{3N-7} G(u_i)^\# \Delta u_i^\# + \sum_i^{3N-6} G(u_i) \Delta u_i \right). \quad (1.14)$$

Расчет кинетических изотопных эффектов для различных реакций требует знания строения и частот соответствующего переходного комплекса. Эти сведения далеко не всегда доступны.

В качестве приближения иногда принимают, что все колебательные члены в уравнении (1.13), кроме одного, отвечающего колебанию связи, разрываемой в реакции, сокращаются. Тогда уравнение (1.13) сводится к соотношению Эйринга и Кейгла, которое может быть использовано для ориентировочной оценки величины кинетического изотопного эффекта:

$$\frac{k}{k^*} = \frac{s^* s \operatorname{sh} \frac{\hbar \nu_a}{kT}}{s^* s^* \operatorname{sh} \frac{\hbar \nu_a^*}{kT}}, \quad (1.15)$$

где  $\nu_a$  и  $\nu_a^*$  – изотопные частоты, характеризующие валентные колебания разрываемой связи. При этом принимается  $\nu_L = \nu_a$ .

Колебательные частоты молекул могут быть в принципе получены экспериментальным путем из спектров комбинационного рассеяния и инфракрасных спектров соответствующих соединений. Однако изотопические смещения для элементов тяжелее водорода невелики, и их трудно измерить с достаточной точностью. Поэтому изотопные колебательные частоты молекулы вычисляются теоретически.

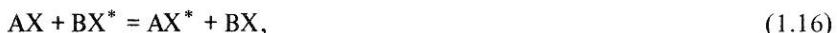
Общий метод состоит в том, что решается в классическом приближении задача колебательного движения молекулы. Соответствующее уравнение имеет вид [4]:  $/GF - I\lambda/ = 0$ , где  $G$  – матрица кинетических элементов;  $F$  – матрица силовых постоянных;  $I$  – единичная матрица;  $\lambda$  – корень квадратного уравнения, который связан с колебательной частотой соотношением  $\nu_i (\text{см}^{-1}) = \sqrt{\lambda_i}$ .

Расчет колебательных частот лежит в основе оценки не только кинетических, но и термодинамических изотопных эффектов. В дальнейшем мы еще вернемся к нему в связи с вопросом о спектральном методе оценки величин так называемых  $\beta$ -факторов.

### ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЙ ИЗОТОПНЫЙ ЭФФЕКТ

Неравноценность свойств изотопов, помимо неравноценности их в кинетическом отношении, проявляется также в том, что соединение, имеющее в своем составе тяжелый изотоп, обладает меньшим запасом свободной энергии, чем изотопно-легкая форма того же соединения. Эта неравноценность изотопных форм неодинакова для различных соединений. Поэтому минимум свободной энергии системы в общем случае достигается при неодинаковом изотопном составе образующих эту систему соединений. Обусловленное этим различие изотопных составов компонентов представляет собой термодинамический изотопный эффект.

Перераспределение изотопа  $X^*$  элемента  $X$  между компонентами системы можно выразить в виде реакции, которую называют реакцией изотопного обмена:



где звездочкой обозначен малораспространенный (тяжелый) изотоп.

Константа равновесия этой реакции, как и любой другой, может быть выражена через концентрации исходных реагентов и продуктов:

$$K = \frac{[\text{AX}^*][\text{BX}]}{[\text{AX}][\text{BX}^*]}. \quad (1.17)$$

С другой стороны, величина константы равновесия определяется изменением свободной энергии в реакции

$$-\Delta Z = RT \ln K. \quad (1.18)$$

Статистическая термодинамика позволяет выразить свободную энергию (изобарно-изотермический потенциал) соединения через так называемую статистическую сумму по энергетическим состояниям (функцию распределения)  $Q$ :

$$Z = -RT \ln Q. \quad (1.19)$$

Отсюда

$$K = \left( \frac{Q_{\text{AX}^*}}{Q_{\text{AX}}} \right) / \left( \frac{Q_{\text{BX}^*}}{Q_{\text{BX}}} \right). \quad (1.20)$$

Методы квантовой статистики позволяют выразить отношение статсумм через колебательные частоты изотопных форм [14]:

$$f_{\text{AX}} = \frac{Q_{\text{AX}^*}}{Q_{\text{AX}}} = \frac{s}{s^*} \prod^{3N-6} \frac{\nu_i^* e^{-\frac{h\nu^*}{2kT}} \left( 1 - e^{-\frac{k\nu_i}{kT}} \right)}{\nu_i e^{-\frac{h\nu_i}{2kT}} \left( 1 - e^{-\frac{h\nu_i^*}{kT}} \right)}, \quad (1.21)$$

где  $s$  и  $s^*$  – числа симметрии.

При помощи (1.21) можно вычислить отношения статсумм по состояниям, если известны колебательные частоты  $\nu_i$  и  $\nu_i^*$  изотопных форм молекул, а следовательно, и величину константы  $K$ .

С другой стороны, соотношение (1.17) для константы представляет собой не что иное, как отношение изотопных составов элемента X в соединении AX и BX:

$$K = \frac{\frac{\text{AX}^*}{\text{AX}}}{\frac{\text{BX}^*}{\text{BX}}} = \frac{(\text{X}^*/\text{X})_{\text{AX}}}{(\text{X}^*/\text{X})_{\text{BX}}}, \quad (1.22)$$

т.е. величину  $\alpha$  (см. (1.7)).

Таким образом, имеется возможность исходя из колебательного спектра молекул определить в конечном счете соотношение изотопных составов соединений в состоянии минимума свободной энергии соответствующей системы.

Следует отметить, что уравнение (1.16) описывает наиболее простой случай, когда рассматривается перераспределение изотопов элемента X, который представлен в соединениях AX и BX лишь одним атомом. Только в этом случае

$$\alpha = K. \quad (1.23)$$

Если происходит перераспределение изотопов между соединениями, в состав которых входит несколько атомов X, то уравнение (1.16) принимает более общий вид:



а константа соответственно

$$K = \frac{[AX_n^*]^m [BX_m]^n}{[AX_n]^m [BX_m^*]^n} = \left( \frac{\varrho_{AX_n^*}}{\varrho_{AX_n}} \right)^m \left( \frac{\varrho_{BX_m^*}}{\varrho_{BX_m}} \right)^n. \quad (1.25)$$

При условии, что все положения X в соединениях AX<sub>n</sub> и BX<sub>m</sub> эквивалентны, например, как у углерода в C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> или водорода в CH<sub>4</sub>, связь между  $\alpha$  и K может быть выражена соотношением [4]

$$\alpha = K^{\frac{1}{mn}} \left[ \prod_{i=1}^n \prod_{j=1}^m \left( \frac{s}{s^*} \right)_i \left( \frac{s^*}{s} \right)_j \right]^{-\frac{1}{mn}}, \quad (1.26)$$

где  $i$  и  $j$  – кратности замещения изотопа X изотопом X\* во всех возможных изотопных формах AX<sub>n-i</sub>X<sub>i</sub>\* и BX<sub>m-j</sub>X<sub>j</sub>\* соединений AX<sub>n</sub> и BX<sub>m</sub>.

Выражение (1.26) можно упростить, если применить следующее обозначение [3]:

$$\frac{\varrho_{AX_n^*}}{\varrho_{AX_n}} = \frac{s}{s^*} \beta_{AX_n}^n. \quad (1.27)$$

Тогда коэффициент распределения изотопов  $\alpha$  окажется равным:

$$\alpha = \frac{\beta_{AX_n}}{\beta_{BX_m}}. \quad (1.28)$$

Более сложный характер носит связь между величинами K и  $\alpha$ , когда атомы X занимают в молекулах неэквивалентные положения, как это имеет место для углерода и водорода в органических соединениях. Но и в этом случае, который был исследован нами в работе [5], коэффициент разделения можно выразить в виде соотношения аналогичного (1.28).

При этом выявляется универсальный характер величины  $f \frac{s^*}{s}$ , представляющей отношение статсумм однократно (в  $i$ -м положении) изотопно-замещенной формы к незамещенной. Мы предложили называть ее термодинамическим изотопным фактором  $i$ -й изотопной формы и обозначили  $\beta_i$ .

Вычислив  $\beta_i$ -факторы всех однократно замещенных форм рассматриваемой пары соединений  $AX_n$  и  $BX_m$  можно выразить коэффициент разделения изотопов между последними следующим образом:

$$\alpha = \frac{\beta_{\Sigma AX_n}}{\beta_{\Sigma BX_m}}, \quad (1.29)$$

где

$$\beta_{\Sigma AX_n} = \frac{1}{n} \sum_i^n (\beta_i)_{AX_n} \text{ и } \beta_{\Sigma BX_m} = \frac{1}{m} \sum_i^m (\beta_i)_{BX_m}.$$

Величины  $\beta_{\Sigma}$ , характеризующие соединение в целом, были названы термодинамическими изотопными факторами соединений.

Мы сочли целесообразным сохранить для обозначения термодинамических изотопных факторов символ  $\beta$ . Однако нужно заметить, что имеется определенное различие в употреблении этого символа в работе Я.М. Варшавского и С.Э. Вайсберга [3] и принятом нами. Упомянутые авторы обозначали символом  $\beta$  величину корня степени  $n$  из произведения в правой части выражения (1.21), где  $n$  – кратность замещения. Понятие термодинамического изотопного фактора относится только к однократно изотопно-замещенной форме ( $\beta_i$ ) или к их среднему арифметическому для соединения ( $\beta_{\Sigma}$ ). Если атомы X занимают в молекуле эквивалентные позиции, оба определения по смыслу совпадают. Однако, если структурные позиции атомов X неэквивалентны, величины  $\beta_i$ , характеризующие  $i$ -е изотопные формы, будут в общем случае неодинаковы, и  $\beta$  в определении [3] теряет физический смысл, который мы ему придаём, в частности тот, который связан, как мы покажем дальше, с понятием внутримолекулярных изотопных эффектов.

К более подробному изложению вопросов, связанных с термодинамическими изотопными эффектами в многоатомных соединениях, мы вернемся в специально посвященном этому разделе. Здесь важно отметить лишь, что благодаря приведенным выше соотношениям термодинамический изотопный эффект может быть вычислен теоретически посредством величин  $\beta$ . Учитывая форму представления  $\alpha$  через величины  $\delta$  (1.9) и связь  $\alpha$  с величинами  $\beta$  в виде (1.29), формулу для термодинамического изотопного эффекта можно записать в виде

$$\delta_1 - \delta_2 = \left( \frac{\beta_1}{\beta_2} - 1 \right) \cdot 10^3, \% . \quad (1.30)$$

В тех случаях, когда необходимо указать элемент, распределение изотопов которого рассматривается, удобно употреблять символ  $\beta$  в сочетании с символом соответствующего изотопа, например  $\beta^{13}\text{C}$ ,  $\beta^{18}\text{O}$  и т.п.

Численные значения величин  $\beta$ -факторов близки к единице для всех элементов, за исключением водорода. Термодинамические изотопные факторы зависят от температуры: с увеличением температуры они быстро уменьшаются. Численные значения  $\beta$  многих соединений разных элементов собраны в работе [13].

Следует подчеркнуть две существенные особенности термодинамических изотопных эффектов.

Во-первых, соотношение термодинамических изотопных факторов характеризует распределение изотопов в состоянии минимума свободной энергии системы, т.е. характеризует равновесное распределение.

Во-вторых, термодинамические изотопные факторы, как и любые другие термодинамические величины, определяют лишь потенциальные возможности системы принять при данных условиях данное состояние. Для того чтобы реально возникло распределение изотопов, отвечающее термодинамическим изотопным факторам, необходимо, чтобы существовал действительный механизм перераспределения изотопов между соединениями. Если соединения не взаимодействуют, то изотопный состав их остается неизменным, как бы долго они не находились в физическом контакте друг с другом.

### ЯДЕРНО-СПИНОВЫЙ ИЗОТОПНЫЙ ЭФФЕКТ

Недавно открыт еще один тип изотопного эффекта — ядерно-спиновый изотопный эффект [2]. На нем следует кратко остановиться, хотя рассмотрение его не связано с основной идеей этой книги. Этот эффект, однако, может иметь значение в некоторых биологических процессах. Кроме того, он занимает весьма специфическое место в систематике изотопных эффектов [6]. Если кинетические, термодинамические и все прочие известные типы изотопных эффектов в конечном счете обусловлены различием изотопов по массе, то ядерно-спиновый изотопный эффект является следствием различия спинов изотопных ядер. Например, два стабильных изотопа углерода  $^{13}\text{C}$  и  $^{12}\text{C}$  имеют соответственно полуцелый и нулевой спин. Из трех стабильных изотопов кислорода два изотопа  $^{16}\text{O}$  и  $^{18}\text{O}$  имеют нулевой спин, а изотоп  $^{17}\text{O}$  — спин, равный  $5/2$ . Практически все биохимически важные элементы содержат изотопы, отличающиеся величиной ядерного спина.

Сущность теоретических предпосылок ядерно-спиновых изотопных эффектов сводится к следующему.

Некоторые химические процессы, прежде всего радикальные процессы, связаны с изменением суммарного электронного спина реагирующей системы или, как говорят, изменением спиновой мультиплетности, например переходом ее из триплетного состояния в синглетное. Выражение для энергии, характеризующей этот переход, содержит член, зависящий от взаимодействия спинов электронов и ядер. Вследствие этого вероятность химического процесса оказывается зависящей от наличия ядерного спина и величины его взаимодействия с электронным спином — так называемого сверхтонкого взаимодействия. Поскольку в общем случае изотопы одного элемента могут отличаться величиной ядерного спина, скорость реакции для изотопных соединений может быть неодинаковой, что и предполагает наличие изотопного эффекта.

Этот механизм может реализовываться в химических радикальных реакциях. Как известно, в молекулах электроны спарены и спины электронов скомпенсированы, т.е. суммарный электронный спин равен нулю.

Такое состояние называется синглетным (*S*). При распаде молекулы на радикалы происходит распаривание электронов. В образовавшейся электронной паре спины неспаренных электронов могут быть либо ориентированы противоположно (синглет), либо они складываются (триплет). В триплетном состоянии суммарный спин равен единице и во внешнем магнитном поле он может ориентироваться в соответствии с правилами квантования тремя способами: +1, 0 и -1, образуя соответствующие подсостояния:  $T_+$ ,  $T_0$  и  $T_-$ .

Если радикальная пара находится в триплетном состоянии, то, прежде чем рекомбинировать, она должна перейти в синглетное состояние.

Вероятность триплет-синглетного перехода различна для ядер, обладающих различным спином. Для магнитных ядер она всегда больше, чем для немагнитных. Различие вероятностей определяет величину ядерно-спинового изотопного эффекта. Изотопный эффект возрастает с увеличением константы сверхтонкого взаимодействия *a*. В отличие от обычных кинетических изотопных эффектов он зависит от напряженности внешнего магнитного поля.

Как известно, существует правило плеяд, в соответствии с которым изотопные сдвиги для плеяды изотопов одного и того же элемента пропорциональны разнице масс изотопов. Для изотопов кислорода, например  $\Delta^{17}\text{O} \simeq 0,5 \Delta^{18}\text{O}$ . Поэтому анализ изотопного состава кислорода практически ограничивают измерениями  $\delta^{18}\text{O}$ , полагая, что тем самым определено также отношение изотопов  $^{17}\text{O}$  и  $^{16}\text{O}$ . Это правило справедливо, однако, для изотопных эффектов, зависящих от масс. Существование ядерно-спиновых эффектов при том обстоятельстве, что  $^{17}\text{O}$  имеет спин, отличный от спинов ядер  $^{16}\text{O}$  и  $^{18}\text{O}$ , делает фракционирование изотопов  $^{17}\text{O}$  и  $^{16}\text{O}$  независимым от  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ . Замечательно, что различие фракционирования  $^{17}\text{O}$  и  $^{18}\text{O}$  является чистым результатом ядерно-спинового изотопного эффекта. Вследствие этого параллельное изучение  $\delta^{18}\text{O}$  и  $\delta^{17}\text{O}$  открывает возможность оценить место и значение в природных процессах, в частности в биологических, радикальных механизмах химических реакций, порождающих ядерно-спиновые изотопные эффекты. Такие процессы, несомненно, свойственны биологическим системам, причем именно биохимия изотопов кислорода, по-видимому, здесь наиболее перспективна.

## СИСТЕМАТИКА ИЗОТОПНЫХ ЭФФЕКТОВ

Помимо рассмотренных, существует множество других типов изотопных эффектов, связанных с диффузией, адсорбцией, испарением, вообще с фазовыми переходами. Известны изотопные эффекты, вызываемые электролизом, термодиффузией, фотооблучением на частоте валентных колебаний одного из изотопов (в частности, лазерное разделение), существует изотопное фракционирование в гравитационном поле, фракционирование, обусловленное различными траекториями изотопных ионов в магнитном поле.

Все эти эффекты можно подразделить на зависящие от скорости процесса и зависящие от состояния системы, т.е. по-существу на кинетичес-

кие и термодинамические в широком понимании этих понятий. В этом понимании к кинетическим следует, отнести, например, диффузионные, туннельные, ядерно-спиновые и другие изотопные эффекты, обусловленные различием скоростей процессов для изотопных форм.

Обнаружение ядерно-спинового изотопного эффекта вносит новую логику в систематику изотопных эффектов [6]. Ядерно-спиновый изотопный эффект относится к числу химических изотопных эффектов, т.е. эффектов, связанных с процессами изменения конфигурации и энергии электронных оболочек. С другой стороны, он зависит от такого типично ядерного свойства, каковым является спин ядра. Можно указать противоположный (довольно редкий) случай, когда ядерный процесс обнаруживает зависимость от строения электронной оболочки, т.е. от химического свойства. Речь идет о  $\beta$ -распаде с предварительным захватом электрона с K-оболочки. Так происходит, например, распад  $^{40}K$  и переход его в  $^{40}Ar$ .

Аналогия этих процессов, с одной стороны, ядерно-зависимого химического, а с другой – химически-зависимого ядерного, – достаточно глубокая и в конечном счете сводится к квантово-механическому феномену присутствия электронной плотности в ядре.

Константа сверхтонкого взаимодействия определяется соотношением

$$a = \frac{8\pi}{3} \beta_e \beta_n |\psi_e(0)|^2, \quad (1.31)$$

где  $\beta_e$  и  $\beta_n$  – магнитные моменты электрона и ядра,  $|\psi_e(0)|^2$  – плотность вероятности присутствия электрона в ядре.

С другой стороны, вероятность  $P_K$  K-захвата (следовательно, вероятность  $\beta$ -распада) также пропорциональна квадрату модуля волновой функции K-электрона на ядре:

$$P_K \sim |\psi_e(0)|^2.$$

Таким образом, оба эффекта с разных сторон примыкают к границе, по одну сторону которой лежит область химических процессов изотопного разделения, а по другую – область ядерных процессов изотопного превращения.

В известном смысле ядерно-спиновый изотопный эффект представляет то звено, которое позволяет связать в единую систему химические и ядерные изотопные эффекты. В результате появляется возможность построить систематику изотопных эффектов на общем принципе зависимости их от глубины свойств материи, затронутых в процессе, обусловившем изотопный эффект.

В этой систематике ядерно-спиновые изотопные эффекты займут положение наиболее глубоких химических изотопных эффектов. (табл. 1.1). Далее в этой иерархии последуют туннельные эффекты, связанные с квантово-механическим просачиванием частиц (зависящим от массы) под энергетическим барьером реакции; затем – обычные химические изотопные эффекты (термодинамические и кинетические), обусловленные процессами, локализованными в электронной

Таблица 1.1.

## Систематика изотопных эффектов

Фактор изменения изотопного состава	Свойство, различие которого обуславливает изотопный эффект	Изотопный эффект	
		тип	разновидность (примеры)
Изотопное разделение	Масса	Инерциальный (корпускулярный)	Гравитационный Диффузионный Электромагнитный (разделение изотопных ионов в электрическом и магнитном поле)
		Корпускулярно-химический	Фазовый Адсорбционный
		Химический	Термодинамический Кинетический ТунNELьный
Изотопное превращение	Спин	Ядерно-химический	Ядерно-спиновый
	Ядерные свойства	Ядерный	К-захват Ядерное превращение

оболочке. Наиболее примитивные изотопные эффекты (корпускулярные) зависят от инертных масс изотопных частиц как целого.

Иерархия изотопных эффектов объективно может быть связана с уровнем их квантовости. Инерциальные (корпускулярные) эффекты полностью описываются средствами классической физики. Химические изотопные эффекты, будучи по природе своей квантовыми, могут быть частично рассчитаны и описаны в рамках классических приближений. Природа изотопных эффектов, связанных с туннельным просачиванием, уже не поддается адекватной классической интерпретации.

В биологическом фракционировании изотопов, несомненно, принимают участие изотопные эффекты самой разной природы. Однако вклад их неодинаков. До сих пор была распространена точка зрения, что биологическое фракционирование имеет преимущественно кинетическую природу, не потому что это было установлено, а потому что кинетические изотопные эффекты из общих соображений казались наиболее правдоподобными для биологических систем.

Мы хотим, однако, в этой книге показать, что в силу специфики механизма ферментативного разделения изотопов существенная роль в биологических системах принадлежит термодинамическим изотопным эффектам и распределение изотопов для статистического множества биомолекул обнаруживает термодинамически упорядоченный характер.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бродский А.И. Химия изотопов. М.: Изд-во АН СССР, 1957.
2. Бучаченко А.Л., Галимов Э.М., Ершов В.В. и др. Обогащение изотопов, индуцированное магнитными взаимодействиями в химических реакциях. – Докл. АН СССР, 1976, 228, № 2.
3. Варшавский Я.М., Вайсберг С.Э. Термодинамические и кинетические особенности реакций изотопного обмена. – Успехи химии, 1957, 24, вып. 12.
4. Вильсон Е., Дешиус Дж., Кросс П. Теория колебательных спектров молекул. М.: Изд-во иностр. лит., 1960.
5. Галимов Э.М. О связи коэффициента разделения изотопов с константами равновесия реакций изотопного обмена углерода в углеводородных системах. – Журн. физ. химии, 1971, № 5.
6. Галимов Э.М. Ядерно-спиновый изотопный эффект – новый тип изотопного эффекта. – Геохимия, 1979, № 2.
7. Гриненко В.А., Гриненко Л.Н. Геохимия стабильных изотопов серы. М.: Наука, 1974.
8. Меландер Л. Изотопные эффекты в скоростях реакций. М.: Мир, 1964.
9. Рогинский С.З. Теоретические основы изотопных методов изучения химических реакций. М.: Изд-во АН СССР, 1956.
10. Bigeleisen J., Mayer M.G. Calculation on equilibrium constants for isotope exchange reactions. – J. Chem. Phys., 1974, 15, p. 261–267.
11. Craig H. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass spectrometric analysis of carbon dioxide. – Geochim. et cosmochim. acta, 1957, 12, N 1/2, p. 133.
12. Craig H. Standard for reporting concentrations of deuterium and oxygen-18 in natural waters. – Science, 1961, 133, p. 1833–1834.
13. Friedman I., O'Neil J.R. Compilation of stable isotope fractionation factors of geochemical interest. – In: Data of geochemistry. 6th ed. Wash.: US Gov. Print. Off., 1977. Chap. KK. Geol. Survey Prof. Pap. 440-K.
14. Urey H.C., Greiff L.J. Isotopic exchange equilibria. – J. Amer. Chem. Soc., 1935, 57, p. 321.

## Глава II

### ИЗОТОПНЫЙ СОСТАВ УГЛЕРОДА ОРГАНИЗМОВ

В биологическом фракционировании изотопов можно выделить два аспекта. Первый – разделение изотопов между организмом и средой, второй – разделение изотопов в биосистемах самого организма.

Эти аспекты взаимосвязаны. Однако исторически сложилось так, что долгое время только первый из них привлекал внимание исследователей. Углерод живых организмов обеднен изотопом  $^{13}\text{C}$  (обогащен изотопом  $^{12}\text{C}$ ) по отношению к исходному для всего живого углероду внешней  $\text{CO}_2$ . Этот замечательный факт был установлен в 1939 г. А. Ниром и Е. Гульбрансеном [45], подтвержден затем Г. Крейгом в его основополагающей работе в 1953 г. [20] и подвергнут всестороннему анализу в десятках последующих работ. Явление обогащенности живых организмов легким изотопом углерода получило название биологического изотопного эффекта. Многие полагают, что этим практически исчерпывается понятие биологического фракционирования изотопов. Хотя позже выяснилось, что внутри самого организма имеет место дифференциация изо-

топного состава, этому факту не придавали значения, пологая, что он обусловлен некоторыми частными причинами. Одно из краеугольных положений данной работы состоит в утверждении, что именно дифференциация изотопов в биосистемах организма определяет главное содержание биологического фракционирования изотопов. Лишь частным проявлением его является разделение изотопов углеродом внешней  $\text{CO}_2$  и первичными биологическими акцепторами углерода.

### ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ИЗОТОПОВ В СИСТЕМЕ ОРГАНИЗМ – СРЕДА

Как ни странно, многие природные (геохимические) закономерности разделения изотопов в системе организм–среда могут быть поняты без знания действительной природы биологического фракционирования изотопов. Это объясняется существованием по крайней мере двух внешних факторов, которые в очень сильной степени влияют на изотопный состав организмов в природных обстановках и которые не зависят от того, каким образом живые организмы производят фракционирование изотопов. Этими факторами являются, во-первых, вариации изотопного состава углекислоты в среде обитания организмов и, во-вторых, коэффициент использования  $\text{CO}_2$ .

То, что изотопный состав организмов (автотрофов) должен зависеть от изотопного состава исходной  $\text{CO}_2$ , кажется вполне очевидным. Но эта зависимость не всегда бывает явной. Во многих случаях она выступает опосредованно. Например, известны зависимости изотопного состава организмов от солености воды в прибрежных акваториях морей или изотопного состава деревьев от высоты их роста, которые в конечном счете есть не что иное, как формы проявления зависимости изотопного состава биологического углерода от изотопного состава внешней  $\text{CO}_2$ .

Что касается коэффициента использования  $\text{CO}_2$ , то нужно заметить, что при любом типе фракционирования изотопов решающее значение для окончательного распределения изотопов между исходным веществом и продуктом имеет степень превращенности или коэффициент использования исходного вещества. Результирующее разделение изотопов произойдет лишь в том случае, если исходное вещество прореагировало частично. Если исходный реагент полностью перейдет в продукт, то последний приобретает изотопный состав исходного вещества независимо от того, сопровождался соответствующий процесс фракционированием изотопов или нет.

Это в полной мере относится и к биологическому фракционированию изотопов. Максимальное разделение изотопов между организмом и внешней  $\text{CO}_2$  при прочих равных условиях должно иметь в том случае, когда скорость лимитируется ассимиляцией  $\text{CO}_2$ , а не ее поступлением. Ограничение доступа  $\text{CO}_2$  приведет к уменьшению видимого изотопного эффекта. Если же вся  $\text{CO}_2$ , диффундирующая в клетки из окружающей среды, вовлекается в процесс биосинтеза, то разделения изотопов между организмом и средой вообще не произойдет.

## Геохимическая шкала

Биологическое фракционирование изотопов происходит на фоне общего разделения изотопов в геологических процессах и является его частью.

Сотни работ, посвященных исследованию изотопного состава углерода природных объектов, в совокупности дают сегодня достаточно подробную картину геохимического поведения изотопов углерода. Систематическое изложение геохимии стабильных изотопов углерода можно найти в специальных монографиях и обзора [3, 2, 24, 28, 34].

Схема на рис. 2.1 может дать представление о том месте, которое занимают биологические объекты на общей шкале распространенности изотопов углерода, и о масштабе биологического фракционирования изотопов в сопоставлении с общим диапазоном вариаций изотопного состава углерода в природе.

В целом диапазон вариаций изотопного состава углерода в природе составляет 120 %. Значительную часть этого диапазона образуют вариации  $\delta^{13}\text{C}$ , так или иначе обусловленные биологическим фракционированием изотопов.

Атмосферная  $\text{CO}_2$  представляет собой общее звено органического и неорганического циклов углерода. Этим двум ветвям круговорота углерода соответствуют два наиболее мощных процесса разделения изотопов углерода, протекающих в природе. Первый из них – биологическое фракционирование изотопов – приводит к обогащению изотопом  $^{12}\text{C}$  углерода биосфера. Второй процесс – обмен изотопов в системе атмосфера – гидросфера – приводит к концентрированию изотопа  $^{13}\text{C}$  в осадочных карбонатах.

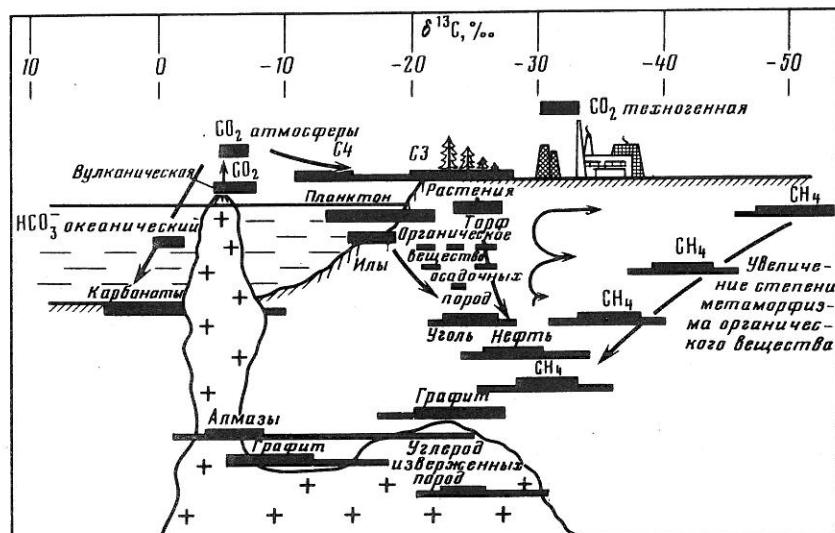


Рис. 2.1. Диапазоны вариаций изотопного состава углерода некоторых природных веществ

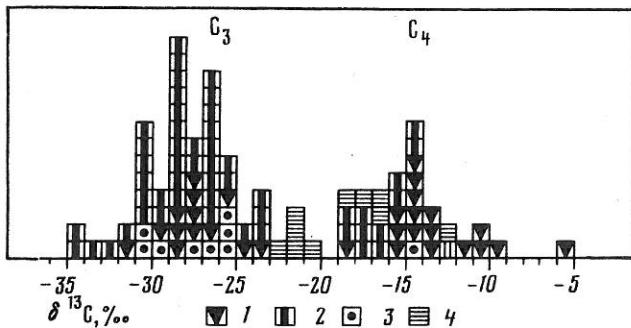


Рис. 2.2. Изотопный состав углерода высших растений

1 – однодольные; 2 – двудольные; 3 – голосеменные; 4 – водоросли (по [54])

Изотопный состав атмосферной углекислоты:  $\delta^{13}\text{C} = -7\text{ ‰}$ . Для углерода биосфера характерны значения  $\delta^{13}\text{C}$  от  $-15$  до  $-35\text{ ‰}$ . Осадочные карбонаты имеют  $\delta^{13}\text{C}$  от  $+5$  до  $-5\text{ ‰}$ .

### Высшие и низшие растения

Между высшими и низшими растениями не отмечено систематических различий в изотопном составе. Правда, морской планктон обычно изотопически легче, чем высшие водоросли. Но наблюдаемые различия почти всегда могут быть объяснены экологическими причинами (в частности, изотопным составом и доступностью  $\text{CO}_2$  в среде обитания). Синезеленые водоросли в некоторых обстановках обеднены легким изотопом [15, 17, 19].

Среди высших растений виды, относящиеся к основным классам голосеменных и покрытосеменных, а среди последних – к подклассам однодольных и двудольных, не отличаются (рис. 2.2) по изотопному составу [54]. Однако относительно изотопически тяжелые растения ( $-6 \div -18\text{ ‰}$ ) почти всегда относятся к подклассу покрытосеменных. Это, по-видимому, объясняется тем местом, которое занимает в филогенезе растения  $\text{C}_4$ -типа, так как именно к последним относятся изотопически тяжелые экземпляры. Отмечалось, что лишайники и грибы относительно обеднены изотопом  $^{12}\text{C}$  [35].

### Возраст растений

Возраст растений не оказывает заметного влияния на изотопный состав их углерода [60]. Молодые деревья иногда несколько обогащены изотопом  $^{12}\text{C}$ , но это связано, по-видимому, не с возрастом, а с высотой растения, поскольку в приземном слое воздуха выше концентрация изотопически легкой углекислоты, образующейся в результате гниения и окисления органических остатков [37, 44].

В одной из работ мы провели сравнение двух рядом произрастающих, но разновозрастных деревьев, проследив изменение изотопного состава

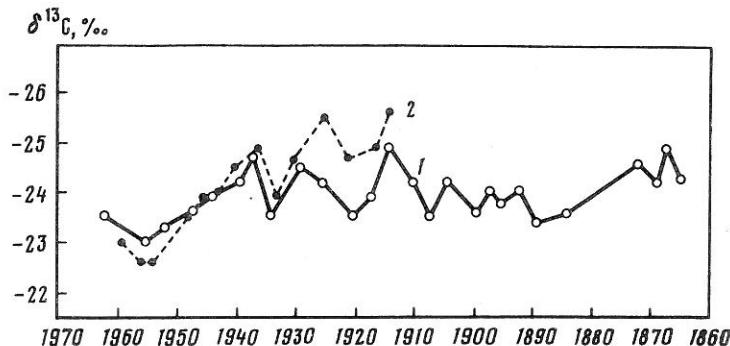


Рис. 2.3. Изменение изотопного состава углерода в годичных кольцах деревьев (высокий берег р. Камы, Пермская обл.)

1 – ель 100-летнего возраста; 2 – ель 50-летнего возраста

углерода древесины по годичным кольцам [32]. Оба дерева показали синхронные колебания изотопного состава, хотя одно из них в соответствующие годы было на 50 лет старше другого (рис. 2.3). Очевидно, эти колебания  $\delta^{13}\text{C}$  были вызваны изменением внешних условий.

Уникальную возможность исследовать вариации изотопного состава углерода в растении на протяжении 2500 лет использовал Г. Крейг [22]. В его распоряжении находился поперечный срез ствола секвойи *Sequoia gigantea*, жившей с 928 г. до н.э. до 1649 г. н.э. Возрастные вариации изотопного состава углерода оказывались несущественными – в пределах 2%. Приблизительно в том же диапазоне они были определены в спиле другого древнего дерева – каури из Новой Зеландии – в интервале времени с 1000 по 1800 г. н.э. [36].

### Растения $\text{C}_3$ - и $\text{C}_4$ -типов

До недавнего времени цикл Кальвина считался общим для всех фотосинтезирующих организмов путем ассимиляции  $\text{CO}_2$ . Первичным продуктом его является трехуглеродная ( $\text{C}_3$ ) фосфоглицериновая кислота, образующаяся в результате карбоксилирования рибулозо-1, 5-дифосфата и последующей реакции дисмутации шестиуглеродного соединения. В середине 60-х годов было установлено, что существует другой тип фиксации углерода  $\text{CO}_2$ , при котором первичными продуктами оказываются четырехуглеродные соединения ( $\text{C}_4$ ): малат и аспарат [10, 39]. Соответствующий реакционный цикл был назван циклом Хетч–Слека по имени исследователей, изучивших его и показавших, что образование четырехуглеродных соединений обусловлено конденсацией экзогенной  $\text{CO}_2$  с фосфоэнолпирватом [33].

Вслед за этим было установлено, что растения обладающие этим типом фотосинтеза, существенно меньше обогащены изотопом  $^{13}\text{C}$ , чем обычные  $\text{C}_3$ -растения [16, 54].

Наземные растения  $\text{C}_3$ -типа характеризуются диапазоном  $\delta^{13}\text{C}$  приблизительно от  $-22$  до  $-32\text{‰}$ . Растения  $\text{C}_4$ -типа образуют диапазон вариа-

ций  $\delta^{13}\text{C}$  от  $-10$  до  $-18\text{‰}$ , почти не перекрывающийся с первым. Представители  $\text{C}_4$ -типа относятся, как правило, к высшим, покрытосеменным растениям, т.е. стоят достаточно высоко в филогенетическом ряду. Типичными представителями их является кукуруза, сорго, многие растения пустынных и засушливых районов.

Еще в ранних работах отмечались отдельные примеры необычно обедненных изотопом  $^{12}\text{C}$  растений [20, 60], хотя подавляющая масса исследованных наземных растений была изотопически легкой. Г. Крейг [20] предположил, что эти аномалии изотопного состава объясняются особой ролью в этих случаях карбонатного и бикарбонатного углерода. Другое объяснение состояло в том, что растения в засушливых районах (аномальные случаи относились к растениям пустынь) более полно используют атмосферную углекислоту, вследствие чего видимое разделение изотопов уменьшается [2]. Позже эти растения были идентифицированы как растения  $\text{C}_4$ -типа. Для них действительно характерно весьма экономное использование углекислоты [33, 43].

В целом вопрос о причинах своеобразного изотопного состава растений  $\text{C}_4$ -типа достаточно сложен. Многие исследователи видят эти причины в высоком коэффициенте использования внешней  $\text{CO}_2$  [42, 56] либо в различном изотопном эффекте ферментативных реакций карбоксилирования фосфоэнолпирувата в цикле Хетч-Слека и рибулозо-1, 5-дифосфата в цикле Кальвина [23, 59]. В главе VIII мы дадим этому несколько иное объяснение.

Следует заметить, что благодаря усиленному исследованию в последние годы изотопного состава растений  $\text{C}_4$ -типа данные, относящиеся к ним, в разного рода сводках и гистограммах занимают равновеликое место с данными об изотопном составе  $\text{C}_3$ -растений (примером этого является и приводимый здесь рис. 2.2). На самом деле распространенность  $\text{C}_4$ -растений существенно меньше, чем распространенность растений  $\text{C}_3$ -типа, а доля их углерода в общем объеме углерода биосфера сравнительно невелика.

### Автотрофы и гетеротрофы

Заметная обогащенность легкими изотопами углерода по сравнению с исходным углеродом является свойством прежде всего автотрофов. Гетеротрофы мало отличаются или не отличаются по изотопному составу от своего органического источника. Это было установлено как для организмов в природной обстановке [24], так и в эксперименте [12]. Зоопланктон, например, неотличим по изотопному составу от служащего ему пищей фитопланктона [24]. Содержание  $^{13}\text{C}$  в мягких тканях беспозвоночных находится приблизительно в тех же пределах, что и в морских водорослях [21]. Такой же изотопный состав имеют рыбы [50]. Изотопный состав сухопутных животных совпадает с изотопным составом наземных растений [31, 51]. Наблюдается довольно четкая корреляция между изотопным составом некоторых животных и пропорцией растений  $\text{C}_3$  и  $\text{C}_4$ -типов их пищевом рационе [27].

## Наземные и водные растения

Наземные растения (за исключением растений C<sub>4</sub>-типа) в среднем более существенно обогащены легким изотопом, чем растения, произрастающие в воде. Основная масса первых попадает в диапазон  $\delta^{13}\text{C}$  от  $-22$  до  $-32\text{‰}$ . Для водорослей характерен диапазон  $\delta^{13}\text{C}$  от  $-10$  до  $-19\text{‰}$ . Этот факт был установлен давно [14, 20]. По-видимому, это было следующее важное наблюдение вслед за открытием общей обогащенности биологического углерода легким изотопом. Рассматривалось несколько объяснений этого факта. Бикарбонат морской воды ( $\delta^{13}\text{C} = -0,2\text{‰}$ ) изотопически тяжелее воздушной CO<sub>2</sub> ( $\delta^{13}\text{C} = -7\text{‰}$ ). Это объяснение приемлемо, если исходной формой углерода для фотосинтеза служит бикарбонат. Если же таковой является растворенная углекислота, то нужно иметь в виду, что по изотопному составу растворенная CO<sub>2</sub> легче бикарбоната и в этом отношении практически не отличается от воздушной [55]. Другое объяснение состоит в том, что в водной среде в отличие от воздушной углекислоты находится в том же фазовом состоянии, что и в цитоплазме растения. Поэтому здесь, возможно, отсутствует изотопный эффект, сопровождающий переход CO<sub>2</sub> из газовой фазы в клеточную жидкость [47]. Наконец, меньшую обогащенность субаквальных растений легким изотопом можно связать со значительно более низкими, чем в воздухе, скоростями диффузии CO<sub>2</sub> в воде. Вследствие этого при прочих равных условиях коэффициент использования CO<sub>2</sub> из объема среды, прилегающего к растению, в водной среде выше, чем в воздушной. Отсюда возможно соответствующее редуцирование изотопного эффекта.

Заметим в этой связи, что зависимость изотопного состава углерода фотосинтезирующих организмов от концентрации CO<sub>2</sub> реально наблюдалась в ряде экспериментов. Например, диатомовые водоросли *Cyclotella* и *Skeletonema*, выращивавшиеся в воде морского состава при нормальных условиях, имели изотопный состав, обычный для морского планктона. Те же самые виды при значительном избытке CO<sub>2</sub> и бикарбоната в растворе (табл. 2.1) оказались заметно изотопически легче [25]. Практически они приобрели изотопный состав, отвечающий изотопному составу наземных организмов.

Чувствительность к концентрации углекислоты характерна и для растений, потребляющих углекислоту из воздуха (табл. 2.2), хотя ввиду большей подвижности воздушной CO<sub>2</sub> она выражена в меньшей степени, чем для водных растений.

Аналогичные по своему характеру эффекты были зафиксированы и в других опытах, причем вплоть до полного исчезновения биологического изотопного эффекта, как это, например, наблюдалось при определенных концентрациях CO<sub>2</sub> в опытах Дж. Кальдера и П. Паркера с синезелеными водорослями [19]. Необходимо иметь в виду также возможные физиологические реакции организма на изменение концентрации углекислоты в среде и связанное с этим изменение изотопного фракционирования.

В наземных условиях в зависимости от местной климатической и экологической обстановки концентрация и изотопный состав CO<sub>2</sub> могут

Таблица 2.1

Зависимость изотопного состава углерода планктона от обилия  $\text{CO}_2$  в среде обитания [25]

Организм	$T^\circ, \text{C}$	pH	Обилие $\text{CO}_2$	$\Delta^{13}\text{C} = \delta^{13}\text{C}_{\text{Copr}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{HCO}_3^-}$
Cyclotella	20	8,6	Воздушная концентрация, нормальная аэрация	-17,0
	20	8,2	10-кратный избыток $\text{HCO}_3^-$	-26,0
	20	5,8	5%-ная концентрация $\text{CO}_2$	-27,6
Sceletonema	18	8,6	Аэрация слабая	-12,3
	18	8,2	Энергичная аэрация	-19,1

Таблица 2.2

Изотопный состав углерода томатов, выращенных в атмосфере с разной концентрацией  $\text{CO}_2$  ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2} = 0,0\%_0$ ) [47]

Концентрация $\text{CO}_2$	Вес растения, г	$\delta^{13}\text{C}, \%_0$	Концентрация $\text{CO}_2$	Вес растения, г	$\delta^{13}\text{C}, \%_0$
0,015	9,3	-24,7	1,5	42,1	-28,5
0,05	35,1	-26,3	1,5	50,1	-27,9

отличаться от тех, которые характерны для атмосферы в среднем. В густых лесах, в надпочвенном слое воздуха возрастает доля углекислоты органического происхождения. Поэтому изотопный состав ее составляет не  $-7\%_0$ , как для атмосферы в среднем, а  $-8 \div 11\%_0$  /1,37/. Это, в свою очередь, приводит к смещению изотопного состава углерода ассимилирующих эту углекислоту растений.

В местах с более высокой циркуляцией воздуха, на участках, открытых ветрам, углекислота имеет "нормальный" изотопный состав. Поэтому растения, например на горных склонах, на  $1 \div 2\%_0$  меньше обогащены изотопом  $^{12}\text{C}$ , чем те же виды в других обстановках [38].

В результате деятельности человека в воздух выбрасывается огромное количество углекислоты, образующейся в результате сгорания разного вида топлива: нефти, газа, угля. Так как углерод органического топлива обогащен изотопом  $^{12}\text{C}$ , техногенная углекислота изотопически легкая ( $\delta^{13}\text{C}$  приблизительно  $-30\%_0$ ). Поэтому в городах и промышленных районах воздушная углекислота на  $2 \div 8\%_0$  обогащена легким изотопом [30], что сказывается и на изотопном составе растений в этих районах.

В ряде работ [29, 32, 52] была сделана попытка использовать это обстоятельство, чтобы по кольцам роста деревьев установить, происходит ли глобальное накопление техногенной  $\text{CO}_2$  в атмосфере, что, как известно, может иметь известные последствия для климата Земли. Упомянутая выше наша работа [32] была предпринята именно с этой целью.

## Пресноводные и морские растения

Пресноводные растения, как правило, в заметно большей степени обогащены легким изотопом, чем морские. Для морского и океанического планктона характерны  $\delta^{13}\text{C}$  от  $-17$  до  $-22\text{\textperthousand}$ , в то время как пресноводный планктон может иметь значения  $\delta^{13}\text{C}$  от  $-20$  до  $-30\text{\textperthousand}$ . Это объясняется тем, что с грунтовыми водами в пресноводные водоемы поступает большое количество изотопно-легкой углекислоты органического происхождения [2]. Бикарбонат речных и озерных вод имеет  $\delta^{13}\text{C}$  от  $-9$  до  $-14\text{\textperthousand}$  [46, 58] в отличие от  $-0,2\text{\textperthousand}$ , характерного для океанической воды. В сущности, это свойство не пресноводных, а внутриконтинентальных, причем небольших водоемов. Чем больше водоем и лучше развита в нем циркуляция воды, тем лучше условия обмена в системе  $\text{HCO}_3^-(\text{воды}) - \text{CO}_2$  (атм) и тем ближе изотопный состав бикарбоната воды к равновесному значению, которое в принципе одинаково для морского и пресноводного бикарбоната.

В зоне, переходной от континентальной к морской обстановке – в районах шельфа, эстуариях больших рек – отмечается градиент изотопного состава углерода организмов (тот же направлении, что и изменение солености воды) от значений  $\delta^{13}\text{C} 24 \div -30\text{\textperthousand}$ , характерных для пресноводных организмов, к значениям  $\delta^{13}\text{C} -18 \div -22\text{\textperthousand}$ , характерных для типичных морских организмов.

## Роль температуры

Изотопный состав углерода живых организмов в некоторых случаях обнаруживает связь с температурой среды обитания. Связь, как правило, состоит в некотором обогащении растений легким изотопом с понижением температуры. Так, океанический планктон изотопически легче в более холодных высокосиротных акваториях. Это было установлено на примере планктона, собранного в Атлантическом [53] и Индийском океанах [8]. В наземных растениях изменение изотопного состава углерода в последовательных годичных кольцах иногда обнаруживало корреляцию с изменением температурных условий в соответствующем районе за время жизни растения [41]. В лабораторных экспериментах была выявлена температурная зависимость состава биологического углерода нескольких видов планктона [25]. В некоторых случаях закономерное изменение изотопного состава органического углерода с температурой не обнаруживается [18, 19, 56].

Поскольку в холодной воде концентрация углекислоты больше, чем в теплой, температурная зависимость может быть приписана частично изменению с температурной коэффициента использования  $\text{CO}_2$  [24]. С другой стороны, как будет показано позже, температурная зависимость может являться следствием термодинамического упорядоченного распределения изотопов в биологических системах.

## ИЗОТОПНЫЙ СОСТАВ БИОХИМИЧЕСКИХ КОМПОНЕНТОВ

Большая часть экспериментальных данных по изотопному составу биохимических компонентов и индивидуальных соединений, входящих в состав организмов, приводится в последующих главах в связи с изложением концепции термодинамически упорядоченного распределения изотопов в биосистемах. Сведения, излагаемые здесь, носят предварительный характер.

### Липиды

Липиды отличаются от других биохимических компонентов более высокой обогащенностью легким изотопом.

В табл. 2.3 приведены данные П. Парка и С. Эпстайна [48], а в табл. 2.4 — наши данные [7], в совокупности охватывающие довольно широкий таксономический диапазон. Во всех случаях липиды неизменно обогащены

Во всех случаях липиды неизменно обогащены изотопом  $^{12}\text{C}$  относительно растения в целом и относительно белков (суммарной фракции аминокислот).

Таблица 2.3

Сравнение изотопного состава углерода растений и их липидных фракций [48]

Растение	$\delta^{13}\text{C}$ , ‰			Доля хлорофформенных липидов, %
	растение в целом	липиды	остаток	
Ulva sp.	-15,7	-23,5	-15,4	4,0
Gelidium sp.	-20,5	-24,3	-19,9	9,4
Macrocystis pyrifera	-12,6	-21,0	-12,7	1,7
Фитопланктон смешанный (преимущественно <i>Prorocentrum micans</i> )	-9,2	-14,2	-8,3	6,8
<i>Asplenium bulbiferum</i>	-29,2	-37,9	-30,7	3,8
<i>Triticum vulgare</i>	-28,5	-31,1	-27,6	11,6
<i>Sequoia gigantea</i>	-26,4	-28,3	-25,2	6,4
<i>Solanum tuberosum</i>	-25,6	-33,6	-25,6	0,2

Таблица 2.4

Изотопный состав углерода липидов, суммарной фракции аминокислот и углерода организмов в целом [7]

Организм	$\delta^{13}\text{C}$ , ‰			Остаток после экстракции липидов
	организм в целом	липиды	амино-кислоты	
<i>Laminaria saccharina</i>	-18,4	-25,1	—	-17,0
<i>Lupinus Luteus</i>	-27,6	-33,0	-26,0	-26,5
<i>Euphausia superba</i>	-25,2	-28,7	-24,0	-24,3
<i>Anabaena variabilis</i>	-27,5	-32,2	-26,4	-26,8

В пределах липидной фракции обнаруживается дифференциация изотопного состава между отдельными компонентами. Полярная фракция липидов (экстрагируемая спирто-бензольной смесью) менее обогащена изотопом  $^{12}\text{C}$  по сравнению с фракцией, экстрагируемой хлорофором [48, 26]. Неомыляемая фракция липидов (преимущественно изопреноиды) в среднем на 2% изотопно тяжелее, чем омыляемая фракция (жирные кислоты) [35].

П. Паркер [49] исследовал изотопный состав индивидуальных жирных кислот. Полученные величины  $\delta^{13}\text{C}$  оказались весьма близкими для предельных и непредельных жирных кислот, принадлежащих к липидной фракции одного организма.

Позже подробное исследование липидной фракции, включая изучение изотопного состава индивидуальных соединений, было предпринято в нашей лаборатории [7]. На этих результатах мы остановимся отдельно в главе IV.

### Белки

Р. Парк и С. Эпстайн [48], впервые исследовавшие, помимо липидов, ряд нелипидных компонентов, обнаружили, что изотопный состав их (белков, крахмала, пектина, лигнина) практически не отличается от среднего изотопного состава углерода организма. Отсюда они сделали заключение, некоторое время разделявшееся многими исследователями, что единственный существующий в организмах механизм фракционирования изотопов (помимо первичной фотосинтетической ассимиляции углерода) связан с биосинтезом липидов.

Из приведенной выше табл. 2.4 видно, что в отличие от липидов белки действительно мало отличаются по изотопному составу от суммарного углерода биомассы организма.

Однако впечатление отсутствия заметного фракционирования изотопов, создаваемое близостью изотопного состава белков и среднего углерода биомассы, обманчиво. Как видно из рис. 2.4, на котором приведены

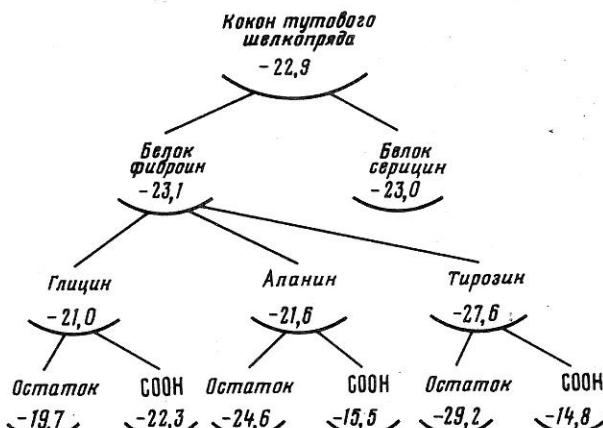


Рис. 2.4. Дифференциация изотопного состава углерода в белке кокона тутового шелкопряда

Таблица 2.5

Изотопный состав ( $\delta / \text{‰}$ ) углерода аминокислот в фотосинтезирующих микроорганизмах (исходный неорганический углерод 0,0) [12]

Амино-кислота	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	<i>Anacystis nidulans</i>	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	<i>Chromatium sp.</i>	<i>Euglena gracilis</i>	<i>Gracilaria sp.</i>
1	2	3	4	5	6	7
<b>Глутамино-вая кислота</b>						
в целом	-18,7	-11,1	-22,6	-15,6	-17,3	-17,2
карбоксил	-8,8	+11,7	-5,6	+2,2	-0,2	-8,4
остаток	-21,1	-16,7	-26,6	-20,1	-21,5	-19,3
<b>Аспарагино-вая кислота</b>						
в целом	-6,6	-9,7	-12,3	-21,8	-9,6	-14,4
карбоксил	+2,2	+2,8	-0,8	-15,9	+1,0	-5,3
остаток	-15,6	-22,1	-24,3	-27,6	-20,3	-18,4
<b>Серин</b>						
в целом	-5,7	-	-	-6,6	-8,3	-14,1
карбоксил	+2,5	-	-	-2,9	-6,1	-8,8
остаток	-9,9	-	-	-8,4	-9,5	-16,8
<b>Тreonин</b>						
в целом	-14,5	-	-	-	-8,6	-14,5
карбоксил	-0,5	-	-	-	+2,1	-8,5
остаток	-19,2	-	-	-	-12,2	-16,4
<b>Глицин</b>						
в целом	-14,3	-10,0	-14,7	-	-12,8	-10,2
карбоксил	-5,3	-8,8	-11,8	-	-11,6	-12,8
остаток	-23,3	-11,1	-17,5	-	-14,1	-7,7
<b>Аланин</b>						
в целом	-10,3	-9,8	-18,2	-	-14,3	-15,3
карбоксил	-7,3	+0,2	-13,5	-	-13,8	-11,5
остаток	-11,8	-14,8	-20,5	-	-14,6	-17,2
<b>Изолейцин</b>						
в целом	-19,6	-10,5	-16,1	-	-	-18,8
карбоксил	-7,4	-1,5	-13,1	-	-	-14,0
остаток	-22,0	-12,2	-17,1	-	-	-19,8
<b>Лейцин</b>						
в целом	-22,7	-17,3	-21,4	-23,5	-23,5	-22,5
карбоксил	-16,3	-15,0	-17,8	-22,5	-13,6	-24,1
остаток	-26,0	-17,8	-22,2	-23,7	-25,6	-22,1
<b>Лизин</b>						
в целом	-17,0	-	-	-	-22,8	-
карбоксил	+2,5	-	-	-	-24,8	-
остаток	-20,9	-	-	-	-22,4	-
<b>Аргинин</b>						
в целом	-19,2	-	-	-	-15,9	-13,8
карбоксил	-2,6	-	-	-	+3,6	-3,6
остаток	-22,6	-	-	-	-19,8	-15,9
<b>Тирозин</b>						
в целом	-19,8	-	-	-	-17,1	-23,0
карбоксил	-4,1	-	-	-	-3,6	-8,3
остаток	-22,8	-	-	-	-18,8	-24,8
<b>Фенилаланин</b>						
в целом	-	-	-	-	-18,6	-21,2
карбоксил	-	-	-	-	-22,2	-9,4
остаток	-	-	-	-	-20,6	-22,7

данные, полученные в нашей лаборатории [6], белки фибронин и серицин, выделенные из кокона тутового шелкопряда, почти совпадают по изотопному составу между собой и с углеродом кокона в целом, однако изотопный состав образующих белок аминокислот заметно дифференцирован.

Изотопный состав аминокислот был подробно исследован Ф. Абелльсоном и Т. Хорингом [12]. Они установили, что изотопный состав аминокислот, выделенных из суммарного гидролизата белковой фракции организма, может быть весьма различен (табл. 2.5), причем наблюдаются определенные устойчивые закономерности. Так, лейцин во всех исследованных организмах относительно обогащен легким изотопом, а аспарагиновая кислота, как правило, наиболее изотопически тяжелая. Чрезвычайно важным было также обнаружение обогащенности тяжелым изотопом углерода карбоксильной группы аминокислот. Это было первое доказательство внутримолекулярной дифференциации изотопов в биологических соединениях.

### Углеводы

Углеводы, так же как белки, представляют собой фракцию, углерод которой по изотопному составу мало отличается от углерода биомассы в среднем. В табл. 2.6 приведены данные Б. Джекобсона и других [35] для крахмала, белков и липидов из клубней картофеля, дополненные результатами исследований белков и углеводной фракций риса и пшеницы, выполненных в нашей лаборатории [6]. Крахмал показал небольшую, на  $1-3\text{\%}$ , обедненность изотопом  $^{12}\text{C}$  по сравнению с белками.

Индивидуальные сахара не исследовались так подробно, как это было сделано для аминокислот. Как видно из табл. 2.6, изотопный состав глюкозы совпадает с изотопным составом крахмала, из которого она была получена.

Э. Дегенс и другие [26] обнаружили, что фракция целлюлозы в планктоне содержит несколько больше изотопа  $^{12}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{cp}} = -22,4\text{\%}$ ), чем гемицеллюлозы ( $\delta^{13}\text{C} = -18,7\text{\%}$ ). Поскольку мономером целлюлозы служит глюкоза, в то время как гемицеллюлозы наряду с гексозами

Таблица 2.6

Изотопный состав ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\text{\%}$ ) углеводов в сопоставлении с другими биохимическими компонентами

Биологический объект	Липиды	Белки	Крахмал	Глюкоза из крахмала	Литературный источник
Клубни картофеля	-34,8	-26,6	-25,5	-	[35]
Клубни картофеля	-	-	-25,2	-24,9	[6]
Рис	-	-26,4	-	-26,1	[6]
Пшеница	-	-25,1	-23,0	-23,1	[6]
Горох	-	-	-25,0	-24,9	[6]

содержат пентозы (в соотношении 2:1), было сделано логическое заключение, что существует дифференциация изотопов между индивидуальными сахарами. В частности, гексозы должны быть несколько обогащены изотопами  $^{12}\text{C}$  по сравнению с пентозами.

### Лигнин

В упомянутой работе Э. Дегенса и других [26] был исследован широкий ряд биохимических конституэнтов морского планктона. Полные результаты этой работы представлены в табл. 2.7. В числе других была исследована лигниновая фракция. Лигнин оказался относительно обогащен изотопом  $^{12}\text{C}$ .

Т а б л и ц а 2.7

Изотопный состав (в ‰) органического углерода основных биохимических конституэнтов планктона [26]

Номер образца*	Общий углерод	Липиды, экстрагируемые спиртом	Липиды экстрагируемые хлороформом	Пектины	Гемицеллюлозы
1	-21,8	-21,2	-23,0	-16,3	-16,7
2	-19,8	-20,6	-20,6	-37,4	-17,3
9	-20,2	-21,7	-28,3	-17,0	-18,2
12	-19,9	-19,8	-23,5	-16,4	-18,3
14	-20,2	-22,5	-31,5	-15,5	-19,7
16	-20,4	-21,0	-30,5	-17,2	-21,0
18	-20,1	-20,9	-34,6	-17,1	-19,6
Среднее	-20,2	-21,1	-29,8	-16,7	-18,7

\* В работе [26] имеется карта мест отбора проб, отвечающих приведенным номерам.

Таблица 27 (окончание)

Номер образца*	Целлюлоза	Общие сахара	Аминокислоты (6N HCl)	Аминокислоты (2N $\text{H}_2\text{SO}_4$ )	Лигнин
1	-20,4	-19,0	-17,9	-17,5	-23,8
2	-20,2	-19,6	-16,1	-15,9	-25,2
9	-21,6	-18,1	-16,5	-16,8	н.о.
12	-21,5	-18,4	-18,0	-17,5	-21,8
14	-23,2	-	-	-	-20,2
16	-23,6	-19,2	-19,1	-18,8	-22,6
18	-26,7	-21,2	-18,8	-17,7	-25,3
Среднее	-22,4	-19,2	-17,7	-17,3	-23,1

Лигниновая фракция, изученная в работе [26], не является лигнином в строгом смысле этого слова. Это ароматические метаболиты — преимущественно гидроксибензойные кислоты, которые в планктоне могут рассматриваться как условные аналоги лигнина в высших растениях. Впрочем, С.М. Манской и Л.А. Кодиной [11] было установлено, что лигнин может быть присущ и некоторым видам низших растений.

Более поздние исследования изотопного состава лигнина высших растений, включая внутримолекулярный анализ, проведенные в нашей лаборатории [5], показали, что этот конституэнт растений действительно относительно обогащен легким изотопом. К этим данным мы обратимся позже.

### Респирируемая углекислота

Углекислота, выделяющаяся в процессе дыхания, была объектом экспериментальных исследований во многих работах [47, 25, 12, 35]. Предполагалось, что изучение ее изотопного состава может дать ключ к пониманию механизма биологического фракционирования изопотов.

Таблица 2.8

Изотопный состав респирируемой углекислоты в эксперименте с томатами ( $\delta^{13}\text{C} = -32,4\text{ ‰}$ ) [47]

Время, прошедшее с начала темнового периода, ч	$\delta^{13}\text{CO}_2, \text{ ‰}$	Время, прошедшее с начала темнового периода, ч	$\delta^{13}\text{CO}_2, \text{ ‰}$
0,16	-24,3	6	-27,6
2	-25,8	16	-28,2
4	-27,2	40	-30,0

Таблица 2.9

Изменение изотопного состава планктона, выдерживавшегося в темноте, в зависимости от длительности темновой экспозиции [25]

Организм	Время, респирации, сутки	$\delta^{13}\text{C}, \text{ ‰}$ бикарбонатного субстрата	$\delta^{13}\text{C}, \text{ ‰}$ углерода клеток	Температура $^{\circ}\text{C}$
Dunaliella	0	0,0	-16,2	18
	1	+0,3	-18,8	18
	5	+0,4	-20,9	18
	12	-	-21,8	18
	19	-	-21,7	18
Skeletonema	0	+3,4	-13,4	8
	1	-	-10,9	8
	6	-	-11,8	8
	12	-	-11,8	8
Skeletonema	0	+2,6	-9,7	18
	1	-	-9,2	18
	6	-	-10,5	18
	12	-	-10,4	18

Было установлено, что в начале темного периода респирируемая углекислота заметно тяжелее органического углерода. Затем она начинает постепенно обогащаться легким изотопом (табл. 2.8).

Органический углерод клеток в течение темного периода также изменяет свой изотопный состав. В отсутствие фотосинтеза выделение обедненной легким изотопом респирируемой  $\text{CO}_2$  приводит к комплементарному обогащению органического углерода легким изотопом [25]. В эксперименте с зеленой водорослью *Dunaliella* было получено резкое обеднение углерода клеток в течение первых пяти дней (табл. 2.9), в последующие дни изотопный состав клеток практически оставался неизменным. В случае диатомовой водоросли *Skeletonema* эффект менее выражен, а тенденция имеет разный знак для двух опытов, проведенных при разных температурах.

### ПОПЫТКИ ОБЪЯСНИТЬ БИОЛОГИЧЕСКОЕ ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ИЗОТОПОВ

Биологическое фракционирование изотопов долгое время отождествлялось с одним лишь явлением обогащенности организмов в целом легким изотопом.

В первых работах ответ на вопрос, почему растения обогащены изотопом  $^{12}\text{C}$ , пытались найти в особенностях поведения  $\text{CO}_2$ . П. Берчи [13] и Г. Крейг [20] указывали на аналогию между процессом растворения воздушной  $\text{CO}_2$  в клеточной жидкости и процессом связывания углекислоты неорганическими поглотителями. Было известно, например, что углекислота, поглощаемая из воздуха раствором гидроокиси бария, обогащается легким изотопом на 10–18% [13]. Дальнейшее обогащение растений легким изотопом связывалось с разного рода циклическими механизмами. Согласно Ф. Викману [60], например, в растениях происходит последовательное увеличение концентрации  $^{12}\text{C}$  в результате накопления вокруг растений продуктов их метаболизма, частично вновь реализуемых в процессе фотосинтеза. Видоизмененный вариант этой гипотезы развил Ч. Килинг [38], предполагавший, что в результате суточного цикла фотосинтеза и циркуляции воздуха будет происходить периодическое накопление вокруг растения  $^{12}\text{CO}_2$  и вынос остаточной  $^{13}\text{CO}_2$ .

Впервые модель фракционирования изотопов, в основе которой лежал собственно биологический процесс, была предложена Ф. Парком и С. Эпстайном [47]. В соответствии с их концепцией разделение изотопов происходит в процессе фотосинтеза, причем оно осуществляется в два этапа. На первой стадии происходит предпочтительное поглощение из воздуха  $^{12}\text{CO}_2$  и растворение ее в цитоплазме растений. Разделение изотопов обусловлено здесь кинетическим изотопным эффектом наподобие того, который предполагался П. Берчи. На втором этапе из растворенной в цитоплазме  $\text{CO}_2$  извлекается, в свою очередь, преимущественно обогащенная изотопом  $^{12}\text{C}$  форма, идущая на синтез органических соединений.

Растворенная в цитоплазме углекислота, извлеченная серной кислотой, действительно оказалась в среднем на 7% легче воздушной (исследовались листья растений томата [47]). Колебания величины  $\delta^{13}\text{C}$  в отдель-

ных опытах составляли — 3—5%, что экспериментаторы объясняли конкуренцией прямого и обратного изотопного эффекта.

Второй этап разделения изотопов углерода Р. Парк и С. Эпстайн моделировали *in vitro* реакцией ферментативного карбоксилирования рибулозидифосфата — начальной реакцией цикла Кальвина, в результате которой получается первый устойчивый продукт фотосинтетической фиксации углерода: две молекулы 3-фосфоглицериновой кислоты.

В результате эксперимента было обнаружено, что фиксируемый в 3-фосфоглицериновой кислоте углерод обогащается легким изотопом на 17%. Следует заметить, что это числовое значение, получившее широкое распространение в литературе, является, вообще говоря, весьма приближительным. Во-первых, реально измеренный изотопный эффект был значительно меньше, так как анализировался изотопный состав фосфоглицериновой кислоты в целом, в которой только один углеродный атом на две молекулы происходит за счет CO<sub>2</sub>. Поэтому вычисленное значение содержит шестикратную ошибку эксперимента. Во-вторых, оноказалось плохо воспроизводящимся. Даже в той же работе Р. Парка и С. Эпстайна в параллельном опыте было получено другое значение (14%). В последующие годы этот ферментативный эксперимент повторялся рядом исследователей, получивших разные результаты. Мы еще вернемся к обсуждению этих данных в последующих главах (см. гл. VIII).

Во всяком случае, получив экспериментально обогащение изотопом <sup>12</sup>C на двух этапах и сложив результаты их: 7 + 17 = 24%, Р. Парк и С. Эпстайн смогли объяснить как обогащенность организмов легким изотопом вообще, так и вариации изотопного состава биогенного углерода в широком диапазоне значений  $\delta^{13}\text{C}$ .

Позже С. Эпстайн [28] несколько видоизменил модель, указав на то, что два последовательных кинетических изотопных эффекта не могут быть аддитивными. В зависимости от того, какой из процессов: прохождение экзогенной CO<sub>2</sub> через клеточную стенку в цитоплазму или фотосинтетическая фиксация CO<sub>2</sub> из цитоплазмы — окажется скорость-лимитирующим, проявится только один из изотопных эффектов. Величина каждого из них, однако, недостаточна, чтобы объяснить весь диапазон наблюдаемых вариаций изотопного состава растений. Поэтому С. Эпстайн предположил, что существует третий путь, которым часть углекислоты выводится из цитоплазмы, а именно транспорт клеточной жидкости через сосудистую систему.

Фракционирование изотопов на стадии фотосинтеза (в рамках двухстадийной модели) рассматривалось как практически полностью определяющее все содержание биологического фракционирования изотопов. Исключение делалось только для липидов. Предполагалось, что обогащение липидов изотопом <sup>12</sup>C является процессом, комплементарным обеднению изотопом <sup>12</sup>C углекислоты, выдыхаемой растением, и происходит в соответствии со следующей схемой [28]:



Одновременно, таким образом, объяснялась наблюдавшаяся в экспериментах обедненность изотопом  $^{12}\text{C}$  респирируемой углекислоты. Однако в дальнейшем эта точка зрения была оставлена. В работе Б. Джекобсона и других [35] (в числе соавторов и С. Эпстайн) признавалось, "что скорость синтеза липидов по углероду составляет менее чем 1%, от скорости продукции  $\text{CO}_2$  и... потребовалось превращение 10% углеводов в липиды, чтобы привести к увеличению на 0,1% величины  $\delta^{13}\text{C}$  респирируемой  $\text{CO}_2$  по отношению к исходному крахмалу" (с. 13).

Ф. Абельсон и Т. Хоеринг вслед за Р. Парком и С. Эпстайном полагали, что "большая часть изотопного фракционирования имеет место в процессе образования углеводов, а именно на стадии рибулозодифосфата" [12, с. 630]. Наблюдавшуюся ими обогащенность изотопом  $^{13}\text{C}$  карбоксильного углерода аминокислот они не связывали с внутренними причинами. Это, по их мнению, просто свидетельствовало о том, "что часть углерода входит в цитоплазму биохимическими путями, отличными от рибулозодифосфата" [12, с. 630]. В качестве такого они указывали на цикл Кребса, в котором  $\text{CO}_2$  может непосредственно потребляться из среды, конденсируясь с пируватом. Углерод этой  $\text{CO}_2$  включается затем в карбоксильные группы аспарагиновой и глутаминовой кислот. Благодаря этому независимому способу включения  $\text{CO}_2$ , который предположительно не связан с заметным фракционированием изотопов, углерод карбоксильных групп аминокислот оказывается изотопически тяжелым. Обогащенность же липидов легким изотопом по сравнению с углеродами требует какого-либо дополнительного процесса фракционирования изотопов. В общих чертах картина биологического фракционирования изотопов представлялась Ф. Абельсону и Т. Хоерингу следующим образом: "Поскольку углерод липидов легкий, законы сохранения требуют, чтобы какая-то другая часть углерода была тяжелой. Или, выражаясь иным образом, изменение в изотопных составах предполагает расщепление популяции молекул на два или более класса или потока. Что-то в этом роде должно иметь место после фиксации  $\text{CO}_2$  рибулозодифосфатом. Часть углерода идет в цикл лимонной кислоты, часть – в углеводы, часть – в липиды, и т.д. Изотопное фракционирование в процессе, ведущем к липидам, вероятно, связано с особой физико-химической стадией в пункте, где поток углерода расщепляется на две или более фракций" [12, с. 632].

Близкие к этому соображения были высказаны Э. Дегенсом [24, 26]. В соответствии с результатами выполненных им с соавторами экспериментов он несколько расширил список возможных барьеров фракционирования изотопов в организмах..

Так же как предшествующие исследователи, Э. Дегенс исходил из того, что процессом, задающим уровень обогащенности организмов изотопом  $^{12}\text{C}$ , является фракционирование изотопов на стадии рибулозодифосфата. Органический углерод, образовавшийся на этой стадии, без дальнейшего фракционирования включается в состав углеводов и белков и с небольшим фракционированием – в состав липидов. Однако в процессе взаимопревращений индивидуальных соединений данной биохимической фракции могут иметь место изотопные эффекты, которые приводят к

вариациям изотопного состава соединений в пределах этой фракции, хотя средний ее изотопный состав при этом остается неизменным.

Доводы в пользу такого содержания процесса приводились, впрочем, чисто умозрительные. Касаясь предполагаемого им фракционирования изотопов между гексозами и пентозами (исходя из фактически установленного различия изотопного состава целлюлозы и гемицеллюлоз), Э. Дегенс с соавторами ограничились лишь указанием на то, что "метаболический путь, ведущий к пентозам, может включать ряд реакций, например карбоксилирование (рибулозидифосфата), декарбоксилирование (пентозный шунт) или существенное перераспределение углеродных атомов (взаимопревращение моносахаров), которые могут вести к изотопному фракционированию" [26, с. 17].

В том же духе было объяснено разнообразие изотопных составов аминокислот в опытах Ф. Абельсона и Т. Хееринга: "С точки зрения множественности путей, которыми может быть перераспределен углерод в цикле трикарбоновых кислот, существует масса возможностей для изотопного фракционирования углерода", и далее: "Белки в наших образцах planktona совпадают по изотопному составу с углеводами. Это предполагает, что изотопный состав углерода, сформированный на уровне РбДФ–ФГК, проходит без существенного изменения в углеводы и белки. А дисперсии величин  $\delta^{13}\text{C}$ , характеризующих индивидуальные сахара и аминокислоты, есть, скорее, результат метаболического перераспределения углеродных скелетов. Следовательно, при условиях стационарного процесса фотосинтеза материальный баланс изотопов углерода всегда будет оставаться константой; в данном случае эта константа принципиально определяется на барьере РбДФ–ФГК" [26, с. 17].

Обогащенность изотопом  $^{12}\text{C}$  "лигниновой" фракции не рассматривалась в качестве самостоятельного феномена, а объяснялось обогащенностью легким изотопом его предшественников: ароматических аминокислот фенилаланина и тирозина.

Ссылаясь на данные П. Паркера [49], установившего небольшие вариации в изотопном составе жирных кислот, Э. Дегенс постулировал также изотопное фракционирование в процессе взаимопревращения жирных кислот.

Основные этапы фракционирования изотопов в организме Э. Дегенс [24, 26] свели к семи барьерам, на которых происходит фракционирование: 1) эффект, связанный с поступлением внешней  $\text{CO}_2$  в цитоплазму; 2) карбоксилирование на уровне РбДФ – ФГК; 3) взаимопревращение сахаров; 4) взаимопревращение аминокислот; 5) дыхание (реакции декарбоксилирования); 6) взаимопревращения жирных кислот; 7) липид–углеводное превращение.

Были предложены и некоторые другие модели. А.А. Ивлев, например, пытался объяснить обогащенность организмов легким изотопом кинетическим изотопным эффектом при декарбоксилировании пирувата: при этом обогащенные легким изотопом  $\text{C}_2$ -фрагменты включаются в биосинтез липидов, а обедненный изотопом  $^{12}\text{C}$  неразложившийся пируват выводится из организма через цикл Кребса [9]. Эта модель повторяет в иной формулировке идею С. Эпстайна об обогащении липидов легким

изотопом в процессе дыхания. Однако сами рассуждения А.А. Ивлева о биологическом фракционировании изотопов основаны на ошибке [4]. Он неосмотрительно перенес результаты опытов с изотопной меткой на интерпретацию изотопных эффектов.

Подводя итоги этому краткому обзору, мы можем отметить, что, во-первых, биологическое фракционирование изотопов характеризуется не только изотопным смещением между углеродом организма и среды, но и глубокой дифференциацией изотопного состава между биохимическими фракциями, индивидуальными соединениями, входящими в состав фракций, и даже внутри биомолекул. Во-вторых, отсутствие систематических различий изотопного состава между высшими и низшими растениями, между отдельными видами высших растений, между автотрофами и гетеротрофами, иначе говоря, отсутствие зависимости изотопного состава от надклеточной организации свидетельствует о том, что биологическое фракционирование изотопов происходит на клеточном уровне, что сложные процессы транспорта веществ и межклеточного обмена, свойственные высшим организмам, играют гораздо меньшую роль в биологическом фракционировании изотопов.

Поэтому справедливыми являются попытки исследователей найти причины биологического фракционирования изотопов в тех физико-химических процессах, которые сопровождают биосинтез органических соединений. Предлагавшиеся гипотезы способны дать более или менее правдоподобную трактовку отдельных фактов, однако они имеют ряд общих недостатков.

Прежде всего они носят качественный характер и сводятся к предположениям о большей или меньшей обогащенности организма (фракции, соединения) тем или иным изотопом, но не содержат никакой основы для количественной оценки биологических изотопных эффектов.

Имеющиеся гипотезы не предполагают какого-либо общего подхода для объяснения наблюдаемых изотопных эффектов. Как следствие они приспособлены лишь для объяснения уже установленных фактов, но на их основе невозможно предсказать факты: скажем, предсказать характер распределения изотопов в еще экспериментально неисследованных классах соединений.

Как мы увидим, новым фактом, совершенно выходящим за рамки существовавших до недавней поры представлений, является связь изотопного состава биомолекул с величинами их термодинамических изотопных факторов. К теории и эксперименту, посвященным изучению и обоснованию этого явления, а также к рассмотрению вытекающих отсюда следствий в отношении механизма биологического фракционирования изотопов мы теперь обратимся.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Галимов Э.М. Изотопный состав углерода почвенной  $\text{CO}_2$ . – Геохимия, 1966, № 9.
2. Галимов Э.М. Геохимия стабильных изотопов углерода. М.: Недра, 1968.
3. Галимов Э.М. Изотопы углерода в нефтегазовой геологии. М.: Недра, 1973.

4. Галимов Э.М. О концепции термодинамического упорядоченного распределения изотопов в биологических системах и ошибках, связанных с ее пониманием. – Геохимия, 1978, № 10.
5. Галимов Э.М., Кодина Л.А., Генералова В.Н. Экспериментальное исследование внутри- и межмолекулярных изотопных эффектов в ароматических соединениях биологической природы. – Геохимия, 1976, № 1.
6. Галимов Э.М., Кодина Л.А., Генералова В.Н. идр. Исследование распределения изотопов углерода в биогенных соединениях. – В кн.: Тр. VIII Междунар. конгр. по орган. геохимии /Под ред. А.В. Сидоренко М.: Наука, 1977, т. 3.
7. Галимова Э.М., Ширинский В.Г. Упорядоченное распределение изотопов углерода в индивидуальных соединениях и компонентах липидной фракции различных организмов. – Геохимия, 1975, № 4.
8. Галимов Э.М., Ширинский В.Г., Бордовский О.К. Изотопный состав углерода липидов planktona Индийского океана. – Геохимия, 1976, № 6.
9. Ивлев А.А. Вопросы теории фракционирования изотопов углерода в фотосинтезирующих организмах. – Успехи соврем. биологии, 1976, 81, вып. 1.
10. Карпилов Ю.С. Распределение радиоактивного углерода  $^{14}\text{C}$  среди продуктов фотосинтеза кукурузы. – Тр. Казах. с.-х. ин-та, 1960, 41, вып. 1.
11. Манская С.М., Кодина Л.А. Геохимия лигнина. М.: Наука, 1975.
12. Abelson P.H., Hoering T.C. Carbon isotope fractionation in formation of amino acids by photosynthetic organisms. – Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1961, 47, N 5, p. 623–632.
13. Baertschi P. Die Fraktionierung der Kohlenstoffisotopen bei der Absorption von Kohlendioxid. – Helv. chim. acta, 1952, 35, S. 1030.
14. Baertschi P. Die Fraktionierung der natürlichen Kohlenstoffisotopen in Kohlendioxidstoffswechsel grüner Pflanzen. – Helv. chim. acta, 1959, 36, S. 773–781.
15. Barghoorn E.S., Knoll A.N., Dembick H., Meinschein W. G. Organic matter from the Gunflint Iron Formation. – Geochim. et cosmochim. acta, 1977, 41, p. 425–430.
16. Bender H.M. Mass spectrometric studies of carbon-13 variations in corn and other grasses. – Radiocarbon, 1968, 10, N 2, p. 468.
17. Behrens E.W., Frishman S.A. Stable carbon isotopes in blue-green algal mats. – J. Geol., 1971, 79, p. 94–100.
18. Berry J., Troughton J.H., Björkman O. Effect of oxygen concentration during growth on carbon isotope discrimination in  $\text{C}_3$  and  $\text{C}_4$  species of Atriplex. – Carnegie Inst. Yearb., 1972, 71, p. 158–161.
19. Calder J., Parker P.L. Geochemical implications of induced changes in  $^{13}\text{C}$  fractionation by blue-green algae. – Geochim. et cosmochim. acta, 1973, 37, p. 133.
20. Craig H. The geochemistry of the stable carbon isotopes. – Geochim. et cosmochim. acta, 1953, 3, N 2/3, p. 53–92. См.: Крейг Г. Геохимия стабильных изотопов углерода. – В кн.: Изотопы в геологии. М.: Изд-во иностр. лит., 1954.
21. Craig H. Carbon-13 in plants and relationships between carbon-13 and carbon-14 variations in nature. – J. Geol., 1954, 62, p. 115–149.
22. Craig H. Carbon-13 variations in Sequoia rings and the atmosphere. – Science, 1954, 119, N 3083, p. 141–143.
23. Deleens E., Lerman J.C., Nato A., Moyse A. Carbon isotope discrimination by the carboxylating reactions in  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_4$  and CAM plants. – In: Proc. 3rd Intern. Congr. on Photosynthesis, Rehovot, 1974, 2–6 Sept.
24. Degens E.T. Biogeochemistry of stable carbon isotopes. – In: Organic geochemistry/Ed. G. Eglinton, M.T. Murphy. Heidelberg Springer, 1969, p. 304–329.
25. Degens E.T., Guillard R.R.L., Sackett W.M., Hellebust J.A. Metabolic fractionation of carbon isotopes in marine plankton. – I. Temperature and respiration experiments. – Deep-Sea Res., 1968, 15, p. 1–19.
26. Degens E.T., Behrend M., Gotthardt B., Reppmann B. Metabolic fractionation of carbon isotopes in marine plankton. – II. Data on samples collected off the coast of Peru and Ecuador. – Deep-Sea Res., 1968, 15, p. 11–20.
27. De Niro M., Epstein S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. – Geochim. et cosmochim. acta, 1978, 42, N 5, p. 495–506.

28. Epstein S. Distribution of carbon isotopes and their biochemical and geochemical significance. — In: Proc. Symp. on CO<sub>2</sub>:Chemical, Biochemical and Physiological Aspects/Ed. Forster et al. Harerford (Pa), 1968, Aug., 1969, (NASA SP-188), p. 5–14.
29. Farmer J.G., Baxter M.S. Short-term trends in natural radiocarbon dating/Ed. T.A. Rafter, T. Grant-Taylor. Wellington: Roy. Soc. N.Z., 1972, A 58–71.
30. Friedman L., Irsa A.P. Variations in the isotopic composition of carbon in urban atmospheric carbon dioxide. — Science, 1967, **158**, p. 263–264.
31. Frolinsbee R.E., Fritz P., Krouse H.R., Robblee A.R. Carbon-13 and oxygen-18 in dinosaur, crocodile and bird eggshells indicate environmental conditions. — Science, 1970, **168**, p. 1353–1356.
32. Galimov E.M. Variations of carbon cycle at the present and in the geological past. — In: Environmental biogeochemistry/Ed. J.O. Nriagu. Ann Arbor. Science Publ., 1976, vol. 1, p. 1–14.
33. Hatch M.D., Slack C.R. Protosynthetic CO<sub>2</sub>-fixation pathways. — Annu. Rev. Plant Physiol., 1970, **21**, p. 141–162.
34. Hoefs J. Stable isotope geochemistry. Heidelberg; New York: Springer, 1973.
35. Jacobson B.S., Smith B.N., Epstein S., Laties G.G. The prevalence of carbon-13 in respiratory carbon dioxide as an indicator of the type of endogenous substrate. — J. Gen. Physiol., 1970, **35**, p. 1–17.
36. Jansen H.S. Depletion of carbon-13 in a young Kauri tree. — Nature, 1962, **196**, p. 84–85.
37. Keeling Ch. D. The concentration and isotopic abundances of carbon dioxide in rural and marine air. — Geochim. et cosmochim. acta, 1961, **24**, p. 277–299.
38. Keeling Ch. D. A mechanism for cyclic enrichment of carbon-12 by terrestrial plants. — Geochim. et cosmochim. acta, 1961, **24**, p. 299–313.
39. Kortschak H.P., Hartt C.E., Burr G.O. Carbon dioxide fixation in sugarcane leaves. — Plant Physiol., 1965, **40**, p. 209–213.
40. Lerman J.C. Soil CO<sub>2</sub> and groundwater: Carbon isotope compositions. — In: Proc. 8th Intern. Conf. on Radiocarbon Dating/Ed. T.A. Rafter, T. Grant-Taylor. Wellington: Roy Soc. N.Z., 1972, D-93–105.
41. Lerman J.C., Mook W.C., Vogel J.C. Effect of the Tunguska meteor and unspots on radiocarbon in tree rings. — Nature, 1967, **216**, p. 990–991.
42. Lerman J.C., Queiroz O. Carbon fixation and isotope discrimination by a crassulacean plant: Dependence on the photoperiod. — Science, 1974, **183**, p. 1207–1209.
43. Moss D.M. The limiting carbon dioxide concentration for photosynthesis. — Nature, 1962, **193**, p. 587.
44. Münnich K.O., Vogel J.C. <sup>14</sup>C-Altersbestimmung von Süßwasser-Kalkablagerungen. — Naturwissenschaften, 1959, Bd. 46, N 5, S. 168–169.
45. Nier A.O., Gulbransen E.A. Variations in the relative abundance of the carbon isotopes. — J. Amer. Chem. Soc., 1939, **61**, p. 697.
46. Oana S., Deevey E.S. Carbon-13 in lake waters and its possible bearing on paleolimnology. — Amer. J. Sci., 1960, **258-A**, p. 253–272.
47. Park R., Epstein S. Carbon isotope fractionation during photosynthesis. — Geochim. et cosmochim. acta, 1960, **27**, N 1/2, p. 110–126.
48. Park R., Epstein S. Metabolic fractionation of <sup>12</sup>C and <sup>13</sup>C in plants. — Plant Physiol., 1961, **36**, p. 133.
49. Parker P.L. The isotopic composition of the carbon of fatty acids. — Carnegie Inst. Yearbook 61, 1962, p. 187–190.
50. Parker P.L. The biogeochemistry of the stable isotopes of carbon in a marine bay. — Geochim. et cosmochim. acta, 1964, **28**, p. 1155–1164.
51. Rafter T.A. C<sup>14</sup>-Variations in nature and effect on radiocarbon dating. — N.Z. J. Sci. Techn. (13), 1955, **37**, p. 20.
52. Rebello A., Wagener K. Evaluation of <sup>12</sup>C and <sup>13</sup>C data on atmospheric CO<sub>2</sub> on the basis of a diffusion model for oceanic mixing. — In: Environmental biogeochemistry/Ed. J. Nriagu. 1976, 1, p. 15.
53. Sackett W.M., Eckelmann W.R., Bender M.L., Be A.W.H. Temperature dependence of carbon isotope composition in marine plankton and sediments. — Science, 1965, **148**, p. 235–237.

54. Smith B.N., Epstein S. Two categories of  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios for higher plants. — Plant Physiol., 1971, 47, p. 380–384.
55. Thode H.G., Shima M., Rees C.E., Krishnamurty K.V. Carbon-13 isotope effects in systems containing carbon dioxide, bicarbonate, carbonate, and metal ions. — Canad. J. Chem., 1965, 43, p. 582–595.
56. Thoughton J.H., Wells P.V., Mooney U.A. Photosynthetic mechanisms and paleoecology from carbon isotope ratios in ancient specimens of  $\text{C}_4$  and CAM plants. — Science, 1974, 185, N 4151, p. 610.
57. Throughton J.H. Carbon isotope fractionation by plants. — In: Proc. 8th Intern. Conf. on Radiocarbon Dating/Ed. T.A. Rafter, T. Grant-Taylor. Wellington: Roy. Soc. N.Z., 1972, E 39–57.
58. Vogel J.C. Über den Isotopengehalt des Kohlenstoffs in Süßwasserkalkablagerungen. — Geochim. et cosmochim. acta, 1959, 16, N 4, p. 236–242.
59. Whelan T.W., Sackett M., Benedict C.R. Enzymatic fractionation of carbon isotopes by phosphoenolpyruvate carboxylase from  $\text{C}_4$ -plants. — Plant. Phisiol., 1973, 51, p. 1051–1054.
60. Wickman F.E. Variations in the relative abundance of the carbon isotopes in plants. — Geochim. et cosmochim. acta, 1952, 2, p. 243.

### Глава III

#### МЕТОД ОЦЕНКИ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ ИЗОТОПНЫХ ФАКТОРОВ МНОГОАТОМНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Биомолекулы представляют собой, как правило, многоатомные соединения, содержащие по меньшей мере несколько атомов одного и того же элемента в разных структурных положениях. Термодинамический изотопный анализ систем, включающих такие соединения, представляет сложную задачу. Применение же изотопной термодинамики к биополимерам, составляющим основу живого, некоторое время назад казалось абсолютно нереалистичным. Впрочем, такая проблема вообще не стояла, поскольку общие соображения не допускали возможности какой-либо связи изотопных эффектов в биомолекулах с их термодинамическими параметрами. Эти общие соображения представлялись весьма вескими. Во-первых, термодинамическое распределение предполагает равновесие изотопного обмена, в то время как биологические системы рассматривают как системы существенно неравновесные. Во-вторых, изотопный обмен, как правило, реализуется только между простыми соединениями. Многоатомные соединения обменивают изотопы, особенно изотопы углерода, образующие скелет органических молекул, очень медленно. Из геохимии изотопов известно, что органические соединения могут сохранять свой изотопный состав неизменным в течение многих миллионов лет.

Тем не менее оказалось, что изотопные составы биомолекул во многих случаях обнаруживают зависимость от термодинамических изотопных факторов, причем, как мы попытаемся показать, это не находится в противоречии ни с биохимией, ни с химией изотопов. Предпосылкой и существенным звеном в установлении явления термодинамического упо-

рядочения изотопов в биосистемах была разработка метода оценки термодинамических изотопных факторов многоатомных соединений, который можно было распространить и на биомолекулы [6, 7, 8, 28]. Поэтому этот метод следует рассматривать как составную часть излагаемой в этой работе термодинамической концепции биологического фракционирования изотопов.

Практически для использования в последующих главах понадобятся только табл. 3.13 и 3.19, содержащие числовые значения изотопических чисел связей и формулы 3.29 и 3.44. Однако мы сочли целесообразным дать здесь развернутое изложение метода. Это важно для того, чтобы читатель мог вынести собственное суждение о степени справедливости и мере ограниченности тех физических предпосылок, которые лежат в основе числовых оценок термодинамических изотопных факторов биомолекул — величин, на которые мы будем опираться в нашей количественной интерпретации биологических изотопных эффектов. Кроме того, многие вопросы, например способ учета дальнего окружения, оценка точности, расчет чисел связей азота и кислорода и ряд других, рассматриваются здесь впервые. В интересах целостного и последовательного изложения целесообразно было также остановиться на тех вопросах, которые уже обсуждались в более ранних публикациях, но тесно связаны с общей идеей метода, например на соотношении между величинами  $\alpha$  и  $\beta$  многоатомных соединений, на понятии внутримолекулярных термодинамических изотопных эффектов и т.д.

### ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНЫЕ И МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ИЗОТОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ. СООТНОШЕНИЕ МЕЖДУ ВЕЛИЧИНАМИ $\beta_i$ И $\beta_{\Sigma}$

Если рассматривать некоторое соединение AX, содержащее единственный атом данного элемента X (например, углерод в молекуле метана), термодинамический изотопный фактор соединения определяется как приведенное по числам симметрий отношение статсумм его изотопных форм:

$$\beta_{AX} = \frac{s^* Q_{AX}^*}{s Q_{AX}}. \quad (3.1)$$

Изотопный эффект, т.е. различие между изотопными составами двух подобных соединений AX и BX, измеряется величиной отношения расположенностей изотопов в их изотопных формах:

$$\alpha = \frac{AX^*/AX}{BX^*/BX}. \quad (3.2)$$

С другой стороны, это отношение определяется соотношением  $\beta$ -факторов соединений AX и BX:

$$\alpha = \frac{\beta_{AX}}{\beta_{BX}}. \quad (3.3)$$

Однако в том случае, когда соединение содержит несколько атомов данного элемента ( $\text{AX}_n$ ), оно образует множество изотопных форм, в которых основной изотоп замещен на тяжелый в разных положениях:  $\text{AX}_1^*\text{X}_2 \dots \text{X}_n$ ,  $\text{AX}_1\text{X}_2^* \dots \text{X}_n$  и т.д., а также изотопные формы с двумя и более изотопными замещениями. При этом само определение термодинамического изотопного фактора нуждается в уточнении: отношением стат-сумм каких именно изотопных форм является в этом случае термодинамический изотопный фактор, характеризующий соединение в целом.

В соединении, содержащем несколько атомов элемента  $X$ , изотопы  $X^*$  распределены по разным изотопным формам пропорционально степени их изотопной замещенности, и поэтому изотопный состав соединения в целом определяется соотношением

$$\left(\frac{X^*}{X}\right)_{\text{AX}_n} = \frac{n[\text{AX}_n^*] + \dots + (n-i)[\text{AX}_i\text{X}_{n-i}^*]}{n[\text{AX}_n] + \dots + (n-i)[\text{AX}_i^*\text{X}_{n-i}]}. \quad (3.4)$$

Соответственно вместо простого соотношения (3.2) изотопный эффект между соединениями  $\text{AX}_n$  и  $\text{BX}_m$  выразится соотношением

$$a = \frac{n[\text{AX}_n^*] + \dots + (n-i)[\text{AX}_i\text{X}_{n-i}^*]}{n[\text{AX}_n] + \dots + (n-i)[\text{AX}_i^*\text{X}_{n-i}]} \Big/ \frac{m[\text{BX}_m^*] + \dots + (m-j)[\text{BX}_j\text{X}_{m-j}^*]}{m[\text{BX}_m] + \dots + (m-j)[\text{BX}_j^*\text{X}_{m-j}]}, \quad (3.5)$$

где  $i$  и  $j$  – числа замещенных атомов в изотопных формах обоих соединений, причем замещение должно производиться по всем сочетаниям неэквивалентных атомов в молекулах.

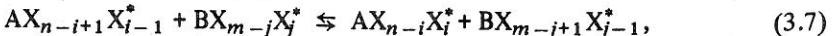
Экспериментально определить соотношение всех изотопных форм многоатомного соединения невозможно. Поэтому практически изотопный состав определяется иначе: переводят исследуемое многоатомное соединение в какое-либо более простое, содержащее один или два эквивалентных атома данного элемента ( $\text{CO}_2$  – при исследовании  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  и  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ,  $\text{SO}_2$  – при исследовании  $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ ,  $\text{H}_2$  – при исследовании D/H и т.п.). Затем изотопный состав этих проб анализируют на масс-спектрометре. Получившаяся величина при условии, что исследуемый образец был количественно переведен в масс-спектрометрическую пробу, точно отвечает величине  $\left(\frac{X^*}{X}\right)_{\text{AX}_n}$ , характеризующей отношение изотопов исследуемого элемента в исходном многоатомном соединении. Правда, при этом теряется информация, заключенная в соотношениях, характеризующих распределение изотопов по изотопным формам соединения.

Какие расчетные параметры и каким образом можно сопоставить с определенным таким способом изотопным составом и отношением изотопных составов  $a$  для соединений, образующих изотопно-обменную систему?

В случае многоатомных соединений реакция изотопного обмена приобретает следующую запись:



Фактически в рамках этой реакции протекает совокупность реакций отдельных изотопных форм:



каждая из которых характеризуется константой равновесия

$$K_{ij} = \frac{[AX_{n-i}X_i^*][BX_{m-j+1}X_{j-1}^*]}{[AX_{n-i+1}X_{i-1}^*][BX_{m-j}X_j^*]}. \quad (3.8)$$

Разрешив выражение (3.8) в отношении концентраций и учитывая зависимость констант от величины  $\beta$ , можно найти (через соотношение 3.5) связь между величиной  $a$  и  $\beta$ -факторами изотопных форм [5].

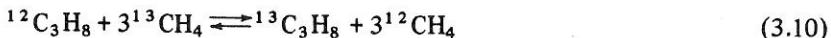
Вывод общего выражения получается довольно громоздким. Поэтому покажем характер соотношений на примере простой системы пропан—метан.

В этой системе молекула пропана является многоатомной по углероду, причем она содержит две группы неэквивалентных атомов: центральный углерод и два периферийных атома углерода. Последние являются эквивалентными, т.е. они переходят друг в друга при операциях симметрии, которым подвергается молекула.

Коэффициент разделения изотопов в системе  $C_3H_8 - CH_4$  по определению имеет вид

$$a = \frac{3[{}^{13}C_3H_8] + 2[{}^{13}C^{12}C^{13}CH_8] + 2[{}^{13}C^{13}C^{12}CH_8]}{3[{}^{12}C_3H_8] + 2[{}^{12}C^{13}C^{12}CH_8] + 2[{}^{13}C^{12}C^{12}CH_8]} + \\ + \frac{[{}^{12}C^{13}C^{12}CH_8] + [{}^{13}C^{12}C^{12}CH_8]}{[{}^{13}C^{12}C^{13}CH_8] + [{}^{13}C^{13}C^{12}CH_8]} / \frac{[{}^{13}CH_4]}{[{}^{12}CH_4]}. \quad (3.9)$$

Полная реакция изотопного обмена



характеризуется константой

$$K = \frac{[{}^{13}C_3H_8][{}^{12}CH_4]^3}{[{}^{12}C_3H_8][{}^{13}CH_4]^3} = \frac{(Q^*/Q) {}^{13}C_3H_8}{{}^{12}C_3H_8} / \frac{(Q^*/Q) {}^{13}CH_4}{{}^{12}CH_4} \quad (3.11)$$

Величина  $\beta_n$  — корень степени  $n$  из произведения статсумм изотопных форм на отношение их чисел симметрии  $s^*$  и  $s$ , где  $n$  — число замещенных атомов в изотопно-замещенной форме.

В случае полностью изотопно-замещенной формы пропана  $n = 3$  и

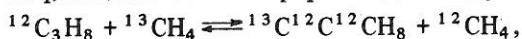
$$\beta_{1,2,3} = \left[ \frac{Q^* {}^{13}C_3H_8}{Q {}^{12}C_3H_8} \frac{s^* {}^{13}C_3H_8}{s {}^{12}C_3H_8} \right]^{\frac{1}{3}}. \quad (3.12)$$

В нижнем индексе  $\beta$  показаны номера атомов углерода пропана, замещенных на тяжелый изотоп. Поскольку числа симметрии полностью изотопно-замещенной и незамещенной форм одинаковы, из (3.12) и (3.11) имеем

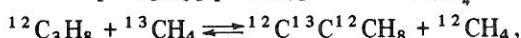
$$K = K_{1,2,3} = \frac{\beta_{1,2,3}^3}{\beta_{CH_4}^3}. \quad (3.13)$$

Чтобы не выписывать ниже в каждом случае выражения для чисел симметрии, сразу учтем, что, как вытекает из анализа геометрии пропана и метана, изотопные молекулы  $^{13}\text{C}_3\text{H}_8$ ,  $^{12}\text{C}_3\text{H}_8$ ,  $^{12}\text{C}^{13}\text{C}^{12}\text{CH}_8$ ,  $^{13}\text{C}^{12}\text{C}^{13}\text{CH}_8$ ,  $^{13}\text{C}^{13}\text{C}^{12}\text{CH}_8$ ,  $^{12}\text{C}^{12}\text{C}^{13}\text{CH}_8$ ,  $^{12}\text{CH}_4$  и  $^{13}\text{CH}_4$  имеют числа симметрии соответственно: 2, 2, 2, 2, 1, 1, 12 и 12.

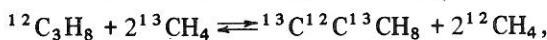
Из реакций изотопных форм найдем следующие соотношения:



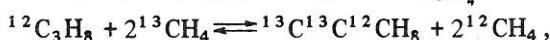
$$K_1 = \frac{[^{13}\text{C}^{12}\text{C}^{12}\text{CH}_8] [^{12}\text{CH}_4]}{[^{12}\text{C}_3\text{H}_8] [^{13}\text{CH}_4]} = 2 \frac{\beta_1}{\beta_{\text{CH}_4}}; \quad (3.14)$$



$$K_2 = \frac{[^{12}\text{C}^{13}\text{C}^{12}\text{CH}_8] [^{12}\text{CH}_4]}{[^{12}\text{C}_3\text{H}_8] [^{13}\text{CH}_4]} = \frac{\beta_2}{\beta_{\text{CH}_4}}; \quad (3.15)$$



$$K_{1,3} = \frac{[^{13}\text{C}^{12}\text{C}^{13}\text{CH}_8] [^{12}\text{CH}_4]^2}{[^{12}\text{C}_3\text{H}_8] [^{13}\text{CH}_4]^2} = \frac{\beta_{1,3}^2}{\beta_{\text{CH}_4}^2}; \quad (3.16)$$



$$K_{1,2} = \frac{[^{13}\text{C}^{13}\text{C}^{12}\text{CH}_8] [^{12}\text{CH}_4]^2}{[^{12}\text{C}_3\text{H}_8] [^{13}\text{CH}_4]^2} = 2 \frac{\beta_{1,2}^2}{\beta_{\text{CH}_4}^2}. \quad (3.17)$$

Поскольку оба периферийных атома пропана эквивалентны, распределение изотопов между ними равновероятно. Следовательно,  $\beta_1 = \beta_3$  и  $\beta_{1,2} = \beta_{2,3}$ . Кроме того, имеют место соотношения:  $\beta_{1,2}^2 = \beta_1 \beta_2$ ;  $\beta_{1,3}^2 = \beta_1 \beta_3$ ;  $\beta_{1,2,3}^3 = \beta_1 \beta_2 \beta_3$  и т.п. Отсюда

$$K_{1,3} = \frac{\beta_1^2}{\beta_{\text{CH}_4}^2}; \quad (3.18)$$

$$K_{1,2} = 2 \frac{\beta_{1,2,3}^3}{\beta_3 \beta_{\text{CH}_4}^2}. \quad (3.19)$$

Разделим теперь числитель и знаменатель выражения (3.9) на  $^{12}\text{C}_3\text{H}_8$  и введем обозначение  $\frac{[^{13}\text{CH}_4]}{[^{12}\text{CH}_4]} = R$ . Подставив в (3.9) величины концентраций изотопных форм молекул, выраженные при помощи соотношений (3.14) – (3.19) через соответствующие  $\beta$ -факторы, и произведя преобразования, получим

$$\alpha = \frac{\beta_{1,2,3}}{\beta_{\text{CH}_4}} \frac{\left[ \frac{3\beta_{1,2,3}^2 R^2 + 2\beta_1^3 + 4\beta_{1,2,3}^3}{\beta_{1,2,3} \beta_1} \frac{R}{\beta_{\text{CH}_4}} + \frac{1}{\beta_{1,2,3}} (\beta_2 + 2\beta_1) \right]}{\left[ \frac{2\beta_{1,2,3}^3 + \beta_1^3}{\beta_1} \frac{R^2}{\beta_{\text{CH}_4}^2} + \frac{2\beta_2 + 4\beta_1}{\beta_{\text{CH}_4}} R + 3 \right]}. \quad (3.20)$$

Прежде всего отметим, что если бы все атомы углерода в молекуле пропана были эквивалентны, т.е.  $\beta_1 = \beta_2$  и, следовательно,  $\beta_1 = \beta_2 =$

$= \beta_{1,2,3}$ , то это привело бы к сокращению квадратных скобок в числитеle и знаменателе выражения (3.20). В результате получилось бы выражение  $\alpha = \beta / \beta_{\text{CH}_4}$ , аналогичное соотношению (3.3) для соединений, содержащих единственный атом данного элемента. Отсюда для соединений, содержащих несколько эквивалентных атомов, коэффициент разделения  $\alpha$  определяется просто отношением их  $\beta$ -факторов. Последний можно рассчитать исходя из любой изотопной формы (ввиду условия  $\beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_{1,2,\dots,n}$ ).

Величина  $R$ , входящая в выражение (3.20), характеризует изотопное отношение углерода. Отношение  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = 0,011$ . Для других биогенных элементов  $R$  также  $\ll 1$ . Поэтому, пренебрегая членами, содержащими  $R$ , выражение (3.20) можно свести к простому соотношению:

$$\alpha \approx \frac{2\beta_1 + \beta_2}{3} \frac{1}{\beta_{\text{CH}_4}}. \quad (3.21)$$

Анализируя общие свойства выражения (3.20), несложно обобщить формулу (3.21) на случай молекул произвольного состава:

$$\alpha = \frac{\frac{q_A}{m} \sum_i p_A (\beta_{AX_n})_i}{\frac{q_B}{n} \sum_i p_B (\beta_{BX_m})_i}. \quad (3.22)$$

Суммирование производится по количеству  $q_A$ - и  $q_B$ -групп эквивалентных атомов в молекулах;  $p_A$  и  $p_B$  – числа эквивалентных атомов в каждой  $q_A$ - и  $q_B$ -группе. Эти числа, между прочим, равны отношению чисел симметрии незамещенной молекулы и замещенной изотопом по одному из атомов соответствующей группы.

Таким образом, для описания разделения изотопов в системе, содержащей многоатомные молекулы, необходимо знать  $\beta$ -факторы их изотопных форм. Число возможных изотопных форм соединения равно

$$\sum_{i=1}^n \frac{n!}{i! (n-1)!}, \quad (3.23)$$

где  $n$  – число атомов данного элемента,  $i$  – степень изотопного замещения.

Из выражения (3.22) следует, что нет необходимости в определении  $\beta$ -факторов всех возможных изотопных форм. Для пентана, например, это число составляет 31. Между тем для изотопной характеристики пентана согласно (3.22) достаточно значений трех  $\beta$ -факторов. Эти  $\beta$ -факторы соответствуют однократно изотопно-замещенным формам, характеризующим независимые типы симметрии изотопных форм данного соединения. Мы обозначаем их как  $\beta_i$ .

Приведенные отношения статсумм по состояниям любых других изотопных форм не являются независимыми и могут быть выражены как комбинации термодинамических изотопных факторов  $\beta_i$ . Величина  $\beta$  любой кратно замещенной изотопной формы есть среднее геомет-

рическое из  $\beta$ -факторов, характеризующих все однократные изотопные замещения в составе данной изотопной формы, т.е.

$$\beta_{AX_n - kX_k} = \left( \prod_i^n \beta_i \right)^{1/k}, \quad (3.24)$$

где  $k$  — здесь кратность замещения. В частности, для полностью замещенной изотопной формы

$$\beta_{AX_n^*} = \left( \prod_i^n \beta_i \right)^{1/n}. \quad (3.25)$$

Неэквивалентные атомы данного элемента в молекуле характеризуются разными величинами  $\beta_i$ . Следовательно, распределение изотопов между ними неравновероятно. Иначе говоря, многоатомные соединения, содержащие неэквивалентные атомы, будут характеризоваться внутримолекулярными термодинамическими изотопными эффектами. Разница в изотопном составе элемента в любых двух неэквивалентных позициях определится соотношением соответствующих внутримолекулярных термодинамических изотопных факторов:

$$\delta_{i(1)} - \delta_{i(2)} = \left( \frac{\beta_{i(1)}}{\beta_{i(2)}} - 1 \right) \cdot 10^3, \text{ \%}. \quad (3.26)$$

Разделение изотопов между двумя разными соединениями определяется соотношением (3.22). Числитель и знаменатель его содержат средние арифметические  $\beta_i$ -факторов соответствующих соединений:

$$\alpha = \frac{\frac{1}{n} \sum_i^n \beta_i (AX_n)}{\frac{1}{m} \sum_i^m \beta_i (BX_m)}. \quad (3.27)$$

В этой записи  $\beta_i$  обозначает  $\beta$ -факторы всех одноизотопно замещенных форм по данному элементу в молекуле (от 1 до  $n$ ). При этом часть значений  $\beta_i$ , отвечающих эквивалентным атомам, окажется одинаковой (вырожденной).

Очевидно, что величина в числителе и знаменателе (3.27) характеризует изотопно-термодинамические свойства сравниваемых соединений в целом. Обозначив их  $\beta_\Sigma$ , получим

$$\alpha = \frac{\beta_\Sigma (AX_n)}{\beta_\Sigma (BX_m)}. \quad (3.28)$$

Тогда  $\alpha$  вновь предстанет как отношение  $\beta$ -факторов, подобно соотношению (3.3) для простых соединений. Величину  $\beta_\Sigma$ , характеризующую соединение в целом, назовем термодинамическим изотопным фактором соединения.

Между ним и термодинамическими изотопными факторами однозамещенных изотопных форм, как следует из (3.27) и (3.28), существует

зависимость

$$\beta_{\Sigma} = \frac{1}{n} \sum_i \beta_i. \quad (3.29)$$

Соотношение (3.29), связывающее молекулярные и внутримолекулярные изотопные эффекты, играет существенную роль в дальнейшем изложении.

Заметим, что из-за аддитивного характера этого важного соотношения мы предпочитаем не пользоваться распространенной в литературе логарифмической формой представления  $\beta$ -факторов (точнее, приведенных статсумм в виде  $\ln f \frac{s^*}{s}$ ). При использовании величин  $\ln \beta \approx \beta - 1$  получаются более удобные аддитивные формы представления для мультиплексивных по своему существу соотношений величин  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\delta$  (см. гл. I). Однако в случае сложных многоатомных соединений это не компенсирует неудобств, связанных с употреблением логарифмических выражений в аддитивном соотношении (3.29).

### СПЕКТРАЛЬНЫЙ МЕТОД РАСЧЕТА $\beta_i$ -ФАКТОРОВ

Итак, как было показано выше, если известны величины  $\beta_i$ , то можно полностью охарактеризовать внутримолекулярные термодинамические изотопные эффекты и изотопные свойства соединения как целого.

Как отмечалось в главе I, существует теоретический метод оценки  $\beta_i$ -факторов (отношений статсумм по состояниям изотопных форм). В основе его лежит квантово-статистическое выражение

$$\beta_i = \frac{(Q^* s^*)_{AX_{n-1}X^*}}{(Q s)_{AX_n}} = \prod_i \frac{\nu_i^* e^{-\frac{h\nu^*}{2kT}} \left(1 - e^{-\frac{h\nu_i}{kT}}\right)}{\nu_i e^{-\frac{h\nu_i}{2kT}} \left(1 - e^{-\frac{h\nu^*}{kT}}\right)}. \quad (3.30)$$

Оно было получено впервые Г. Юри [40, 39]. Модификации его, упрощающие вычислительную процедуру, были разработаны Я. Бигеляйзеном [24].

Этот метод называют иногда "квантово-статистическим". Но, по-видимому, более точно передает его существо название "спектральный метод", так как реализация его связана с оценкой колебательных частот изотопных форм соединения и базируется в конечном счете на спектроскопических данных. С процедурой определения колебательных частот связаны также основные погрешности и ограничения метода.

Необходимые для расчета  $\beta$ -факторов колебательные частоты основной и изотопно-замещенной форм изучаемых молекул могут быть получены непосредственно из спектров комбинационного рассеяния и инфракрасных спектров соответствующих соединений. Однако спектроскопические данные о частотах, особенно многоатомных и высокосимметрических молекул, неполны, а изотопические смещения частот для элементов тяжелее водорода невелики и их трудно измерить с достаточ-

ной точностью. Поэтому при вычислении  $\beta$ -факторов используются теоретически установленные изотопные частоты.

Методы теории колебаний, лежащие в основе расчета изотопных частот, хорошо разработаны. В ряде руководств и монографий [2, 4, 10, 13, 16] теория колебаний излагается в связи с ее приложениями в области спектроскопии и физической химии. Методика нахождения изотопных частот в связи с оценкой термодинамических изотопных факторов ряда соединений углерода достаточно подробно изложена в нашей работе [7]. Расчетам величин термодинамических изотопных факторов отдельных соединений на основе спектрального метода посвящена обширная литература [9, 11, 12, 18, 25, 26, 27, 29, 31, 32, 33, 34, 36, 37, 38, 39 и др.].

Колебательные частоты находят путем решения уравнения колебательного движения молекул. В матричном виде оно записывается следующим образом:

$$|GF - I\lambda| = 0, \quad (3.31)$$

где  $F$  — матрица силовых постоянных;  $G$  — кинетическая матрица;  $I$  — так называемая единичная матрица;  $\lambda_i = \sqrt{2\pi\nu_i}$ .

Нахождение корней  $\lambda$  векторного уравнения представляет весьма трудоемкую процедуру, но при использовании вычислительной техники является стандартной математической задачей и решается на ЭВМ по стандартным программам нахождения собственных значений матриц.

Расчет сводится к тому, чтобы добиться наилучшего совпадения вычисленных и экспериментальных частот. Если совпадение неудовлетворительное, то силовые постоянные корректируют и получают новый набор частот. Если сходимость расчетного спектра с экспериментальным спектром признается удовлетворительной, то переходят к нахождению частот изотопно-замещенной формы. Это достигается подстановкой массы другого изотопа и соответствующим изменением  $G$ -матрицы. Иначе говоря, решается уравнение

$$|FG^* - I\lambda^*| = 0. \quad (3.32)$$

Найденные значения  $\nu_i$  и  $\nu_i^*$  подставляются в (3.30), и определяется величина  $\beta_i$ -фактора соответствующей изотопной формы.

Этим методом были вычислены  $\beta_i$ -факторы многих соединений разных элементов, установлены температурные зависимости изотопных эффектов, оценен диапазон термодинамических изотопных эффектов для разных элементов и определены коэффициенты разделения в различных изотопно-обменных системах.

Однако метод имеет ряд ограничений, которые проявляются особенно заметно при переходе к анализу сложных многоатомных соединений.

Принципиальное ограничение связано с неопределенностью силового поля молекулы. Дело в том, что силовые постоянные находят путем решения так называемой обратной спектральной задачи, т.е. уравнения (3.31), разрешенного относительно элементов  $F_{ij}$ . Однако, поскольку число силовых постоянных  $\left(\frac{1}{2}N(N+1)\right)$  всегда больше числа исходных уравнений, равного числу  $3N - 6$ , определить все силовые постоянные

практически невозможно. Поэтому приходится делать допущения, что некоторые силовые постоянные пренебрежимо малы, другие равны друг другу, некоторые аналогичны родственным силовым постоянным из других молекул. Несколько уменьшить неопределенность (увеличить число уравнений для нахождения постоянных) можно, привлекая экспериментальные данные об изотопных частотах. Подставляя в вековое уравнение изотопную частоту и соответствующим образом пересчитанные кинематические элементы  $G_{ij}$ , можно получить дополнительное исходное уравнение. Подобный прием особенно эффективен для водородсодержащих соединений, так как дейтерозамещенные молекулы дают существенный сдвиг изотопной частоты, который может быть измерен с достаточно высокой точностью. Поэтому, и это важно подчеркнуть, данные о силовых постоянных и соответственно величинах  $\beta$ спектр водородсодержащих соединений наиболее достоверны. Однако в общем случае неопределенность в оценках силовых постоянных остается значительной. Первоначально выбранную систему силовых постоянных последовательно корректируют, как уже отмечалось выше, путем сравнения расчетного спектра с экспериментальным до получения удовлетворительной сходимости. Вопрос о том, что считать удовлетворительной сходимостью, достаточно субъективен. Сами спектроскопические данные, служащие основой для сравнения, имеют ограниченную точность. Разные авторы пользуются разными данными. Во многих случаях наблюдательные спектры неполны, т.е. нет сведений о всех частотах, характеризующих молекулу, особенно в случае высокомолекулярных соединений. Определенные ошибки могут быть связаны с неправильным отнесением частот. Неопределенности в оценке геометрии молекулы могут явиться источником ошибок в вычислении элементов Г-матрицы. Это касается преимущественно сложных соединений. Источником погрешности является также сама модель гармонического приближения колебательного движения молекулы.

Значение указанных ограничений, как правило, возрастает с увеличением числа атомов и усложнением молекулярного строения соединения. Поэтому точная оценка  $\beta$ -факторов многоатомных сложных соединений, к числу которых принадлежит большинство биологически интересных соединений, оказывается практически невозможна.

Следует заметить, что спектральный метод оценки  $\beta$ -факторов весьма трудоемок. Достаточно сказать, что определение  $\beta$ -факторов даже такого сравнительно простого соединения, как гексан, требует операций с матрицами 54 степени. Современная вычислительная техника позволяет справиться с математическими трудностями. Но за известными пределами громоздкость вычислительной задачи является препятствием для применения метода к расчету  $\beta$ -факторов высокомолекулярных соединений.

Обращение к изотопному термодинамическому анализу биологических систем необходимо требует более общего подхода к оценке термодинамических изотопных факторов сложных соединений. Такой подход и соответственно расчетный метод были найдены на основе сформулированного ниже "принципа аддитивности".

## ПРИНЦИП АДДИТИВНОЙ ОЦЕНКИ $\beta$ -ФАКТОРА

Процедура определения величины термодинамического изотопного фактора такова, что при вычислении  $\beta$ -фактора одного соединения мы не можем воспользоваться знанием величины  $\beta$ -фактора другого соединения, даже если последнее близко к первому по структуре и составу. В каждом случае единственный путь — полное решение уравнения колебательного движения молекулы и нахождения частот изотопных форм того соединения,  $\beta$ -фактор которого требуется определить. Надо заметить, однако, что при решении колебательного уравнения широко практикуется "перенесение" силовых постоянных: силовые постоянные, характеризующие взаимодействие атомов в одних молекулах, используется в  $F$ -матрицах других молекул, содержащих аналогичные химические связи. Это дало основание поставить вопрос о том, нельзя ли саму величину  $\beta$ -фактора представить как некоторую комбинацию числовых величин, каждая из которых характеризует определенный тип связи и с одинаковым значением входит в  $\beta$ -факторы тех соединений, которые включают данный тип связи [7].

К выводу о том, что  $\beta$ -фактор может представлять величину, аддитивную по отношению к инкрементам, характеризующим отдельные связи в молекуле, можно прийти исходя из самых общих соображений, не опираясь на опыт теории валентно-силового поля.

Прежде всего обратим внимание на два важных свойства термодинамических изотопных факторов: 1) термодинамический изотопный фактор свободного атома равен единице; 2) термодинамический изотопный фактор молекул всегда больше единицы.

Это значит, что отличие  $\beta$ -фактора от единицы возникает только с появлением химической связи между атомами. Лишь при наличии химических связей выявляется энергетическое преимущество изотопной формы, содержащей тяжелый изотоп.

Отсюда следует, что термодинамический изотопный фактор можно в принципе представить в виде

$$\beta = 1 + x, \quad (3.33)$$

где  $x$  — член, зависящий от наличия и характера химических связей.

Известно, что если какой-либо параметр, относимый к данному атому в молекуле, зависит от характера окружающих атомов, то он сильнее всего зависит от ближайшего окружения, т.е. определяется прежде всего теми химическими связями, которые образуют данный атом. Это проявление известного в химии принципа локализации. С другой стороны, распространенное свойство аддитивности термодинамических величин делает вероятной линейную комбинацию инкрементов, характеризующих отдельные связи. Иначе говоря, можно попытаться представить  $x$  в виде  $\sum_{j=1}^n L_j$ , где  $L_j$  — величина, характеризующая  $j$ -ю связь из числа  $n$  связей, образуемых  $i$ -м атомом, т.е.

$$\beta_i = 1 + \sum_{j=1}^n L_j. \quad (3.34)$$

Наконец, известно, что параметры, характеризующие химическую связь, в той или иной мере обладают свойством трансферабельности, т.е. сохраняют присущие им значения в разных химических соединениях. Этим свойством в какой-то степени должно обладать  $L_j$ .

Вопрос о том, насколько справедливы указанные приближения и, следовательно, насколько удовлетворительным может быть основанный на них метод оценки  $\beta$ -факторов, зависит от того, в какой мере применимы к случаю изотопной термодинамики общие идеи локализации, аддитивности и трансферабельности.

Указанные принципы содержат известные ограничения. В некоторых случаях они существенны, в других – нет. Выражение (3.34), вытекающее из столь общих соображений, могло оказаться совершенно нереализуемым в изотопной термодинамике. На самом деле оно обнаружило, как мы увидим, удивительную работоспособность.

Этот факт имеет прежде всего значение для понимания существа изотопной термодинамики, которой упомянутые принципы оказались глубоко присущи. Как практическое следствие этого возникает способ оценки термодинамических изотопных факторов на весьма общей основе.

Хотя постулирование аддитивного принципа не зависит от представлений теории валентно-силового поля, лежащих в основе оценки  $\beta$ -факторов через колебательные частоты, можно показать, что структура выражения (3.44) выводима из этих представлений и в определенном смысле заключена в квантово-статистическом соотношении (3.30) [8].

Итак, принцип аддитивности предполагает возможность представления  $\beta$ -фактора посредством инкрементов, числовые значения которых зависят от вида химической связи. Величину соответствующего инкремента мы предложили называть изотопическим числом связи.

Существует, как известно, несколько подходов к описанию химической связи. По своей сути принцип аддитивности логически увязывается с пониманием природы химической связи в рамках теории локализованных электронных пар (метода валентных связей).

В соответствии с этим представлением связь между атомами возникает в результате перекрывания направленных атомных орбиталей, находящихся в валентном состоянии. Перекрывание  $s$ -орбиталей или  $sp$ -гибридизированных орбиталей приводит к образованию связи, в которой электронное облако вытянуто аксиально вдоль связи. Такая связь называется  $\sigma$ -связью. Взаимное перекрывание негибридизированных  $p$ -орбиталей приводит к возникновению общего электронного облака, с двух сторон параллельного оси связи. Такая связь носит название  $\pi$ -связи.

В молекуле этана, например, атомы углерода находятся в состоянии  $sp_3$ -гибридизации. Каждый из них образует связи с водородом, атомная орбиталь которого находится в  $s$ -состоянии. Электронное облако вытянуто аксиально вдоль связи. В дальнейшем примем следующее обозначение связи; в скобках указываем сначала символ атома, связь которого нас интересует, затем – символ атома, с которым образована связь; рядом со скобкой указываем тип связи и в нижнем индексе – состояние гибридизации рассматриваемого атома и атома, с которым он образует

связь. Таким образом, связь углерода с водородом в этане обозначим  $(C-H)\sigma_{sp_3-sp}$ . Между собой атомы углерода в этане образуют связь  $(C-C)\sigma_{sp_3-sp_3}$ . В молекуле этилена орбитали атомов углерода находятся в состоянии  $sp_2$ -гибридизации. С водородом углерод образует  $\sigma$ -связь:  $(C-H)\sigma_{sp_2-sp}$ . Между собой атомы углерода образуют одну  $\sigma$ -связь за счет перекрывания  $sp_2$ -орбиталей и дополнительно  $\pi$ -связь — за счет перекрывания  $2p_z$ -негибридизированных орбиталей. Таким образом, в этилене атомы углерода образуют связь  $(C=C)\sigma\pi_{sp_2-sp_2}$ . Эта связь, поскольку в ее реализации участвует не два, а четыре электрона, является кратной — двойной связью. Обычно для ее обозначения используют две черточки (валентных штриха).

Взаимодействие атомных орбиталей передает реальную структуру молекул. Тетраэдрическая конфигурация метильных групп этана, плоское строение молекулы этилена, угловое строение молекулы воды, также как пирамидальная структура молекулы  $NH_3$  и линейность молекулы ацетилена — непосредственное следствие строения атомных орбиталей в валентном состоянии атомов, образующих соответствующие молекулы.

Связь может осуществляться путем как сочетания атомных орбиталей, каждая из которых содержит по одному электрону, так и сочетания заполненной атомной орбитали одного атома с вакантной атомной орбиталью другого. В последнем случае связь носит специальное название донорно-акцепторной. Электронное строение ее совпадает с электронным строением обычной  $\sigma$ -связи. Они не отличимы химически и, как мы увидим, характеризуются одинаковым изотопическим числом связи.

Следует отметить, что при традиционном изображении структурных формул химических соединений донорно-акцепторная связь часто отмечается двумя черточками (как двойная), хотя в действительности она является связью ординарной. Например, при изображении структурной формулы  $SO_4^2-$ , чтобы передать шестивалентный характер серы, ее связи с атомами кислорода иногда изображают как две двойные и две ординарные. На самом деле в сульфат-ионе атом серы, находящийся в состоянии  $sp_3$ -гибридизации, образует с атомами кислорода 4 связи одинакового электронного строения, две из которых являются обычными  $\sigma$ -связями, а две другие — связями донорно-акцепторного типа. Поскольку изотопическим числом мы условились характеризовать связь в том понимании, которое придается ей в рамках теории локализованных электронных пар,  $\beta$ -фактор шестивалентной серы в молекуле  $SO_4^2-$  определится суммированием четырех одинаковых чисел связей  $L_{(S-O)}\sigma_{sp_3-sp_3}$ .

Напротив, в некоторых случаях следует различать (специализировать) фактически равносильные связи. Например, в карбонат-ионе атом углерода, находящийся в состоянии  $sp_2$ -гибридизации, образует три равносильные связи с атомами кислорода. Однако, с точки зрения метода локализованных электронных пар здесь присутствуют два разных типа связи:  $\sigma\pi$ -связь с  $sp_2$ -гибридизированным атомом кислорода и две обычные  $\sigma$ -связи с  $sp_3$ -гибридизированными атомами кислорода. Соответственно  $\beta^{13}C$ -фактор  $CO_3^{2-}$  должен определяться суммой  $1 + L_{(C=C)}\sigma\pi_{sp_2-sp_2} + 2L_{(C-O)}\sigma_{sp_2-sp_3}$ .

Этими примерами мы хотим подчеркнуть, что при оценке величины  $\beta$ -фактора набор изотопических чисел связей должен определяться электронным строением химических связей в понимании метода локализованных электронных пар.

Следует иметь в виду, что, несмотря на доказанную многими приложениями плодотворность этой концепции, она базируется на определенных приближениях, которые могут быть вполне приемлемы для одних случаев, но непригодны для других. Теория локализованных электронных пар не позволяет объяснить некоторые свойства соединений, например, окраску, магнитные свойства. В основе ее лежит представление о локализации электронов на связях, хотя физически строгим считается представление о полностью делокализованных молекулярных орбиталах. Коэффициенты гибридизации (отношение  $p$ -состояния к  $s$ -состоянию) рассматриваются как целочисленные: 3 — при  $sp_3$ -гибридизации, 2 — при  $sp_2$ -гибридизации, 1 — при  $sp_1$ -гибридизации. Между тем фактически коэффициенты гибридизации отличаются от целочисленных значений; например, в молекуле этана ( $sp_3$ ) — 3,2, бензола ( $sp_2$ ) — 2,18, ацетилена ( $sp_1$ ) — 1,30, и т.п. Представление о локализованных химических связях оказывается недостаточным для описания связей в молекулах с нечетным числом электронов, например  $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2$  и др. Эти ограничения в той или иной мере сказываются на применимости принципа аддитивности для оценки  $\beta$ -факторов соединений.

### ИЗОТОПИЧЕСКИЕ ЧИСЛА СВЯЗЕЙ УГЛЕРОДА

Изотопические числа связей  $L_{\text{C}-x}$  могут быть вычислены из соотношения (3.34), если известны подходящие величины  $\beta_i^{13}\text{C}$ . В настоящее время для значительного числа соединений углерода величины термодинамических изотопных факторов установлены спектральным методом. Определив  $L_{\text{C}-x}$  на основе ряда значений  $\beta_{\text{спектр.}}$  и используя затем полученные числа связи для оценки  $\beta$ -факторов других соединений, можно проверить справедливость принципа аддитивности в принятом приближении.

В качестве исходных следует использовать  $\beta$ -факторы для газообразного состояния. В конденсированных средах величины  $\beta$ -факторов содержат вклад, обусловленный межмолекулярными взаимодействиями. Полученные числа связи  $L_i$  и величины  $\beta_{\text{аддит.}}$  поэтому будут характеризовать вещество в газообразной форме. Однако, термодинамические изотопные эффекты в системе пар—жидкость имеют заметную величину только для изотопов водорода и отчасти кислорода в простых соединениях, например в воде. Для органических соединений углерода межфазовые изотопные эффекты незначительны [7] и значения  $\beta^{13}\text{C}$ , вычисленные для газообразного состояния без существенной погрешности, могут быть использованы при рассмотрении конденсированных фаз.

Величины  $\beta_{\text{спектр.}}$  в силу неопределенностей, присущих спектральному методу, вычисляются с известной погрешностью. В некоторых случаях она может быть значительной. Это заставляет с осторожностью выби-

пать те значения  $\beta_{\text{спектр}}$ , которые могут послужить в качестве базовых для определения  $L_{C-X}$ . Сходимость  $\beta_{\text{спектр}}$  и  $\beta_{\text{аддит}}$  также лишь до известного предела может служить основанием для оценки справедливости принципа аддитивности. Тем не менее, определение  $L_{C-X}$  из известных значений  $\beta_{\text{спектр}}$  является наиболее простым способом реализации аддитивного метода.

Все вычисленные ниже изотопические числа связей относятся к температуре 300°К.

### Изотопические числа связей $L_{C-H}$ и $L_{C-C}$

В молекуле метана углерод образует 4 эквивалентные связи типа (C—H)  $\sigma_{sp_3-sp_3}$ . Следовательно имеем  $\beta^{13}\text{C} = 1 + 4L_{(C-H)} \sigma_{sp_3-sp_3}$ . Величина  $\beta^{13}\text{C}$ , вычисленная нами спектральным методом равна 1,1136 при 300°К [9]. Отсюда можно получить величину  $L_{(C-H)} \sigma_{sp_3-sp_3}$ . Она оказывается равной 0,028. В молекуле этана каждый атом углерода образует три связи (C—H)  $\sigma_{sp_3-sp_3}$  и одну связь типа (C—C)  $\sigma_{sp_3-sp_3}$ . Используя величину  $L_{(C-H)} \sigma_{sp_3-sp_3}$ , полученную для молекулы метана и величину термодинамического изотопного фактора, вычисленную для этана на основе спектральных данных  $\beta^{13}\text{C} = 1,1316$  [9], найдем, что величина  $L_{(C-C)} \sigma_{sp_3-sp_3} = 0,046$ . Комбинируя найденные величины, можно оценить значения  $\beta^{13}\text{C}$ -факторов других углеводородов. Сопоставление их с величинами  $\beta_{\text{спектр}}$  (табл. 3.1 столбцы 2 и 4) показывает, что между первыми и вторыми существует удовлетворительная сходимость. Однако при этом CH<sub>2</sub>-группы разных углеводородов характеризуются одинаковыми величинами  $\beta_i^{13}\text{C}$ , в то время как решение колебательной задачи для соответствующих изотопных форм дает несколько отличающиеся, приблизительно на ± 0,2% значения  $\beta_i^{13}\text{C}$  для CH<sub>2</sub>-групп в разных молекулах. Причина этого в данном случае, очевидно, состоит во влиянии

Таблица 3.1

К оценке изотопических чисел связей  $L_{C-H} = 0,0284$ ,  $L_{C-C} = 0,0464$ ,  $l_{C-H} = 0$ ,  $l_{C-C} = 0,0013$

Соединение	$\beta^{13}\text{C}_{\text{спектр}}$	$\Sigma L_{C-X}$	$\beta_{\text{аддит}}^{13}\text{C}$ (без учета $l_{C-X}$ )
*CH <sub>4</sub>	1,1136	$4L_{C-H}$	1,1136
*CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	1,1317	$3L_{C-H} + L_{C-C}$	1,1316
*CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1,1331	$3L_{C-H} + L_{C-C}$	1,1316
CH <sub>3</sub> *CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1,1493	$2L_{C-H} + 2L_{C-C}$	1,1496
*CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1,1331	$3L_{C-H} + 2L_{C-C}$	1,1316
CH <sub>3</sub> *CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1,1507	$2L_{C-H} + 2L_{C-C}$	1,1496
*CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1,1330	$3L_{C-H} + L_{C-C}$	1,1316
CH <sub>3</sub> *CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1,1506	$2L_{C-H} + 2L_{C-C}$	1,1496
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> *CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1,1519	$2L_{C-H} + 2L_{C-C}$	1,1496

Среднеквадратическое отклонение

<sup>1</sup> Получены в работе [9].

"дальнего окружения". Это обстоятельство может быть учтено введением поправочных изотопических чисел с индексами, соответствующими типам связей, образуемыми атомами-партнерами данного атома углерода (6 столбец табл. 3.1). Величина  $\beta_i$ -фактора тогда определится при помощи выражения

$$\beta_i = 1 + \sum_j L_j + \sum_k l_k,$$

где  $k$  нумерует связи, образуемые атомами, соседними с данным атомом углерода.

Используя известные значения  $\beta_i$ , приведенные в табл. 3.1, можно определить величины  $l_{C-H}$  и  $l_{C-C}$ . Одна из величин окажется неизбежно зависимой. Поэтому удобно принять  $l_{C-H} \equiv 0$ . Тогда для  $l_{C-C}$  получим значение 0,0013.

Введение поправки за дальнее окружение, как видно из табл. 3.1, приводит к совпадению результатов, полученных аддитивным и спектральным методом для гомологов метана, с точностью до четвертого знака. В то же время величина числа  $l_{C-C} = 0,0013$  невелика. Она составляет приблизительно 3% от значения  $L_{C-C} = 0,0464$ , что дает представление о мере вклада дальнего окружения в величину  $\beta$ -фактора.

Практически значения изотопических чисел связей  $L_{C-H}$ ,  $L_{C-C}$  и  $l_{C-C}$  найдены методом наименьших квадратов с использованием всех 9 известных значений  $\beta_i$ . Имеются определения  $\beta^{13}\text{C}$  для этих молекул, выполненные разными авторами. Значения несколько отличаются друг от друга. Мы предпочли использовать в качестве базовых значений  $\beta$ -факторов только результаты собственных расчетов [9], поскольку они получены на основе единой системы силовых постоянных.

Три из девяти значений  $\beta$ аддит, приведенных в табл. 3.1 не являются независимыми.

$\Delta = \beta_{\text{аддит}}^{13}\text{C} - \beta^{13}\text{C}_{\text{спектр}}$	$\Sigma l_{C-X}$	$\beta_{\text{аддит}}^{13}\text{C}$	$\Delta = \beta_{\text{аддит}}^{13}\text{C} - \beta^{13}\text{C}_{\text{спектр}}$
0,0000	—	1,1136	0,0000
-0,0001	$3l_{C-H}$	1,1316	-0,0001
-0,0015	$l_{C-C} + 2l_{C-H}$	1,1329	-0,0002
+0,0003	$6l_{C-H}$	1,1496	+0,0003
-0,0015	$l_{C-C} + 2l_{C-H}$	1,1329	-0,0002
-0,0011	$l_{C-C} + 5l_{C-H}$	1,1509	+0,0002
-0,0014	$l_{C-C} + 2l_{C-H}$	1,1329	-0,0001
-0,0010	$l_{C-C} + 5l_{C-H}$	1,1509	+0,0003
-0,0023	$2l_{C-C} + 4l_{C-H}$	1,1522	+0,0003
			$\pm 0,0002$

Однако оставшиеся шесть степеней свободы обеспечивают достаточно высокий уровень значимости оценки расхождения, составляющую  $\pm 0,0002$ , что составляет  $\pm 0,5\%$  от диапазона изменения использованных значений  $\beta$ -факторов (от 1,1136 до 1,1519).

### Изотопические числа $L_{C-O}$ и $L_{C=O}$

В молекуле  $CO_2$  углерод образует с кислородом две связи типа  $(C=O)\sigma\pi_{sp_1-sp_2}$ . Величина  $\beta^{13}C_{спектр.}$  для  $CO_2$  при  $300^{\circ}K$  равна 1,1909 [16]. Значение соответствующего изотопического числа получается равным 0,0955. В молекуле CO между атомами углерода и кислорода также существует связь типа  $(C=O)\sigma\pi_{sp_1-sp_2}$ . Величина  $\beta^{13}C$ , рассчитанная спектральным методом, составляет 1,0970. Следовательно, изотопическое число связи равно 0,0970. Несмотря на существенное различие величин  $\beta^{13}C$   $CO_2$  и CO, одноименные числа связей оказываются близкими, т.е. обнаруживается удовлетворительная трансферабельность. Выше отмечалось, что в соответствии с теорией валентных связей в строении молекулы  $CO_3^{2-}$  принимают участие одна  $(C=O)\sigma\pi_{sp_2-sp_3}$  и две  $(C-O)\sigma_{sp_2-sp_3}$  связи. Фактическую равнозначенность связей углерода с кислородом в карбонат-ионе можно при этом рассматривать как результат делокализации  $\pi$ -электронов, а формальную представлять как результат смешения трех форм, в каждой из которых  $\sigma\pi$ -связь занимает одно из выделенных направлений.

Отождествляя изотопические числа для одноименных связей во всех трех молекулах, получим  $L_{C-O} = 0,0550$  и  $L_{C=C} = 0,0958$  (табл. 3.2). Заметим, что при этом мы пренебрегаем тем обстоятельством, что  $\sigma\pi$ -связи в молекулах  $CO_2$  и CO с одной стороны и в  $CO_3^{2-}$  — с другой образованы атомами, находящимися в разном состоянии гибридизации. Это допущение оказывается справедливым и при рассмотрении дальше других типов связей.

Таблица 3.2

К оценке изотопических чисел связей  $L_{C-O} = 0,00550$ ,  $L_{C=O} = 0,0958$ ,  $L_{C-O} = 0,0019$ ,  $L_{C=O} = 0,0028$

Соединение	$\beta^{13}C_{спектр}$		$\Sigma L_{C-X}$	$\Sigma l_{C-X}$	$\beta^{13}C_{аддит}$	$\Delta$
	величина	литературный источник				
$CO_2$	1,1909	[39]	$2L_{C=O}$	—	1,1915	+0,0006
$CO_3^{2-}$	1,2057	[39]	$2L_{C-O} + L_{C=O}$	—	1,2058	+0,0001
CO	1,0970	[39]	$L_{C=O}$	—	1,0958	-0,0012
Среднеквадратическое расхождение						$\pm 0,0009$

Таблица 3.3

Сопоставление величин  $\beta^{13}\text{C}$ , определенных спектральным и аддитивным методом

Соединение	$\beta^{13}\text{C}_{\text{спектр}}$		$\Sigma L_{\text{C}-\text{X}}$	$\Sigma l_{\text{C}-\text{X}}$	$\beta^{13}\text{C}_{\text{аддит}}$	$\Delta$
	величина	литературный источник				
CH <sub>3</sub> OH	1,1328	[11]	$3L_{\text{C}-\text{H}} + L_{\text{C}-\text{O}}$	—	1,1402	+0,0074
*CH <sub>3</sub> COOH	1,1381	[11]	$3L_{\text{C}-\text{H}} + L_{\text{C}-\text{C}}$	$l_{\text{C}=\text{O}} + l_{\text{C}-\text{O}}$	1,1363	-0,0018
CH <sub>3</sub> *COOH	1,1978	[11]	$L_{\text{C}-\text{C}} + L_{\text{C}-\text{O}} + L_{\text{C}=\text{O}}$	—	1,1974	-0,0004
*CH <sub>3</sub> CHO	1,1293	[11]	$3L_{\text{C}-\text{H}} + L_{\text{C}-\text{C}}$	$l_{\text{C}=\text{O}}$	1,1344	+0,0051
CH <sub>3</sub> *CHO	1,1731	[11]	$L_{\text{C}-\text{H}} + L_{\text{C}-\text{C}} + L_{\text{C}=\text{O}}$	—	1,1708	-0,0023
Среднеквадратическое расхождение						±0,0036

В табл. 3.3 представлены величины  $\beta_i$ -факторов еще пяти соединений, содержащих связи C—O и C=O. Оценки  $\beta^{13}\text{C}_{\text{спектр}}$  для них менее надежны, чем для CO, CO<sub>2</sub> и CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>. Кроме того, наряду со связями C—O и C=O, они содержат связи C—H, C—C и O—H. Следовательно в этом случае помимо неопределенности, вносимой погрешностью определения  $L_{\text{C}-\text{O}}$  и  $L_{\text{C}=\text{O}}$  и ограниченностью самого принципа аддитивности имеются и другие источники расхождения  $\beta_{\text{спектр}}$  и  $\beta_{\text{аддит}}$ . Тем не менее величина расхождения достаточно умерена:  $\Delta = \pm 0,0036$ , что составляет около 4% от диапазона изменения рассмотренных значений  $\beta^{13}\text{C}$ .

Для изотопных форм \*CH<sub>3</sub>COOH и \*CH<sub>3</sub>CHO должна быть учтена поправка за дальнее окружение. Следуя логике принципа аддитивности, можно предположить, что величины  $l_{\text{C}-\text{X}}$  находятся между собой в тех же соотношениях, что и величины  $L_{\text{C}-\text{X}}$ . Тогда числа  $l_{\text{C}-\text{X}}$  для других типов связей можно найти при помощи следующего выражения:

$$l_{\text{C}-\text{X}} = (L_{\text{C}-\text{X}} - m L_{\text{C}-\text{H}}) \cdot 0,0722 \quad (3.35)$$

где  $m$  — кратность связи C—X. Отсюда  $l_{\text{C}-\text{O}} = 0,0019$  и  $l_{\text{C}=\text{O}} = 0,0028$ .

### Изотопическое число связи $L_{\text{C}=\text{C}}$ и ароматические соединения

Типичным соединением, содержащим связь типа (C=C)  $\sigma\pi_{sp_2-sp_2}$ , является этилен. Величина  $\beta_i^{13}\text{C}$ -фактора \*CH<sub>2</sub> = CH<sub>2</sub> определена С. Хартшорном и В. Шайнером [29]. Точнее, в этой работе приведены не величины  $\beta$ , а коэффициенты разделения изотопов по отношению к ацетилену. Поскольку в числе других имеется коэффициент разделения в

Таблица 3.4

К оценке изотопических чисел связей  $L_{C=C} = 0,0785$ ,  $l_{C=C} = 0,0016$ ,  $l_0 = -0,0029$ 

Соединение	$\beta^{13}\text{C}$ спектр		$\Sigma L_{\text{C}-\text{X}}$	$\Sigma l_{\text{C}-\text{X}}$	$\beta^{13}\text{C}_{\text{аддит}}$	$\Delta$
	величина	литературный источник				
$\text{CH}_2=\text{CH}_2$	1,1354	[29]	$2L_{\text{C}-\text{H}} + L_{\text{C}=\text{C}}$	-	1,1354	0,0000
	1,1533	[9]	$L_{\text{C}-\text{H}} + L_{\text{C}-\text{C}} + L_{\text{C}=\text{C}}$	$l_{\text{C}-\text{C}} + l_{\text{C}=\text{C}} + l_0$	1,1533	0,0000
	1,1293	[9]	$3L_{\text{C}-\text{H}} + L_{\text{C}-\text{C}}$	-	1,1316	+0,0023
	1,1677	[9]	$2L_{\text{C}-\text{C}} + L_{\text{C}=\text{C}}$	$l_{\text{C}-\text{C}} + l_{\text{C}=\text{C}} + l_0$	1,1712	+0,0035
	1,1545	[9]	$L_{\text{C}-\text{H}} + L_{\text{C}-\text{C}} + L_{\text{C}=\text{C}}$	$2l_{\text{C}-\text{C}} + l_{\text{C}=\text{C}} + l_0$	1,1546	+0,0001
Среднеквадратическое расхождение						$\pm 0,0020$

системе  $\text{CO}_2-\text{C}_2\text{H}_2$ , то, приняв для  $\text{CO}_2$  величину  $\beta_i^{13}\text{C} = 1,1909$ , можно вычислить  $\beta_i^{13}\text{C}$ -фактор  $\text{CH}_2$ -группы этилена, который оказывается равным 1,1354. Пренебрегая влиянием степени гибридизации углерода (связь углерода с водородом в этилене,  $(\text{C}-\text{H})\sigma_{sp^2-s}$  несколько отличается от одноименной связи в метановых углеводородах  $(\text{C}-\text{H})\sigma_{sp^3-s}$ ) и принимая для этилена величину  $L_{\text{C}-\text{H}} = 0,0284$ , получим для изотопического числа  $L_{\text{C}=\text{C}}$  величину 0,0785 (табл. 3.4).

Для ароматических соединений первоначально казалось необходимым ввести специальное число  $L_{\text{C}=\text{C}} = 0,062$  [8]. Оно было вычислено исходя из значения  $\beta_i = 1,1533$ , рассчитанного нами спектральным методом для молекулы бензола [9]. Однако выяснилось, что величина  $L_{\text{C}=\text{C}}$  точно равна полусумме  $L_{\text{C}-\text{C}}$  и  $L_{\text{C}=\text{C}}$ . Иначе говоря, для целей оценки изотопических чисел связей физическую равнозначность связей углерод–углерод в молекуле бензола можно рассматривать как результат смешения чередующихся одинарных и двойных связей.

Аналогичная ситуация уже отмечалась в случае молекулы карбоната-иона. Подобная специализация равноценных связей, согласующаяся с методом локализованных электронных пар, как будет показано дальше, оказывается оправданной также в случаях оценки изотопических чисел связей азота и кислорода.

В виду  $\pi$ -сопряжения в молекуле бензола влияния дальнего окружания, очевидно, должно учитываться иным образом. Для того, чтобы сохранить общность способа введения поправок, целесообразно суммировать поправочные числа  $l_{\text{C}-\text{C}}$  и  $l_{\text{C}=\text{C}}$  с дополнительным поправочным числом  $l_0$  для ароматического кольца. В первом приближении суммарную поправку

следует сделать нулевой, т.е. принять  $l_0 = -0,0029$  ( $-l_0 = l_{C-C} + l_{C=C}$ ). В общем случае величина этой поправки, вероятно, должна зависеть от числа заместителей, характера заместителей и положения атома углерода в кольце относительно заместителей, т.е. от тех факторов, которые определяют делокализацию  $\pi$ -электронов.

Сейчас недостаточно данных, чтобы рассмотреть вопрос о поправках второго порядка в ароматических соединениях более подробно. Он нуждается в дальнейших уточнениях.

### Изотопическое число связи $L_{C=C}$

Изотопическое число связи ( $C \equiv C$ ) от  $\pi_{sp-sp}$  первоначально было определено исходя из значений  $\beta_i$  изотопной формы пропинала  $^*CH \equiv C - CHO$  – единственного соединения, содержащего связь подобного типа, для которого имелась величина  $\beta_{спектр}$ . Величина  $L_{C=C}$  была найдена равной 0,088 [7]. Правда, при этом получалось сравнительно большое расхождение между оценками величин  $\beta^{13}C$  спектральным и аддитивным методами для другой изотопной формы пропинала –  $CH \equiv ^*C - CHO$  (см. табл. 3.15). Однако значение  $\beta_{спектр}$  для этой изотопной формы представлялось нам сомнительным, и в качестве  $L_{C=C}$  была принята величина 0,088. Позже в нашем распоряжении оказались данные работы С. Хартшорна и В. Шайнера [29], в которой приводится значение  $\alpha_{(CO_2 - C_2H_2)} = 1,0659$ . Так как эта величина равна отношению  $\beta_{CO_2}/\beta_{C_2H_2}$ , а для  $\beta_{CO_2}$  известно значение 1,1909, то  $\beta_{C_2H_2}$  оказывается равным 1,1173. Отсюда величина  $L_{C=C}$  получается равной 0,0889, т.е. в хорошем согласии с принятым ранее значением. При этом вновь, как и в случае этилена, подтверждается несущественность влияния характера гибридизации углерода на величину  $L_{C-H}$ .

Изотопические числа связей ( $C-H$ )<sub>sp3-s</sub>, ( $C-H$ )<sub>sp2-s</sub> и ( $C-H$ )<sub>sp-s</sub> в пределах существующих неопределенностей в оценках  $\beta$ -факторов неразличимы.

В табл. 3.5 приводятся величины расхождения  $\beta_{аддит}$  и  $\beta_{спектр}$  при значении  $L_{C=C} = 0,0881$ . Из выражения (3.35) определена величина  $l_{C=C} = 0,0003$ .

Таблица 3.5

К оценке изотопических чисел связей  $L_{C=C} = 0,0881$ ,  $l_{C=C} = 0,0002$

Соединение	$\beta_{спектр}^{13}C$		$\Sigma L_{C-X}$	$\Sigma l_{C-X}$	$\beta_{аддит}^{13}C$	$\Delta$
	величина	литературный источник				
$CH \equiv CH$	1,1173	[29]	$L_{C-H} + L_{C=C}$	–	1,1165	-0,0008
$^*CH \equiv C - CHO$	1,117	[31]	$L_{C-H} + L_{C=C}$	$l_{C=O}$	1,1178	+0,0008

## Изотопические числа связей $L_{C-N}$ и $L_{C\equiv N}$

Изотопическое число связи ( $C-N$ )  $\sigma_{sp_3-sp_3}$  определено из двух оценок  $\beta_{спектр}$  для соединения  $^*CH_3NH_2$ . Его величина найдена равной 0,050.

Изотопическое число связи ( $C\equiv N$ )  $\sigma\pi_{sp-sp}$  определено исходя из данных о величинах  $\beta_i$  для молекулы HCN и иона  $CN^-$  (табл. 3.6). При величине  $L_{C\equiv N} = 0,090$  расхождение между  $\beta_{спектр}$  и  $\beta_{аддит}$  составляет  $\pm 0,0025$ .

Таблица 3.6

К оценке изотопических чисел связей  $L_{C-N} = 0,050$ ,  $L_{C\equiv N} = 0,090$ ,  $l_{C\equiv N} = 0,0003$ ,  
 $l_{C-N} = 0,0016$

Соединение	$\beta_{спектр}^{13C}$		$\Sigma L_{C-X}$	$\Sigma l_{C-X}$	$\beta_{аддит}^{13C}$	$\Delta$
	величина	литературный источник				
$H^*CN$	1,1206	[39]	$L_{C-H} + L_{C\equiv N}$	—	1,1184	-0,0022
$*CN^-$	1,0875	[39]	$L_{C\equiv N}$	—	1,0900	+0,0025
$^*CH_3NH_2$	1,1361	[7]	$3L_{C-H} + L_{C-N}$	—	1,1352	-0,0009
$^*CH_3NH_2$	1,1344	[11]	$3L_{C-H} + L_{C-N}$	—	1,1352	+0,0008

## Изотопические числа связей $L_{C-F}$ , $L_{C-Cl}$ , $L_{C-Br}$ , $L_{C-I}$

Изотопическое число связи C–F было определено первоначально на основе значения  $\beta_{CF_4} = 1,2241$ , вычисленного нами через колебательные частоты в работе [7]. Величина  $L_{C-F}$  была найдена равной 0,056.

В настоящее время известны значения  $\beta_{спектр}$  для нескольких соединений, содержащих связь C–F (табл. 3.7). Определение изотопического числа  $L_{C-F}$  методом наименьших квадратов на основе трех соединений дает величину 0,0564, практически совпадающую с установленной ранее.

Среднеквадратическое расхождение между  $\beta_{аддит}$  и  $\beta_{спектр}$  составляет  $\pm 0,0050$ , т.е. около 6% диапазона изменения величин  $\beta$ , характеризующих рассмотренные соединения. Если принять во внимание, что  $\beta_{спектр}$  соединений рассчитывались разными авторами, наблюдаемая сходимость значений  $\beta$ , определенных спектральным и аддитивным методами, может рассматриваться как вполне удовлетворительная.

Приблизительно такой же уровень сходимости обнаруживают величины  $\beta_{спектр}$  и  $\beta_{аддит}$  для соединений, содержащих связь C–Cl (табл. 3.8). Изотопическое число этой связи  $L_{C-Cl} = 0,030$ .

В упоминавшейся уже работе С. Хартшорна и В. Шайнера [29] приведены значения коэффициентов разделения изотопов между галогенза-

Таблица 3.7

К оценке изотопических чисел связей  $L_{C-F} = 0,0564$ ,  $l_{C-F} = 0,0020$ 

Соединение	$\beta_{\text{спектр}}^{13\text{C}}$		$\Sigma L_{C-X}$	$\Sigma l_{C-X}$	$\beta_{\text{аддит}}^{13\text{C}}$	$\Delta$
	величина	литературный источник				
CF <sub>4</sub>	1,2241	[7]	$4L_{C-F}$	—	1,2256	+0,0015
CH <sub>3</sub> F	1,1368	[29]	$3L_{C-H} + L_{C-F}$	—	1,1416	+0,0048
HCOF	1,186	[31]	$L_{C-H} + L_{C=O} + L_{C-F}$	—	1,1808	-0,0052
Среднеквадратическое расхождение						$\pm 0,0050$

Таблица 3.8

К оценке изотопических чисел связей  $L_{C-Cl} = 0,030$ ,  $l_{C-Cl} = 0,0001$ 

Соединение	$\beta_{\text{спектр}}^{13\text{C}}$		$\Sigma L_{C-X}$	$\Sigma l_{C-X}$	$\beta_{\text{аддит}}^{13\text{C}}$	$\Delta$
	величина	литературный источник				
CH <sub>3</sub> Cl	1,1149	[29]	$3L_{C-H} + L_{C-Cl}$	—	1,1152	0,0003
*CH <sub>2</sub> ClCOOH	1,133	[31]	$2L_{C-H} + L_{C-C} + L_{C-Cl} + L_{C-O}$	$+ l_{C=O}$	1,1379	+0,005
CH <sub>2</sub> =*CCl <sub>2</sub>	1,1436	[29]	$2L_{C-Cl} + L_{C=C}$	—	1,1385	-0,0051

мешанными метана: CH<sub>3</sub>F, CH<sub>3</sub>Cl, CH<sub>3</sub>Br, CH<sub>3</sub>J и ацетиленом. К величинам  $\beta$ -факторов этих соединений целесообразно перейти через значение  $\beta_{CH_4}$ , приняв для последнего рассчитанное нами [9] и использованное для оценки  $L_{C-H}$  значение  $\beta_{CH_4} = 1,1136$ . Переход через  $\beta_{CH_4}$  (а не через  $\beta_{CO_2}$ ) дает возможность более точно оценить соотношение между величинами изотопических чисел галогенуглеродных связей и  $L_{C-H}$ .

Значения  $\beta_{CH_3F}$  и  $\beta_{CH_3Cl}$  приведены в табл. 3.7 и 3.8. В табл. 3.9 и 3.10 представлены величины  $\beta_{\text{спектр}}$  для CH<sub>3</sub>Br и CH<sub>3</sub>J, которые вместе с данными Г. Войта [37] для JCN и BrCN дают возможность произвести оценку изотопических чисел связей углерод–бром и углерод–йод. В работе Г. Войта [37] величины  $\beta_{\text{спектр}}$  определены для 273,15°K.

Переход к значениям  $\beta_{\text{спектр}}$  для 300°K произведен нами путем умножения  $\beta_{273,15}$  на 0,9766. Погрешность такой экстраполяции находится в

Таблица 3.9

К оценке изотопических чисел связей  $L_{C-J} = 0,018$ 

Соединение	$\beta_{спектр}^{13\text{C}}$		$\Sigma L_{C-X}$	$\Sigma l_{C-X}$	$\beta_{аддит}^{13\text{C}}$	$\Delta$
	величина	литературный источник				
JCN	1,107	[37]	$L_{C \equiv N} + L_{C-J}$	—	1,106	-0,001
CH <sub>3</sub> J	1,1031	[29]	$3L_{C-H} + L_{C-J}$	—	1,1032	+0,000

Таблица 3.10

К оценке изотопических чисел связей  $L_{C-Br} = 0,027$ 

Соединение	$\beta_{спектр}^{13\text{C}}$		$\Sigma L_{C-X}$	$\Sigma l_{C-X}$	$\beta_{аддит}^{13\text{C}}$	$\Delta$
	величина	литературный источник				
BrCN	1,119	[37]	$L_{C \equiv N} + L_{C-Br}$	—	1,117	-0,002
CH <sub>3</sub> Br	1,111	[29]	$3L_{C-H} + L_{C-Br}$	—	1,1122	+0,001

пределах  $\pm 0,003$ . Несмотря на то, что упомянутые преобразования могут явиться дополнительным источником неопределенности исходных величин  $\beta_{спектр}$  сходимость величин  $\beta_{спектр}$  и  $\beta_{аддит}$  для соединений, содержащих связи C–Br и C–J, получается удовлетворительной. Изотопические числа этих связей равны:  $L_{C-Br} = 0,027$  и  $L_{C-J} = 0,018$ . Пара соединений, служащих для оценки каждого из этих чисел связей, имеет близкие значения  $\beta$ -факторов, например:  $\beta_{JCN} = 1,107$ , а  $\beta_{CH_3J} = 1,1031$ . Однако они характеризуются совершенно различным набором чисел связей: в одном случае, помимо  $L_{(C-J)}$ , есть  $L_{C \equiv N}$ , а в другом –  $3L_{C-H}$ . Поэтому тот факт, что величины  $\beta$  для этих соединений, определенные аддитивным методом, находятся в хорошем согласии с величинами, вычисленными через колебательные частоты, служит хорошим примером работоспособности принципа аддитивности.

Наблюдается закономерное уменьшение величин  $L_{C-X}$  в ряду C–F, C–Cl, C–Br, C–J.

### Изотопическое число связи $L_{C=S}$

Определение величины  $L_{C=S}$  и оценка его аддитивных свойств возможна на основе значений  $\beta_{\text{спектр}}$  для двух соединений COS и  $CS_2$  (табл. 3.11), вычисленных Г. Войта [37]. Величины  $\beta_{\text{спектр}}$  для  $300^{\circ}\text{K}$  получены путем экстраполяции данных для  $\beta_{273,15}$ , как указано выше. Расхождение  $\beta_{\text{спектр}}$  и  $\beta_{\text{аддит}}$  составляет  $\pm 0,005$ .

Т а б л и ц а 3.11

К оценке изотопического числа  $L_{C=S} = 0,0495$

Соединение	$\beta_{\text{спектр}}^{13\text{C}}$		$\Sigma L_{C-X}$	$\Sigma l_{C-X}$	$\beta_{\text{аддит}}^{13\text{C}}$	$\Delta$
	величина	литературный источник				
COS	1,140	[37]	$L_{C=O} + L_{C=S}$	—	1,145	+0,005
$CS_2$	1,104	[37]	$2L_{C=S}$	—	1,099	-0,005

### Изотопическое число связи $L_{C=N}$

Величину изотопического числа  $L_{C=N}$  можно определить из значения  $\beta_{\text{спектр}}$  для изотопной формы  $\text{CH}_3\text{NC}^*$  [38]. Значение  $\beta_{\text{CH}_3\text{NC}^*}$  для  $300^{\circ}\text{K}$  равно 1,079. Отсюда  $L_{C=N} = 0,079$ . Надежность полученной величины трудно оценить непосредственно, так как указанное соединение является единственным соединением, содержащим связь типа C=N, для которого нам известно значение  $\beta_{\text{спектр}}$ . Однако из косвенных соображений можно заключить, что значение  $L_{C=N}$ , равное 0,079, является вполне правдоподобным. Анализ изотопических чисел связей показывает, что величина их закономерно увеличивается с увеличением кратности связи (табл. 3.12). Полученное значение  $L_{C=N} = 0,079$  хорошо согласуется с этой закономерностью.

Т а б л и ц а 3.12

Изотопические числа связей углерод–углерод и углерод–азот разной степени кратности

Связь	Тип связи		
	$\sigma_{sp_3-sp_3}$	$\sigma\pi_{sp_2-sp_2}$	$\sigma\pi\pi_{sp-sp}$
Углерод–углерод	0,0464	0,0785	0,0881
Углерод–азот	0,050	0,079	0,090

## ТОЧНОСТЬ АДДИТИВНОГО МЕТОДА

### Погрешность оценок изотопических чисел связей

Полученные значения изотопических чисел связей суммированы в табл. 3.13. Указанную в ней величину  $\Delta$  можно условно рассматривать как погрешность оценки величины  $L_{C-X}$ . Практически она представляет собой расхождение между величинами  $\beta_{спектр}$  и  $\beta_{аддит}$  и поэтому акумулирует не только погрешность оценки определяемого числа связи, но и других  $L_{C-X}$ , являющихся инкрементом данного значения  $\beta_{аддит}$ . Природа погрешности  $L_{C-X}$  двояка. Вследствие погрешностей, присущих спектральному методу расчета  $\beta$ -факторов, известная неопределенность заложена в самой исходной для оценки  $L_{C-X}$  информации. Величина расхождения  $\Delta$  частично отражает эту неопределенность, частично же обусловлена ограниченностью постулированного принципа аддитивности.

Для того чтобы свести к минимуму неопределенность в оценке изотопического числа связи, обусловленную ошибками определения  $\beta_{спектр}$ , в каждом случае использовалось ограниченное число наиболее надежных определений  $\beta_{спектр}$ . Число степеней свободы в табл. 3.13 указывает, насколько больше было взято исходных величин  $\beta_{спектр}$ , чем, собственно, необходимо для определения изотопического числа. Иначе говоря, оно

Таблица 3.13

Изотопические числа связей углерода

N	$L_{C-X}$				$l_{C-X}$	
	символ	значение	число степеней свободы	$\Delta$	символ	значение
1	$L_{C-H}$	0,0284	6	$\pm 0,0002$	$l_{C-H}$	0
2	$L_{C-C}$	0,0464	6	$\pm 0,0002$	$l_{C-C}$	0,0013
3	$L_{C=C}$	0,0785	4	$\pm 0,002$	$l_{C=C}$	0,0016
4	$L_{C\equiv C}$	0,088	1	$\pm 0,001$	$l_{C\equiv C}$	0,0002
5	$L_{C-N}$	0,050	1	$\pm 0,001$	$l_{C-N}$	0,0016
6	$L_{C=N}$	0,079	0		$l_{C=N}$	0,0016
7	$L_{C\equiv N}$	0,090	1	$\pm 0,002$	$l_{C\equiv N}$	0,0003
8	$L_{C-O}$	0,055	2	$\pm 0,001$	$l_{C-O}$	0,0019
9	$L_{C=O}$	0,096	2	$\pm 0,001$	$l_{C=O}$	0,0028
10	$L_{C-F}$	0,056	2	$\pm 0,005$	$l_{C-F}$	0,0020
11	$L_{C-Cl}$	0,030	2	$\pm 0,005$	$l_{C-Cl}$	0,0001
12	$L_{C-Br}$	0,027	1	$\pm 0,002$	$l_{C-Br}$	-0,0001
13	$L_{C-J}$	0,018	1	$\pm 0,001$	$l_{C-J}$	-0,0007
14	$L_{C=S}$	0,050	1	$\pm 0,005$	$l_{C=S}$	-0,0005

соответствует числу независимых испытаний аддитивного метода путем сравнения  $\beta_{\text{аддит}}$  с достаточно надежными величинами  $\beta_{\text{спектр}}$ . Более полный анализ, включающий сопоставление  $\beta_{\text{аддит}}$  с известными из литературы определениями  $\beta_{\text{спектр}}$ , дан ниже.

### Статистический анализ расхождений между $\beta_i^{13}\text{C}_{\text{спектр}}$ и $\beta_i^{13}\text{C}_{\text{аддит}}$

Вопрос о точности аддитивного метода определения  $\beta$ -факторов и границах применимости принципа аддитивности достаточно сложен. Обычный способ проверки теории — обращение к эксперименту — в данном случае практически неприменим. Современная точность экспериментального определения коэффициентов разделения изотопов недостаточно высока, да и достижение изотопного равновесия возможно лишь для весьма ограниченного круга систем. Поэтому единственным способом оценки корректности аддитивного метода может служить сравнение его с другим теоретическим методом. Естественно, что таковым является спектральный метод расчета  $\beta$ -факторов. Если бы этот метод был абсолютно строг и лишен ошибок, сравнение с ним могло бы быть положено в основу оценки точности аддитивного метода. Однако опыт показывает, что расчет  $\beta$ -факторов при помощи спектрального метода сопряжен с ошибками, иногда весьма существенными. Некоторые источники их были указаны выше, в соответствующем разделе.

Вследствие этих причин для одних и тех же соединений, даже достаточно простых, получаются заметные расхождения в оценках  $\beta$ -факторов, сделанных разными авторами (табл. 3.14). Они отражают ту неопределенность, с которой приходится иметь дело при спектральном методе расчета  $\beta$ -факторов. Усредненная величина стандартного расхождения между оценками  $\beta_{\text{спектр}}$  для одного и того же соединения составляет  $\pm 0,0055$ .

Таким образом, наблюдаемые расхождения  $\beta_{\text{спектр}}$  и  $\beta_{\text{аддит}}$  могут быть вызваны как погрешностью, присущей аддитивному методу, так и ошибками спектрального метода.

На рис. 3.1 сопоставлены соответственные значения  $\beta_{\text{спектр}}$  и  $\beta_{\text{аддит}}$ . Среднеквадратическое расхождение между ними составляет  $\pm 0,006$ . Значения  $\beta_i$ -факторов меняются в диапазонах от  $\beta_i = 1,0875$  до  $\beta_i = 1,225$ . Следовательно, неопределенность оценок  $\beta_i$ -факторов составляет около 5% по отношению к диапазону их изменчивости. В пределах этой неопределенности как часть ее заключена неопределенность, обусловленная погрешностью аддитивного метода. Заметим, что на рис. 3.1 не представлены значения  $\beta$ , из которых определялись числа связи — сопоставлены только независимые оценки  $\beta_{\text{спектр}}$  и  $\beta_{\text{аддит}}$ . Поскольку практически числа связей определялись методом наименьших квадратов из значений  $\beta_{\text{спектр}}$  для нескольких соединений, исключено одно из них для каждого числа связи, причем то, для которого сходимость  $\beta_{\text{спектр}}$  и  $\beta_{\text{аддит}}$  была наилучшей. Только для двух соединений в этом отношении сделано исключение. Вместо величин  $\beta_{\text{CH}_3\text{Cl}}$  и  $\beta_{\text{CF}_4}$ , характеризующихся наименьшими значениями  $\Delta = \beta_{\text{спектр}} - \beta_{\text{аддит}}$ , устраниены величины

Таблица 3.14

Сопоставление величин термодинамических изотопных факторов, вычисленных при помощи спектрального метода ( $\beta_{\text{спектр}}$ ) разными авторами для одних и тех же соединений

Соединение	[34]	[29]	[9, 11]	[25]
CH <sub>4</sub>	1,1192	1,1224	1,1136	1,112
CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	1,1366	1,1363	1,1317	—
*CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1,1411	1,1413	1,1331	—
CH <sub>3</sub> *CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1,1483	1,1488	1,1493	—
CO <sub>2</sub>	1,1904	1,1904 <sup>1</sup>	—	—
*CH <sub>3</sub> CHO	—	—	1,1293	—
CH <sub>3</sub> *CHO	—	—	1,1731	—
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	—	1,1982	—	1,202
*CH <sub>3</sub> CN	—	1,1353	—	—

<sup>1</sup> Данные этих авторов пересчитаны к величине  $\beta_{\text{CO}_2} = 1,1904$ .

$\beta_{\text{CH}_2\text{CCl}_2}$  ( $\Delta = -0,004$ ) и  $\beta_{\text{HCOF}}$  ( $\Delta = -0,005$ ). В первом случае – чтобы не снимать одно из параллельных значений (соединенных линиями на рис. 3.1), во втором – чтобы оставить величину, характеризующую верхний предел всего диапазона значений  $\beta$ -факторов.

В табл. 3.15 сведены 76 известных значений  $\beta_i^{13}\text{C}_{\text{спектр}}$ . Соответствующие значения  $\beta_{\text{аддит}}$  получены путем суммирования изотопических чисел связей. Использовано 13 типов  $L_{\text{C}-\text{X}}$ . Поскольку сами  $L_{\text{C}-\text{X}}$  определялись из величин  $\beta_{\text{спектр}}$ , исследуемая совокупность характеризуется  $75 - 13 = 62$  степенями свободы, что составляет выборку достаточного объема. Изотопическое число  $L_{\text{C}-\text{H}}$  при определении величин  $\beta_{\text{аддит}}$  в рассмотренной совокупности использовалось в качестве инкремента 128 раз,  $L_{\text{C}-\text{C}} - 41$ ,  $L_{\text{C}-\text{O}} - 20$ ,  $L_{\text{C}-\text{O}} - 12$ ,  $L_{\text{C}-\text{C}} - 8$ ,  $L_{\text{C}-\text{N}} - 8$ ,  $L_{\text{C}-\text{C}} - 3$ ,  $L_{\text{C}-\text{N}} - 2$ ,  $L_{\text{C}-\text{F}} - 7$ ,  $L_{\text{C}-\text{Cl}} - 6$ ,  $L_{\text{C}-\text{Br}} - 3$ ,  $L_{\text{C}-\text{J}} - 3$ ,  $L_{\text{C}-\text{S}} - 3$  раза. В целом статистика довольно значительная, но различные числа связи представлены в выборке неравномерно, что уменьшает общность выводов, которые можно сделать в отношении границ применимости аддитивного метода<sup>1</sup>. С другой стороны, в выборке хорошо представлены связи, характерные для биологических молекул. Это особенно важно в связи с целями данной работы.

Математическое ожидание значений расхождений  $\Delta$  близко к нулю:

$$M\Delta = \frac{1}{n} \sum_i^{76} \Delta_i = +0,0003.$$

<sup>1</sup> Так как имеется единственное соединение, содержащее связь C=N, для которого известна величина  $\beta_{\text{спектр}}$ , изотопическое число  $L_{\text{C}-\text{N}}$  и соответствующая величина  $\beta_{\text{CH}_3\text{NC}^*}$  однозначно связаны и поэтому исключены из рассмотрения.

[31]	[38]	[27]	[39]	Стандартное отклонение
—	—	1,1220	—	±0,005
—	—	—	—	±0,003
—	—	—	—	±0,004
—	—	—	—	±0,001
—	1,1948	—	1,1909	±0,002
1,141	—	—	—	±0,008
1,160	—	—	—	±0,009
—	—	—	1,2057	±0,004
—	1,1424	—	—	±0,005
в среднем				±0,0055

Это значит, что принятая совокупность инкрементов (чисел связей) является достаточной для определения соответствующей аддитивной величины ( $\beta_i^{13}\text{C}$ ). В противном случае выявилось бы отклонение, носящее систематический характер.

Дисперсия значений  $\Delta$  составляет

$$D\Delta = M(\Delta_i - M)^2 = \frac{1}{n} \sum_i^{76} (\Delta_i - M\Delta)^2 = 4372 \cdot 10^{-8},$$

а величина среднеквадратичного отклонения

$$\sigma = \pm \sqrt{D\Delta} = \pm 0,0066.$$

Последняя характеризует суммарную погрешность определений  $\beta_{\text{спектр}}$  и  $\beta_{\text{аддит.}}$ . Поскольку нас интересует оценка точности аддитивного метода, следует рассмотреть имеющуюся выборку с точки зрения исключения тех отклонений  $\Delta$ , которые почти определенно происходят за счет погрешности определения  $\beta_{\text{спектр}}$ .

Прежде всего из числа значений  $\beta_{\text{спектр}}$ , для которых имеется несколько определений, сделанных разными авторами, целесообразно исключить те, которые обладают явно худшей сходимостью с величинами  $\beta_{\text{аддит.}}$ .

Далее исключим несколько крайних значений, для которых хотя и нет параллельных определений, но есть основание считать, что соответствующие определения  $\beta_{\text{спектр}}$  сделаны с существенной ошибкой. Таких величин четыре. Рассмотрим их отдельно. Начнем с  $\beta_{\text{HCOO}^-} = 1,162$ ,  $\beta_{\text{HCOOH}} = 1,197$ . Для обоих соединений совокупность чисел связей  $L_{\text{C-X}}$  одинакова. В структуре этих соединений нет каких-либо особенностей, отличающих их от других соединений, на которые принцип аддитивности распространяется. Свойства аддитивности не зависят существенно от ионной или молекулярной формы соединения, как это видно на примере  $\text{CN}^-$ ,

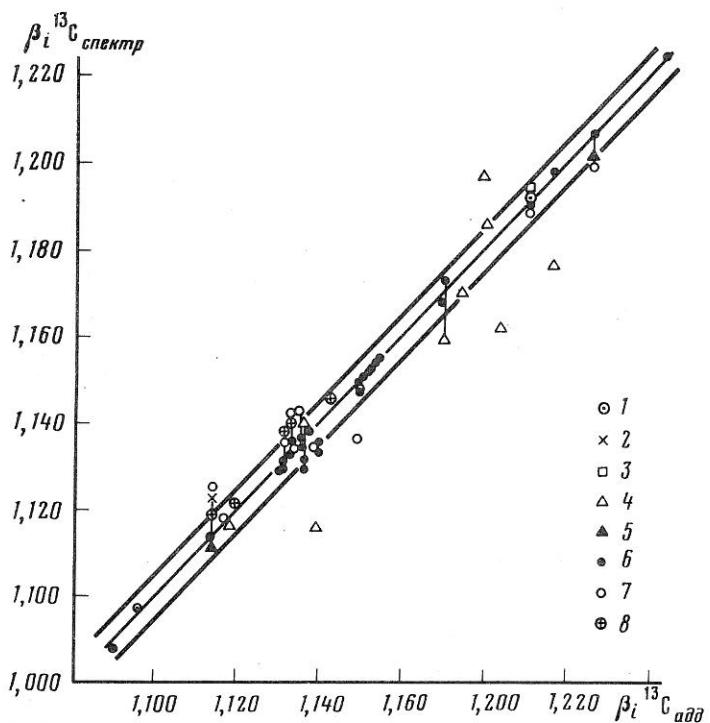


Рис. 3.1. Сопоставление величин термодинамических изотопных факторов углерода, вычисленных при помощи спектрального ( $\beta_{\text{спектр}}$ ) и аддитивного метода ( $\beta_{\text{аддит}}$ )

Вертикальной линией соединены значения  $\beta_{\text{спектр}}$  одного и того же соединения, полученные разными авторами. На графике указан коридор ошибок, отвечающий среднеквадратическому расхождению между величинами  $\beta_{\text{спектр}}$  и  $\beta_{\text{аддит}}$ ;  $\sigma = \pm 0,006$ . Условные обозначения относятся к ссылкам: 1 - [39]; 2 - [27]; 3 - [37, 38]; 4 - [31]; 5 - [26]; 6 - [9 (I, II, IV)]; 7 - [29]; 8 - [34]

$\text{CO}_3^-$ . Присоединение водорода к кислородному атому может оказать влияние на уровне величины  $L_{\text{C}-\text{X}}$ . Поэтому существенное различие между величинами  $\beta_{\text{HCOO}^-}$  и  $\beta_{\text{HCOOH}}$  внушает сомнение в достоверности их значений.

Также вызывает сомнение величина  $\beta_{\text{спектр}}$  для  $\text{CCl}_2^*\text{COOH}$ , равная 1,177. Для углерода карбоксильной группы уксусной кислоты получено значение  $\beta_{\text{CH}_3^*\text{COOH}} = 1,1978$  [11], находящееся в хорошем согласии со значением, полученным аддитивным способом ( $\beta_{\text{аддит}} = 1,1974$ ). Поэтому нет оснований ожидать, что карбоксильный углеродmonoхлоруксусной кислоты, образующей те же самые химические связи, будет иметь столь резко отличный  $\beta$ -фактор. Тем более, что величина  $L_{\text{C}-\text{Cl}}$  близка к  $L_{\text{C}-\text{H}}$ , а для соединений углерода с хлором правило аддитивности, как видно из табл. 3.15, хорошо выполняется для всех исследованных соединений. Четвертым соединением, для которого получается аномально большое расхождение между  $\beta_{\text{аддит}}$  и  $\beta_{\text{спектр}}$ , является изотопная форма пропинала:  $\text{CH}\equiv\text{C}^*-\text{CHO}$ . Для второго атома углерода этого соединения

Таблица 3.15

Сопоставление величин  $\beta_t^{13}\text{C}$ , вычисленных спектральным и аддитивным методами

Номер п/п	Соединение	$\beta_{\text{спектр}}$		$\beta_{\text{аддит}}$	$\Delta$
		величина	литера- турный источ- ник		
1	2	3	4	5	6
1	$\text{CH}_4$	1,1136	[9]	1,1136	0,0000
2	$\text{CH}_4$	1,112	[26]	1,1136	+0,0016
3	$\text{CH}_4$	1,122	[27]	1,1136	-0,0084
4	$\text{CH}_4$	1,1224	[29]	1,1136	-0,0088
5	$\text{CH}_4$	1,1112	[34]	1,1136	-0,0056
6	$\text{CH}_3\text{CH}_3$	1,1317	[9]	1,1316	-0,0001
7	$\text{CH}_3\text{CH}_3$	1,1368	[29]	1,1316	-0,0052
8	$\text{CH}_3\text{CH}_3$	1,1366	[34]	1,1316	-0,0050
9	$^*\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_3$	1,1331	[9]	1,1329	-0,0002
10	$^*\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_3$	1,1418	[29]	1,1329	-0,0089
11	$^*\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_3$	1,1411	[34]	1,1329	-0,0082
12	$\text{CH}_3^*\text{CH}_2\text{CH}_3$	1,1493	[9]	1,1496	+0,0003
13	$\text{CH}_3^*\text{CH}_2\text{CH}_3$	1,1492	[29]	1,1496	+0,0004
14	$\text{CH}_3^*\text{CH}_2\text{CH}_3$	1,1483	[34]	1,1496	+0,0013
15	$^*\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	1,1331	[9]	1,1329	-0,0002
16	$\text{CH}_3^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	1,1507	[9]	1,1509	+0,0002
17	$^*\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	1,1330	[9]	1,1329	-0,0001
18	$\text{CH}_3^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	1,1506	[9]	1,1509	+0,0003
19	$\text{CH}_3\text{CH}_2^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	1,1519	[9]	1,1522	+0,0003
20	Цикло- $\text{C}_3\text{H}_8$	1,1355	[29]	1,1522	+0,0167
21	Цикло- $\text{C}_3\text{H}_8$	1,1353	[34]	1,1522	+0,0169
22	Цикло- $\text{C}_6\text{H}_6$	1,1544	[9]	1,1522	-0,0022
23	$\text{CO}_2$	1,1909	[39]	1,1915	+0,0006
24	$\text{CO}_2$	1,1904	[34]	1,1915	+0,0011
25	$\text{CO}_2$	1,1948	[38]	1,1915	-0,0033
26	$\text{CO}_3^{2-}$	1,2057	[39]	1,2058	+0,0001
27	$\text{CO}_3^{2-}$	1,2020	[26]	1,2057	+0,0037
28	$\text{CO}_3^{2-}$	1,1988	[29]	1,2057	+0,0069
29	$\text{CO}$	1,0970	[39]	1,0958	-0,0012
30	$^*\text{CH}_3\text{COOH}$	1,1381	[11]	1,1363	-0,0018
31	$\text{CH}_3^*\text{COOH}$	1,1978	[11]	1,1974	-0,0004
32	$^*\text{CH}_3\text{CHO}$	1,1293	[11]	1,1344	+0,0051
33	$^*\text{CH}_3\text{CHO}$	1,140	[31]	1,1344	-0,0056
34	$\text{CH}_3^*\text{CHO}$	1,1731	[11]	1,1708	-0,0023
35	$\text{CH}_3^*\text{CHO}$	1,160	[31]	1,1708	+0,0108
36	$\text{CHC}^*\text{CHO}$	1,170	[31]	1,1708	+0,001
37	$\text{HCOO}^-$	1,162	[31]	1,1791	-0,017
38	$\text{HCOOH}$	1,197	[31]	1,1791	-0,017
39	$\text{CCl}_2^*\text{COOH}$	1,177	[31]	1,1974	+0,020
40	$\text{CH}_3\text{OH}$	1,1328	[11]	1,1402	+0,0074

Таблица 3.15 (окончание)

1	2	3	4	5	6	
41	CHCH	1,1173	[29]	1,1165	-0,0008	
42	*CH <sub>2</sub> CHO	1,117	[31]	1,1178	+0,0008	
43	CH*CCHO	1,116	[31]	1,1373	+0,0213	
44	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	1,1354	[29]	1,1353	-0,0001	
45	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	1,1351	[34]	1,1353	+0,0002	
46	*CH <sub>2</sub> CBr <sub>2</sub>	1,1293	[29]	1,1351	+0,0058	
47	*CH <sub>2</sub> CF <sub>2</sub>	1,1334	[11]	1,1393	+0,0059	
48		1,1533	[9]	1,1532	-0,0001	
49		(1)	1,1293	[9]	1,1316	+0,0023
50		(2)	1,1677	[9]	1,1713	+0,0036
51		(3)	1,1545	[9]	1,1546	+0,0001
52	HCN	1,1206	[39]	1,1184	-0,0022	
53	CN <sup>-</sup>	1,0875	[9]	1,0900	+0,0025	
54	CH <sub>3</sub> *CN	1,1325	[38]	1,1364	+0,0039	
55	*CH <sub>3</sub> CN	1,1424	[38]	1,1319	-0,0105	
56	*CH <sub>3</sub> CN	1,1358	[29]	1,1319	-0,0039	
57	*CH <sub>3</sub> NH <sub>2</sub>	1,1344	[11]	1,1352	+0,0008	
58	*CH <sub>3</sub> NH <sub>2</sub>	1,1361	[7]	1,1352	-0,0009	
59	CF <sub>4</sub>	1,2241	[7]	1,2256	+0,0015	
60	CH <sub>3</sub> F	1,1368	[29]	1,1416	+0,0048	
61	HCOF	1,186	[31]	1,1808	-0,0052	
62	CH <sub>3</sub> F	1,1457	[34]	1,1416	-0,0041	
63	*CH <sub>3</sub> Cl	1,1149	[29]	1,1162	+0,0013	
64	*CH <sub>2</sub> ClCOOH	1,133	[31]	1,1389	+0,0059	
65	CH <sub>2</sub> *CCl <sub>2</sub>	1,1436	[29]	1,1395	-0,0041	
66	ClCN	1,126	[37]	1,1210	-0,0050	
67	CH <sub>3</sub> Cl	1,1240	[34]	1,1162	-0,0078	
68	BrCN	1,119	[37]	1,117	-0,002	
69	CH <sub>3</sub> Br	1,111	[29]	1,112	+0,001	
70	CH <sub>3</sub> Br	1,1177	[31]	1,1122	-0,0055	
71	JCN	1,107	[37]	1,108	+0,001	
72	CH <sub>3</sub> J	1,103	[29]	1,103	0,000	
73	CH <sub>3</sub> J	1,1101	[31]	1,1032	-0,0069	
74	COS	1,140	[37]	1,146	+0,006	
75	CS <sub>2</sub>	1,104	[37]	1,100	-0,004	
76	CH <sub>3</sub> N*C	1,0789	[38]	1,079	-	

нения получена величина  $\beta_i = 1,116$ , практически совпадающая со значением  $\beta_i$ -фактора третьего атома (1,117). Поскольку эти атомы углерода занимают неравноценное положение, подобное совпадение представляется сомнительным. В отличие от атома углерода, связанного с водородом, второй атом углерода, связанный с альдегидным углеродом, должен

обладать повышенным значением  $\beta_i$ -фактора, что наблюдается во всех других аналогичных случаях.

Заметим, что все четыре указанные определения  $\beta_{спектр}$  принадлежат одному и тому же автору [31]. Рассчитанные им значения  $\beta_i$ -факторов углерода метильной и альдегидной групп уксусного альдегида также существенно расходятся с соответствующими значениями  $\beta_i$ , полученными аддитивным путем. Но эти значения  $\beta_{спектр}$  можно исключить безусловно, поскольку в случае уксусного альдегида имеются параллельные определения, выполненные другими авторами, которые показывают хорошую сходимость с аддитивными оценками.

Наконец, есть еще одно значение  $\beta_{спектр}$ , явных оснований для исключения которого нет, но расхождение  $\beta_{спектр}$  и  $\beta_{аддит}$  для которого столь велико, что требует специального рассмотрения. Речь идет о циклопропане, для которого получена величина  $\beta_{спектр} = 1,135$ , в то время как аддитивный метод дает величину 1,152. Структура циклопропана не имеет аналогов среди других соединений, для которых известны величины  $\beta^{13}\text{C}$ . Тетраэдрическая конфигурация *s*p<sub>3</sub>-гибридизированного углерода в молекуле циклопропана сильно деформирована. Вследствие сближенности непосредственно не взаимодействующих  $\sigma$ -орбиталей возможно дополнительное перекрывание. Возможно, по этой причине величина  $\beta_{аддит}$ , полученная без учета эффектов сопряжения, оказалась завышенной. Нельзя исключать, конечно, и просто ошибку определения  $\beta_{спектр}$ . Во всяком случае этот вопрос нуждается в исследовании. По-видимому,  $\beta^{13}\text{C}_{\text{цикло-С}_3\text{H}_8}$  следует исключить из выборки, так как большая величина расхождения  $\beta_{спектр}$  и  $\beta_{аддит}$ , связанная с этим соединением, искаляет представление о дисперсии, характеризующей выборку в целом.

Применение критериев согласия к улучшенному в результате исключения больших расхождений  $\Delta$  распределению, показывает, что оно не является гауссовским.

Полученное распределение характеризуется высоким эксцессом. В подобных случаях можно полагать, что на результаты испытаний, содержащих небольшую погрешность, накладываются результаты, полученные со значительным отклонением, которые по отношению к первым представляют собой "грубые" ошибки [15].

Анализ показывает, что если в выборке исключить все члены с отклонением больше 0,004, то оставшаяся выборка, содержащая 28 элементов, подчиняется гауссовскому распределению.

Стандартное отклонение, характеризующее это распределение, составляет  $\sigma_{\beta_i} \pm 0,0016$ .

Анализ выборки показывает, что она включает соединения разного типа, содержащие все виды связей, для которых определены  $L_{\text{C}-\text{X}}$ . Иначе говоря, значительные расхождения  $\Delta$  не связаны с каким-либо определенным типом связи. Мы склонны полагать в связи с этим, что распределение со стандартом  $\sigma_{\beta_i} = \pm 0,0016$  отражает пределы справедливости принципа аддитивности для соединений, содержащих химические связи рассмотренного типа. Если расхождение между  $\beta_{спектр}$  и  $\beta_{аддит}$  превышает 0,004,

то это, по-видимому, скорее всего связано с погрешностью в определении  $\beta_{\text{спектр}}$ , если, конечно, химическое строение соединения не имеет каких-либо особенностей, которые не могли быть учтены аддитивным методом в его настоящем виде.

### Погрешность определения $\beta_{\Sigma}$ -факторов

Установленное выше значение дисперсии выборки  $\beta_{\text{аддит}} - \beta_{\text{спектр}}$  следует рассматривать как дисперсию, характеризующую оценку величины  $\beta_i$ , зависящую от неопределенности  $\sigma_{LX}$  оценок соответствующих чисел связей:

$$D\beta_i = \sigma_{\beta_i}^2 = \sum_m^m \sigma_L^2. \quad (3.36)$$

Термодинамический изотопный фактор соединения в целом определяется в соответствии с (3.34) как среднее арифметическое величин  $\beta_i$  изотопных форм. Следовательно,

$$D\beta_{\Sigma} = D \frac{1}{m} \sum_m \beta_i. \quad (3.37)$$

В соответствии с известными свойствами дисперсии, если все значения случайной величины умножены на некоторый множитель, то дисперсия умножится на квадрат этого множителя:

$$D\beta_{\Sigma} = \frac{1}{m^2} D \sum_m \beta_i. \quad (3.38)$$

Дисперсия суммы независимых случайных величин равна сумме дисперсий:

$$D\beta_{\Sigma} = \frac{1}{m^2} \sum_m D\beta_i \quad (3.39)$$

и

$$\sigma_{\beta_{\Sigma}} = \pm \frac{\sqrt{\sum_m D\beta_i}}{m} = \frac{\sqrt{\sum_m \sigma_{\beta_i}^2}}{m}. \quad (3.40)$$

Если ошибки определения величин  $\beta_i^{13}\text{C}$  принять приблизительно равными, т.е.  $\sigma_{\beta_i(1)} = \sigma_{\beta_i(2)} = \sigma_{\beta_i(m)}$ , то

$$\sigma_{\beta_{\Sigma}} = \pm \frac{\sigma_{\beta_i}}{\sqrt{m}}. \quad (3.41)$$

Следовательно, оценка термодинамического изотопного фактора соединения, содержащего много атомов углерода, производится с меньшей неопределенностью, чем оценка  $\beta_i$ -фактора. Если, например, погрешность оценки  $\beta_i$  принять равной  $\pm 0,004$ , то для молекул, содержащих 20–25 атомов углерода  $|\sigma_{\beta_{\Sigma}}| < 0,001$ , т.е. погрешность определения  $\beta_{\Sigma}$ -фактора окажется в четвертом знаке после запятой.

Сказанное справедливо при условии, что величина  $\beta_i$  (аддит) вследствие недостаточности принципа аддитивности случайным образом откло-

няется от истинного значения в сторону несколько больших или меньших значений. Симметричный характер распределения величин расхождения  $\beta_i$  (аддит) —  $\beta_i$  (спектр) как будто бы свидетельствует об этом. Однако необходимо иметь в виду, что нам неизвестен действительный вид функции распределения  $\beta_i$  (аддит) —  $\beta_i$  (истин). Поэтому соотношения (3.39) и (3.41) скорее отражают тенденцию к уменьшению  $\sigma_{\beta_{\Sigma}}$  с увеличением  $t$ , чем точно передают соотношение между погрешностями определения  $\beta_{\Sigma}$ - и  $\beta_i$ -факторов.

Большинство экспериментальных данных о биологических изотопных эффектах получено путем изучения межмолекулярных изотопных эффектов, т.е. различий между изотопными составами отдельных соединений. Эти изотопные эффекты подчас весьма малы. Поэтому то обстоятельство, что  $\beta_{\Sigma}$ -факторы, характеризующие соединение в целом, могут быть получены с относительно высокой точностью, имеет большое значение.

Оценка  $\beta_i$ -факторов менее точна. Однако величина внутримолекулярных изотопных эффектов обычно существенно больше, чем межмолекулярных. Потому более высокая погрешность в этом случае менее ощутима.

### ИЗОТОПИЧЕСКИЕ ЧИСЛА СВЯЗЕЙ АЗОТА

Количество соединений, для которых вычислены величины  $\beta^{15}\text{N}_{\text{спектр}}$ , недостаточно для надежной оценки изотопических чисел связей азота. Тем не менее из предварительного анализа можно получить представление о принципиальной применимости концепции аддитивности к изотопной термодинамике азота.

В табл. 3.16 представлены известные в литературе величины  $\beta^{15}\text{N}_{\text{спектр}}$  и набор аддитивных инкрементов (чисел связей), определяющих соответствующие термодинамические изотопные факторы.

Из этих данных можно вычислить значения некоторых изотопических чисел связей азота. Они представлены в табл. 3.17. Не для каждого числа связи имеется возможность проверить его переносимость. Однако, в тех случаях, когда соответствующая величина  $L_{\text{N-X}}$  определена из нескольких соединений, вариации значений оказываются в сравнительно узких пределах.

Оценку изотопических чисел связей азота с кислородом можно произвести лишь условно. Известно значение  $\beta^{15}\text{N} = 1,1534$  для молекулы  $\text{NO}_3^-$  [12]. Физически все три связи N—O в этой молекуле неразличимы (так же, как связи C—O в молекуле  $\text{CO}_3^{2-}$ ). Однако, следуя методу валентных связей, можно принять, что в молекуле  $\text{NO}_3^-$  присутствуют одновременно 2 связи (N—O)  $\sigma_{sp_2-sp_3}$  и одна связь (N=O)  $\sigma\pi_{sp_2-sp_2}$ . Известны также значения  $\beta^{15}\text{N}$  для молекул NO и  $\text{NO}_2$ , равные соответственно 1,0659 [39] и 1,1079 [12]. Принимая, что азот в этих соединениях находится в  $sp_2$ -гибридизации, (хотя метод валентных связей несостоителен для описания молекул с нечетным числом электронов), и учитывая упомянутый характер связей в молекуле  $\text{NO}_3^-$ , получим для связи азота с кислородом следующие числа:  $L_{\text{N-O}} = 0,044$ ;  $L_{\text{N-O}} = 0,065$ .

Величина изотопического числа  $\sigma$ -связи, образованной взаимодействи-

Таблица 3.16

Термодинамические изотопные факторы соединений азота и химические связи, образуемые атомами азота в соответствующих изотопных формах

Соединение	$\beta_i^{15}\text{N}$ спектр		Химическая связь
	величина	литера-турный источ-ник	
NH <sub>3</sub>	1,0683	[12]	$3L_{(\text{N}-\text{H})\sigma sp_3-s}$
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1,0947	То же	$4L_{(\text{N}-\text{H})\sigma sp_3-s}$
CH <sub>3</sub> NH <sub>2</sub>	1,0853	"	$2L_{(\text{N}-\text{H})\sigma sp_3-s} + L_{(\text{N}-\text{C})\sigma sp_3-sp_3}$
C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> NH	1,1074	"	$L_{(\text{N}-\text{H})\sigma sp_3-s} + 2L'_{(\text{N}-\text{C})\sigma sp_3-sp_2}$
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> - <sup>*</sup> N=N-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	1,0970	"	$L_{(\text{N}-\text{C})\sigma sp_2-sp_2} + L_{(\text{N}=\text{N})\sigma\pi sp_2-sp_2}$
CN <sup>-</sup>	1,0641	[39]	$L_{(\text{N}\equiv\text{C})\sigma\pi\pi sp_1-sp_1}$
HCN <sup>-</sup>	1,0655	То же	$L_{(\text{N}\equiv\text{C})\sigma\pi\pi sp_1-sp_1}$
N <sub>2</sub>	1,0814	"	$L_{(\text{N}\equiv\text{N})\sigma\pi\pi sp_1-sp_1}$

Таблица 3.17

Изотопические числа связей азота

Символ	Диапазон вариаций	Среднее значение	Символ	Диапазон вариаций	Среднее значение
$L_{\text{N}-\text{H}}$	0,023–0,025	0,023	$L_{\text{N}\equiv\text{C}}$	0,064–0,065	0,065
$L_{\text{N}-\text{C}}$	0,039–0,042	0,040	$L_{\text{N}\equiv\text{N}}$	0,081	0,081
$L_{\text{N}=\text{N}}$	0,058	0,058			

ем незаполненных орбиталей атомов, имеет то же значение (в пределах погрешности данного рассмотрения), что и для связи донорно-акцепторного типа. Отсюда, в частности, следует, что термодинамические изотопные факторы азота не зависят от его валентного состояния, т.е. величины  $\beta^{15}\text{N}$  в случае как трехвалентного, так и пятивалентного азота определяются одинаковыми инкрементами для однотипных связей.

Изотопическим числам связей азота присущи те же закономерности, что и изотопическим числам связей углерода. Минимальным значением обладает изотопическое число  $L_{\text{N}-\text{H}}$ , характеризующее связь азота с водородом. Величины  $L_{\text{N}-\text{X}}$  увеличиваются с увеличением электроотрицательности атома-партнера. Так же как и для углерода, происходит изменение величины изотопического числа в зависимости от кратности связи. Очевидно, на величины  $\beta^{15}\text{N}$  переносимы и другие закономерности, установленные на более обширном материале соединений углерода.

Таким образом, анализ имеющихся данных дает основания предполагать распространимость принципа аддитивности на изотопную термодинамику азота. Ограничное количество исходных данных не позволяет оценить погрешность расчета  $\beta^{15}\text{N}_{\text{аддит.}}$ .

### ИЗОТОПИЧЕСКИЕ ЧИСЛА СВЯЗЕЙ КИСЛОРОДА

Кислород – двухвалентный элемент. Он образует две ординарные  $\sigma$ -связи или одну двойную  $\pi$ -связь. Величина  $\beta_i^{18}\text{O}$  определяется только одним или двумя аддитивными инкрементами. Поэтому идея аддитивности применительно собственно к вычислению  $\beta_i$ -факторов кислорода через числа связей в значительной степени теряет свое значение. В полной мере представляет интерес лишь реализуемость принципа трансферабельности.

В табл. 3.18 представлена исходная информация. Величину числа связи  $L_{\text{O}-\text{H}}$  определим, используя значение  $\beta^{18}\text{O}_{\text{спектр}}$  для молекулы воды. Используя имеющиеся данные для  $\beta^{18}\text{O}$ -факторов молекул  $\text{CO}$ ,  $\text{CO}_2$  и  $\text{CO}_3^{2-}$ , можно определить значения изотопических чисел  $L_{\text{O}=\text{C}}$  и  $L_{\text{O}-\text{C}}$ .

Результаты представлены в табл. 3.19.

Если предположить, что различие величин  $\beta^{18}\text{O}$ -факторов кислорода  $\text{CO}$  и  $\text{CO}_2$  объясняется присутствием в молекуле  $\text{CO}_2$  второго атома кислорода, можно найти величины  $l_{\text{O}=\text{C}}$  и  $l_{\text{O}-\text{C}}$ . Они равны соответственно 0,012 и 0,007.

Таблица 3.18

Термодинамические изотопные факторы соединений кислорода и химические связи, образуемые атомами кислорода в соответствующих изотопных формах

Соединение	$\beta_i^{18}\text{O}_{\text{спектр}}$		Химические связи
	величина	литературный источник	
$\text{CO}$	1,1053	[39]	$L_{(\text{O}=\text{C})\sigma\pi sp_2-sp_1}$
$\text{CO}_2$	1,1172	[25]	$L_{(\text{O}=\text{C})\sigma\pi sp_2-sp_1}$
$\text{CO}_3^{2-}$	1,0945 <sup>1)</sup>	[39]	$\frac{1}{3}L_{(\text{O}=\text{C})\sigma\pi sp_2-sp_2} + \frac{2}{3}L_{(\text{O}-\text{C})\sigma sp_3-sp_2}$
$\text{O}_2$	1,0818	[39]	$L_{(\text{C}=\text{O})\sigma\pi sp_2-sp_2}$
$\text{H}_2\text{O}$	1,0636 <sup>2)</sup>	[25]	$2L_{(\text{O}-\text{H})\sigma sp_3-s}$
$\text{SO}_4^{2-}$	1,0924	[39]	$L_{(\text{O}-\text{S})\sigma sp_3-sp_3}$
$\text{SO}_2$	1,0888	[39]	$\frac{1}{2}L_{(\text{O}=\text{S})\sigma\pi sp_2-sp_2} + \frac{1}{2}L_{(\text{O}-\text{S})\sigma sp_3-sp_2}$

<sup>1)</sup> Приведено значение для полностью изотопно-замещенной формы, т.е  $1,0945^3 = (1 + L_{\text{O}-\text{C}} + 2l_{\text{O}-\text{C}})(1 + L_{\text{O}-\text{C}} + l_{\text{O}=\text{C}} + l_{\text{O}-\text{C}})^2$ .

<sup>2)</sup> Приведено значение  $\beta^{18}\text{O}$  для водяного пара.

Таблица 3.19

## Изотопические числа связей кислорода

Символ	Величина	Символ	Величина
$L_{O-H}$	0,032	$L_{O-S}$	0,092
$L_{O-C}$	0,065	$L_{O=S}$	0,085
$L_{O=C}$	0,105		

В молекуле  $SO_2$  кислород образует с серой, находящейся в состоянии  $sp_3$ -гибридизации, 4 неразличимые связи ( $O-S$ )  $\sigma_{sp_3-sp_3}$ . В молекуле  $SO_2$  сера находится в состоянии  $sp_2$ -гибридизации. Она также образует две равноценные связи с кислородом. Однако, последние могут рассматриваться как результат смешения двух связей ( $O=S$ )  $\sigma\pi_{sp_2-sp_2}$  и ( $O-S$ )  $\sigma_{sp_3-sp_2}$ . Отсюда можно определить величины изотопических чисел  $L_{S-O}$  и  $L_{S=S}$ .

### НЕКОТОРЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИЕ ИЗОТОПИЧЕСКИЕ ЧИСЛА СВЯЗЕЙ

Из сказанного выше можно вывести несколько общих заключений.

1. Положенные в основу аддитивного метода оценки  $\beta$ -факторов, принципы локализации, аддитивности и трансферабельности оказываются в существенной степени присущи изотопной термодинамике.

2. Свойство аддитивности инкрементов (чисел связей) в принципе справедливо для разных типов связей углерода, для связей углерода с разными элементами (включая H, N, O, F, S, Cl, Br, J), а также для разных элементов (C, N, O).

3. Величина  $\beta$ -фактора определяется главным образом ближним химическим окружением, атомами, непосредственно связанными с данным. Вклад дальнего окружения (через один атом) составляет приблизительно 3%.

4. Величина изотопического числа, характеризующего связь данного типа, мало зависит от состояния гибридизации атома, образующего связь. Например, связь углерода с водородом в метане ( $sp_3$ -гибридизация), этилене ( $sp_2$ ) и ацетилене ( $sp_1$ ) характеризуется одним и тем же числом  $L_{C-H} = 0,0284$ .

5. Молекулярная структура незначительно влияет на величину  $\beta_i$ -фактора. Это согласуется с предыдущим пунктом, поскольку молекулярная структура соединений углерода (тетраэдрическая, плоская, линейная) тесно связана с состоянием гибридизации атомов углерода. Аналогичный вывод о слабой связи изотопных эффектов с молекулярной структурой делался и на основе других подходов [22, 35].

6. Для C, N и O наблюдается один и тот же тип закономерного изменения величины изотопического числа с изменением типа связи (табл. 3.20). Значение числа, характеризующего  $\sigma\pi$ -связь (двойную), больше, чем

Таблица 3.20

Закономерности изменения чисел связей разного типа для N, C, O

Связь	Тип связи		
	$\sigma$	$\sigma\pi$	$\sigma\pi\pi$
Азот – водород	0,023	–	–
Азот – углерод	0,040	–	0,065
Азот – азот	–	0,058	0,081
Азот – кислород	0,044	0,065	–
Углерод – водород	0,0284	–	–
Углерод – углерод	0,0464	0,078	0,088
Углерод – азот	0,050	0,079	0,090
Углерод – кислород	0,055	0,096	–
Кислород – водород	0,033	–	–
Кислород – углерод	0,065	0,105	–
Кислород – азот	–	–	–
Кислород – кислород	–	0,082	–

Таблица 3.21

Закономерность изменения чисел связей углерода по периодам и группам таблицы Менделеева (в скобках указаны значения для двойных  $\sigma\pi$ -связей)

H 0,0284							
Li	Be	B	C 0,0464 (0,0785)	N 0,050 (0,079)	O 0,055 (0,096)	F 0,056	
			Si	P	S	Cl 0,030 (0,050)	
						Br 0,027	
						J 0,018	

числа, характеризующего одноименную  $\sigma$ -связь (одинарную), но увеличение меньше чем в два раза. Иначе говоря, соединение, содержащие C=C связь, обнаруживает меньшее средство к изотопу  $^{13}\text{C}$  по сравнению с соединением, содержащим две C-C связи. Точно так же величина изотопического числа для  $\sigma\pi\pi$ -связи больше, чем величина изотопического числа для  $\sigma\pi$ -связи, но увеличение меньше, чем увеличение кратности.

7. Наблюдается закономерное изменение величины изотопических чисел связей углерода в зависимости от положения элемента-партнера в таблице Менделеева (табл. 3.21). Величины чисел увеличиваются слева направо и уменьшаются сверху вниз. В соответствии с этой закономерностью следует ожидать, что величина числа связи  $L_{\text{C}-\text{S}}$  должна быть около 0,029, а  $L_{\text{C}-\text{Si}}$  – около 0,027. Максимальным значением обладает число  $L_{\text{C}-\text{F}}$ . Минимальные значения следует ожидать для связей углеро-

да с тяжелыми щелочными металлами. Ранее отмечались корреляции изотопных эффектов с положением элементов в периодической таблице [1]. Следует, однако, заметить, что в действительности корреляция должна быть справедлива для изотопических чисел связей, а не для изотопных эффектов ( $\beta$ -факторов соединений). Наиболее отчетливая корреляция наблюдалась для  $\beta$ -факторов водорода [1], что и понятно, поскольку для водорода значение  $\beta - 1$  тождественно соответствующему числу связи. В отношении углерода, например, считалось, что соединения его с водородом изотопически легче, чем соединения с кислородом [2, 27]. В известной степени это справедливо, поскольку величины  $L_{C-H}$  меньше, чем величины  $L_{C-O}$ . Однако такое соединение углерода с кислородом, как CO, обладает меньшей величиной  $\beta$ -фактора, чем CH<sub>4</sub>. Это расходится с упомянутым эмпирическим правилом.

8. Существует корреляция величин изотопических чисел связей с электроотрицательностью атомов-партнеров.

Нетрудно видеть, что отмеченные закономерности связаны так или иначе с электронной плотностью в окрестности ядра. Как известно из теории ЛКАОМО, электронная плотность в молекулярной орбитали вокруг ядра меньше, чем в соответствующей атомной орбитали [14]. Чем больше изменяет химическая связь электронную плотность, тем, очевидно, больше энергетический эффект, связанный с замещением одного изотопа на другой. Поэтому в величину  $\beta$ -фактора наибольший вклад вносят инкременты, относящиеся к связям, образуемым данным элементом с атомами-партнерами, способными максимально оттянуть электронное облако. Заметим, что сама химическая связь обусловлена перекрыванием волновых функций атомов (интеграл перекрывания), т.е. увеличением электронной плотности между взаимодействующими атомами и в меньшей степени — сжатием электронных зарядов, окружающих ядра [17]. Поэтому корреляция изотопических чисел с величинами энергий связей практически отсутствует.

Взгляд на изотопическое число связи как на меру изменения электронной плотности вокруг ядра вследствие образования данной химической связи дает основу как для объяснения наблюдаемых закономерностей, так и для указания некоторых ограничений аддитивного метода. В частности, вероятно, явления, связанные с делокализацией электронов сопряжением и сверхсопряжением, должны приводить к нарушению аддитивности. Возможно, в этой связи применение метода для описания изотопных эффектов в ароматических соединениях, напряженных циклах и полиеновых структурах потребует введения дополнительных поправок.

#### ДРУГИЕ АДДИТИВНЫЕ МЕТОДЫ

Рядом исследователей предпринимались попытки упростить процедуру классического метода расчета  $\beta$ -фактора ( $\beta$ -спектр). Парадокс этого метода состоит в том, что силовые постоянные, с нахождением которых связаны основные трудности решения колебательной задачи, одинаковы для изотопных молекул. Поэтому логично попытаться связать величины изотопных эффектов непосредственно с величинами силовых постоянных

и элементов, зависящих от массы, минуя расчет колебательных частот. Я. Бигеляйзен, Т. Ишида, В. Шпиндель [19, 21, 23, 30] в ряде работ показали, что это можно в принципе сделать в рамках приближенных представлений квантово-статистического выражения (3.30) в ортогональных полиномах. Значение этих работ состоит, помимо прочего, в том, что они выявили относительно слабую зависимость изотопных эффектов от молекулярной структуры и незначительное влияние удаленных частот молекулы (более чем на две связи) на изотопные эффекты по данному атому, т.е. слабое влияние дальнего окружения. Последнее свойство было использовано М. Штерном и М. Вольфсбергом [35] для разработки процедуры так называемых урезанных расчетов изотопных эффектов. Было показано, что при исследовании изотопных эффектов в системах, включающих большие молекулы, можно без большой ошибки вычислять изотопные эффекты, принимая во внимание взаимодействия только в непосредственной окрестности изотопно-замещенной позиции, пренебрегая наличием остальной части молекулы.

Понятно, что отмеченные свойства – проявление тех же свойств локализации аддитивности и трансферабельности, которые обусловливают возможность оценки  $\beta$ -факторов при помощи аддитивных и универсальных инкрементов в развитом нами методе. Физический смысл инкрементов (изотопических чисел связи), как показано выше, не связан с представлениями теории валентно-силового поля. В то же время свойство аддитивности присуще в известной мере и тем взаимодействиям, которые рассматриваются в модели валентно-силового поля. Недавно Я. Бигеляйзен, Р. Хом и Т. Ишида [20] исследовали аддитивность вкладов в общую величину термодинамического изотопного фактора, происходящих от взаимодействий отдельных координат, и нашли, что аддитивность действительно имеет место. Заметим, что американские авторы используют понятие приведенного отношения статсумм по состояниям  $(s^*/s)f$ , где  $f$  – собственно отношение статсумм по состояниям изотопных форм молекулы ( $s^*$  и  $s$  – числа симметрии последних), которое соответствует нашему термодинамическому изотопному фактору. Обычно используется величина  $\ln(s/s^*)f$ , т.е.  $\ln\beta$  для значений  $\beta$ , близких к 1, приблизительно равная  $\beta - 1$ .

Процедура, разработанная Я. Бигеляйзеном и его сотрудниками, состоит в следующем. Вычисляется  $(s/s^*)f$  на основе достаточно надежной системы силовых постоянных, иначе говоря, рассчитывается  $\beta_{спектр}$ . Затем оценивается приведенное отношение статсумм при экстраполяции к нулевому значению одной из силовых постоянных. Получившуюся величину вычитают из полного значения  $(s^*/s)f$  и находят вклад данной силовой постоянной, и так для всех взаимодействий в молекуле. Эта процедура была названа ее авторами "методом полных эффектов".

В табл. 3.22 представлены результаты, полученные для молекулы метана. Приведены величины силовых постоянных, характеризующих взаимодействие соответствующих координат; величины  $\delta g_{ij}$ , равные разности элементов  $g_{ij}^*$  и  $g_{ij}$  G-матрицы (в скобках число эквивалентных ненулевых  $\delta g_{ij}$ -элементов); абсолютные величины  $\ln(s/s^*)f$ , т.е. значения, полученные путем полного решения колебательной задачи с

Т а б л и ц а 3.22

Основные вклады в величину  $\ln(s^*/s)f$  для  $^{13}\text{CH}_4/^{12}\text{CH}_4$  (по [20])

	Абсолютная величина	$\Sigma$ "полных эффектов"	Растяжение связи С–Н
F -матрица Джонса и Мак-Доузлла			
$f_{ij}(\text{mdyn A}^\circ)^{-1}$			5,495
$\delta g_{ij}(\text{amu})^{-1}$			0,0064 (4)
$T = 300^\circ\text{K}$	1,1135–01	116,4%	82,7%
760	3,0299–02	106,2%	84,1%
3020	2,5476–03	100,5%	86,2%
$\infty$		100,0%	86,4%
F -матрица Хартшорна и Шайнера			
$f_{ij}(\text{mdyn A}^\circ)^{-1}$			4,918
$\delta g_{ij}(\text{amu})^{-1}$			0,0064 (4)
$T = 300^\circ\text{C}$	1,1477–01	93,2%	60,3%
760	3,1479–02	97,9%	68,8%
3020	2,6413–03	99,7%	74,2%
		100,0%	74,8%

данной F-матрицей для нескольких температур; вклад каждого вида взаимодействия и, наконец, сумма вкладов в процентах. Близость последней к 100% служит мерой аддитивности вкладов. Представлены два варианта, отличающиеся выбором исходных для расчета F-матрицы. В одном случае модель силового поля принадлежит Джонсу и Мак-Доузллу, в другом – С. Хартшорну и В. Шайнера (см. ссылки в работе [20]).

В табл. 3.23 и 3.24 приведены данные, полученные Я. Бигелайзеном и другими [20] для ряда соединений углерода и кислорода при температуре  $300^\circ\text{K}$ .

Т а б л и ц а 3.23

Вклады растягивающих и деформирующих сил в значение  $10^3 \ln(s^*/s)f ({}^{13}\text{C} {}^{12}\text{C})$  при  $300^\circ\text{K}$  (по [20])

Координата	$\text{CH}_2\text{O}$	$\text{CH}_4$ (1)	$\text{CH}_4$ (2)
Растяжение связи С–Н	30	92	69
Растяжение связи С–Х	70	–	–
Деформация угла X–С–Х	–	–	–
Деформация угла Н–С–Н	4	49	38
Деформация угла Н–С–Х	38	–	–
$\Sigma$ "полных эффектов"	141	130	108
Точное значение	142	111	115

П р и м е ч а н и е. Расчеты произведены исходя из матриц силовых элементов: па (3) V; Кроусфорда–Миллера (4); Дьюнкера–Милза (5); ссылки на лите-

Деформация угла Н—С—Н	Растяжение X рас- тяжение	Растяжение X де- формация	Деформация X деформация
<b>F-матрица Джонса и Мак-Доуэлла</b>			
0,475	0,124	0,151	0,016
0,0171 (6)	-0,0021 (6)	-0,0061 (12)	-0,0171 (3)
44,4%	-1,0%	-8,7%	-1,0%
36,0%	-1,3%	-11,2%	-1,1%
30,4%	-1,9%	-13,2%	-1,0%
29,9%	-1,9%	-13,4%	-1,0%
<b>F-матрица Хартшорна и Шайнера</b>			
0,370	0,066	-0,0011	-0,058
0,0171 (6)	0,0021 (6)	-0,0061 (12)	-0,0171 (3)
29,6%	-0,5%	0,1%	3,7%
25,9%	-0,7%	0,1%	3,8%
22,8%	-1,0%	0,1%	3,6%
22,5%	-1,0%	0,1%	3,5%

Авторы рассматривают полученные результаты как свидетельствующие в целом о замечательной аддитивности вкладов. Аддитивность существенно улучшается с увеличением температуры, хотя она достаточно высока и при 300°К. Свойство аддитивности проявляется сильнее в отсутствии больших недиагональных членов F- и G-матриц. Наличие таковых в модели силового поля метана Джонса и Мак-Доуэлла ослабляет наблюдаемую в этом случае аддитивность (см. табл. 3.22).

Наилучшие аддитивные свойства, согласно Я. Бигелайзену, наблюдаются для изотопов водорода. Водород занимает концевые положения в

C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> (3) IV	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> (3) V	плоскост- ные (4)	плоскост- ные (5)	внеплоскост- ные (4)
32	49	49	14	16	—
76	35	33	63	106	—
—	—	—	60	19	11
12	21	21	—	—	—
31	22	24	17	11	32
143	126	123	157	141	36
125	134	128	132	126	18

Джонса и Мак-Доуэлла (1); С. Хартшорна и В. Шайнера (2); Шахтшнейдера и Снайдерту см. в работе [20].

Таблица 3.24

Вклады растягивающих и деформирующих сил в величину  $10^3 \ln(s^*/s) f(^{18}\text{O}/^{16}\text{O})$  при  $300^\circ\text{K}$  (по [20])

Координата	$\text{H}_2\text{O}$	$\text{CO}_2$	$\text{CH}_2\text{O}$
Растяжение связи X—O	56,9	99,4	81,0
Деформация угла X—O—X	10,0	—	—
Деформация угла X—X—O	—	11,2	10,2
$\Sigma$ "полных эффектов"	66	111	91
Точное значение	64	109	90

молекуле. В связи с этим  $\delta g_i$  ( $i \neq j$ ) равны нулю для всех типов координат, за исключением непосредственно прилегающей к замещенному атому. В определенной степени это свойственно и кислороду, атомы которого также занимают концевое положение в молекуле. Для углерода аддитивность в целом хуже (ср. табл. 3.22 и 3.24). Помимо неаддитивности, происходящей от недиагональных элементов G-матрицы, существенная неаддитивность вносится внеплоскостными движениями в ароматической молекуле бензола. "В отсутствие больших недиагональных элементов F-матрицы изотопная химия углерода, согласно Я. Бигеляйзену и другим [20], показывает при  $300^\circ\text{K}$  аддитивность в пределах 6%". Следует уточнить, что речь идет об аддитивности тех вкладов силовых взаимодействий, которые исследовали эти авторы.

Метод, развитый Я. Бигеляйзеном и другими, представляет независимый подход к оценке свойств аддитивности. Поэтому весьма ценным для нас является сделанное американскими исследователями заключение: "Приведенные числовые примеры дополняют предшествующие теоретические подтверждения (ссылки 8, 18 в цитируемой работе) метода Галимова оценки величин  $\ln(s/s^*)f$  для широкого спектра соединений углерода путем суммирования чисел связей" [20, с. 3309].

Достоинством метода Бигеляйзена является возможность автономной оценки величины аддитивных инкрементов.

Однако он содержит два существенных ограничения. Во-первых, метод опирается на модель валентно-силового поля. Поэтому величины инкрементов зависят от принятой системы силовых постоянных (см. табл. 3.22 и 3.23). При этом неопределенность инкрементов и, следовательно, основанных на них аддитивных оценок может оказаться существенно больше, чем неопределенность величин  $\beta_{\text{спектр}}$ , вычисленных непосредственно на основе различных моделей силового поля. Во-вторых, инкременты, характеризующие не химические связи как таковые, а взаимодействия с координатами в молекуле, более тесно связаны с ее конкретным строением и поэтому обладают худшей переносимостью. Следовательно, в известной степени утрачивается наиболее ценное свойство аддитивного метода — универсальность системы инкрементов.

## ТЕМПЕРАТУРНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ ИЗОТОПНЫХ ФАКТОРОВ

Термодинамические изотопные факторы, как и любые другие термодинамические величины, зависят от температуры. С уменьшением температуры значения  $\beta$ -факторов увеличиваются, возрастают также величины коэффициентов разделения  $\alpha$ . В качестве примера в табл. 3.25 приведены температурные зависимости изотопных факторов простых углеводородных соединений.

В последующих главах при рассмотрении биологического фракционирования изотопов используются числовые величины  $\beta$ -факторов, относящиеся только к одной температуре 300°К. Это, конечно, представляет собой просто упрощающую теоретический анализ условность. Строго говоря, в зависимости от температурных условий биосинтеза необходимо использовать соответствующую систему  $\beta$ -факторов и соответствующую систему изотопических чисел связей.

Ниже сопоставлены величины  $L_{C-X}$  для  $T = 300^{\circ}\text{K}$  и  $T = 273^{\circ}15\text{K}$

$T, ^{\circ}\text{K}$	$L_{C-\text{H}}$	$L_{C-\text{C}}$	$L_{C-\text{N}}$	$L_{C-\text{O}}$	$L_{C-\text{F}}$	$L_{C=\text{C}}$	$L_{C=\text{C}}$	$L_{C=\text{N}}$	$L_{C=\text{O}}$
300°	0,0284	0,046	0,050	0,055	0,056	0,078	0,088	0,091	0,095
273°15	0,033	0,055	0,059	0,064	0,065	0,095	0,100	0,103	0,108

Во многих случаях, однако, достаточно приближенной оценки температурной зависимости. В сравнительно узком температурном диапазоне 0–25°С, характерном для развития живых организмов, зависимость  $L_{C-X}$  от  $T$  практически линейна. Кроме того, в достаточно сложных органических соединений происходит усреднение температурных зависимостей для разных связей, образуемых атомами углерода. Это делает ее в известной мере инвариантной для разных биохимических компонентов.

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

$$\Psi_t = 1 + \frac{2}{3}(27 - t^{\circ}) \cdot 10^{-2}, \quad (3.42)$$

где  $t^{\circ}$  – температура биогенеза (в °С).

Таблица 3.25  
Зависимость величин  $\beta_{\Sigma}^{C^{13}}$ ,  $\alpha$  и  $\Delta$  от температуры [9]

$T^{\circ}, \text{K}$	$\beta_{\Sigma}$			$\text{CH}_4/\text{C}_2\text{H}_6$		$\text{C}_2\text{H}_6/\text{C}_3\text{H}_8$	
	$\text{CH}_4$	$\text{C}_2\text{H}_6$	$\text{C}_3\text{H}_8$	$\alpha$	$\Delta$	$\alpha$	$\Delta$
300	1,1136	1,1317	1,1385	0,9840	-16,0	0,9940	-6,0
400	1,0765	1,0861	1,0895	0,9912	-8,8	0,9969	-3,1
500	1,0554	1,0610	1,0630	0,9947	-5,3	0,9981	-1,9
600	1,0421	1,0455	1,0468	0,9967	-3,2	0,9988	-1,2
700	1,0331	1,0353	1,0361	0,9979	-2,1	0,9992	-0,8
800	1,0267	1,0282	1,0288	0,9985	-1,5	0,9994	-0,6

Величина  $\beta$ -фактора при данной температуре определяется так:

$$\beta_t \approx 1 + \Psi_t (\beta_{300^\circ \text{ K}} - 1). \quad (3.43)$$

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  $\beta_{273} = 1,196$ .

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Варшавский Л.Н., Вайсберг С.Э. Термодинамические и кинетические особенности реакций изотопного обмена. – Успехи химии, 1957, 26, вып. 12.
2. Вильсон Е., Дешиус Дж., Кросс П. Теория колебательных спектров молекул. М.: Изд-во иностр. лит., 1960.
3. Виноградов А.П. Геохимия изотопов. – Изв. АН СССР, Сер. геол., 1954, № 3.
4. Волькенштейн М.В., Ельяшевич М.А., Степанов Б.И. Колебания молекул. М.: ГИТТЛ, 1949. Т. 1.
5. Галимов Э.М. О связи коэффициента разделения изотопов с константами равновесия реакций изотопного обмена углерода в углеводородных системах. – Журн. физ. химии, 1971, 45, № 5.
6. Галимов Э.М. Метод изотопических чисел связей. Применение в биохимии и геохимии. – В кн.: Тез. IV Всесоюз. симпоз. по применению стабил. изотопов в геохимии. ГЕОХИ, М.; 1972.
7. Галимов Э.М. Изотопы углерода в нефтегазовой геологии. М.: Недра, 1973.
8. Галимов Э.М. Приближенный способ нахождения термодинамических изотопных факторов соединений углерода. – Журн. физ. химии, 1974, 48, № 2.
9. Галимов Э.М., Ивлев А.А. Термодинамические изотопные эффекты органических соединений. I. Изотопные эффекты в нормальных алканах. – Журн. физ. химии, 1973, 47, № 11, с. 2787; II. Расчет изотопных частот и  $\beta$ -факторы углерода нормальных алканов. Там же, № 10, с. 2707, депониров. ВИНТИ № 6306-73; III. Водородный изотопный эффект в  $n$ -алканах. – Там же, депониров. ВИНТИ № 6307-73; IV. Расчет изотопных частот и  $\beta$ -факторы углерода бензола, толуола, циклогексана. – Там же, депониров. ВИНТИ № 6308-73; V. Изотопные эффекты углерода в алиптических и ароматических углеводородах. – Журн. физ. химии, 1974, 48, № 4.
10. Грибов Л.А. Введение в теорию и расчет колебательных спектров многоатомных молекул. Л.: Изд-во ЛГУ, 1965.
11. Ивлев А.А., Королева М.Я., Галимов Э.М. Термодинамические изотопные эффекты органических соединений. VI. Уксусная кислота, ацетальдегид, метиламин, метиловый спирт. – Журн. физ. химии, 1974, 48, № 1.
12. Ивлев А.А., Королева М.Я., Тран Суан Хоань, Клина М. Термодинамические изотопные эффекты органических соединений. VII. Изотопные эффекты азота. – Журн. физ. химии, 1974, 48, № 5.
13. Накамото К. Инфракрасные спектры неорганических и координационных соединений. М.: Мир, 1966.
14. Пиментал Г., Стратли Р. Как квантовая механика объясняет химическую связь. М.: Мир, 1973.
15. Пустыльник Е.И. Статистические методы анализа и обработка наблюдений. М.: Наука, 1968.
16. Свердлов Л.И., Ковнер М.А., Кондратов Е.П. Колебательные спектры многоатомных молекул. М.: Наука, 1970.
17. Шустарович Е.М. Химическая связь. М.: Наука, 1973.

18. Bachinski D. J. Bond Strength and sulfur isotope fractionation in coexisting sulfides. – Econ. Geol., 1969, 69, p. 56–65.
19. Bigeleisen J. Isotopes and chemical principles/ Ed. Roch. Wash.: Amer. Chem. Soc., 1975.
20. Bigeleisen J., Hom R.C., Ishida T. Isotope chemistry and molecular structure: Carbon and oxygen isotope chemistry. – J. Chem. Phys., 1976, 64, N 8, 3303–3310.
21. Bigeleisen J., Ishida T. Application of finite orthogonal polynomials to the thermal functions of harmonic oscillators. I. Reduced partition function of isotopic molecules. – J. Chem. Phys., 1968, 48, N 3, p. 1311–1330.
22. Bigeleisen J., Ishida T. Isotope chemistry and molecular structure: A simplified theory of end atom isotope effects. – J. Amer. Chem. Soc., 1973, 95, N 9, p. 6155.
23. Bigeleisen J., Ishida T., Spindel W. Correlation of isotope effects with molecular forces. II. Triatomic molecules. – J. Chem. Phys., 1971, 55, N 10, p. 5021–5028.
24. Bigeleisen J., Mayer M.G. Calculation of equilibrium constants for isotope exchange reactions. – J. Chem. Phys., 1947, 15, p. 261–267.
25. Bottinga Y. Calculation of fractionations factors for carbon and oxygen isotope exchange in the system calcite–carbon dioxide–water. – J. Phys. Chem., 1968, 72, N 2, p. 800–809.
26. Bottinga Y. Calculated fractionation factors for carbon and hydrogen isotope exchange in the system calcite–carbon–dioxide–graphite–methane–hydrogen–water vapor. – Geochim. et. cosmochim. acta, 1969, 33, N 1, p. 49.
27. Craig H. The geochemistry of the stable carbon isotopes. – Geochim. et cosmochim. acta, 1953, 3, N 2/3, p. 53–92.
28. Galimov E.M. Biogenic intermolecular and intramolecular carbon isotope effects: Method of "isotopic numbers of bindings". Biochemical and geochemical applications. – In: Intern. Meeting on isotope effects in physical and chemical processes. Cluj (Romania), 1973.
29. Hartshorn S.R., Shiner V.J. Calculation of H/D,  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$  and  $^{12}\text{C}/^{14}\text{C}$  fractionation factors from force fields derived for a series of simple organic molecules. – J. Amer. Chem. Soc., 1972, 94, p. 9002.
30. Ishida T., Spindel W., Bigeleisen J. Theoretical analysis of chemical isotope fractionation by orthogonal Polynomial methods. – Adv. Chem. Amer. Chem. Soc., 1969, 89, p. 1–65.
31. Johansen H. Normalkoordinatenanalyse mehratomiger Moleküle und statistische Thermodynamik isotoper Molekül. I. – Ztschr. Phys. Chem., 1964, 227, H. 5/6, p. 306.
32. Ohmoto H. Systematics of sulfur and carbon isotopes in hydrothermal ore deposits. – Econ. Geol., 1972, 67, p. 551–578.
33. Sakai H. Isotopic properties of sulfur compounds on hydrothermal processes. – Geochim. J., 1968, 2, p. 29–49.
34. Singh G., Wolfsberg M. The calculation of isotopic partition function ratios by a perturbation theory technique. – J. Chem. Phys., 1975, 62, p. 4165–4180.
35. Stern M.J., Wolfsberg M. Simplified procedure for the theoretical calculation of isotope effects involving large molecules. – J. Chem. Phys., 1966, 45, N 11, p. 4105–4124.
36. Vojta G. Näherungsformeln zur quantenstatistischen Berechnung chemischer Isotopenaustauschgleichgewichte und Anwendung auf Moleküle mit  $^{18}\text{O}$ . – Kernenergie, 1960, 3, N 9, S. 327.
37. Vojta G. Grundlagen der statistischen Thermodynamik von Isotopensystem mit chemischen Reaktionen. – Kernenergie, 1960, 3, N 9, S. 917.
38. Vojta G. Zur statistischen Thermodynamik von idealen Gasen mit isotopensubstituierten Molekülen. – Zeitschr. Phys. Chem., 1960, Bd. 217, H. 5/6, S. 337.
39. Urey H.G. The thermodynamic properties of isotopic substances. – J. Chem. Soc., 1947, p. 526–581.
40. Urey H.G., Greiff L.J. Isotopic exchange equilibria. – J. Amer. Chem. Soc., 1935, 57, p. 321.

## Глава IV

# ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СВИДЕТЕЛЬСТВА ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИ УПОРЯДОЧЕННОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ИЗОТОПОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Изложенный в предыдущей главе аппарат можно применить для оценки термодинамических изотопных факторов биологических соединений.

Когда подобные оценки были впервые проведены [3, 13, 14, 4] обнаружилось, что между величинами  $\beta^{13}\text{C}$  и реальным изотопным составом биомолекул в некоторых случаях имеется явное соответствие.

Надо подчеркнуть, что наличие такого соответствия совершенно не вязалось с привычным представлением об условиях, в которых возможно проявление термодинамических изотопных эффектов. Как известно, величины термодинамических изотопных факторов характеризуют разделение изотопов в состоянии равновесия изотопного обмена. Но в сложных органических соединениях, типичных для биологических систем, изотопный обмен (особенно изотопов углерода) протекает чрезвычайно медленно.

Тем не менее факты указывали на то, что во многих случаях, если не в большинстве, существует корреляция между величинами  $\beta^{13}\text{C}$  и  $\delta^{13}\text{C}$ . Ниже мы рассмотрим соответствующие экспериментальные данные, а в следующей главе обсудим природу и возможный механизм этого явления.

## РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОТОПОВ МЕЖДУ ИНДИВИДУАЛЬНЫМИ АМИНОКИСЛОТАМИ

Первоначально были вычислены термодинамические факторы тех соединений, для которых в литературе имелись данные по изотопному составу. Наиболее подробными были результаты, полученные Ф. Абельсоном и Т. Хоерингом при изучении аминокислот. Таблица с этими результатами приводилась в главе II.

Ниже произведена оценка величин  $\beta_{\Sigma}^{13}\text{C}$  и  $\beta_i^{13}\text{C}$  аминокислот (табл. 4.1). Вычислены значения  $\beta$ -факторов тех аминокислот, для которых Ф. Абельсоном и Т. Хоерингом были получены экспериментальные данные по изотопному составу. Таблица использованных чисел связей дана в предшествующей главе.

В отличие от первых наших публикаций [4] при вычислениях использованы не только основные числа связи  $L_{\text{C}-\text{X}}$ , но и числа связи  $l_{\text{C}-\text{X}}$ , учитывающие дальнее окружение. С целью униформности записи величины  $\beta$ -факторов приводятся всегда с точностью до четвертого знака, хотя в отдельных случаях четвертый, а иногда и третий знак могут оказаться не значимыми (по вопросу о точности см. предыдущую главу).

Для каждого из изученных в работе [9] организмов было произведено сопоставление изотопного состава индивидуальных аминокислот с величинами их  $\beta_{\Sigma}$ -факторов. В табл. 4.2 приведены результаты корреляционного анализа полученных зависимостей  $\beta_{\Sigma}^{13}\text{C}-\delta^{13}\text{C}$ . Для трех из

Таблица 4.1

Оценка термодинамических изотопных факторов некоторых аминокислот

Аминокислота	Структурная формула	$\beta_I$ -фактор	Набор чисел связей и числовое значение $\beta_I$ -фактора
1	2	3	4
Глутамино-вая кислота	COOH   H <sub>2</sub> NCH   CH <sub>2</sub>   CH <sub>2</sub>   COOH	$\beta_1$ $\beta_2$ $\beta_3$ $\beta_4$ $\beta_5$ $\beta_{\Sigma}$	$1 + L_{C-C} + L_{C-O} + L_{C=O} + l_{C-C} + l_{C-N} = 1,2001$ $1 + L_{C-H} + 2L_{C-C} + L_{C-N} + l_{C-O} + l_{C=O} + l_{C-C} = 1,1772$ $1 + 2L_{C-H} + 2L_{C-C} + 2L_{C-C} + l_{C-N} = 1,1538$ $1 + 2L_{C-H} + 2L_{C-C} + l_{C-C} + l_{C-O} + l_{C=O} = 1,1553$ $1 + L_{C-C} + L_{C-O} + L_{C=O} + l_{C-C} = 1,1985$ $1,1769$
Аспарагиновая кислота	COOH   H <sub>2</sub> NCH   CH <sub>2</sub>   COOH	$\beta_1$ $\beta_2$ $\beta_3$ $\beta_4$ $\beta_{\Sigma}$	$1 + L_{C-C} + L_{C-O} + L_{C=O} + l_{C-C} + l_{C-N} = 1,2001$ $1 + L_{C-H} + 2L_{C-C} + L_{C-N} + l_{C-O} + l_{C=O} + l_{C-C} = 1,1772$ $1 + 2L_{C-H} + 2L_{C-C} + l_{C-C} + l_{C-O} + l_{C=O} + l_{C-N} = 1,1569$ $1 + L_{C-C} + L_{C-O} + L_{C=O} + l_{C-C} = 1,1985$ $1,1832$
Аргинин	COOH   H <sub>2</sub> NCH   CH <sub>2</sub>   CH <sub>2</sub>   CH <sub>2</sub>   HN   HN   NH <sub>2</sub>	$\beta_1$ $\beta_2$ $\beta_3$ $\beta_4$ $\beta_5$ $\beta_6$ $\beta_{\Sigma}$	$1 + L_{C-C} + L_{C-O} + L_{C=O} + l_{C-C} + l_{C-N} = 1,2001$ $1 + L_{C-H} + 2L_{C-C} + L_{C-N} + l_{C-O} + l_{C=O} + l_{C-C} = 1,1772$ $1 + 2L_{C-H} + 2L_{C-C} + l_{C-N} + 2l_{C-C} = 1,1541$ $1 + 2L_{C-H} + 2l_{C-C} + l_{C-N} + 2l_{C-C} = 1,1525$ $1 + 2L_{C-H} + L_{C-C} + L_{C-N} + l_{C-C} = 1,1545$ $1 + 2L_{C-N} + L_{C=C} + l_{C-C} = 1,1803$ $1,1698$
Лизин	COOH   H <sub>2</sub> N   CH <sub>2</sub>   CH <sub>2</sub>   CH <sub>2</sub>   NH <sub>3</sub> —CH <sub>2</sub>	$\beta_1$ $\beta_2$ $\beta_3$ $\beta_4$ $\beta_5$ $\beta_6$ $\beta_{\Sigma}$	$1 + L_{C-C} + L_{C-O} + L_{C=O} + l_{C-C} + l_{C-N} = 1,2001$ $1 + L_{C-H} + 2L_{C-C} + L_{C-N} + l_{C-O} + l_{C=O} + l_{C-C} = 1,1772$ $1 + 2L_{C-H} + 2L_{C-C} + 2l_{C-C} + l_{C-N} = 1,1538$ $1 + 2L_{C-H} + 2L_{C-C} + 2l_{C-C} = 1,1522$ $1 + 2L_{C-H} + 2L_{C-C} + l_{C-C} + l_{C-N} = 1,1525$ $1 + 2L_{C-H} + L_{C-C} + L_{C-N} + l_{C-C} = 1,1545$ $1,1651$

Таблица 4.1 (продолжение)

1	2	3	4
Аланин	 COOH $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\beta_1$ $1 + L_{\text{C}-\text{C}} + L_{\text{C}-\text{O}} + L_{\text{C}=\text{O}} + l_{\text{C}-\text{C}} + l_{\text{C}-\text{N}}^* = 1,2001$ $\beta_2$ $1 + L_{\text{C}-\text{H}} + 2L_{\text{C}-\text{C}} + L_{\text{C}-\text{N}} + l_{\text{C}=\text{O}} + l_{\text{C}-\text{O}} = 1,1759$ $\beta_3$ $1 + 3L_{\text{C}-\text{H}} + L_{\text{C}-\text{C}} + l_{\text{C}-\text{C}} + l_{\text{C}-\text{N}} = 1,1345$ $\beta_{\Sigma}$ $1,1702$	
Лейцин	 COOH $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH} \\   \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$	$\beta_1$ $1 + L_{\text{C}-\text{C}} + L_{\text{C}-\text{O}} + L_{\text{C}=\text{O}} + l_{\text{C}-\text{C}} + l_{\text{C}-\text{N}} = 1,2001$ $\beta_2$ $1 + L_{\text{C}-\text{H}} + 2L_{\text{C}-\text{C}} + L_{\text{C}-\text{N}} + l_{\text{C}=\text{O}} + l_{\text{C}-\text{O}} + l_{\text{C}-\text{C}} = 1,1772$ $\beta_3$ $1 + 2L_{\text{C}-\text{H}} + 2L_{\text{C}-\text{C}} + 3l_{\text{C}-\text{C}} + l_{\text{C}-\text{N}} = 1,1538$ $\beta_4$ $1 + L_{\text{C}-\text{H}} + 3L_{\text{C}-\text{C}} + l_{\text{C}-\text{C}} = 1,1689$ $\beta_5, \beta_6$ $1 + 3L_{\text{C}-\text{H}} + L_{\text{C}-\text{C}} + 2l_{\text{C}-\text{C}} = 1,1342$ $\beta_{\Sigma}$ $1,1614$	
Изолейцин	 COOH $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH} \\   \\ \text{CH} \\   \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\beta_1$ $1 + L_{\text{C}-\text{C}} + L_{\text{C}-\text{O}} + L_{\text{C}=\text{O}} + l_{\text{C}-\text{C}} + l_{\text{C}-\text{N}} = 1,2001$ $\beta_2$ $1 + L_{\text{C}-\text{H}} + 2L_{\text{C}-\text{C}} + L_{\text{C}-\text{N}} + l_{\text{C}-\text{O}} + 2l_{\text{C}-\text{C}} = 1,1785$ $\beta_3$ $1 + L_{\text{C}-\text{H}} + 3L_{\text{C}-\text{C}} + 2l_{\text{C}-\text{C}} + l_{\text{C}-\text{N}} + l_{\text{C}=\text{O}} = 1,1718$ $\beta_4$ $1 + 3L_{\text{C}-\text{H}} + L_{\text{C}-\text{C}} + 2l_{\text{C}-\text{C}} = 1,1342$ $\beta_5$ $1 + 2L_{\text{C}-\text{H}} + 2L_{\text{C}-\text{C}} + 2l_{\text{C}-\text{C}} = 1,1509$ $\beta_6$ $1 + 3L_{\text{C}-\text{H}} + L_{\text{C}-\text{C}} + l_{\text{C}-\text{C}} = 1,1329$ $\beta_{\Sigma}$ $1,1614$	
Фенилаланин	 COOH $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{C} \\    \\ \text{CH} \quad \text{CH} \\    \\ \text{CH} \quad \text{CH} \\    \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	$\beta_1$ $1 + L_{\text{C}-\text{C}} + L_{\text{C}=\text{O}} + L_{\text{C}-\text{O}} + l_{\text{C}-\text{N}} + l_{\text{C}-\text{C}} = 1,2001$ $\beta_2$ $1 + L_{\text{C}-\text{H}} + 2L_{\text{C}-\text{C}} + L_{\text{C}-\text{N}} + l_{\text{C}=\text{O}} + l_{\text{C}-\text{O}} + l_{\text{C}-\text{C}} = 1,1772$ $\beta_3$ $1 + 2L_{\text{C}-\text{H}} + 2L_{\text{C}-\text{C}} + 2l_{\text{C}-\text{C}} + l_{\text{C}-\text{N}} + l_{\text{C}=\text{C}} = 1,1554$ $\beta_4$ $1 + 2L_{\text{C}-\text{C}} + L_{\text{C}=\text{C}} + 2l_{\text{C}-\text{C}} + l_{\text{C}=\text{C}} + l_{\text{O}} = 1,1725$ $\beta_5, \beta_6$ $1 + L_{\text{C}-\text{H}} + L_{\text{C}-\text{C}} + L_{\text{C}=\text{C}} + 2l_{\text{C}-\text{C}} + l_{\text{C}=\text{C}} + l_{\text{O}} = 1,1545$ $\beta_7, \beta_8$ $1 + L_{\text{C}-\text{H}} + L_{\text{C}-\text{C}} + l_{\text{C}=\text{C}} + l_{\text{C}-\text{C}} + l_{\text{C}=\text{C}} + l_{\text{O}} = 1,1532$ $\beta_9$ $1 + L_{\text{C}-\text{H}} + L_{\text{C}-\text{C}} + L_{\text{C}=\text{C}} + l_{\text{C}-\text{C}} + l_{\text{C}=\text{C}} + l_{\text{O}} = 1,1532$ $\beta_{\Sigma}$ $1,1637$	

Таблица 4.1 (окончание)

1	2	3	4
Глицин	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\   \\ \text{H}_2\text{NCH}_2 \end{array}$	$\beta_1$ $\beta_2$ $\beta_{\Sigma}$	$1 + L_{\text{C}-\text{C}} + L_{\text{C}=\text{O}} + L_{\text{C}-\text{O}} + l_{\text{C}-\text{N}} = 1,1988$ $1 + 2L_{\text{C}-\text{H}} + L_{\text{C}-\text{C}} + L_{\text{C}-\text{N}} + l_{\text{C}=\text{O}} + l_{\text{C}-\text{O}} =$ $= 1,1579$ $1,1783$
Серин	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\   \\ \text{H}_2\text{NCH} \\   \\ \text{HOCH}_2 \end{array}$	$\beta_1$ $\beta_2$ $\beta_3$ $\beta_{\Sigma}$	$1 + L_{\text{C}-\text{C}} + L_{\text{C}=\text{O}} + L_{\text{C}-\text{O}} + l_{\text{C}-\text{N}} + l_{\text{C}-\text{C}} =$ $= 1,2001$ $1 + L_{\text{C}-\text{H}} + 2L_{\text{C}-\text{C}} + L_{\text{C}-\text{N}} + l_{\text{C}=\text{O}} +$ $+ 2l_{\text{C}-\text{O}} = 1,1778$ $1 + 2L_{\text{C}-\text{H}} + L_{\text{C}-\text{C}} + L_{\text{C}-\text{O}} + l_{\text{C}-\text{C}} +$ $+ l_{\text{C}-\text{N}} = 1,1611$ $1,1797$
Тreonин	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\   \\ \text{H}_2\text{NCH} \\   \\ \text{HOCH} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\beta_1$ $\beta_2$ $\beta_3$ $\beta_4$ $\beta_{\Sigma}$	$1 + L_{\text{C}-\text{C}} + L_{\text{C}=\text{O}} + L_{\text{C}-\text{O}} + l_{\text{C}-\text{N}} + l_{\text{C}-\text{C}} =$ $= 1,2001$ $1 + L_{\text{C}-\text{H}} + 2L_{\text{C}-\text{C}} + L_{\text{C}-\text{N}} + l_{\text{C}=\text{O}} +$ $+ 2l_{\text{C}-\text{O}} + l_{\text{C}-\text{C}} = 1,1791$ $1 + L_{\text{C}-\text{H}} + 2L_{\text{C}-\text{C}} + L_{\text{C}-\text{O}} + l_{\text{C}-\text{N}} +$ $+ l_{\text{C}-\text{C}} = 1,1791$ $1 + 3L_{\text{C}-\text{H}} + L_{\text{C}-\text{C}} + l_{\text{C}-\text{O}} + l_{\text{C}-\text{C}} = 1,1363$ $1,1736$
Тирозин	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\   \\ \text{H}_2\text{NCH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{C} \\    \\ \text{CH} \quad \text{CH} \\    \\ \text{C} \quad \text{C} \\    \\ \text{CH} \quad \text{OH} \end{array}$	$\beta_1$ $\beta_2$ $\beta_3$ $\beta_4$ $\beta_5, \beta_6$ $\beta_7, \beta_8$ $\beta_9$ $\beta_{\Sigma}$	$1 + L_{\text{C}-\text{C}} + L_{\text{C}=\text{O}} + L_{\text{C}-\text{O}} + l_{\text{C}-\text{N}} + l_{\text{C}-\text{C}} =$ $= 1,2001$ $1 + L_{\text{C}-\text{H}} + 2L_{\text{C}-\text{C}} + L_{\text{C}-\text{N}} + l_{\text{C}=\text{O}} + l_{\text{C}-\text{O}} =$ $= l_{\text{C}-\text{C}} = 1,1772$ $1 + 2L_{\text{C}-\text{H}} + 2L_{\text{C}-\text{C}} + 2l_{\text{C}-\text{C}} + l_{\text{C}-\text{N}} + l_{\text{C}=\text{C}} =$ $= 1,1554$ $1 + 2L_{\text{C}-\text{C}} + L_{\text{C}=\text{C}} + 2l_{\text{C}-\text{C}} + l_{\text{C}=\text{C}} + l_{\text{O}} =$ $= 1,1725$ $1 + L_{\text{C}-\text{H}} + L_{\text{C}-\text{C}} + L_{\text{C}=\text{C}} + 2l_{\text{C}-\text{C}} + l_{\text{C}=\text{C}} +$ $+ l_{\text{O}} = 1,1545$ $1 + L_{\text{C}-\text{H}} + L_{\text{C}-\text{C}} + L_{\text{C}=\text{C}} + l_{\text{C}-\text{C}} + l_{\text{C}=\text{C}} +$ $+ l_{\text{C}-\text{O}} + l_{\text{O}} = 1,1551$ $1 + L_{\text{C}-\text{C}} + L_{\text{C}-\text{O}} + L_{\text{C}=\text{C}} + l_{\text{C}-\text{C}} + l_{\text{C}=\text{C}} +$ $+ l_{\text{O}} = 1,1798$ $1,1671$

шести организмов наблюдается значимая корреляция (величина коэффициента корреляции  $\eta$  выше критического значения). В трех других случаях, в которых число исследованных аминокислот было мало, корреляция не значима.

На рис. 4.1–4.3 связь между величинами  $\delta^{13}\text{C}-\beta_{\Sigma}^{13}\text{C}$  для аминокислот трех организмов изображена графически. При 10–11 аминокислотах,

Таблица 4.2

Параметры, характеризующие корреляцию величин  $\beta_{\Sigma}^{13}\text{C}$  и  $\delta^{13}\text{C}$  для аминокислот ряда организмов

Организм	Число изученных аминокислот	Коэффициент корреляции $\eta$	Критическое значение коэффициента корреляции	$\bar{k}$
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	10	0,76	0,54	0,58
<i>Euglena gracilis</i>	11	0,82	0,54	0,60
<i>Anacystis nidulans</i>	6	0,59	0,69	—
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	6	0,43	0,69	—
<i>Gracilaria</i> sp.	11	0,74	0,54	0,40
<i>Chromatium</i> sp.	4	0,45	0,81	—

составляющих исследованную совокупность для каждого организма, коэффициент корреляции имеет значения в пределах 0,74–0,82, что с доверительной вероятностью более чем 0,99 указывает на неслучайный характер зависимости.

Анализируя экспериментальные данные, Ф. Абельсон и Т. Хоеринг [9] отмечали, что аспарагиновая кислота, серин и глицин обычно во всех организмах относительно обеднены изотопом  $^{12}\text{C}$ , в то время как лейцин, изолейцин и ароматические аминокислоты относятся к числу наиболее изотопически легких. Как мы видим, это согласуется с высокими значениями величин  $\beta_{\Sigma}^{13}\text{C}$  для первых и относительно низкими значениями — для последних.

Корреляции, очевидно, являются линейными в силу физического смысла величин  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\beta^{13}\text{C}$ . В равновесной системе они связаны соотношением

$$\delta^{13}\text{C}_1 - \delta^{13}\text{C}_2 = \left( \frac{\beta_1}{\beta_2} - 1 \right) \cdot 10^3, \text{ } \% \quad (4.1)$$

или

$$\delta^{13}\text{C}_1 - \delta^{13}\text{C}_2 \approx (\beta_1 - \beta_2) \cdot 10^3, \text{ } \% \quad (4.2)$$

Из графиков видно, что линии регрессий характеризуются уравнениями вида

$$\delta^{13}\text{C} = \delta^{13}\text{C}_{cp} + \kappa(\beta - \beta_{cp}) \cdot 10^3, \quad (4.3)$$

где  $\kappa < 1$ . Коэффициент  $\kappa$  показывает, в какой мере наблюдаемые изотопные сдвиги меньше их полной равновесной величины, определяемой непосредственно соотношением  $\beta$ -факторов. Подобное снижение изотопных эффектов является, как мы увидим, характерной чертой распределения изотопов в биологических системах.

Если распределение изотопов отвечает величинам  $\beta$ -факторов, то это свидетельствует о существовании термодинамических изотопных эффектов в системе, т.е. осуществлении в той или иной форме равновесного распределения изотопов. Однако употребление понятия изотопного равно-

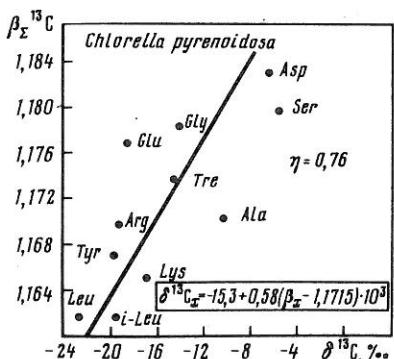


Рис. 4.1.

Рис. 4.1. Сопоставление величин  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\beta_{\Sigma}^{13}\text{C}$  аминокислот организма *Chlorella pyrenoidosa*

На графике указано значение коэффициента корреляции  $\eta$  и приведено уравнение регрессии

Рис. 4.2. Сопоставление величин  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\beta_{\Sigma}^{13}\text{C}$  аминокислот организма *Gracilaria* sp.

Рис. 4.3. Сопоставление величин  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\beta_{\Sigma}^{13}\text{C}$  аминокислот организма *Euglena gracilis*

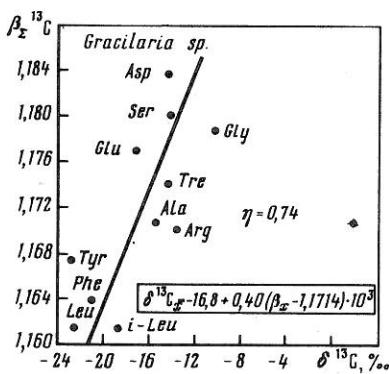


Рис. 4.2.

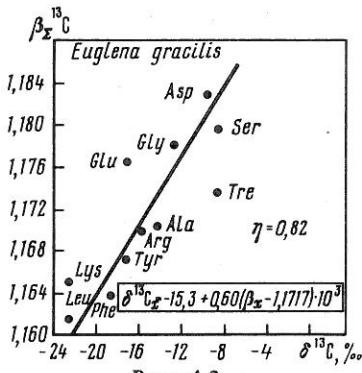


Рис. 4.3.

весия может вызвать ложное представление о якобы необходимом в этом случае химически равновесном состоянии биологических систем, чего на самом деле не требуется. Поэтому мы предпочитаем говорить не о равновесном, а о термодинамически упорядоченном распределении изотопов в биологических системах.

### ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОТОПОВ В АМИНОКИСЛОТАХ

В своей работе [9], посвященной изотопному анализу аминокислот, Ф. Абельсон и Т. Хоеринг, помимо измерения изотопного состава углерода аминокислот в целом, производили отщепление и измерение изотопного состава карбоксильной группы. По существу ими были получены первые данные о внутримолекулярном распределении изотопов в биологических соединениях. Углерод карбоксильной группы в подавляющем большинстве исследованных аминокислот оказался заметно обеднен изотопом  $^{12}\text{C}$  по сравнению с углеродом аминокислоты в целом (см. табл. 2.5). В среднем соотношение изотопов в карбоксильном углероде оказалось близким к таковому для углерода питающей углекислоты.

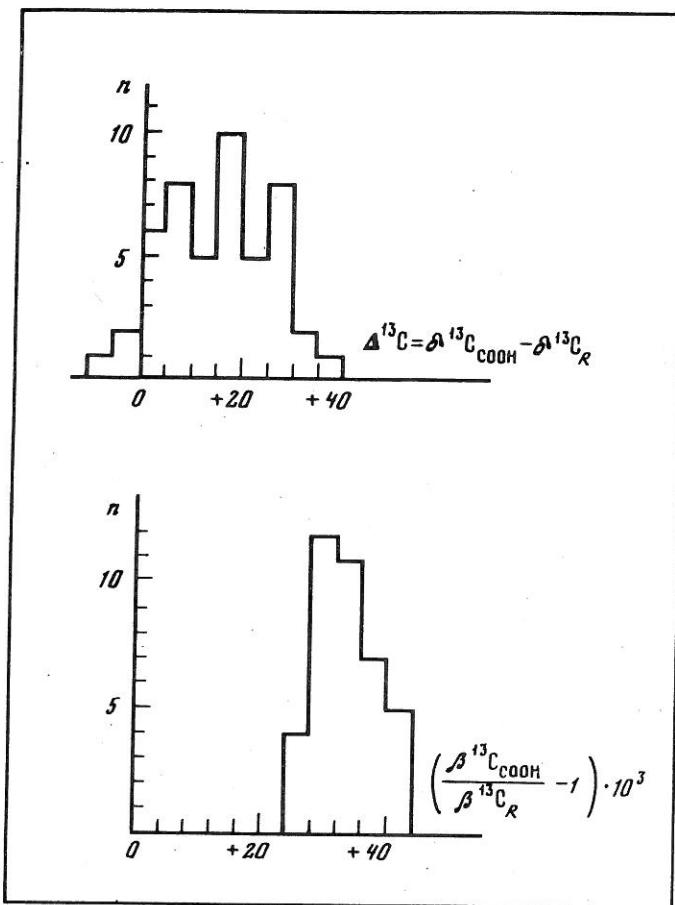


Рис. 4.4. Распределение экспериментально наблюдаемых и рассчитанных равновесных величин внутримолекулярных изотопных сдвигов в биогенных аминокислотах. Данные по изотопному составу приведены в табл. 2.5, величины  $\beta$ -факторов — в табл. 4.1

Если обратиться к термодинамическому изотопному анализу, то можно легко обнаружить, что изотопные формы аминокислот, замещенные по углероду карбоксильной группы, обладают весьма высокими значениями  $\beta$ -факторов (см. табл. 4.1), близкими, между прочим, к величине термодинамического изотопного фактора  $\text{CO}_2$ .

На рис. 4.4 приведены в виде гистограммы величины отношений  $\beta$ -факторов карбоксильного углерода и декарбоксилированного остатка аминокислот, изученных в работе [9]. На том же рисунке и в том же масштабе приведены наблюдаемые значения изотопных сдвигов  $\Delta^{13}\text{C}$ . Оба распределения находятся в области положительных значений соответствующих изотопных сдвигов. Распределение наблюдаемых величин, как и следует ожидать, характеризуется большей дисперсией. Кроме того, как и в слу-

Таблица 4.3

Сопоставление распределения изотопов углерода в аминокислотах, выделенных из *Chlorella pyrenoidosa* при нормальном (1) и ограниченном (2) снабжении  $\text{CO}_2$

	$\delta^{13}\text{C}$ , ‰			$\delta^{13}\text{C}$ , ‰	
	(1)	(2)		(1)	(2)
Исходная $\text{CO}_2$	0,0	0,0	Глицин		
Общий органический углерод	-25,8	-11,3	в целом	-14,3	-2,1
Глутаминовая кислота			карбоксил	-5,3	-5,0
в целом	-18,7	-9,9	остаток	-23,3	+0,8
карбоксил	-8,8	+9,6	Аланин		
остаток	-21,1	-14,8	в целом	-10,3	-5,9
Аспарагиновая кислота			карбоксил	-7,3	+11,9
в целом	-6,6	-3,5	остаток	-11,8	-14,8
карбоксил	-2,2	+8,7			
остаток	-15,6	-15,7			

чае межмолекулярных изотопных эффектов, наблюдаемые изотопные сдвиги меньше равновесных значений. Величина коэффициента  $k$ , характеризующего это изменение, составляет в среднем 0,34.

Сами Ф. Абелсон и Т. Хоеринг [9] не рассматривали обогащенность изотопом  $^{13}\text{C}$  карбоксильного углерода аминокислот как следствие какого-либо фракционирования изотопов. Они полагали, что в отличие от основного пути ассимиляции  $\text{CO}_2$ , проходящего через стадию рибулозидифосфата и связанного с фракционированием изотопов, существует побочный путь вхождения  $\text{CO}_2$  (через цикл Кребса), при котором  $\text{CO}_2$  может без заметного изменения изотопного состава включаться сначала в карбоксильные группы аспарагиновой и глутаминовой кислот, а затем и других аминокислот.

Иначе говоря, согласно Ф. Абелсону и Т. Хоерингу, высокое содержание изотопа  $^{13}\text{C}$  в карбоксильном углероде объясняется не тем, что он обогащен им по сравнению с остальным биологическим углеродом, а тем, что он не обеднен им по сравнению с источником, в то время как остальной биологический углерод обеднен изотопом  $^{13}\text{C}$  вследствие изотопного фракционирования на стадии рибулозидифосфата.

Это соображение если и справедливо, то лишь отчасти. Оно находится в известном противоречии с результатами, полученными в той же работе [9].

Исследуя, как влияет концентрация  $\text{CO}_2$  во внешней среде на изотопный состав фотосинтезирующих организмов, Ф. Абелсон и Т. Хоеринг установили, что при ограниченном снабжении  $\text{CO}_2$  клетки *Chlorella pyrenoidosa* фракционируют изотопы существенно слабее. Если при благоприятных условиях (5% концентрации  $\text{CO}_2$  в растворе) изотопный состав клеток характеризовался величиной  $-25,8\text{‰}$ , то при ограничении доступа  $\text{CO}_2$  величина  $\delta^{13}\text{C}$  оказалась равной  $-11,3\text{‰}$ .

В табл. 4.3 мы сопоставили результаты этих двух экспериментов. Характерно, что изотопный состав не только общего углерода, но и карбоксильного углерода аминокислот сместился в сторону более положительных значений. Если следовать Ф. Абелсону и Т. Хорингу, этого не должно было произойти, поскольку изотопный состав питающей углекислоты не изменился. Влияние пониженной концентрации  $\text{CO}_2$  должно было сказаться только на углероде, входящем в организм через стадию фотосинтетической ассимиляции  $\text{CO}_2$ . Мы видим вместе с тем, что оно сказалось на изотопном составе карбоксильного углерода аминокислот. Следовательно, обогащенность изотопом  $^{13}\text{C}$  углерода карбоксильных групп нельзя рассматривать просто как результат инкорпорации в них экзогенной  $\text{CO}_2$ . Это явление обусловлено фракционированием изотопов в биологических системах. Необычный характер этого фракционирования мог показаться труднообъяснимым. Однако, как мы видим, он находится в согласии с тенденцией, отвечающей термодинамически упорядоченному распределению изотопов.

### РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОТОПОВ УГЛЕРОДА В КОМПОНЕНТАХ ЛИПИДНОЙ ФРАКЦИИ

К 1972 г., когда появилась возможность теоретической оценки  $\beta$ -факторов биомолекул при помощи аддитивного метода, экспериментальных данных по изотопному составу биомолекул было накоплено немного. Помимо рассмотренных выше данных для аминокислот, до недавнего времени по существу не было систематических исследований изотопного состава биологических соединений. Поэтому дальнейшее изучение обнаруженной закономерности потребовало прежде всего получения новых экспериментальных данных о распределении изотопов в биомолекулах. Следовало изучить распределение изотопов углерода в индивидуальных соединениях и узких, химически идентифицируемых фракциях, в частности принадлежащих к одному классу биохимических соединений, 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.

Подходящим объектом для этой цели могли служить индивидуальные соединения и компоненты липидной фракции организмов. Чтобы добиться необходимой общности выводов, важно было исследовать организмы в широком таксономическом и экологическом диапазоне: например, морские и пресноводные организмы, автотрофы и гетеротрофы, примитивные и более высокоорганизованные формы, водоросли и наземные растения.

В работе [7] мы попытались совместить эти требования, отобрав для изучения следующие четыре объекта: морские растения (ламинарию), морские раки (криль), речные синезеленые водоросли и луговой люпин.

Образцы морской водоросли (*Laminaria saccharina*) были собраны на Белом море в шельфовой зоне со среднегодовой температурой воды +5°С. Криль – макрозоопланктон, представленный раками вида *Euphausia superba*, выловлен в летний период в антарктических водах моря Скоттия. Растения люпина (люпин желтый быстрорастущий – 4, *Lupinus Luteus*) собраны в Подмосковье. Синезеленые водоросли, представленные на 96–98% родом *Anabaena variabilis*, были выловлены на р. Десне при температуре воды +28°С.

Липиды экстрагировали из объектов смесью хлороформ–метанол (2:1). Препартивное разделение липидов на фракции проводили методом тонкослойной хроматографии на силикагеле.

Идентификация фракций проводилась как по индивидуальным свидетелям, так и при помощи масс-спектрометрии. Подробности экспериментальной методики изложены в работе [7].

В табл. 4.4–4.7 приведены результаты изотопного анализа углерода компонентов, входящих в состав липидных фракций исследованных организмов. Там же приведены вычисленные значения  $\beta_{\Sigma}$ -факторов. В некоторых случаях хроматографические фракции содержали ряд соединений. Величина термодинамического изотопного фактора в этом случае определялась либо с учетом состава фракции, либо по преобладающему компоненту [7]. Следует отметить, что ввиду близости структурных формул соединений, входящих в состав одной хроматографической фракции, некоторая неопределенность в идентификации их, практически не отражалась на величине вычисляемого значения  $\beta_{\Sigma}$ -фактора. Заметим, что величины  $\beta_{\Sigma}^{13}\text{C}$  в табл. 4.4–4.7 несколько отличаются от приводимых в статье [7], поскольку здесь они вычислены с использованием правок  $I_x$  за дальнее окружение.

Предпринятое исследование позволило установить следующее.

Между расчетными величинами  $\beta_{\Sigma}$ -факторов и измеренными значениями  $\delta^{13}\text{C}$  имеется связь, характеризующаяся во всех исследованных случаях высокими коэффициентами корреляции. В табл. 4.8 приведены результаты корреляционного анализа.

Корреляционные зависимости, изображенные на рис. 4.5–4.8, являются значимыми с доверительным уровнем, превышающим 0,99.

Величины наблюдаемых изотопных эффектов редуцированы относительно расчетной величины термодинамических изотопных эффектов. Коэффициент  $k$  изменяется в пределах 0,31–0,55.

Термодинамически упорядоченное распределение изотопов характерно для организмов в широком таксономическом и экологическом диапазоне. По крайней мере 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  $\beta_{\Sigma}$ -факторов и величинами  $\delta^{13}\text{C}$  принципиально одинаков (см. рис. 4.5–4.8).

Изотопные составы компонентов липидной фракции разных исследованных организмов характеризуются несколько различными интервалами

Таблица 4.4

Результаты анализа липидной фракции синезеленых водорослей

Порядок расположения на хроматограмме	Компонент	Содержание, %	$\delta^{13}\text{C}$ , ‰	$\beta_{\Sigma}^{13}\text{C}$
Общие липиды				
12	Полярные липиды	23,6	-31,6	-
11	Моноглицериды	6,8	-30,0	1,1562
10	Каротиноид (миксосантофилл)	4,8	-29,4	1,1607
9	Диглицериды	8,1	-30,1	1,1552
8	Хлорофилл	27,7	-28,4	1,1611
7	Неидентифицировано	-	-30,0	-
6	Стерины ( $\beta$ -ситостерин)	2,7	-29,5	1,1590
5	Каротиноид (эхиненон)	-	-29,5	1,1575
4	Жирные кислоты	4,9	-31,9	1,1540
3	Каротиноид ( $\beta$ -каротин)	2,2	-31,5	1,1567
2	Триглицериды	17,7	-30,5	1,1548
1	Воска, углеводороды, эфиры стеринов	1,5	-32,3	1,1527
Полярные липиды				
5	Кефалин	-	-30,3	1,1553
4	Лецитин	-	-30,6	1,1538
3	Фосфатидилинозит	-	-29,1	1,1592
2	Сфингомиелин	-	-30,8	1,1530
1	Фосфатидсерин	-	-31,9	1,1571

Таблица 4.5

Результаты анализа липидной фракции криля

Порядок расположения на хроматограмме	Компонент	Содержание, %	$\delta^{13}\text{C}$ , ‰	$\beta_{\Sigma}^{13}\text{C}$
Общие липиды				
9	Полярные липиды	2,6	-27,3	-
8	Моноглицериды	1,4	-27,0	1,1562
7	Каротиноид (астацин)	1,8	-25,7	1,1608
6	Диглицериды	1,7	-27,1	1,1552
5	Стерины (холестерин)	8,0	-27,0	1,1590
4	Пигмент (эхиненон)	1,9	-26,9	1,1575
3	Жирные кислоты	64,5	-28,1	1,1540
2	Триглицериды	12,6	-27,3	1,1548
1	Воска, углеводороды, эфиры стеринов	5,5	-29,8	1,1527
Полярные липиды				
3	Кардиолипин	-	-27,8	1,1561
2	Лецитин	-	-28,4	1,1538
1	Сфингомиелин	-	-28,6	1,1530

Таблица 4.6

## Результаты анализа липидной фракции люпина

Порядок расположения на хроматограмме	Компонент	Содержание, %	$\delta^{13}\text{C}$ , ‰	$\beta_{\Sigma}^{13}\text{C}$
Общие липиды				
12	Полярные липиды	36,1	-32,0	-
11	Моноглицериды	3,0	-31,4	1,1562
10	Пигмент (лютеин)	6,6	-31,1	1,1591
9	Диглицериды	3,6	-32,1	1,1552
8	Хлорофилл + ксантофилл	24,3	-29,7	-
7	Хлорофилл	10,2	-29,0	1,1611
6	Неидентифицировано	0,7	-29,2	-
5	"	0,9	-31,4	-
4	Стерины ( $\beta$ -ситостерин)	7,1	-29,6	1,1590
3	Жирные кислоты	1,2	-32,7	1,1540
2	Триглицериды	0,3	-32,3	1,1548
1	Воска, углеводороды, эфиры стеринов	6,0	-33,5	1,1527
Полярные липиды				
7	Моногалактозилглицерид	-	-32,0	1,1588
6	Кефалин	-	-32,7	1,1553
5	Лецитин	-	-32,8	1,1538
3	Фосфатидсерин	-	-33,1	1,1571

Таблица 4.7

## Результаты анализа липидной фракции ламинарии

Порядок расположения на хроматограмме	Компонент	Содержание, %	$\delta^{13}\text{C}$ , ‰	$\beta_{\Sigma}^{13}\text{C}$
Общие липиды				
8	Полярные липиды	45,6	-22,6	-
7	Моноглицериды	6,6	-25,0	1,1562
6	Каротиноид (фукоксантин)	14,9	-23,7	1,1589
5	Хлорофилл	20,8	-21,6	1,1611
4	Стерины (фукостерин)	3,8	-24,5	1,1590
3	Жирные кислоты	3,8	-25,6	1,1540
2	Триглицериды	1,1	-24,8	1,1548
1	Воска, углеводороды, эфиры стеринов	3,4	-27,8	1,1527

Таблица 4.8

Параметры, характеризующие корреляцию величин  $\beta_{\Sigma}^{-13}\text{C}$  и  $\delta^{13}\text{C}$  компонентов липидной фракции ряда организмов

Организм	Число изученных компонентов фракции	Коэффициент корреляции	Критическое значение коэффициента корреляции	$K$	Уравнение регрессии
<i>Laminaria saccharina</i>	7	0,90	0,65	0,55	$\delta^{13}\text{C} = -24,7 + 0,55(\beta - 1,1567) \cdot 10^3$
<i>Lupinus Luteus</i>	12	0,82	0,52	0,44	$\delta^{13}\text{C} = -31,9 + 0,44(\beta - 1,1564) \cdot 10^3$
<i>Euphausia superba</i>	11	0,87	0,54	0,37	$\delta^{13}\text{C} = -27,6 \div 0,37(\beta - 1,1557) \cdot 10^3$
<i>Anabaena variabilis</i>	15	0,73	0,47	0,31	$\delta^{13}\text{C} = -30,4 + 0,31(\beta - 1,1564) \cdot 10^3$

значений  $\delta^{13}\text{C}$ . Это естественное следствие различного изотопного состава исходного углерода в среде обитания изученных организмов. Как упоминалось, пресноводные организмы, а также наземные организмы обогащены изотопом  $^{12}\text{C}$  относительно морских организмов.

Следует заметить, что обсуждаемые данные относятся к очень узкому диапазону значений  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\beta_{\Sigma}$ -факторов, в пределах которого одна только ошибка масс-спектрометрических измерений, составляющая  $\pm (0,2-0,3)\%$ , способна обусловить заметную долю наблюдаемого на графиках (см. рис. 4.5-4.8) разброса данных относительно линий регрессий. К этому следует добавить также погрешности, обусловленные не вполне четким выделением и недостаточно точной идентификацией компонента. Тем не менее связь между величинами  $\beta_{\Sigma}$  и  $\delta^{13}\text{C}$  характеризуется весьма высокими значениями коэффициентов корреляции. Это между прочим лишний раз подтверждает надежность аддитивного метода оценки величин  $\beta_{\Sigma}$ -факторов. Понятно, погрешность оценки  $\beta_{\Sigma}$  не может превышать величину дисперсии, характеризующей зависимость  $\delta^{13}\text{C}-\beta_{\Sigma}^{-13}\text{C}$ . В исследованных случаях величина дисперсии, включающей все виды неопределенностей, находится в пределах  $\pm 0,0008$  по шкале  $\beta_{\Sigma}^{-13}\text{C}$ . Теоретическая оценка погрешности также определяет ее в четвертом знаке величины  $\beta$ . Поскольку компоненты липидной фракции содержат 20–30 углеродных атомов, погрешность определения величин  $\beta_{\Sigma}$  должна быть приблизительно в  $\sqrt{n} \simeq 5$  раз меньше, чем погрешность оценки  $\beta_i$ -фактора. Последняя, согласно анализу, проведенному в предыдущей главе, составляет  $\pm 0,003 \div 0,005$ . Следовательно, погрешность вычисления  $\beta_{\Sigma}$ -факторов липидных компонентов должна составлять единицы в четвертом знаке величины, что согласуется с экспериментом. Практически погрешность оценки термодинамических изотопных факторов, очевидно, в данном

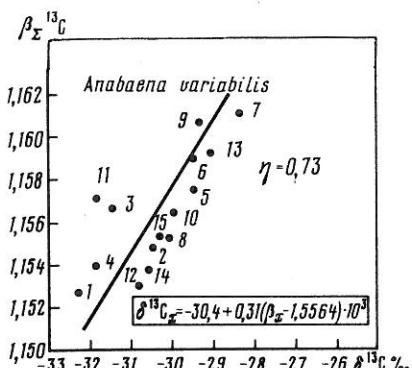


Рис. 4.5. Корреляция  $\beta_{\Sigma}^{13}\text{C}$ – $\delta^{13}\text{C}$  компонентов липидной фракции синезеленой водоросли *Anabaena variabilis*

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

Рис. 4.6. Корреляция  $\beta_{\Sigma}^{13}\text{C}$ – $\delta^{13}\text{C}$  компонентов липидной фракции крыла *Euphausia superba*

1 – воска, углеводороды, эфиры стеринов; 2 – триглицериды; 3 – каротиноид (астаксандин); 4 – жирные кислоты; 6 – стерины (холестерин); 8 – диглицериды; 10 – моноглицериды; 12 – сфингомиелин; 14 – лецитин; 16 – кардиолипин; 17 – пигмент (эхиненон)

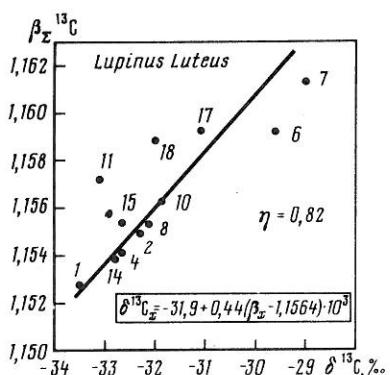
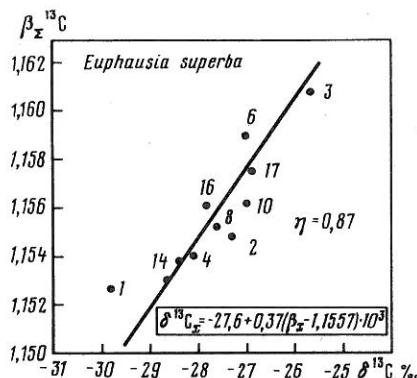


Рис. 4.7. Корреляция  $\beta_{\Sigma}^{13}\text{C}$ – $\delta^{13}\text{C}$  липидной фракции люпина *Lupinus Luteus*

1 – воска, углеводороды, эфиры стеринов; 2 – триглицериды; 4 – жирные кислоты; 6 – стерины ( $\beta$ -ситостерин); 7 – хлорофилл; 8 – диглицериды; 10 – моноглицериды; 11 – фосфатидилсерин; 14 – лецитин; 15 – кефалин; 18 – моногалактозилглицерид

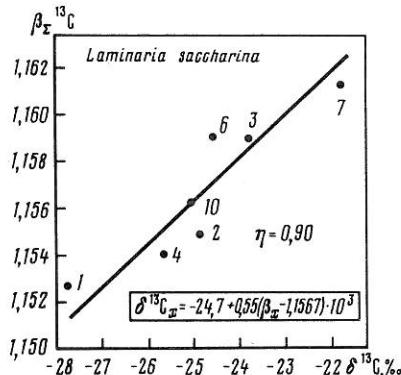


Рис. 4.8. Корреляция  $\beta_{\Sigma}^{13}\text{C}$ – $\delta^{13}\text{C}$  липидной фракции ламинарии *Laminaria saccharina*

1 – воска, углеводороды, эфиры стеринов; 2 – триглицериды; 3 – каротиноид (фукоксантин); 4 – жирные кислоты; 6 – стерины (фукостерин); 7 – хлорофилл; 10 – моноглицериды

случае сопоставима с погрешностью масс-спектрометрических измерений изотопного состава.

С другой стороны, если учесть, что дисперсия, характеризующая связь  $\delta^{13}\text{C}$ – $\beta_{\Sigma}^{13}\text{C}$ , частично обусловлена погрешностями в оценках  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\beta_{\Sigma}^{13}\text{C}$ , то ясно, что сама зависимость между  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\beta_{\Sigma}^{13}\text{C}$  является еще более тесной, чем это следует из корреляционного анализа.

Выше мы рассматривали зависимость  $\delta^{13}\text{C}$ – $\beta_{\Sigma}^{13}\text{C}$ , используя числовые значения  $\beta$ -факторов, относящихся к 27°C (300°K). Практически исследованные организмы развивались в средах с разной температурой. Если реальная температура биосинтеза отличается от 27°C, то это скажется на угле наклона соответствующей линии регрессии  $\delta^{13}\text{C}$ – $\beta^{13}\text{C}$ , т.е. видимом значении коэффициента  $\bar{k}$ . Для организмов, развивающихся при температурах меньше, чем 27°C, коэффициент  $k$  окажется несколько завышенным, а соответствующая линия регрессии на графиках пойдет более полого и, наоборот, если биосинтез происходил в среде с температурой выше 27°C, линия регрессии пойдет с меньшим коэффициентом  $k$ .

Пользуясь выражениями (3.42) и (3.43) можно привести уравнения регрессии к виду, отвечающему фактической температуре.

К примеру связь  $\delta^{13}\text{C}$ – $\beta^{13}\text{C}$  для липидных компонентов ламинарии (см. рис. 4.8) характеризуется уравнением регрессии  $\delta^{13}\text{C} = 0,55 (\beta^{13}\text{C}_{(300^{\circ}\text{K})} - 1,1567) \cdot 10^3 - 24,7$ . Ламинария произрастала при  $t = 5^{\circ}\text{C}$ . Приведение уравнения регрессии к этой температуре дает  $\delta^{13}\text{C} = 0,47 (\beta^{13}\text{C}_{(278^{\circ})} - 1,1791) \cdot 10^3 - 24,7$ . Видимая величина  $\bar{k}$  снижается от 0,55 до 0,47.

### ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОТОПОВ В АЦЕТАТЕ

Ацетат является одним из важных метаболитов. В частности, биосинтез липидных компонентов осуществляется преимущественно через ацетил-КоА.

У. Майншайн и другие [17] исследовали внутримолекулярное распределение изотопов углерода в ацетате. Они измерили изотопный состав углерода метильной и карбоксильной групп уксусной кислоты, выделенной из яблочного сидра. Уксусная кислота представляла собой продукт окисления этанола аэробными организмами. Спирт в свою очередь образовался в результате катаболической деградации сахаров в процессе гликолиза.

Измерялся изотопный состав углерода  $\text{CH}_3$ -группы, практически метана, выделившегося при пиролизе уксусной кислоты, и изотопный состав уксусной кислоты в целом. Изотопный состав карбоксильной группы вычисляли по разности величины  $\delta^{13}\text{C}$ . Полученные результаты представлены в табл. 4.9 (в графической форме на рис. 4.9). Там же приведены величины  $\beta$ -факторов изотопных форм, замещенных по метильной и карбоксильной группам.

Таблица 4.9

Внутримолекулярное распределение изотопов углерода в биогенной уксусной кислоте

	$\delta^{13}\text{C}$ , ‰	$\beta^{13}\text{C}$		$\delta^{13}\text{C}$ , ‰	$\beta^{13}\text{C}$
$\text{CH}_3-$	-34,9	1,1363	-COOH	-16,5	1,1972

Карбоксильная группа уксусной кислоты обогащена изотопом  $^{13}\text{C}$  на 18,4% по отношению к метильной группе. Величина термодинамического изотопного фактора карбоксильной группы (изотопной формы, замещенной по карбоксильной группе) больше, чем величина  $\beta_i$ -фактора метильной группы. Из соотношения

$$-16,5 = -34,9 + \kappa \left( \frac{1,1972}{1,1363} - 1 \right) \cdot 10^3$$

можно определить коэффициент пропорциональности  $\kappa$ , который оказывается равным в данном случае 0,34.

Таким образом, внутри молекулы уксусной кислоты распределение изотопов носит такой же характер, как и между различными соединениями липидной фракции. Величина  $\kappa$  совпадает со средним значением этой величины, установленной для внутримолекулярного (между углеродом карбоксильной группы и радикала) распределения изотопов в аминокислотах.

Одна из привлекательных сторон исследования компонентов липидной фракции, результаты которого были изложены выше, состоит в том, что биосинтез их осуществляется преимущественно из одного и того же исходного субстрата — ацетил-КоА.

Это позволяет разрешить некоторые альтернативы, касающиеся внутримолекулярного распределения изотопов.

На рис. 4.10,а приведен пример теоретически ожидаемого внутримолекулярного распределения изотопов в одном из соединений липидной фракции — молекула холестерина. Диаметр кружков, отвечающих атомам углерода, пропорционален расчетной величине  $\beta_i$ -фактора изотопной формы, замещенной по данному положению, т.е. вероятности концентрации изотопа  $^{13}\text{C}$  в этом положении.

Следует подчеркнуть принципиальное отличие внутримолекулярной изотопической неоднородности, имеющей термодинамическую природу от возможной внутримолекулярной неоднородности, обусловленной различием изотопного состава предшественников разных атомов углерода в биомолекуле. В первом случае изотопный состав углерода в молекуле зависит от его химического окружения и определяется величиной  $\beta_i$ -фактора, а изотопный состав молекулы в целом — величиной  $\beta_{\Sigma}$ -фактора. Во втором случае внутримолекулярная изотопическая неоднородность имеет чисто унаследованный характер.

Благодаря многочисленным работам по исследованию путей биосинтеза при помощи меченого углерода  $^{14}\text{C}$ , вводящегося в карбоксильную

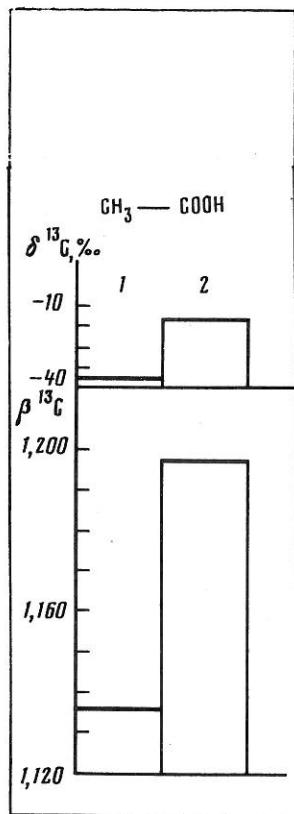


Рис. 4.9.

Рис. 4.9. Внутримолекулярный изотопный сдвиг в биогенной уксусной кислоте  
1 – метильная группа; 2 – карбоксильная группа

Рис. 4.10. Относительные величины  $\beta_i^{13}\text{C}$ -факторов молекулы холестерина (а) и распределение в ней углерода метильного ( $\bar{M}$ ) и карбоксильного ( $\bar{K}$ ) происхождения (б). Диаметр кружков пропорционален величине  $\beta_i^{13}\text{C}$  и соответствует при термодинамически упорядоченном распределении изотопов относительной обогащенности изотопов  $^{13}\text{C}$  углерода в данном структурном положении

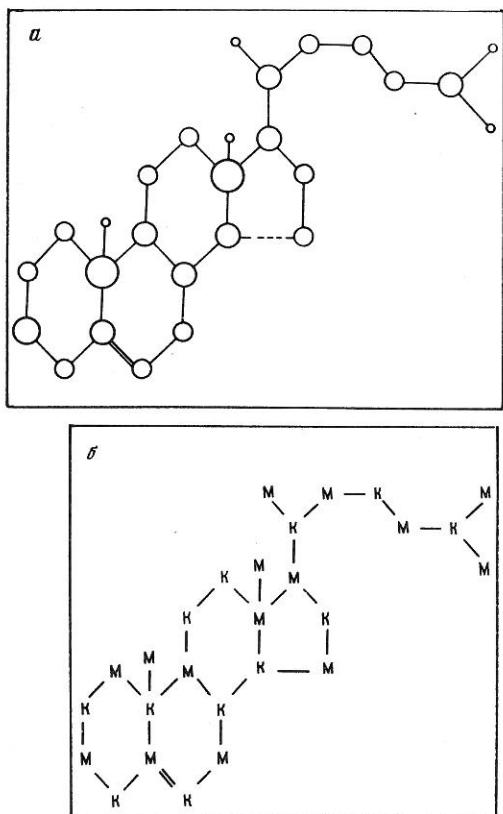


Рис. 4.10.

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. 4.10, б. Если изотопный состав углеродных атомов определяется их происхождением, то изотопный состав соединения в целом должен определяться соотношением  $m/k$ , т.е. отношением числа изотопически легких атомов углерода, унаследованных от метиль-

Таблица 4.10

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

Соединение	$\beta_{\Sigma}$ -фактор	$\delta^{13}\text{C}$ , ‰	м/к	Соединение	$\beta_{\Sigma}$ -фактор	$\delta^{13}\text{C}$ , ‰	м/к
Пальмитиновая кислота	1,1540	-31,9	1,00	$\beta$ -ситостерин	1,1590	-29,5	1,25
$\beta$ -каротин	1,1567	-31,5	1,50	Миксоксантофилл	1,1607	-29,4	1,50

ной группы, к числу изотопически тяжелых атомов, унаследованных от карбоксильной группы ацетата.

В табл. 4.10 приведены м/к соединений, углеродные атомы которых происходят только из ацетата. В жирных кислотах атомы м-и к-происхождения чередуются [16, 21]. Аналогичное чередующееся распределение атомов м- и к-типа имеет место в скваленах и происходящих от них каротиноидах. Углерод боковых  $\text{CH}_3$ -групп в каротиноидах имеет метил-ацетатное происхождение [15, 22]. Распределение атомов м- и к-типов в  $\beta$ -ситостерине аналогично распределению в холестерине [11, 22]. 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 [10]. В сфинголипидах 1-й и 2-й атомы сфингозина образуются за счет 2-го и 3-го углеродного атома серина [20]. В хлорофилле восемь углеродных атомов порфиринового ядра происходят из  $\alpha$ -углерода глицина, остальные – из ацетата [19].

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. 4.10 взяты лишь те соединения, для которых величина м/к определяется отношением только метильных и карбоксильных атомов ацетата. Эти величины сопоставлены с изотопным составом соответствующих соединений в конкретном исследованном организме. Видно, что между величинами м/к и  $\delta^{13}\text{C}$  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, харак-

теризующихся повышенными значениями изотопических чисел ( $L_{C-O} = 0,0550$ ,  $L_{C=O} = 0,0958$ ), должно привести к увеличению  $\beta_i$ -факторов соответствующих атомов углерода, а отсюда и  $\beta_\Sigma$ -фактора в целом. Расчет дает для  $\beta_\Sigma$ -фактора миксоксантофилла величину 1,1607, а для  $\beta_\Sigma$ -фактора  $\beta$ -каротина — величину 1,1567 (см. табл. 4.10). Результаты исследования изотопного состава этих компонентов показывают, что миксоксантофилл ( $\delta^{13}\text{C} = -29,4\%$ ) действительно изотопически тяжелее  $\beta$ -каротина ( $\delta^{13}\text{C} = -31,5\%$ ). В то же время отношения м/к у обоих соединений одинаковы, т.е. с этой точки зрения они должны были бы иметь одинаковый изотопный состав.

Из сказанного следует, что изотопный состав биомолекул липидной фракции и внутримолекулярное распределение изотопов в них зависит не столько от изотопного состава предшественников и способа включения углерода предшественников в состав данного соединения, сколько определяется процессами фракционирования в ходе биосинтеза, приводящими к распределению изотопов в соответствии с термодинамическими изотопными факторами синтезируемых структур.

### ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОТОПОВ В АРОМАТИЧЕСКИХ МОНОМЕРАХ ЛИГНИНА

Выше было показано, что карбоксильная группа в исследованных биомолекулах обогащена, как правило, тяжелым изотопом углерода. Это соответствует высокому значению  $\beta_i$ -фактора карбоксильного углерода, как правило, большему, чем для органического углерода в среднем.

Ароматические мономеры лигнина содержат метоксильную группу, которая, будучи как и карбоксильная кислородосодержащей, характеризуется, однако, существенно меньшим значением  $\beta_i$ -фактора, меньшим, чем в среднем для углеродного скелета биомолекул.

В этой связи представляло интерес измерение внутримолекулярного изотопного сдвига по метоксильному углероду. Подобные исследования были предприняты в работах [2,5]. В качестве объектов анализа в [5] были выбраны три биогенетически и структурно-родственных аромати-

Таблица 4.11

Распределение изотопов углерода в ароматических мономерах лигнина

Образец	$\delta^{13}\text{C}$ , ‰		Образец	$\delta^{13}\text{C}$ , ‰	
	тростник	пшеница		тростник	пшеница
п-оксибензальдегид	-29,5	-	4-окси-3,5-диметоксибензальдегид (сиреневый альдегид)	-30,6	-31,3
4-окси-3-метоксибензальдегид (ванилин)	-29,9	-30,2	ОСН <sub>3</sub> -группа	-32,7	-32,4
			4-окси-3-метоксибензальдегида (ванилина)		

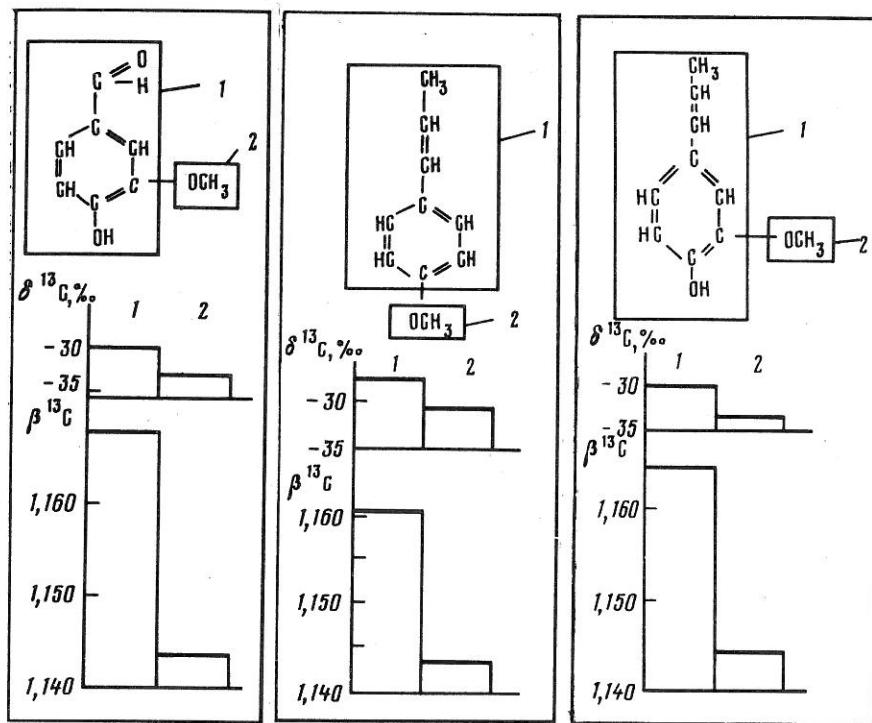
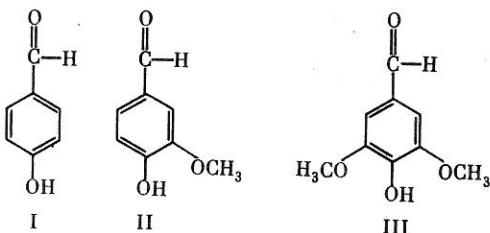


Рис. 4.11. Внутримолекулярный изотопный сдвиг и корреляция его с соотношением величин  $\beta^{13}\text{C}$  в биогенном ванилине

Рис. 4.12. Внутримолекулярный изотопный сдвиг и корреляция его с соотношением величин  $\beta^{13}\text{C}$  в биогенном анетоле

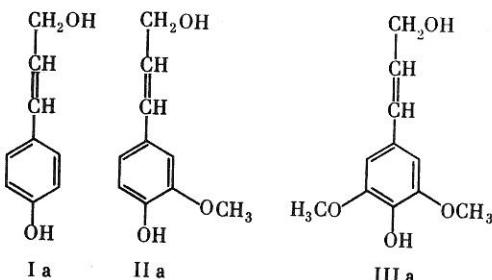
Рис. 4.13. Внутримолекулярный изотопный сдвиг и корреляция его с соотношением величины  $\beta^{13}\text{C}$  в биогенном эвгеноле

ческих альдегида: п-оксибензальдегид (I), 4-окси-3-метоксибензальдегид (II) (ванилин) и 4-окси-3,5-диметоксибензальдегид (III) (сиреневый альдегид).



Альдегиды являются продуктами щелочно-нитробензольного окисления фенилпропановых структур типа Ia, IIa, IIIa, которые являются моно-

мерными единицами лигнина [8] и некоторых других природных соединений (флавоноиды, оксикоричные кислоты и др.):



Для выделения ароматических альдегидов использована обезжиренная биомасса стеблей дикорастущего среднеазиатского тростника *Phragmites communis* и озимой пшеницы сорта "Мироновская 808". Окисление растительной биомассы и выделение ароматических альдегидов проводили по методу Гибберта. Смесь альдегидов разделяли методом возгонки при пониженном давлении (10–12 мм) с последующей многократной перекристаллизацией препаратов и применением препаративной тонкослойной хроматографии. Подробности аналитической и препаративной методики изложены в [5]. Полученные препараты индивидуальных альдегидов содержали не более 5% загрязняющих примесей.

Для выделения углерода метоксильной группы была использована классическая методика расщепления простых эфирных связей с помощью йодистоводородной кислоты. При температуре кипения йодистоводородной кислоты углерод метоксильной группы количественно выделяется в виде иодистого метила, углерод которого затем окислялся до CO<sub>2</sub> и анализировался на масс-спектрометре.

В табл. 4.11 приведены данные по изотопному составу суммарного углерода п-оксибензальдегида, ванилина и сиреневого альдегида из тростника, двух метоксилированных альдегидов (ванилина и сиреневого альдегида) из пшеницы и углерода метоксильной группы ванилина из обоих растений. Углерод метоксильной группы, отделенной от молекулы ванилина, оказался в случае обоих растений изотопически легче суммарного углерода ароматического кольца. Таким образом, здесь также выявляется соответствие изотопного распределения соотношению величин термодинамических изотопных факторов (рис. 4.11).

В дополнение к этому были исследованы еще два ароматических соединения, выделенные из растительных объектов: трансанетол и изоэвгенол [2]. Изотопный сдвиг между углеродом из метоксильной группы и остальной частью молекулы оказался того же знака и приблизительно той же величины, что и в случае ванилина (рис. 4.12 и 4.13).

Коэффициент редуцирования изотопного эффекта  $\kappa$  во всех случаях оказался приблизительно одинаковым и равным 0,12 для ванилина тростника, 0,19 для трансанетола и 0,17 для изоэвгенола.

## ИЗОТОПНЫЙ СОСТАВ УГЛЕРОДА ФИТОЛА И ПОРФИРИНОВОГО ЯДРА ХЛОРОФИЛЛА

Молекула хлорофилла представляет собой привлекательный объект для внутримолекулярного изотопного анализа. Она содержит углеродные атомы, заметно отличающиеся величинами  $\beta$ -факторов. Поэтому можно ожидать ощутимых изотопных сдвигов между углеродом в разных структурных положениях. Хлорофилл — важное биологическое соединение. Он имеет также существенное геохимическое значение. Его фитольная часть является предшественником изопренOIDНЫХ углеводородов, а тетрапиррольное ядро — предшественником ископаемых порфиринов.

В нашей лаборатории был исследован изотопный состав углерода двух фрагментов молекулы хлорофилла: фитольной цепи и порфиринового ядра [1, 6].

Исходный для опыта хлорофилл *a + b* выделялся из крапивы. Фитол отщеплялся путем омыления хлорофилла щелочью в метаноле и экстрагировался из реакционной смеси эфиром. После отгонки эфира под вакуумом фитол очищался при помощи возгонки при давлении 10 тор и температурах 202,5–204,0°C. Процедура возгонки применялась дважды. Порфириновый остаток извлекался из щелочнометанольного раствора при понижении pH его до 4,5. Образующаяся взвесь экстрагировалась эфиром. Осадок после упаривания эфира представлял собой порфириновое ядро хлорофилла. Чистота подготовленных препаратов контролировалась при помощи ультрафиолетовой спектроскопии. Следует отметить, что процедура очистки фитола возгонкой является важным условием получения воспроизводимых результатов изотопного анализа.

Таблица 4.12

Изотопный состав углерода хлорофилла и фрагментов хлорофилловой молекулы

	$\beta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}, \text{‰}$	
		опыт I	опыт II
Хлорофилл <i>a + b</i>	1,1617	-32,50	-31,45
Фитол	1,1525	-33,00	-33,88
Порфириновое ядро	1,1669	-31,40	-28,77

В табл. 4.12 приведены результаты двух независимых опытов.

Углерод фитольной цепи оказался изотопически легче порфиринового ядра, что отвечает соотношению величин  $\beta^{13}\text{C}$ , характеризующих эти фрагменты (рис. 4.14).

## ИЗОТОПНЫЙ СОСТАВ ФРАГМЕНТОВ МОЛЕКУЛЫ ГЕМИНА

Изучение изотопного состава фрагментов молекулы гемина явилось по существу продолжением исследования внутримолекулярного распределения изотопов в хлорофилле (табл. 4.13). Гемин был использован

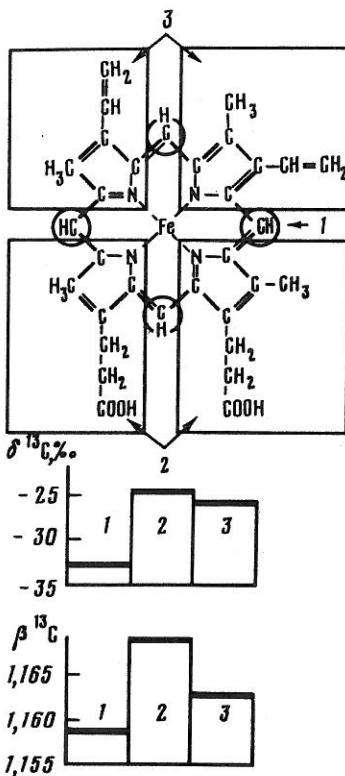
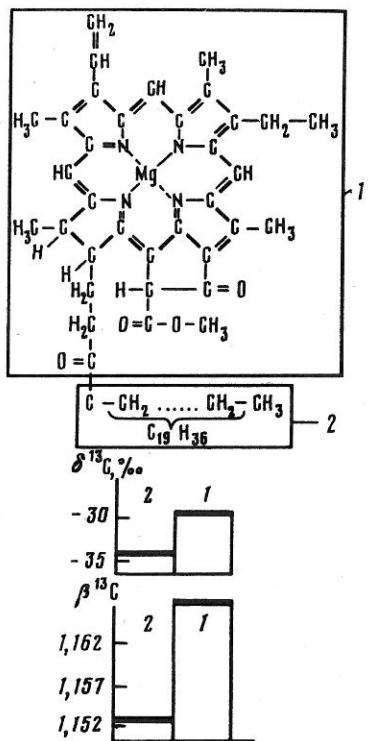


Рис. 4.14. Внутримолекулярный изотопный сдвиг в хлорофилле  
1 – порфириновое ядро; 2 – фитол (опыт II)

Рис. 4.15. Внутримолекулярные изотопные сдвиги в молекуле гемина

1 – метиновые мостики; 2 – фрагменты, преобразуемые в гематиновую кислоту;  
3 – фрагменты, преобразуемые в метилэтилмалеинимид (опыт II)

как удобное исходное соединение для изучения изотопного распределения внутри порфиринового ядра [1].

Продукты фрагментации порфиринового ядра были получены путем расщепления мезопорфирина IX. Последний был предварительно приготовлен из гемина, выделенного из свежей дефибринированной бычьей крови. Гемин восстанавливается до мезогемина гидрированием в 90% муравьиной кислоте в течение 1 ч при 94–98°C в присутствии окиси палладия в качестве катализатора. Мезогемин путем обработки его аммиачного раствора динатрийтартратом переводился в динатриевую соль мезопорфирина, которая, в свою очередь, путем насыщения его хлороформенно-метанольного раствора сухим газообразным хлористым водородом переводилась в диметиловый эфир мезопорфирина. Последний после очистки на колонках с  $\text{Al}_2\text{O}_3$  и перекристаллизации переводился гидролизом в свободный мезопорфирин IX. Мезопорфирин наследует все углеродные атомы гемина. Однако он оказался несколько более обога-

Таблица 4.13

Изотопный состав углерода гемина и фрагментов его порфиринового ядра

Исследуемое соединение (фрагмент)	Анализируемый продукт реакции	$\beta^{13}\text{C}$ фрагмента	$\delta^{13}\text{C}, \text{‰}$	
			опыт I	опыт II
Гемин	Гемин	1,1654	—	-25,74
Мезопорфирина IX	Мезопорфирина IX		-26,58	-26,18
Пиррольные кольца A и B	Метилэтилмалеинимид	1,1626	-25,99	-25,54
Пиррольные кольца C и D	Гематиновая кислота	1,1691	-25,08	-24,37
CH-группа метиновых мостиков	$\text{CO}_2$	1,1592	—	-32,52

Таблица 4.14

Изотопный состав углерода  $\text{CO}_2$ , происходящей от окисления метиновых мостиков мезопорфирина при разных выходах продукта

Выход продукта, %	$\delta^{13}\text{C}, \text{‰}$	Выход продукта, %	$\delta^{13}\text{C}, \text{‰}$
50	-35,22	90	-32,52
60	-36,21	97	-32,92

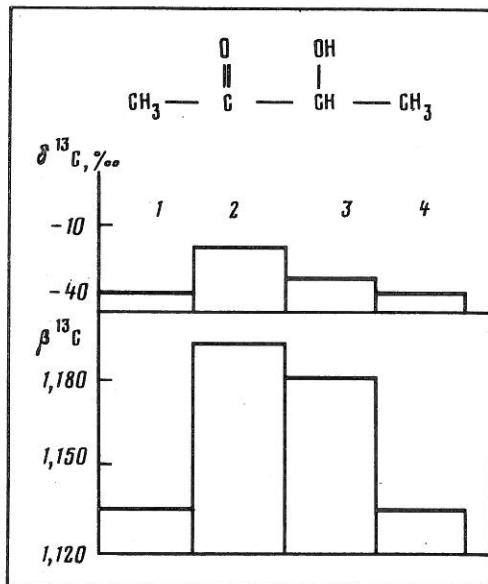
щен изотопом  $^{12}\text{C}$ , чем гемин. Это связано либо с кинетическим изотопным эффектом в процессе гидрирования гемина и метилирования динатровой соли мезопорфирина, либо с остаточными примесями углеродсодержащих реагентов, которые использовались в описанной процедуре восстановления гемина.

Деструкция мезопорфирина осуществлялась при помощи хромовой кислоты в реакционном сосуде, приспособленном для улавливания выделяющейся углекислоты. Реакция проводилась при комнатной температуре. В результате образуются три продукта: углекислота — продукт окисления углерода метиновых мостиков; метилэтилмалеинимид — продукт отщепления колец A и B (рис. 4.15) и гематиновая кислота — продукт отщепления колец C и D.

Углекислота улавливалась гидроокисью бария. Метилэтилмалеинимид и гематиновая кислота были выделены из реакционной смеси экстракцией этилацетатом и растворены в кипящей воде. Раствор охлаждался до  $0^\circ\text{C}$  и его pH доводился до 7,0 путем добавления  $\text{NaHCO}_3$ . Метилэтилмалеинимид экстрагировался из нейтрального раствора хлорофилла. Остаточный раствор подкислялся до pH 5 и из него этилацетатом экстрагировалась гематиновая кислота. Препараты очищались перекристаллизацией.

Мы специально остановились на подробностях методики, поскольку химическая процедура является довольно сложной. На некоторых этапах не обеспечивается количественный выход, поэтому существует реаль-

Рис. 4.16. Внутримолекулярные изотопные сдвиги в молекуле ацетона



ная опасность внесения искажений в первоначальное изотопное распределение.

При неколичественном выходе, например, изотопный состав углерода метиновых мостиков может быть заметно искажен кинематическим изотопным эффектом, как это видно из табл. 4.14, где приведены результаты анализа при различных выходах анализируемого продукта.

Из рис. 4.15 видно, что изотопные составы исследованных фрагментов соотносятся между собой подобно величинам их  $\beta$ -факторов.

Отметим, хотя это достаточно ясно, что сопоставление изотопного состава фрагмента биомолекулы необходимо производить с величиной его  $\beta$ -фактора с составе исходного соединения. Продукты реакции фрагментации при отсутствии сопровождающих реакцию изотопных эффектов наследуют изотопный состав соответствующего фрагмента, а величина их  $\beta$ -фактора может существенно изменяться.

### ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИЗОТОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ В ДРУГИХ БИОГЕННЫХ СОЕДИНЕНИЯХ

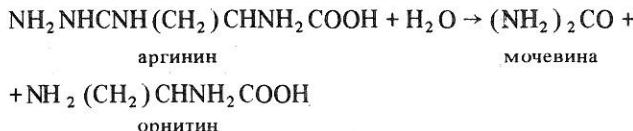
Выше мы останавливались на результатах экспериментов, которые были выполнены нами специально с целью проверки гипотезы термодинамически упорядоченного распределения изотопов в биосистемах. В литературе имеются данные, которые также могут быть интерпретированы с этой точки зрения. Часть из них была рассмотрена. Заслуживают упоминания еще несколько примеров.

Дж. Ринальди, Г. Мейншайн, Дж. Хейс [18]<sup>1</sup> исследовали внутримолекулярное распределение изотопов в молекуле биогенного ацетона. Полученные ими данные сопоставлены с вычисленными значениями  $\beta$ -факторов на рис. 4.16. Наблюдается согласие между измеренными изотопными эффектами и термодинамическими изотопными факторами.

В работе [9] аргинин, выделенный из хлореллы, был ферментативно

<sup>1</sup> Благодарю проф. Дж. Хайса за предоставленную возможность познакомиться с работой [18] до ее опубликования.

расщеплен на орнитин и мочевину:



мочевина

Мочевина в этой реакции образуется за счет гуанадиновой группы, орнитин — за счет остальной части молекулы. Поэтому изотопный состав продуктов реакции должен отражать внутримолекулярное распределение изотопов в аргинине при условии, однако, что происходит полное превращение аргинина. К сожалению, в работе [9] нет указаний относительно условий протекания реакции. Не указан также изотопный состав исходного аргинина. Если степень превращения аргинина мала, то изотопный состав мочевины следует сопоставлять с величиной  $\beta$ -фактора мочевины, если превращение полное — то с величиной  $\beta_i^{13}\text{C}$ , характеризующей гуанадиновый углерод. Углерод мочевины имел в эксперименте  $\delta^{13}\text{C} = +7,1^{\circ}/\text{o}$ , орнитина —  $\delta^{13}\text{C} = -15,2^{\circ}/\text{o}$ . Величина  $\beta$ -фактора мочевины составляет 1,1958, гуанадинового углерода — 1,1802, а орнитина — 1,1675. Таким образом, несмотря на отмеченную неопределенность можно видеть, что наблюдаемая обогащенность мочевины изотопом  $^{13}\text{C}$  относительно орнитина согласуется с соотношением соответствующих  $\beta$ -факторов.

Г. Ди Марко и другие [12] исследовали изотопный состав углерода яблочной и винной кислот, выделенных из сока ягод винограда. Химический состав винной кислоты отличается от яблочной лишь наличием одной дополнительной OH-группы. Соответственно ее  $\beta$ -фактор несколько выше. Она оказалась на  $0,5^{\circ}/\text{o}$  обогащена изотопом  $^{13}\text{C}$  (табл. 4.15).

Подытоживая рассмотрение экспериментальных данных, можно заключить, что для многих рассмотренных биосистем характерна связь между изотопными составами компонентов и величинами термодинамических изотопных факторов. Эта связь носит достаточно общий характер. Она присуща соединениям разного строения, компонентам, относящимся к различным биохимическим фракциям, наблюдается в организмах разной экологической и таксономической принадлежности и, что самое главное, проявляется как на межмолекулярном, так и на внутримолекулярном уровне.

В то же время следует подчеркнуть, что могут встречаться случаи, когда связь между наблюдаемыми изотопными эффектами и величинами

Таблица 4.15

Сопоставление величин  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\beta^{13}\text{C}$  яблочной и винной кислот

Кислота	Структурная формула	$\delta^{13}\text{C}, ^{\circ}/\text{o}$	$\beta^{13}\text{C}$
Яблочная	$\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ \text{COOH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$	-23,5	1,1844
Винная	$\begin{array}{c} \text{COOH}-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}(\text{OH})-\text{COOH} \end{array}$	-23,0	1,1918

$\beta$ -факторов отсутствует. Даже в достаточно хороших корреляциях, например между липидными компонентами, можно всегда выбрать пару компонентов, изотопные составы которых не согласуются с величинами  $\beta$ . Иначе говоря, термодинамически упорядоченное распределение изотопов представляет собой закономерность, имеющую статистический характер. Она отчетливо проявляется, когда рассматривается большое число случаев или компонентов. Высокие коэффициенты корреляции свидетельствуют о значимом характере связи, т.е. о реальном существовании в биологических системах механизма, обусловливающего соответствующее распределение изотопов. Но в отдельных случаях связь  $\delta^{13}\text{C}$ — $\beta$  нарушается. Это значит, что либо реализация зависимости требует определенных условий, либо происходит наложение изотопных эффектов другой природы, например кинетических, диффузионных и т.п.

Нужно заметить также, что для различных биосистем корреляция проявляется в разной степени. Для компонентов липидной фракции из нескольких исследованных организмов связь  $\delta^{13}\text{C}$ — $\beta$  оказывается весьма тесной. Для аминокислот она заметно слабее.

Существенным свойством наблюдаемого распределения изотопов является то, что изотопные эффекты почти всегда меньше равновесных величин, т.е. величин, определяемых непосредственно соотношением  $\beta$ -факторов. Изотопный эффект редуцируется наполовину и более: коэффициент  $k$  в большинстве случаев меньше 0,5.

Ниже мы попытаемся рассмотреть возможный механизм фракционирования изотопов в биосистемах, обуславливающий термодинамически упорядоченное распределение изотопов и объясняющий наблюдаемые свойства этого распределения.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Богачева М.П., Галимов Э.М. Внутримолекулярное распределение изотопов углерода в хлорофилле и гемине. — Геохимия, 1979, № 7.
2. Виноградов А.П., Галимов Э.М., Кодина Л.А., Генералова В.Н. Внутримолекулярное распределение изотопов углерода как критерий биологического происхождения органических соединений. — Геохимия, 1976, № 7.
3. Галимов Э.М. Метод изотопических чисел связей. Применение в биохимии и геохимии. — В кн.: Тез. докл. на IV Всесоюз. симпоз. по применению стабил. изотопов в геохимии. М., 1972.
4. Галимов Э.М. Изотопы углерода в нефтегазовой геологии. М.: Недра, 1973.
5. Галимов Э.М., Кодина Л.А., Генералова В.Н. Экспериментальное исследование внутри- и межмолекулярных изотопных эффектов в ароматических соединениях биологической природы. — Геохимия, 1976, № 1.
6. Галимов Э.М., Кодина Л.А., Генералова В.Н. и др. Исследование распределения изотопов углерода в биогенных соединениях. — В кн.: Тр. VIII Междунар. конгр. по орган. геохимии. М.: Наука, 1977.
7. Галимов Э.М., Ширинский В.Г. Упорядоченное распределение изотопов углерода в индивидуальных соединениях и компонентах липидной фракции организмов. — Геохимия, 1975, № 4.
8. Манская С.М., Кодина Л.А. Геохимия лигнина. М.: Наука, 1975.
9. Abelson P.H., Hoering T.C. Carbon isotope fractionation in formation of amino acids by photosynthetic organisms. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1961, 47, N 5, p. 623.
10. Buell G.C., Reiser R. Gluceride — glucerol precursors in the intestinal mucosa. — J. Biol. Chem., 1959, 234, N 2.

11. Clatron R.B. Biosynthesis of sterols steroids, and terpenoids. — Quart. Rev., 1965, 19.
12. Di Marco G., Grego S., Tricoli D., Turi B. Carbon isotope ratios  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  in fractions of field-grown grape. — Physiol. plant., 1977, 41, N 2.
13. Galimov E.M. Biogenic intermolecular and intramolecular carbon isotope effects: Method of "isotopic number of bindings". Biochemical and geochemical applications. — In: Intern. Meeting on isotope effects in physical and chemical processes. Cluj (Romania), 1973.
14. Galimov E.M. Organic geochemistry of carbon isotopes. — In: Advances in organic geochemistry. Paris Technip, 1973, p. 439—452.
15. Grob E.C., Bütler R. Über die Biosynthese des  $\beta$ -Catoris bei Mucor hiemalis Wehmer. — Henv. chim. acta, 1956, 39, p. 1975.
16. Mahler H., Cordes E. Basic biological chemistry. N.Y.: Harper and Row, 1968.
17. Meinschein W.G., Rinaldi G.L., Hayes J.M., Schoeller D.A. Intramolecular isotopic order in biologically produced acetic acid. Biomed. Mass-Spectrometry, 1974, 1(3), p. 172—174.
18. Rinaldi G.G., Meinschein W.G., Hayes J.M. Intramolecular carbon isotopic distribution in biologically produced acetoin. Biomed. Mass-Spectrometry, 1974, 1(6), p. 415—417.
19. Shemin D., Wittenberg J. The mechanism of porphyrin formation. — J. Biol. Chem., 1951, 192, p. 315.
20. Sprinson D.B., Coulon A. The precursors of sphingosine in brain tissue. — J. Biol. Chem., 1951, 207, N 2.
21. Strickland K.P. Biogenesis of lipids. — In: Biogenesis of natural compounds /Ed. P. Bernfeld. New York, Pergamon Press, 1963, Chapt. 3.
22. Staple E. Biosynthesis of steroids. — In: Biogenesis of natural compounds / Ed. P. Bernfeld. New York, Pergamon Press, 1963, Chapt. 4.

## Глава V

### ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ БИОЛОГИЧЕСКОГО ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ ИЗОТОПОВ

#### МЕХАНИЗМ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКОГО ИЗОТОПНОГО ЭФФЕКТА ПРИ ФЕРМЕНТАТИВНОМ КАТАЛИЗЕ

Представление о термодинамически упорядоченном распределении изотопов в биологических системах с первого взгляда кажется равносильным представлению о полном химическом равновесии биомолекул и, следовательно, принципиально неприемлемым по отношению к живым системам. Такого рода сомнения иногда высказывались при обсуждении термодинамической концепции.

Думается, что некоторые трудности восприятия идеи термодинамически упорядоченного распределения изотопов происходят, с одной стороны, из недооценки значения ферментативного характера биохимических реакций, а с другой — из переоценки понятия неравновесности живых систем, которое относится скорее к уровню организации биологических систем, чем к содержанию элементарных химических актов, которые вполне могут быть равновесными именно в силу высокой организации процесса в целом.

Для того чтобы уяснить природу термодинамически упорядоченного распределения изотопов в биомолекулах нужно рассмотреть те следствия,

которые вытекают из главной особенности химии живых систем, а именно, из того обстоятельства, что в живых системах в отличие от неживых все химические реакции протекают при участии ферментов. При этом ферментативному процессу придется придать определенную интерпретацию, отвечающую наблюдаемому фракционированию изотопов.

Ферментную реакцию обычно записывают следующим образом:



где  $E$  – свободный фермент,  $S$  – субстрат,  $P$  – продукт,  $ES$  – фермент-субстратный комплекс.

Началом реакции является образование фермент-субстратного комплекса в физическом смысле, т.е. стадия, включающая ориентацию субстрата, индукционную конформацию фермента, адаптацию активного центра и другие акции, предшествующие собственно химической реорганизации субстрата. С этим этапом мы не связываем какого-либо значительного изотопного эффекта.

Следующим этапом является процесс, идущий в активном центре фермент-субстратного комплекса, т.е. процесс, связанный с химической перестройкой субстрата. Обычно нет необходимости как-то детализировать эту стадию, поскольку наличие или отсутствие каких-либо промежуточных состояний не меняет конечного химического результата: перехода субстрата  $S$  в продукт  $P$ . Однако для понимания механизма биологического фракционирования изотопов конкретизировать содержание этой стадии существенно важно.

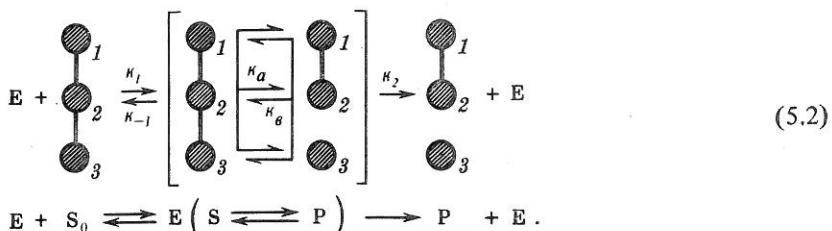
Мы покажем, что наблюдаемое в биосистемах распределение изотопов можно объяснить и количественно описать, если ввести представление о микроскопической обратимости превращения субстрата в ферментном комплексе. При этом в целом ферментная реакция может быть необратимой.

Как известно, образованию собственно продукта  $P$  предшествует переход комплекса фермент-субстрат в комплекс фермент-продукт  $EP$ . Мы полагаем, что этот переход обратим. В самом деле, если энергия активации химического превращения субстрата, катализируемого ферментом, близка к нулю и если время жизни фермент-субстратного комплекса заметно больше, чем характерное время перестройки связей, то есть основание ожидать, что на активном центре фермента сначала произойдет реорганизация химических связей, соответствующая переходу субстрата в продукт, а затем возможен обратный процесс, соответствующий переходу продукта в исходный субстрат, и так – многократно за время жизни данного фермент-субстратного комплекса.

Особенность такой интерпретации состоит в том, что понятие обратимости оказывается отнесенным к процессу превращения одной молекулы (или нескольких реагирующих молекул, вообще, – к элементарному акту). В обычной химической реакции превращение одной молекулы всегда необратимо. Это происходит потому, что энергия, выделяющаяся при перестройке связей (образовании продукта), рассеивается в среде. Считается, что переходный комплекс либо распадается до исходного состояния, либо необратимо превращается в продукт  $A \rightleftharpoons [A]^\# \rightarrow B$ .

Если мы говорим, что реакция в целом обратима ( $A \rightleftharpoons B$ ), то это значит, что в другой момент, в другом месте системы, другая молекула типа В может превратиться в A:  $B \rightleftharpoons [B]^{\#} \rightarrow A$ , т.е. обратимость реакции – явление макроскопическое. Микроскопическая обратимость превращения молекулы субстрата в ферментном комплексе предполагает, что энергия, выделяющаяся при образовании продукта не диссирирует в окружающую среду, а может быть немедленно реализована вновь с преобразованием продукта в исходное состояние, т.е. фермент ведет себя наподобие "пружины". Реакцию такого типа следует записать в виде  $A \rightleftharpoons [A \rightleftharpoons B]^{\#} \rightarrow B$ .

В более развернутом виде и в принятых обозначениях соответствующую схему ферментной реакции можно изобразить следующим образом:



Процесс перехода преобразуемого соединения из состояния S в состояние P и обратно прерывается в какой-то момент либо распадом комплекса на свободный фермент и субстрат (из состояния ES), либо распадом комплекса на свободный фермент и продукт (из состояния EP). Последнюю стадию мы рассматриваем, как преимущественно необратимую.

Вследствие стерической специфичности фермента углерод в позиции (1) продукта будет происходить всегда за счет углерода в позиции (1) субстрата, углерод  $P_{(2)}$  за счет углерода  $S_{(2)}$  и т.д. В единичном фермент-субстратном комплексе углерод в  $i$ -той позиции молекулы субстрата может быть либо в виде изотопа  $^{13}\text{C}$ , либо изотопа  $^{12}\text{C}$ . В первом случае совершается переход



а во втором случае



Пусть  $\beta_i$  – фактор изотопной формы, замещенной по  $i$ -тому атому углерода, в состоянии P больше, чем в состоянии S ( $\beta_{P(i)} > \beta_{S(i)}$ ). При-

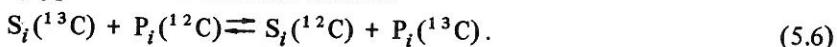
менительно к единичной молекуле это означает, что преимущественная вероятность нахождения в состоянии P изотопной формы  $P_i(^{13}\text{C})$  по сравнению с  $P_i(^{12}\text{C})$  выше, чем преимущественная вероятность нахождения в состоянии S изотопной формы  $S_i(^{13}\text{C})$  по сравнению с  $S_i(^{12}\text{C})$ . Мерой отношения этих относительных вероятностей по определению является отношение величин  $\beta$ -факторов ( $\beta_{P_i}/\beta_{S_i}$ ). Из этого следует, что момент диссоциации фермент-субстратного комплекса будет относительно чаще

заставлять EP в состоянии  $P_i(^{13}\text{C})$ , чем ES в состоянии  $S_i(^{13}\text{C})$ . Чтобы эта вероятность могла реализоваться, число переходов  $S \rightleftharpoons P$  за время жизни фермент-субстратного комплекса должно быть достаточно большим. При выполнении этого условия продукт будет обогащаться изотопом  $^{13}\text{C}$ . Если имеет место соотношение  $\beta_{P_i}/\beta_{S_i} < 1$ , то распределение изотопных составов  $S_i$  и  $P_i$  получится обратным.

В целом оно определяется отношением

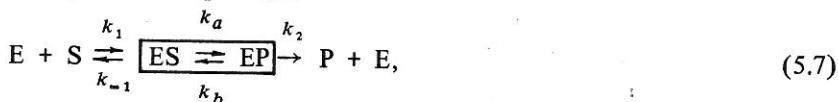
$$\delta^{13}\text{C}_{P_i} - \delta^{13}\text{C}_{S_i} = \left( \frac{\beta_{P_i}}{\beta_{S_i}} - 1 \right) \cdot 10^3, \text{ } \% . \quad (5.5)$$

Суммируя процессы (5.3) и (5.4), проходящие в единичных фермент-субстратных комплексах для всей совокупности подобных комплексов, присутствующих в клетках, т.е. переходя к макроскопическому рассмотрению, получим соотношение, формально вполне аналогичное обычному уравнению изотопного обмена:



Таким образом, если предположить, что в активном центре фермента имеет место обратимый переход  $S \rightleftharpoons P$ , то между соответственными структурными позициями  $S_i$  и  $P_i$  произойдет разделение изотопов, отвечающее термодинамическому изотопному эффекту. Последний не является в данном случае результатом изотопного обмена в буквальном смысле этого понятия. В пределах единичного фермент-субстратного комплекса  $S_i$  и  $P_i$  являются двумя формами существования одного и того же углерода (или другого элемента). Они существуют во времени попеременно и между ними поэтому не может быть материального, в том числе изотопного обмена. Процесс в единичном фермент-субстратном комплексе сводится к селекции изотопных форм по энергиям. При этом, как и в случае изотопного обмена, процесс направлен в сторону такого соотношения изотопных форм, которое отвечает минимуму свободной энергии системы. Выражение (5.5) определяет величину термодинамического изотопного эффекта в системе  $S_i \rightleftharpoons P_i$ . Под последней с учетом сказанного, и имея в виду статистический смысл термодинамического изотопного эффекта, мы будем понимать теперь всю совокупность одноименных фермент-субстратных комплексов, в которых совершается процесс типа  $S_i \rightleftharpoons P_i$ .

Итак, мы имеем реакцию



где  $k_a$  и  $k_b$  — константы скоростей перехода фермент-субстратного комплекса из состояния S в состояние P и обратно.

Сфокусируем внимание на процессе, происходящем в фермент-субстратном комплексе, и рассмотрим в первом приближении случай, когда концентрация свободного фермента E мала, а скорости  $k_a$  и  $k_b$

существенно выше чем  $k_1$ ,  $k_{-1}$  и  $k_2$ . Тогда

$$[ES] + [EP] = 1 \quad (5.8)$$

и

$$k_a [ES] = k_b [EP]. \quad (5.9)$$

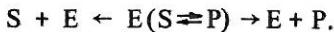
Отсюда

$$k_a [ES] = k_b - k_b [ES] \quad (5.10)$$

и

$$[ES] = \frac{k_b}{k_a + k_b}. \quad (5.11)$$

Если в химическом отношении субстрат ( $S$ ), высвобождаемый при распаде фермент-субстратного комплекса  $ES$  (левая часть уравнения (5.7)), вполне аналогичен исходному субстрату  $S_0$ , то в изотопном смысле они не идентичны. В результате изотопного разделения в системе  $S \rightleftharpoons P$ , высвобождаемый субстрат отличается по изотопному составу от исходного. Поэтому будет более точно записать уравнение (5.7) в виде



Поскольку углерод как продукта, так и высвобождаемого субстрата происходит за счет углерода исходного субстрата в каждый момент времени должен иметь место изотопный баланс:

$$\delta^{13}C_{S_{0i}} = \delta^{13}C_{S_i} [ES] + \delta^{13}C_{P_i} (1 - [ES]). \quad (5.13)$$

Изотопный состав субстрата, находящегося в комплексе с ферментом, т.е. величину  $\delta^{13}C_{S_i}$  нельзя измерить. Для того чтобы получить соотношение между физически измеряемыми величинами, следует, используя (5.13), исключить  $\delta^{13}C_{S_i}$  из выражения (5.5):

$$\delta^{13}C_{P_i} - \frac{1}{[ES]} \left[ \delta^{13}C_{S_{0i}} - (1 - [ES]) \delta^{13}C_{P_i} \right] = \left( \frac{\beta_{P_i}}{\beta_{S_i}} - 1 \right) \cdot 10^3, \% \quad (5.14)$$

Отсюда получим:

$$\delta^{13}C_{P_i} = \delta^{13}C_{S_{0i}} + [ES] \left( \frac{\beta_{P_i}}{\beta_{S_i}} - 1 \right) \cdot 10^3, \% \quad (5.15)$$

Величину  $[ES]$  перед скобкой, содержащей соотношение термодинамических изотопных факторов, можно рассматривать как редуцирующий множитель, аналогичный введенному выше коэффициенту  $k$ . Обозначим его также  $k$ . Величина  $k$  в соответствии с (5.11) определяется отношением констант скоростей и всегда меньше единицы.

Таким образом:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{P}_i} = \delta^{13}\text{C}_{\text{S}_{0i}} + \kappa \left( \frac{\beta_{\text{P}_i}}{\beta_{\text{S}_i}} - 1 \right) \cdot 10^3, \text{‰}. \quad (5.16)$$

Коэффициент разделения изотопов в соответствии с определением этого параметра для системы продукт–субстрат есть

$$\alpha_i = (\delta^{13}\text{C}_{\text{S}_{0i}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{P}_i}) \cdot 10^{-3} + 1. \quad (5.17)$$

Отсюда

$$\alpha_k(i) = -\kappa \left( \frac{\beta_{\text{P}_i}}{\beta_{\text{S}_i}} - 1 \right) + 1. \quad (5.18)$$

Нижний индекс  $k$  при  $\alpha$  будем употреблять в дальнейшем для обозначения коэффициента фракционирования, определяемого термодинамическим изотопным эффектом в фермент-субстратном комплексе, в отличие от других типов изотопных эффектов.

Если выражать изотопные составы не в величинах  $\delta^{13}\text{C}$ , а непосредственно через отношение распространенности тяжелого и легкого изотопа ( $R$ ), то, учитывая соотношение (см. главу 1)

$$\frac{R_{\text{P}_i}}{R_{\text{S}_{0i}}} = -(\delta^{13}\text{C}_{\text{P}_i} - \delta^{13}\text{C}_{\text{S}_{0i}}) \cdot 10^{-3} + 1, \quad (5.19)$$

получим

$$R_{\text{P}_i} = R_{\text{S}_{0i}} \frac{1}{\alpha_k(i)}. \quad (5.20)$$

Полученное выше соотношение (5.16) весьма характерно. Оно передает три наиболее существенные черты, присущие наблюдаемому в биологических системах распределению изотопов:

1. Связывает изотопный состав продукта  $\delta^{13}\text{C}_{\text{P}_i}$  с изотопным составом его непосредственного предшественника  $\delta^{13}\text{C}_{\text{S}_{0i}}$ .

2. Передает связь изотопных составов с величинами термодинамических изотопных факторов, т.е. объясняет в принципе наблюдаемую термодинамическую упорядоченность изотопов в биологических системах.

3. Показывает, что наблюдаемые изотопные эффекты должны быть всегда меньше равновесных, определяемых непосредственно отношением  $\beta$ -факторов (ввиду того, что  $\kappa$  всегда меньше единицы). Коэффициент  $\kappa$  мы ввели эмпирически как величину, показывающую насколько наблюдаемый изотопный эффект меньше равновесного. Выражения (5.11) и (5.15) раскрывают его физический смысл, как величины, зависящей от констант скоростей ферментативного процесса.

Следует подчеркнуть, что предполагаемое фракционирование изотопов в элементарном акте ферментативного катализа может привести к термодинамическим изотопным эффектам между позицией  $S_1$  субстрата и

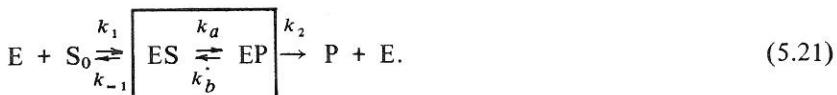
позицией  $P_1$  продукта, между позицией  $S_2$  субстрата и позицией  $P_2$  продукта и т.д., но не может обусловить термодинамически упорядоченное распределение изотопов между позициями  $P_1$ ,  $P_2$  и т.д. продукта. Как мы покажем дальше, наблюдаемая в биомолекулах внутримолекулярная термодинамическая упорядоченность изотопов является следствием процесса более высокого порядка, чем изолированная ферментная реакция. Она обусловлена циклическим характером цепей превращения, присущим организмам, взаимосвязанностью работы ферментов, в конечном счете – обменом веществ. Но прежде получим более полную формулу фракционирования изотопов в ферментной реакции.

### ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ИЗОТОПОВ В ФЕРМЕНТНОЙ РЕАКЦИИ

Выше мы рассматривали процесс упрощенно, чтобы показать, каким образом в ферментной реакции может реализовываться термодинамический изотопный эффект. В принципе такой эффект возникает, если имеет место микроскопическая обратимость превращения субстрата в фермент-субстратном комплексе.

Исследуем теперь фракционирование изотопов в ферментной реакции в более общем виде.

Вернемся к записи ферментной реакции в виде



При установившемся процессе справедливы следующие кинетические уравнения

$$[ES] (k_a - k_{-1}) = ([E_T] - [ES] - [EP]) \cdot [S_0] k_1 + [EP] k_b, \quad (5.22)$$

$$[ES] k_a = [EP] (k_2 + k_b), \quad (5.23)$$

$$v = [EP] k_2, \quad (5.24)$$

где  $v$  – скорость процесса (скорость образования продукта),  $E_T$  – общая концентрация фермента:

$$[E_T] = [E] + [ES] + [EP].$$

Подставляя в (5.22) величину  $[ES]$  из (5.23) и  $[EP]$  из (5.24), получим

$$\frac{v(k_2 + k_b)(k_a + k_{-1})}{k_2 k_a} = E_T S_0 k_1 - \frac{v(k_2 + k_b)}{k_a k_2} S_0 k_1 - \frac{v S_0 k_1}{k_2} - \frac{v k_b}{k_2}. \quad (5.25)$$

Кинетика ферментативного процесса, как известно, описывается уравнением Михаэлиса–Ментен [2]

$$v = \frac{V_{\max} [S_0]}{K_m + [S_0]}, \quad (5.26)$$

где  $V_{\max}$  – максимальная скорость реакции,  $K_m$  – константа Михаэлиса.

Преобразуем (5.25) в форму, соответствующую уравнению Михаэлиса—Ментен:

$$v = \frac{[E_T] [S_0] k_1 k_2 k_a}{(k_2 + k_b)(k_a + k_{-1}) - k_b k_a + [(k_2 + k_b)k_1 + k_1 k_a] S_0}. \quad (5.27)$$

Отсюда

$$V_{\max} = \frac{k_2 k_a [E_T]}{k_2 + k_b + k_a}, \quad (5.28)$$

$$K_m = \frac{k_2 k_{-1} \left( 1 + \frac{k_b}{k_2} + \frac{k_a}{k_{-1}} \right)}{k_1 (k_2 + k_b + k_a)}. \quad (5.29)$$

В общем виде изотопный эффект реакции, описываемой уравнением

$$-\frac{d[S_0]}{dt} = \frac{V_{\max} [S_0]}{K_m + [S_0]}, \quad (5.30)$$

исследовать трудно. Поэтому мы рассмотрим два предельных случая, отвечающих уравнению Михаэлиса—Ментен: при низкой концентрации субстрата ( $K_m \gg S_0$ ) и при высокой концентрации субстрата ( $K_m \ll S_0$ ).

При низкой концентрации субстрата уравнение Михаэлиса—Ментен принимает вид [2]

$$v = \frac{V_{\max}}{K_m} [S_0]. \quad (5.31)$$

Реакция имеет первый порядок. Соотношение (5.27) для этого случая преобразуется к виду

$$-\frac{d[S_0]}{dt} = \frac{k_a k_1 [E_T]}{k_{-1} (1 + k_b/k_2 + k_a/k_{-1})} [S_0]. \quad (5.32)$$

Выражение в правой части перед  $[S_0]$  соответствует константе скорости реакции. Обозначим ее  $k_e$ , тогда

$$-\frac{d[S_0]}{dt} = k_e [S_0]. \quad (5.33)$$

Для изотопно-замещенной формы соответствующее кинетическое уравнение имеет вид

$$-\frac{d[S_0^*]}{dt} = k_e^* [S_0^*] \quad (5.34)$$

и

$$\frac{d[S_0]}{[S_0]} = \frac{k_e}{k_e^*} \frac{d[S_0^*]}{[S_0^*]}, \quad (5.35)$$

где  $k_e/k_e^*$  как обычно характеризует изотопный эффект реакции

$$\alpha_e = \frac{k_e}{k_e^*}. \quad (5.36)$$

Таким образом, изотопный эффект рассматриваемого процесса определяется соотношением

$$\alpha_e = \frac{k_a k_1 k_{-1}^* (1 + k_b^*/k_2^* + k_a^*/k_{-1}^*)}{k_a^* k_{-1}^* (1 + k_b/k_2 + k_a/k_{-1})}. \quad (5.37)$$

Изотопные эффекты отдельных стадий выражаются отношениями типа (5.36), а именно:

$$k_1^* = \frac{k_1}{\alpha_1}; \quad k_{-1}^* = \frac{k_{-1}}{\alpha_{-1}}; \quad k_2^* = \frac{k_2}{\alpha_2}; \quad k_a^* = \frac{k_a}{\alpha_a}; \quad k_b^* = \frac{k_b}{\alpha_b}.$$

Вводя эти соотношения в выражение (5.37), получим

$$\alpha_e = \frac{\alpha_a \alpha_1 / \alpha_{-1} + k_b \alpha_a \alpha_2 \alpha_1 / k_2 \alpha_b \alpha_{-1} + k_a \alpha_1 / k_{-1}}{1 + k_b/k_2 + k_a/k_{-1}}. \quad (5.38)$$

Отношение кинетических изотопных эффектов прямой и обратной реакции  $\alpha_a/\alpha_b$  равно термодинамическому изотопному эффекту, который в данном случае определяется отношением величин  $\beta$ -факторов S и P, т.е.

$$\frac{\alpha_a}{\alpha_b} = \frac{\beta_S}{\beta_P}. \quad (5.39)$$

Величины  $\alpha_2$  и  $\alpha_1$  представляют собой кинетические изотопные эффекты диссоциации фермент-субстратного комплекса. Вероятность физического распада комплекса, по-видимому, мало зависит от изотопного состава субстрата. Поэтому мы примем  $\alpha_2 = 1$  и  $\alpha_{-1} = 1$ .

В результате можно представить выражение (5.38) в следующем виде:

$$\alpha_e = \alpha_1 \left[ 1 + \frac{k_b/k_2}{1 + k_b/k_2 + k_a/k_{-1}} \left( \frac{\beta_S}{\beta_P} - 1 \right) + \frac{1}{1 + k_b/k_2 + k_a/k_{-1}} (\alpha_a - 1) \right]. \quad (5.40)$$

Множитель перед скобкой, описывающей термодинамический изотопный эффект, обозначим, как и прежде,  $\kappa$ :

$$\kappa = \frac{k_b/k_2}{1 + k_b/k_2 + k_a/k_{-1}}. \quad (5.41)$$

Величина  $\alpha_a$  — кинетический изотопный эффект превращения субстрата в продукт в фермент-субстратном комплексе. Множитель перед скобкой  $(\alpha_a - 1)$  обозначим  $\lambda$ :

$$\lambda = \frac{1}{1 + k_b/k_2 + k_a/k_{-1}}. \quad (5.42)$$

С этими обозначениями выражение (5.40) примет вид

$$\alpha_e = \alpha_1 \left[ 1 + \kappa \left( \frac{\beta_S}{\beta_P} - 1 \right) + \lambda(\alpha_a - 1) \right]. \quad (5.43)$$

Обратим внимание на соотношение  $\beta_S/\beta_P$ . Это изменит знак перед  $\kappa$ . Так как оба слагаемых (не считая единицы) в квадратных скобках в силу их физи-

ческого смысла значительно меньше единицы, то (5.43) можно преобразовать:

$$\alpha_e = \alpha_1 \left[ 1 - \kappa \left( \frac{\beta_p}{\beta_s} - 1 \right) \right] [1 + \lambda (\alpha_a - 1)]. \quad (5.44)$$

Первая квадратная скобка не что иное, как редуцированный термодинамический изотопный эффект системы субстрат–продукт в фермент–субстратном комплексе  $\alpha_k$  (см. выражение (5.18)). Вторая скобка – соответственно редуцированный кинетический изотопный эффект превращения субстрата в фермент–субстратном комплексе. Обозначим его  $\alpha_\lambda$ .

Таким образом, мы приходим к соотношению

$$\alpha_e = \alpha_1 \alpha_k \alpha_\lambda. \quad (5.45)$$

Из этого соотношения следует, что изотопный эффект ферментативной реакции в общем случае определяется произведением величин изотопного эффекта адсорбции субстрата на ферменте ( $\alpha_1$ ) редуцированного термодинамического ( $\alpha_k$ ) и редуцированного кинетического изотопного эффекта ( $\alpha_\lambda$ ).

Величина изотопного эффекта физической адсорбции субстрата на ферменте, по-видимому, незначительна и им можно пренебречь. Вероятно, эффект такого рода может иметь какое-то значение только для водорода вследствие образования водородных связей и больших, чем для других элементов, стерических различий в нормальной и изотопно-замещенной форме. Однако ввиду конформационной подвижности активного центра фермента вряд ли в случае водорода подобный эффект может быть заметным. Относительный вклад термодинамического и кинетического изотопного эффектов зависит от величин соответствующих редуцирующих множителей:  $\kappa$  и  $\lambda$ . Величины последних в свою очередь зависят от соотношения констант скоростей отдельных стадий процесса.

Как видно из выражений (5.41) и (5.42), для величин  $\kappa$  и  $\lambda$  существенными являются соотношения между  $k_b$  и  $k_2$  и между  $k_{-1}$  и  $k_2$ . При этом возможны следующие предельные случаи:

- 1) если  $k_b \ll k_2$  и  $k_a \gg k_{-1}$ , то  $\lambda \approx 0$  и  $\kappa \approx 0$ ;
- 2) если  $k_b \ll k_2$  и  $k_a \ll k_{-1}$ , то  $\lambda \approx 1$  и  $\kappa \approx 0$ ;
- 3) если  $k_b \gg k_2$  и  $k_a \ll k_{-1}$ , то  $\lambda \approx 0$  и  $\kappa \approx 1$ ;
- 4) если  $k_b \gg k_2$  и  $k_a \gg k_{-1}$ , то  $\lambda \approx 0$  и

$$\kappa \approx \frac{k_b/k_2}{k_b/k_2 + k_a/k_{-1}}. \quad (5.46)$$

Условие  $k_b \ll k_2$  при  $k_a \gg k_{-1}$  означает практическую необратимость последовательных стадий, вследствие чего изотопные эффекты (помимо  $\alpha_1$ ) не могут иметь места.

Максимальному проявлению кинетического изотопного эффекта отвечает второй случай, сочетающий условия  $k_b \ll k_2$  и  $k_a \ll k_{-1}$ . При этом процесс обратим на стадии образования фермент–субстратного комплекса, но переход  $S \rightarrow P$  практически необратим, так как скорость рас-

пада комплекса ЕР выше, чем скорость обратного перехода. Иначе говоря, времени жизни фермент-субстратного комплекса недостаточно для много-кратного  $S \rightleftharpoons P$  перехода. В этих условиях термодинамический изотопный эффект подавлен ( $\kappa = 0$ ). В то же время кинетический изотопный эффект редуцирован минимально.

В третьем и четвертом случае при выполнении условия  $k_b \gg k_2$ , на-против, кинетический изотопный эффект подавлен. Проявляется пре-имущественно термодинамический изотопный эффект. Сочетание условий  $k_b \gg k_2$  и  $k_a \gg k_{-1}$  соответствует ситуации, при которой обеспечен многократный  $S \rightleftharpoons P$  переход за время жизни фермент-субстратного комплекса. В последнем случае термодинамический изотопный эффект редуцирован на величину коэффициента  $\kappa$ , определяемого выражением (5.46).

Таким образом, в зависимости от конкретного содержания энзиматиче-ского процесса может проявляться как кинетический, так и термодинами-ческий характер изотопного эффекта либо оба эффекта в определенном сочетании.

Рассмотрим теперь другой предельный случай ферментативной реак-ции – случай с высокой концентрацией субстрата. Константа Михаэлиса численно равна концентрации субстрата, при которой скорость составляет половину максимальной. При выполнении условия  $K_m \ll S_0$  скорость реакции достигает максимума. Ввиду насыщения фермента она пере-стает зависеть от концентрации субстрата. Реакция приобретает первый порядок, и

$$v = V_{\max}, \quad (5.47)$$

следовательно, в соответствии с (5.28)

$$-\frac{d[S_0]}{dt} = \frac{k_2 k_a [E_T]}{k_2 + k_b + k_a}. \quad (5.48)$$

Величина изотопного эффекта реакции в этом случае определяется соотношением

$$\alpha_e = \frac{\alpha_2 \alpha_a (k_2/\alpha_2 + k_b/\alpha_b + k_a/\alpha_a)}{(k_2 + k_b + k_a)}. \quad (5.49)$$

Пренебрегая, как и в предыдущем случае, изотопным эффектом в процессе физической диссоциации фермент-субстратного комплекса ( $\alpha_2 = 1$ ), получим

$$\alpha_e = \left[ 1 - \frac{k_b/k_2}{1 + k_b/k_2 + k_a/k_2} \left( \frac{\beta_P}{\beta_S} - 1 \right) \right] \left[ 1 + \frac{1}{1 + k_b/k_2 + k_a/k_2} (\alpha_a - 1) \right]. \quad (5.50)$$

Выражение (5.50) в целом вполне аналогично выражению (5.40), за исключением отсутствия  $\alpha_1$  и тем, что место константы  $k_{-1}$  в выражениях для  $\kappa$  и  $\lambda$  заняла константа  $k_2$ . Однако мы уже раньше приняли  $\alpha_1 = 1$ . Замена константы  $k_{-1}$  на  $k_2$  не вносит принципиальных измене-ний в характер выражений для  $\kappa$  и  $\lambda$ . (Обе константы характеризуют

скорость диссоциации фермент-субстратного комплекса. Соотношение между  $k$  и  $\lambda$  и общая структура зависимости их от отношения констант скоростей остаются такими же, как и в предыдущем случае.

Поскольку выражения (5.40) и (5.50), отвечающие двум предельным случаям применения уравнения Михаэлиса–Ментен, близки, можно заключить, что выражение вида

$$\alpha_e = \left[ 1 - k \left( \frac{\beta_p}{\beta_s} - 1 \right) \right] [1 + \lambda(\alpha_a - 1)] \quad (5.51)$$

является достаточно общим для описания фракционирования изотопов в энзиматическом процессе.

Если кинетический изотопный эффект мал, а это происходит при условии  $k_b \gg k_2$ , т.е. при условии, что скорость обратимого перехода  $S \rightleftharpoons P$  выше, чем скорость распада комплекса, выражение (5.51) сводится к (5.18) и к (5.16). Последние как раз и были получены выше в предположении о существенной обратимости каталитической стадии.

Можно вычленить термодинамическую компоненту в выражении (5.51) и, переходя к значениям  $\delta$ , представить его в виде

$$\delta^{13}\text{C}_P = \delta^{13}\text{C}_{S_0} + k \left( \frac{\beta_p}{\beta_s} - 1 \right) \cdot 10^3 + \Delta_{\text{кин}}, \quad (5.52)$$

где  $\Delta_{\text{кин}}$  – кинетическая компонента изотопного эффекта.

То обстоятельство, что в природных биологических материалах мы обнаруживаем часто термодинамически упорядоченное распределение изотопов, говорит о том, что термодинамическая компонента энзиматического фракционирования изотопов имеет существенное значение во многих ферментных реакциях, протекающих в живых организмах.

Более того, экспериментальные данные указывают на то, что в большинстве случаев величина эмпирического коэффициента  $k$  близка к 0,5. Из теоретического выражения для редуцирующего множителя  $k$  (5.41) и (5.46) следует, что значение его, близкое к 0,5, отвечает случаю  $k_b/k_2 \gg 1$  и  $k_b/k_2 \approx k_a/k_{-1}$ . Следовательно, наблюдаемые значения коэффициента  $k$  указывают не только на обратимость каталитической стадии ферментной реакции, но и во многих случаях на ее симметричность в отношении диссоциации комплекса как в сторону образования продукта, так и в сторону высвобождения субстрата (последнее определяется отношением  $\frac{k_b}{k_2} / \frac{k_a}{k_{-1}}$ ).

Целесообразно ввести специальные обозначения, характеризующие эти свойства каталитической стадии:

$$\frac{k_b}{k_2} = g; \quad \frac{k_b}{k_2} / \frac{k_a}{k_{-1}} = \xi. \quad (5.53)$$

Полученные выше соотношения позволяют связать величину  $k$  с фундаментальными параметрами ( $V_{\max}$  и  $K_m$ ), характеризующими кинетику ферментативного процесса, с одной стороны, и параметрами, характеризующими каталитическую стадию ( $g$  и  $\xi$ ) – с другой.

Сопоставление (5.41) с (5.28) и (5.29) позволяет получить для величины  $\kappa$  следующее выражение ( $E_T = 1$  и  $K_m \gg S_0$ ):

$$\kappa = \frac{k_b}{k_2} \cdot \frac{k_{-1}}{k_a} \cdot \frac{1}{k_1}. \quad (5.54)$$

Принимая во внимание (5.53), получим

$$\kappa = \frac{\xi}{k_1} \cdot \frac{V_{\max}}{K_m}. \quad (5.55)$$

Величины редуцирующих множителей термодинамического и кинетического изотопного эффектов связаны между собой, как видно из (5.40) и (5.50), простым соотношением

$$\kappa = g\lambda. \quad (5.56)$$

Подставляя (5.55) и (5.56) в (5.51), получим

$$\alpha_e = \left[ 1 - \frac{\xi}{k_1} \frac{V_{\max}}{K_m} \left( \frac{\beta_p}{\beta_s} - 1 \right) \right] \left[ 1 + \frac{\xi}{g \cdot k_1} \frac{V_{\max}}{K_m} (\alpha_a - 1) \right]. \quad (5.57)$$

Выражение (5.57) определяет величину изотопного эффекта в зависимости от параметров, характеризующих ферментативный процесс. Из него следует также, что на основе сочетания кинетических и изотопных исследований можно подойти в принципе к анализу каталитической стадии ферментативной реакции.

### ИЗОТОПНЫЙ ЭФФЕКТ ПЕРЕНОСА

Помимо химического превращения, в организмах происходит перенос вещества. Прохождение вещества через межклеточные и внутриклеточные мембранны может сопровождаться разделением изотопов, причиной которого является различие подвижностей изотопных форм соединения.

Разделение изотопов в этом случае чаще всего пропорционально отношению коэффициентов диффузии изотопных форм. Выражение для последних содержит корень квадратный из масс диффундирующих молекул. Поэтому соответствующий коэффициент разделения изотопов выразится соотношением

$$\alpha = \sqrt{\frac{M}{M^*}}.$$

В реальном процессе изотопный эффект зависит от соотношения скоростей прямой и обратной диффузии, от наличия и величины активационных барьеров в процессе переноса, от наличия конкурирующих процессов переноса вещества в потоке и в комплексе с другими соединениями, от наличия межмолекулярных связей и других факторов. В совокупности они осложняют численную оценку величины изотопного эффекта, связанного с процессом переноса.

Фракционирование изотопов при установившемся потоке через объем, ограниченный мембранными и содержащими внутренние перегородки

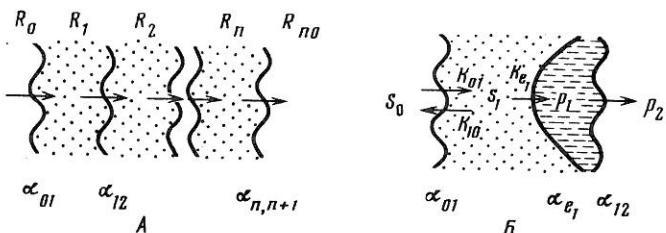


Рис. 5.1. К иллюстрации изотопных эффектов переноса

*A* – при прохождении потока вещества через последовательные фракционирующие мембранны; *B* – при прохождении через ячейку, в которой осуществляется его химическое превращение

(рис. 5.1, *A*), определяется соотношениями

$$R_1 = R_0 \frac{\alpha_{12}}{\alpha_{01}}; \quad R_2 = R_0 \frac{\alpha_{23}}{\alpha_{01}}; \quad R_n = R_0 \frac{\alpha_{n,n+1}}{\alpha_{01}}; \quad R_{n+1} = R_0 \frac{1}{\alpha_{01}}, \quad (5.58)$$

где  $R_0$  – изотопный состав вещества в среде до поступления в объем, ограниченный мембраной,  $R_n$  – изотопный состав вещества в элементарных ячейках, ограниченных мембранными,  $R_{n+1}$  – изотопный состав вещества, выделяемого во внешнюю среду,  $\alpha_{n,n+1}$  – коэффициент разделения на ( $n+1$ )-й мембране.

Как видно из (5.58), при установившемся потоке фракционирование изотопов между поступающим и выделяющимся веществом определяется величиной коэффициента однократного разделения изотопов  $\alpha_{01}$  независимо от числа внутренних мембранных.

Изотопный состав вещества в данной ячейке по сравнению с предшествующей определяется отношением коэффициентов разделения на входе ( $\alpha_{n-1,n}$ ) и на выходе ( $\alpha_{n,n+1}$ ) ячейки:

$$R_n = R_{n-1} \frac{\alpha_{n-1,n}}{\alpha_{n,n+1}}.$$

Если коэффициенты разделения изотопов на входе и выходе равны, что можно предположить для многих случаев, изотопный состав вещества в данной ячейке не должен отличаться от предшествующей. Если это условие можно распространить на ту или иную совокупность ячеек, то изотопное распределение в соответствующей многоклеточной структуре не должно зависеть от эффектов переноса.

Однако в общем случае разделение изотопов в процессе поступления и выноса вещества может быть неодинаковым. Причина может состоять в следующем: а) в различном механизме прямого и обратного прохождения через стенку: например, поступление осуществляется путем диффузии, а выделение – дискретными порциями или через высоко-проницаемый контакт; б) в различии форм переноса; например, привнос в виде комплексов, вынос – в свободном состоянии; в) в изменении химической формы соединения в результате прохождения химической реакции в рассматриваемом объеме и, как следствие этого, изменения

диффузионных свойств вещества и относительной разницы в массах его изотопных форм.

Если  $\alpha_{n-1,n}$  не равно  $\alpha_{n,n+1}$ , то имеет место некоторый результирующий изотопный эффект:

$$\alpha_{TR} = \frac{\alpha_{n-1,n}}{\alpha_{n,n+1}}$$

Практический интерес представляет случай, когда субстрат поступает к месту реакции через мембрану, подвергается превращению и продукт вновь выделяется через мембрану (см. рис. 5.1, Б).

Нетрудно видеть, что в этом случае изотопный состав выделенного продукта  $R_{P_2}$  будет связан с изотопным составом субстрата  $R_{S_0}$  до его поступления в ячейку соотношением

$$R_{P_2} = R_{S_0} \frac{(k_{10} + k_e)}{\alpha_{01}\alpha_{e_1}(k_{10}/\alpha_{10} + k_e/\alpha_e)}. \quad (5.59)$$

Как следует из выражения (5.59), разделение изотопов между выделенным продуктом и потребляемым веществом зависит от соотношения констант скоростей, характеризующих циркуляцию потребляемого вещества через мембрану ( $k_{10}$ ), и химическое превращение его ( $k_{e_1}$ ). Возможны два предельных случая.

1.  $k_{e_1} \gg k_{10}$ .

Применение этого условия к выражению (5.59) дает соотношение

$$R_{P_2} = R_{S_0} \frac{1}{\alpha_{01}}. \quad (5.60)$$

Следовательно, при больших скоростях превращения изотопный эффект определяется лишь разделением изотопов на мембране. Изотопный эффект химического превращения удаляется.

2.  $k_{e_1} \ll k_{10}$ .

В этом случае получаем

$$R_{P_2} = \frac{\alpha_{10}}{\alpha_{01}\alpha_{e_1}} R_{S_0}$$

или

$$R_{P_2} = \frac{R_{S_0}}{\alpha_{TR}\alpha_e}. \quad (5.61)$$

Из полученного соотношения следует, что при достаточно интенсивном обмене вещества через мембрану (по сравнению со скоростью его химического превращения) изотопный эффект зависит от произведения коэффициентов разделения, характеризующих фракционирование изотопов как в процессе переноса, так и в собственно химической реакции:

$$\alpha_{\text{сум}} = \alpha_e \alpha_{TR} = \alpha_k \alpha_\lambda \alpha_{TR}. \quad (5.62)$$

Переходя к обозначениям изотопного состава в значениях  $\delta$  и принимая

$$-\Delta_{TR} = (\alpha_{TR} - 1) \cdot 10^3,$$

получим общую формулу в виде

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{P}_2} = \delta^{13}\text{C}_{\text{S}_0} + \kappa \left( \frac{\beta_{\text{P}}}{\beta_{\text{S}}} - 1 \right) \cdot 10^3 + \Delta_{\text{кин}} + \Delta_{\text{TR}}. \quad (5.63)$$

Таким образом, если биохимическая реакция сопряжена с переносом вещества через клеточную стенку или мембрану, формула биологического фракционирования должна быть дополнена членом, учитывающим возможный изотопный эффект в процессе переноса.

#### ЗАМЕЧАНИЕ К МЕТОДИКЕ КИНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

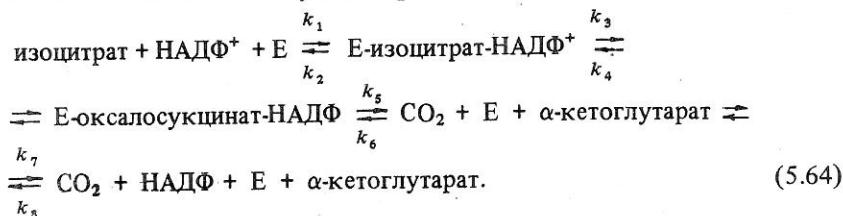
В. Клеланд, М. Шимерлик и другие исследователи [3–7] развили в последние годы методику оценки относительных скоростей реакций отдельных стадий ферментативного процесса на основе изучения изотопных эффектов.

Существо используемой методики состоит в следующем. Рассматривается некоторая модель процесса, описываемая определенным соотношением констант скоростей протекания отдельных стадий. Предполагается, что на одной из стадий имеет место изотопный эффект. Исходит из того, что эффект – кинетический. В зависимости от того, как соотносятся между собой скорость-лимитирующая и эффект-задающая стадии, наблюдаемый изотопный эффект окажется заниженным в той или иной степени. Мера занижения зависит от соотношения соответствующих констант скоростей. В конечном счете, варьируя обстоятельства эксперимента и анализируя результаты, можно прийти к заключению относительно лимитирующей стадии исследуемого процесса.

Таким образом, метод В. Клеланда и других представляет собой обратную задачу для изотопного эффекта в цепях превращения.

Этот метод, являющийся плодотворным по своей идеи, содержит, однако, ту неопределенность, что величина реального (нередуцированного) изотопного эффекта, присущего исследуемой стадии, остается неизвестной.

Рассмотрим в качестве примера одну из работ этого типа. М.О'Лерри и Дж. Лимбург [4] исследовали изотопный эффект окислительного декарбоксилирования изолимонной кислоты. НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа катализирует окислительное декарбоксилирование изолимонной кислоты до  $\alpha$ -кетоглутаровой в присутствии иона двухвалентного металла по следующей предполагаемой схеме:



Система была спарена с глутаматдегидрогеназой в присутствии  $\text{NH}_3$  для того, чтобы обеспечить необратимость реакции и регенерировать НАДФ<sup>+</sup>.

Связь изотопного эффекта, наблюдавшегося при энзиматическом декарбоксилировании, с механизмом записанной выше реакции дается [4] при помощи уравнений:

$$\frac{k_5^{1^2}}{k_5^{1^3}} \text{ (набл)} = \frac{k_5^{1^2}/k_5^{1^3} + R_1}{1 + R_1}, \quad (5.65)$$

$$R_1 = \frac{k_5}{k_4} \left[ 1 + \frac{k_3}{k_2} \right]. \quad (5.66)$$

Авторы цитируемой работы предположили, что  $k_5^{1^2}/k_5^{1^3} = 1,03 - 1,06$  и что только эта стадия показывает существенный изотопный эффект. Они также приняли, что взаимодействие энзим-нуклеотид- $\alpha$ -кетоглутаратата с  $\text{CO}_2$  отсутствует, т.е.  $k_6 = 0$  в условии эксперимента. Фактор  $R_1$  равен отношению скорости декарбоксилирования к скорости обратной реакции для энзим-оксалосукцинат-НАДФ-комплекса.

Прежде всего отметим, что при условии  $k_6 = 0$  (принято в [4]) возникает формальная аналогия между приведенной выше схемой ферментативной реакции окислительного декарбоксилирования изолимонной кислоты и исследованной нами моделью ферментативной реакции (5.21). Индексы соответствующих констант:  $k_1 (k_1)$ ;  $k_2 (k_{-1})$ ;  $k_3 (k_a)$ ;  $k_4 (k_b)$ ;  $k_5 (k_2)$ . В скобках указаны константы с индексами, принятыми в уравнении (5.21).

Преобразуем соотношения, приведенные в статье М.О'Лерри и Дж. Лимбурга [4], к виду, удобному для сравнения с соотношением, выведенным для процесса (5.21):

$$\begin{aligned} \frac{k_5^{1^2}}{k_5^{1^3}} \text{ (набл)} &= \frac{k_5^{1^2}/k_5^{1^3} + k_5/k_4 (1 + k_3/k_2)}{1 + k_5/k_4 (1 + k_3/k_2)} = \\ &= \frac{k_5^{1^2}/k_5^{1^3} \cdot k_4/k_5 + 1 + k_3/k_2}{k_4/k_5 + 1 + k_3/k_2}. \end{aligned} \quad (5.67)$$

Заменив индексы констант, получим

$$\alpha_{\text{набл}} = \frac{1 + k_b/k_2 \alpha_2 + k_a/k_{-1}}{1 + k_b/k_2 + k_a/k_{-1}}.$$

Это выражение по форме аналогично соотношению (5.38). Его можно преобразовать далее к виду

$$\alpha_{\text{набл}} = 1 + \frac{k_b/k_2}{1 + k_b/k_2 + k_a/k_{-1}} (\alpha_2 - 1). \quad (5.68)$$

Из сопоставления соотношения (5.68) с соотношением (5.40), описывающим фракционирование изотопов в рассмотренной нами модели, видно, что в (5.68) отсутствует существенно важный член, отвечающий термодинамическому изотопному эффекту ферментативного процесса.

Заметим, что коэффициент  $\alpha_2$  в выражении (5.68) играет роль  $\alpha_a$  в (5.40). Это объясняется отнесением кинетического изотопного эффекта к различным стадиям в схеме (5.21) и (5.64).

Формулы (5.65) и соответственно (5.68) — не полны вследствие изначального постулирования чисто кинетического характера изотопного эффекта ферментативной реакции. Представляется, что выведенные выше формулы (5.40) и (5.57) могут послужить более корректной основой изотопного метода изучения кинетики ферментативных реакций.

### ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ИЗОТОПОВ ПРИ ИЗМЕНЯЮЩИХСЯ ОБЪЕМАХ СУБСТРАТА И ПРОДУКТА

При выводе формул предшествующего раздела изотопный состав исходного субстрата рассматривался как неизменный. В действительности изотопный состав субстрата будет со временем изменяться. По мере накопления продукта, субстрат, благодаря энзиматическому изотопному эффекту, будет все более обогащаться тем изотопом, которым обогащается продукт.

Это обстоятельство должно быть учтено введением в соответствующие формулы фактора времени или некоторой другой координаты, определяющей развитие процесса во времени, например степени завершенности реакции.

В общем случае изменение изотопных составов описывается дифференциальными соотношениями. Последние для различных типов процессов достаточно подробно исследованы в общей химии изотопов. Если процесс происходит таким образом, что накопление продукта сопровождается последовательным исчерпыванием субстрата, то соотношение изотопных составов субстрата  $R_S$  и продукта  $R_P$  определяется соотношением [1]

$$\frac{1}{\alpha_e} = \frac{\ln(1 - R_P/R_S \cdot f)}{\ln(1 - f)}, \quad (5.69)$$

где  $f$  — координата процесса, которая в данном случае охарактеризована долей превращенного субстрата.

Выражение (5.69) можно преобразовать к виду

$$\frac{R_P}{R_{S_0}} = \frac{1}{f} [1 - (1 - f)^{1/\alpha_e}]. \quad (5.70)$$

Член  $\frac{1}{f} [1 - (1 - f)^{1/\alpha_e}]$  ведет себя следующим образом. В начале процесса, когда  $f$  близко к нулю, он стремится к значению  $1/\alpha_e$ .

Таким образом, в начальный момент соотношения изотопных составов продукта и субстрата определяются величиной коэффициента разделения

$$\frac{R_P(t=0)}{R_{S_0}} = \frac{1}{\alpha_e}. \quad (5.71)$$

В момент, когда реакция близка к завершению, т.е.  $f \rightarrow 1$ , величина

$\frac{1}{f} [1 - (1-f)^{1/\alpha_e}]$  приближается к единице. Следовательно,

$$R_{P(t=0)} = R_{S_0}, \quad (5.72)$$

т.е. при исчерпании субстрата, когда значительная часть его преобразована в продукт, изотопный состав последнего приближается к изотопному составу исходного субстрата. Результирующее разделение изотопов в этом случае отсутствует.

В промежуточные моменты разделение изотопов меньше описываемого соотношением (5.71).

В значениях  $\delta$  выражение (5.70) приобретает следующую запись:

$$\delta^{13}C_P = \delta^{13}C_{S_0} + \left\{ \frac{1}{f} [1 - (1-f)^{1/\alpha_e}] - 1 \right\} \cdot 10^3, \% . \quad (5.73)$$

Так как  $\alpha$  – величина, близкая к 1 (за исключением изотопных эффектов по водороду), то, представив выражение (5.51) в виде

$$\frac{1}{\alpha_e} = \left[ \kappa \left( \frac{\beta_P}{\beta_S} - 1 \right) + 1 \right] \frac{1}{\alpha_\lambda},$$

можно записать

$$\delta^{13}C_P = \delta^{13}C_{S_0} + \mu(f) \kappa \left( \frac{\beta_P}{\beta_S} - 1 \right) + \mu(f) \Delta_{\text{кин}}, \quad (5.74)$$

где  $\mu(f)$  – некоторый коэффициент  $0 \leq \mu \leq 1$ , зависящий от  $f$ :  $\mu = 0$  при  $f = 1$  и  $\mu = 1$  при  $f = 0$ .

Из этого следует, что нестационарный характер процесса оказывает влияние на величину редуцирующих множителей энзиматического фракционирования изотопов, приводя к занижению их.

Подобный случай может встретиться при некоторых биохимических реакциях в живом организме, если процесс протекает с интенсивным потреблением субстрата так, что его убыль не успевает компенсироваться поступлением его в зону реакции.

В качестве следующего приближения к реальному процессу в организме целесообразно рассмотреть модель, в соответствии с которой убыль субстрата непрерывно возмещается синтезом новых порций субстрата так, что объем последнего остается постоянным.

Этот случай отвечает известной в химии изотопов модели разделения изотопов в процессе "перегонки с постоянным уровнем", для которой известно следующее соотношение [1]

$$\ln \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha - N/N_0} \right) = \frac{V}{\alpha V_0}, \quad (5.75)$$

где  $\alpha$  – коэффициент разделения изотопов (отношение доли тяжелого изотопа в исходном объеме к доле тяжелого изотопа в отгоне),  $N_0$  – содержание тяжелого изотопа в исходном объеме (или, что то же самое, в веществе, поступающем извне),  $N$  – текущее содержание тяжелого

изотопа в исходном объеме,  $V_0$  – исходный объем вещества, поддерживаемый на постоянном уровне,  $V$  – перегнанный объем (объем испарившегося, прореагировавшего и т.п. вещества).

Выражение (5.75) удобно преобразовать к следующему виду, заменяя использованные символы на их смысловые аналоги применительно к ферментативной реакции:

$$\frac{R_P}{R_{S_0}} = (\alpha_e - 1) \left( 1 - e^{-[P]/[S_0]} \right) + 1. \quad (5.76)$$

В значениях  $\delta$  оно примет следующий вид, если ограничиться термодинамической компонентой экзиматического изотопного эффекта:

$$\delta^{13}C_P = \delta^{13}C_{S_0} + \kappa e^{-[P]/[S]} \left( \frac{\beta_P}{\beta_S} - 1 \right) \cdot 10^3, \text{ ‰}. \quad (5.77)$$

Анализ этого выражения показывает, что в зависимости от соотношения концентраций продукта и субстрата видимое значение редуцирующего множителя, как и в предыдущем случае, изменяется от 1 до 0. Если  $[P] \ll [S_0]$ , то фракционирование изотопов определяется величиной коэффициента разделения, если же количество образовавшегося продукта превосходит количество субстрата, изотопный состав продукта приближается к исходному составу субстрата. Таким образом, описание фракционирования изотопов вновь сводится к формуле типа (5.74).

Модель "перегонки с постоянным уровнем", учитывающая постоянство объема субстрата при неограниченном росте объема продукта, может иметь значение в некоторых частных случаях, например, если происходит существенный по объему и интенсивный биосинтез некоторых компонентов.

### МОДЕЛЬ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ ИЗОТОПОВ В МЕТАБОЛИЧЕСКИ СВЯЗАННОЙ СИСТЕМЕ ФЕРМЕНТНЫХ РЕАКЦИЙ

До сих пор речь шла о фракционировании изотопов в изолированной ферментной системе, но, как указывает А. Ленинджер, "почти все метаболические реакции связаны между собой, поскольку продукт одной ферментативной реакции служит субстратом другой реакции, которая является следующим этапом данного процесса. Существование такой преемственности обусловливается специфическими особенностями ферментов" [2, с. 321].

В живом организме процессы анаболизма уравновешены процессами катаболизма. Поэтому концентрации промежуточных метаболитов в известных пределах можно рассматривать как неизменные. Многие метаболические пути взаимосвязаны так, что метка, введенная в некоторое соединение, может быть через некоторое время обнаружена в непосредственном предшественнике этого соединения. Обобщенная модель подобного процесса изображена на рис. 5.2. На рис. 5.2 показана схема идеализированной метаболической системы, которая включает наряду с прямым путем последовательных превращений промежуточных мета-

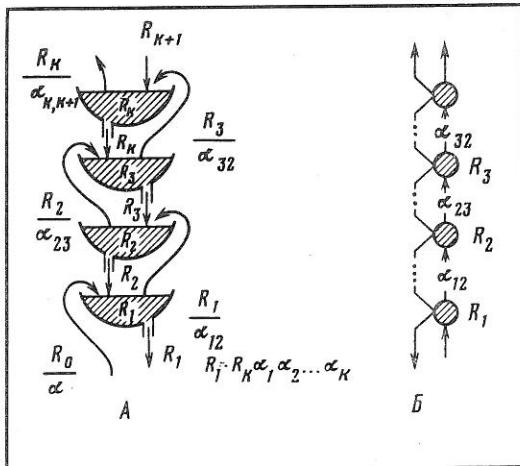


Рис. 5.2. К аналогии между фракционированием изотопов в идеальной метаболической системе (Б) и во фракционной колонке (А)

болитов (сопровождаемых изотопными эффектами  $\alpha_{12}$ ,  $\alpha_{23}$  и т.д.) обратные пути превращения от продуктов к предшественникам.

Сопоставляя эту модель с известными механизмами разделения изотопов, нетрудно увидеть, что в интересующем нас смысле существует принципиальная аналогия между процессом метаболизма и процессом, происходящим на фракционной колонке. В стационарном состоянии объем вещества на каждой "тарелке" фракционной колонки остается постоянным, причем характерной чертой работы фракционной колонки является обратный "слив" [1].

Как известно, отношение изотопных составов веществ между любыми двумя "тарелками" колонки в стационарном режиме определяется произведением коэффициентов разделения изотопов всех разделительных стадий между рассматриваемыми тарелками. В применении к биологическим системам это означает, что различие в изотопном составе любых двух метаболитов (1-го и  $k$ -го), относящихся к данному метаболическому пути, будет определяться произведением коэффициентов разделения изотопов всех промежуточных ферментативных реакций на пути их биосинтеза:

$$\frac{R_k}{R_1} = \alpha_{1,2}^{-1} \alpha_{2,3}^{-1} \dots \alpha_{k-1,k}^{-1} = \prod_{i=1}^{k-1} \alpha_{i,i+1}^{-1}. \quad (5.78)$$

Коэффициент энзиматического фракционирования на каждом этапе определяется произведением термодинамической и кинетической компоненты изотопного эффекта:

$$\alpha_{e(k-1,k)} = \alpha_{\kappa(k-1,k)} \alpha_{\lambda(k-1,k)}. \quad (5.79)$$

В случае, если ферментативному процессу предшествует процесс переноса вещества, например, через клеточную мембрану, коэффициент энзи-

матического фракционирования  $\alpha_e$  должен быть умножен на величину изотопного эффекта переноса.

Таким образом

$$\frac{R_k}{R_1} = \prod_{i=1}^{k-1} \alpha_{\kappa(i,i+1)}^{-1} \prod_{i=1}^{k-1} \alpha_{\lambda(i,i+1)}^{-1} \prod_{i=1}^{k-1} \alpha_{TR(i,i+1)}^{-1}. \quad (5.80)$$

Термодинамическая компонента изотопного эффекта между углеродом продукта  $P_k$  и непосредственно предшествующим ему углеродом продукта  $P_{k-1}$  выразится, как было показано выше, соотношением

$$\alpha_{\kappa(k-1,k)} = -\kappa_{k-1,k} \left( \frac{\beta_k}{\beta_{k-1}} - 1 \right) + 1 \quad (5.81)$$

или

$$\alpha_{\kappa(k-1,k)}^{-1} = -\kappa_{k-1,k} \left( \frac{\beta_{k-1}}{\beta_k} - 1 \right) + 1.$$

Последнему соотношению можно придать следующий вид:

$$\alpha_{\kappa(k-1,k)}^{-1} = \frac{\beta_{k-1}}{\beta_k} \left[ 1 + (1 + \kappa_{k-1,k}) \left( \frac{\beta_k}{\beta_{k-1}} - 1 \right) \right]. \quad (5.82)$$

Соответственно

$$\prod_{i=1}^{k-1} \alpha_{\kappa(i,i+1)}^{-1} = \prod_{i=1}^{k-1} \frac{\beta_i}{\beta_{i+1}} \prod_{i=1}^{k-1} \left[ 1 + (1 + \kappa_{i,i+1}) \left( \frac{\beta_{i+1}}{\beta_i} - 1 \right) \right]. \quad (5.83)$$

Правая часть полученного выражения (5.83) представлена двумя произведениями. Первое из них сводится просто к соотношениям  $\beta$ -факторов 1-го и  $k$ -го углерода:

$$\prod_{i=1}^{k-1} \frac{\beta_i}{\beta_{i+1}} = \frac{\beta_1}{\beta_2} \frac{\beta_2}{\beta_3} \cdots \frac{\beta_{k-2}}{\beta_{k-1}} \frac{\beta_{k-1}}{\beta_k} = \frac{\beta_1}{\beta_k}. \quad (5.85)$$

Во втором произведении квадратная скобка для каждого значения  $i$  близка к 1 (это условие выполняется для изотопных эффектов по углероду и более тяжелых атомов). Исходя из этого, произведение можно выразить через сумму:

$$\prod_{i=1}^{k-1} \left[ 1 + (1 + \kappa_{i,i+1}) \left( \frac{\beta_{i+1}}{\beta_i} - 1 \right) \right] = 1 + \sum_{i=1}^{k-1} (1 + \kappa_{i,i+1}) \left( \frac{\beta_{i+1}}{\beta_i} - 1 \right). \quad (5.85)$$

Следовательно,

$$\prod_{i=1}^{k-1} \alpha_{\kappa(i,i+1)}^{-1} = \frac{\beta_1}{\beta_k} \left[ 1 + \sum_{i=1}^{k-1} (1 + \kappa_{i,i+1}) \left( \frac{\beta_{i+1}}{\beta_i} - 1 \right) \right]. \quad (5.86)$$

Представим величину  $\kappa_{i,i+1}$ , которая в принципе может быть различна для каждого элементарного акта биосинтеза, в виде

$$\kappa_{i,i+1} = \bar{\kappa} + \Delta \kappa_{i,i+1}, \quad (5.87)$$

где  $\bar{\kappa}$  — некоторое усредненное значение коэффициента, а  $\Delta \kappa_{i,i+1}$  — отклонение от него.

Перепишем (5.86) с учетом (5.87) :

$$\begin{aligned} \prod_{i=1}^{k-1} \alpha_{\kappa}^{-1}(i, i+1) &= \frac{\beta_1}{\beta_k} \left[ 1 + (1 + \bar{\kappa}) \sum_{i=1}^{k-1} \left( \frac{\beta_{i+1}}{\beta_i} - 1 \right) \right] + \\ &+ \frac{\beta_1}{\beta_k} \sum_{i=1}^{k-1} \Delta \kappa_{i, i+1} \left( \frac{\beta_{i+1}}{\beta_i} - 1 \right). \end{aligned} \quad (5.88)$$

Пользуясь тем, что под знаком  $\sum_{i=1}^{k-1}$  в квадратной скобке производится суммирование величин, составляющих малую долю от единицы, представим соответствующую сумму через произведение:

$$\sum_{i=1}^{k-1} \left( \frac{\beta_{i+1}}{\beta_i} - 1 \right) = \prod_{i=1}^{k-1} \frac{\beta_{i+1}}{\beta_i} - 1. \quad (5.89)$$

Произведение в правой части сводится к отношению  $\beta_k/\beta_1$ :

$$\prod_{i=1}^{k-1} \frac{\beta_{i+1}}{\beta_i} - 1 = \frac{\beta_k}{\beta_1} - 1. \quad (5.90)$$

Подставляя (5.89) в формуле (5.90) в выражение (5.88), получим

$$\begin{aligned} \prod_{i=1}^{k-1} \alpha_{\kappa}^{-1}(i, i+1) &= \frac{\beta_1}{\beta_k} \left[ 1 + (1 + \bar{\kappa}) \left( \frac{\beta_k}{\beta_1} - 1 \right) \right] + \\ &+ \frac{\beta_1}{\beta_k} \sum_{i=1}^{k-1} \Delta \kappa_{i, i+1} \left( \frac{\beta_{i+1}}{\beta_i} - 1 \right). \end{aligned} \quad (5.91)$$

Первый член в правой части этого выражения имеет структуру величины  $\alpha_{\kappa}$  как в соотношении (5.82). Отсюда

$$\prod_{i=1}^{k-1} \alpha_{\kappa}^{-1}(i, i+1) = -\bar{\kappa} \left( \frac{\beta_1}{\beta_k} - 1 \right) + 1 + \frac{\beta_1}{\beta_k} \sum_{i=1}^{k-1} \Delta \kappa_{i, i+1} \left( \frac{\beta_{i+1}}{\beta_i} - 1 \right). \quad (5.92)$$

Последний член выражения (5.92) плюс 1 вновь представим в виде произведения:

$$\prod_{i=1}^{k-1} \alpha_{\kappa}^{-1}(i, i+1) = -\bar{\kappa} \left( \frac{\beta_1}{\beta_k} - 1 \right) + \frac{\beta_1}{\beta_k} \prod_{i=1}^{k-1} \left[ \Delta \kappa_{i, i+1} \left( \frac{\beta_{i+1}}{\beta_i} - 1 \right) + 1 \right]. \quad (5.93)$$

Вернемся к исходному выражению (5.80) :

$$\begin{aligned} \frac{R_k}{R_1} &= \left\{ -\bar{\kappa} \left( \frac{\beta_1}{\beta_k} - 1 \right) + \frac{\beta_1}{\beta_k} \prod_{i=1}^{k-1} \left[ \Delta \kappa_{i, i+1} \left( \frac{\beta_{i+1}}{\beta_i} - 1 \right) + 1 \right] \right\} \times \\ &\times \prod_{i=1}^{k-1} \alpha_{\lambda}^{-1}(i, i+1) \prod_{i=1}^{k-1} \alpha_{TR}^{-1}(i, i+1). \end{aligned} \quad (5.94)$$

Применяя правило преобразования произведения в сумму, развернем

выражение (5.94) в следующей форме:

$$\begin{aligned} \frac{R_k}{R_1} = & -\bar{\kappa} \left( \frac{\beta_1}{\beta_k} - 1 \right) - \left\{ \sum_{i=1}^{k-1} [(\alpha_{\lambda(i,i+1)}^{-1} - 1) + (\alpha_{TR(i,i+1)}^{-1} - 1)] + \right. \\ & + \sum_{i=1}^{k-1} (\alpha_{\lambda(i,i+1)}^{-1} - 1) \sum_{i=1}^{k-1} (\alpha_{TR(i,i+1)}^{-1} - 1) \left. \right\} \bar{\kappa} \left( \frac{\beta_1}{\beta_k} - 1 \right) + \\ & + \frac{\beta_1}{\beta_k} \prod_{i=1}^{k-1} \left[ \Delta \kappa_{i,i+1} \left( \frac{\beta_{i+1}}{\beta_i} - 1 \right) + 1 \right] \alpha_{\lambda(i,i+1)}^{-1} \alpha_{TR(i,i+1)}^{-1}. \quad (5.95) \end{aligned}$$

Второй член в правой части — малая второго порядка по сравнению с первым членом. Поэтому им можно пренебречь либо учесть путем соответствующего изменения величины  $\bar{\kappa}$  в первом члене. Последний член вновь представим в виде суммы:

$$\begin{aligned} \frac{R_k}{R_1} = & -\bar{\kappa} \left( \frac{\beta_1}{\beta_k} - 1 \right) + 1 + \frac{\beta_1}{\beta_k} \sum_{i=1}^{k-1} \left\{ \Delta \kappa_{i,i+1} \left( \frac{\beta_{i+1}}{\beta_i} - 1 \right) + 1 + \right. \\ & \left. + (\alpha_{\lambda(i,i+1)}^{-1} - 1) + (\alpha_{TR(i,i+1)}^{-1} - 1) \right\}. \quad (5.96) \end{aligned}$$

Учитывая, что

$$\frac{R_k}{R_1} = (\delta^{13}\text{C}_k - \delta^{13}\text{C}_1) \cdot 10^{-3} + 1$$

и переходя к величинам  $\delta^{13}\text{C}$ , получим

$$\begin{aligned} \delta^{13}\text{C}_1 - \delta^{13}\text{C}_k = & \bar{\kappa} \left( \frac{\beta_1}{\beta_k} - 1 \right) \cdot 10^3 - \\ & - \frac{\beta_1}{\beta_k} \sum_{i=1}^{k-1} \left\{ \Delta \kappa_{i,i+1} \left( \frac{\beta_{i+1}}{\beta_i} - 1 \right) + \right. \\ & \left. + [\alpha_{\lambda(i,i+1)}^{-1} - 1] + [\alpha_{TR(i,i+1)}^{-1} - 1] \right\} \cdot 10^3. \quad (5.97) \end{aligned}$$

Обозначим второй член в выражении (5.97) через  $\Delta$ . В зависимости от соотношения образующих его величин он может иметь как положительный, так и отрицательный знак. В конечном итоге имеем соотношение

$$\delta^{13}\text{C}_1 - \delta^{13}\text{C}_k = \bar{\kappa} \left( \frac{\beta_1}{\beta_k} - 1 \right) \cdot 10^3 \pm |\Delta|. \quad (5.98)$$

Таким образом, различие в изотопном составе между любыми двумя атомами углерода можно выразить как сумму двух членов. Первый член представляет собой величину редуцированного термодинамического изотопного эффекта, выраженную через отношение термодинамических изотопных факторов сравниваемых компонентов и усредненную вели-

чину  $\bar{k}$ . Второй член характеризует величину отклонения наблюдаемого изотопного эффекта от чисто термодинамического и включает алгебраическую сумму отклонений, обусловленных отличием действительных значений  $k_{i,i+1}$  от среднего значения  $\bar{k}$ , а также алгебраическую сумму кинетических изотопных эффектов и эффектов переноса на пути, разделяющем биосинтез 1-го и  $k$ -го углерода.

Полученные соотношения, как увидим дальше, создают основу для понимания происхождения внутримолекулярных изотопных эффектов в биомолекулах и наблюдаемых в биологических системах корреляций между величинами  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\beta_\Sigma$ .

Следует отметить, что при выводе теоретических соотношений в этом разделе не использовалось условий, которые были бы специфично присущи только изотопии углерода. Поэтому, хотя в силу соображений, которые уже приводились, удобно вести изложение по отношению к конкретному элементу, и удобнее всего это делать именно на примере углерода, нет оснований ограничивать справедливость полученных соотношений только изотопией этого элемента. Очевидно, там, где употреблены символы  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\beta^{13}\text{C}$ , могут быть употреблены соответственно символы  $\delta^{18}\text{O}$  и  $\beta^{18}\text{O}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$  и  $\beta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{34}\text{S}$  и  $\beta^{34}\text{S}$ . В некоторых случаях возможны специфические каналы фракционирования. Водород и кислород в некоторых случаях, вероятно, могут обменивать изотопы с водой помимо ферментативных реакций. Для водорода могут играть роль изотопные эффекты, связанные с туннельным просачиванием. Больше чем для других элементов относительные различия в массах протия и дейтерия могут обусловить изотопные эффекты, вызванные физиологической неравнозначностью изотопных форм молекул, содержащих эти изотопы. Некоторые преобразования выше делались при допущении, что величина  $\alpha$  близка к единице. Однако в случае больших изотопных эффектов, что особенно характерно для изотопных эффектов по водороду, это допущение становится неудовлетворительным. Еще одно ограничение, которое необходимо иметь в виду связано с тем, что при выводе ряда теоретических соотношений один из изотопов рассматривался как редкий по сравнению с другим.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бродский А.И. Химия изотопов. М.: Изд-во АН СССР, 1957.
2. Ленинджер А. Биохимия. М.: Мир, 1974.
3. Cleland W.W. Partition analysis and the concept of net rate constants as tools in enzyme kinetics. — Biochemistry, 1975, 14, N 14, p. 3220.
4. O'Leary H., Ltimburg J.A. Isotope effect studies of the role of metall ions in isocitrate dehydrogenase. — Biochemistry, 1977, 16, N 6, p. 1129.
5. Northrop D.B. Steady-state analysis of kinetic isotope effects in enzymic reactions. — Biochemistry, 1975, 14, N 12, p. 2644.
6. Shimerlik M., Grimshaw C.E., Cleland W.W. Determination of the rate-limiting steps for malic enzyme by the use of isotope effects and other kinetic studies. — Biochemistry, 1977, 16, N 4, p. 571.
7. Schimerlink M., Rife J.E., Cleland W.W. Equilibrium perturbation by isotope substitution. — Biochemistry, 1975, 14, N 24, p. 5347.

## Глава VI

### ОБЪЯСНЕНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ БИОЛОГИЧЕСКОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ИЗОТОПОВ В РАМКАХ ПРЕДЛОЖЕННОЙ ТЕОРИИ

#### КОРРЕЛЯЦИЯ $\delta^{13}\text{C} - \beta_{\Sigma}^{13}\text{C}$

Основное экспериментальное наблюдение, заставившее заново поставить вопрос о происхождении биологических изотопных эффектов, состоит в существовании корреляций между величинами  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\beta^{13}\text{C}$ , которые были обнаружены для многих биологических систем.

Соответствие реального изотопного распределения величинам термодинамических изотопных факторов биомолекул предполагает, что в биологических системах каким-то образом реализуются изотопные эффекты термодинамической природы. Мы постулировали выше, что механизм возникновения термодинамических изотопных эффектов связан с механизмом каталитического действия ферментов. Универсальность термодинамического упорядочения изотопов, которое, как было установлено, может проявляться в организмах, принадлежащих к разным видам, средам обитания, разной степени организованности, наблюдаться в разных биохимических фракциях как между отдельными молекулами, так и внутри молекул, согласуется с той универсальной ролью, которую играют ферменты в химии живого.

Следуя модели, мы показали, что при определенных допущениях и при определенных условиях фракционирование изотопов в ферментативной реакции может обусловить разделение изотопов между продуктом и субстратом, пропорциональное величинам термодинамических изотопных факторов, характеризующих соответствующие углеродные позиции в продукте и в субстрате ( $\beta_i$ -факторов) или характеризующих молекулы продукта и субстрата в целом ( $\beta_{\Sigma}$ -факторы).

Но существование корреляций типа  $\delta^{13}\text{C} - \beta^{13}\text{C}$  предполагает нечто большее, чем термодинамический изотопный эффект между продуктом и его непосредственным предшественником. Корреляция означает наличие зависимости между изотопными составами и термодинамическими изотопными факторами любых соединений, относящихся к рассматриваемой системе, а не только участников одной ферментативной реакции. Замечательное свойство выражения (5.97), полученного в предыдущем разделе, состоит как раз в том, что оно показывает, при каких условиях и каким образом осуществляется зависимость между изотопными составами любых (1-го и  $k$ -го) произвольно выбранных соединений данной системы. Путем несложных преобразований выражение (5.97) или его сокращенную форму (5.98) можно привести к виду уравнения регрессии, характеризующего корреляционную связь  $\delta^{13}\text{C} - \beta^{13}\text{C}$ .

Перепишем (5.98) в следующей форме:

$$\delta^{13}\text{C}_k = \delta^{13}\text{C}_1 + \frac{\bar{k}}{\beta_k} (\beta_k - \beta_1) \cdot 10^3 \pm |\Delta|, \quad (6.1)$$

так как  $\bar{\kappa}/\beta_k \approx \bar{\kappa}$ , а под  $\delta^{13}\text{C}_1$  можно подразумевать изотопный состав любого углерода, в том числе  $\delta^{13}\text{C}_{\text{cp}}$ , соотношение (6.1) принимает вид

$$\delta^{13}\text{C}_k = \delta^{13}\text{C}_{\text{cp}} + \bar{\kappa}(\beta_k - \beta_{\text{cp}}) \cdot 10^3 \pm |\Delta|. \quad (6.2)$$

Обращаясь к анализу соотношения (5.97), мы видим, что сложный член, обозначенный в (5.98) и соответственно в (6.2) как  $\Delta$ , принимает нулевое значение при отсутствии кинетических изотопных эффектов, изотопных эффектов переноса и выполнении условия  $\kappa_{1,2} = \kappa_{2,3} = \dots = \kappa_{k-1,k}$ . Тогда имеет место уравнение

$$\delta^{13}\text{C}_k = \delta^{13}\text{C}_{\text{cp}} + \bar{x}(\beta_k - \beta_{\text{cp}}) \cdot 10^3. \quad (6.3)$$

Последнее – не что иное, как уравнение регрессии в той форме, в которой мы получали его, непосредственно сопоставляя экспериментально измеренные изотопные составы биологических соединений с величинами их  $\beta$ -факторов.

Таким образом, раскрывается физический смысл стохастической компоненты наблюдаемых корреляционных зависимостей  $\delta^{13}\text{C}-\beta^{13}\text{C}$ . Функциональная зависимость между  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\beta^{13}\text{C}$  отвечает идеализированному состоянию, при котором система вполне стационарна, пути биосинтеза обратимы, эффекты переноса и кинетические изотопные эффекты практически отсутствуют, величины коэффициентов  $\kappa$ , редуцирующих термодинамический изотопный эффект на разных этапах, одинаковы.

Поразительно, что эти условия в значительной мере удовлетворяются по крайней мере для некоторых биологических систем. Вспомним, что при исследовании липидных компонентов сила связи между величинами  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\beta_{\Sigma}$  характеризовалась коэффициентами корреляции от 0,87 до 0,94.

Выражение (6.2) объясняет также природу случайной компоненты экспериментальной зависимости  $\delta^{13}\text{C}-\beta^{13}\text{C}$ . Помимо погрешности изменения  $\delta^{13}\text{C}$  и известной неопределенности, присущей оценке величины  $\beta$ , уменьшение коэффициента корреляции  $\delta^{13}\text{C}-\beta^{13}\text{C}$  может быть обусловлено факторами, влияние которых описывается членом  $\Delta$  в выражении (6.2). Вариации величин  $\Delta \times k_{k+1}$  могут рассматриваться как одна из причин отклонения величин  $\delta^{13}\text{C}$  от уравнения регрессии. Другая причина состоит в появлении отличной от нуля кинетической компоненты энзиматического изотопного эффекта и в проявлении изотопных эффектов переноса. Нарушение условия стационарности приводит к тому, что модель, выраженная исходным соотношением (5.78), становится справедливой лишь отчасти. Приобретают значение частные модели, описываемые выражениями (5.73) и (5.77), которые в предельных случаях отвечают полному отсутствию изотопных эффектов на соответствующих стадиях. Величина  $\Delta$  в выражении (6.2) имеет смысл дисперсии, характеризующей корреляцию между величинами  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\beta^{13}\text{C}$ . Следовательно, дисперсия, соответствующая экспериментальной зависимости величин  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\beta^{13}\text{C}$  для данной системы, определяет совокупный вклад всех указанных выше факторов, отклоняющих изотопное распределение от строго термодинамического.

Тот факт, что во многих случаях удается обнаружить хорошую корреляцию между величинами  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\beta^{13}\text{C}$ , свидетельствует о том, что кинетические и транспортные изотопные эффекты в этих биологических системах имеют подчиненное значение. Преобладающим типом изотопного эффекта в этих случаях является термодинамический изотопный эффект. При коэффициентах корреляции порядка 0,9, характерных для исследованных липидных систем, фракционирование изотопов по крайней мере на 90% имеет термодинамическую природу.

В некоторых других системах корреляция проявляется хуже. Например, аминокислоты, выделенные путем гидролиза общих белков, показывают связь  $\delta^{13}\text{C}-\beta^{13}\text{C}$  с гораздо меньшими коэффициентами корреляции, чем липиды (см. главу IV). Причина этого в общем случае может быть связана с вариациями величины  $k$ . Из анализа соотношения (5.97) следует, что величина дисперсии  $|\Delta|$  тем больше, чем больше величина отклонений  $\Delta x_k$  и чем большее количество инкрементов  $\Delta x_k$  суммируется под знаком  $\Sigma$ . Очевидно, что при прочих равных условиях существенно различные ферментные системы с большей вероятностью могут иметь различные величины  $k$ . Очевидно также, что число суммируемых инкрементов  $\Delta k_k$  определяется тем, насколько далеко отстоят друг от друга рассматриваемые соединения на метаболических путях. Поэтому понятно, что наиболее четкие зависимости  $\delta^{13}\text{C}-\beta^{13}\text{C}$  должны наблюдаться для систем таких соединений, биосинтез которых сходен, а в основе его лежат общие субстраты. Таковыми являются, например, компоненты липидной фракции. В отличие от липидов, формирующихся в преобладающем большинстве путем однообразной конденсации двухуглеродного фрагмента ацетила-КоА, аминокислоты белков образуются из разных предшественников, на разных путях биосинтеза. В подобных случаях следует ожидать более слабой корреляции величин  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\beta^{13}\text{C}$ .

Справедливость уравнения (5.97) ограничена условиями,ложенными в основу его вывода, а именно условиями стационарности процесса и обратимости метаболических путей. Нарушение этих условий нарушает справедливость соотношений между величинами  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\beta^{13}\text{C}$ , передаваемого этим уравнением. Следовательно, если метаболический процесс в силу резкого изменения внешних условий или каких-либо иных причин принимает нестационарный характер, это должно приводить к ухудшению корреляции  $\delta^{13}\text{C}-\beta^{13}\text{C}$ , а в некоторых процессах и при некоторых состояниях к полной утрате термодинамически упорядоченного распределения изотопов.

Таким образом, выражение (5.97), по-видимому, в достаточно общей форме передает особенности биологического фракционирования изотопов. Оно раскрывает природу корреляций  $\delta^{13}\text{C}-\beta^{13}\text{C}$  и увязывает их с характером изотопных эффектов и состоянием метаболической системы.

Заметим, что относительно слабая корреляция или отсутствие ее не обязательно означает, что фракционирование изотопов при биосинтезе соответствующих соединений не включает термодинамических изотопных эффектов. Из сказанного выше следует, что термодинамически

упорядоченное распределение может не проявиться в силу причин, связанных с состоянием метаболической системы независимо от природы изотопных эффектов, присущих собственно ферментативным реакциям. Иными словами, можно говорить о двух уровнях фракционирования изотопов в биологических системах. Первый связан с собственно ферментативным процессом. На этом уровне определяется природа изотопного эффекта. Второй уровень связан с состоянием метаболической системы как целого. На этом уровне формируются закономерности, связывающие изотопный состав разных компонентов биологической системы, в частности определяется мера термодинамически упорядоченного распределения изотопов.

### ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНОЕ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИ УПОРЯДОЧЕННОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОТОПОВ

Со вторым из упомянутых уровней фракционирования изотопов — метаболическим — связано возникновение внутримолекулярной упорядоченности изотопов.

Фракционирование изотопов в единичной ферментативной реакции может обусловить термодинамический характер разделения изотопов между углеродом в данной позиции в продукте и углеродом в соответствующей позиции в субстрате, но оно не определяет распределения изотопов между разными углеродными позициями в пределах одного соединения, т.е. не определяет внутримолекулярного распределения изотопов. Каким образом возникает внутримолекулярная термодинамическая упорядоченность изотопов в биологических соединениях?

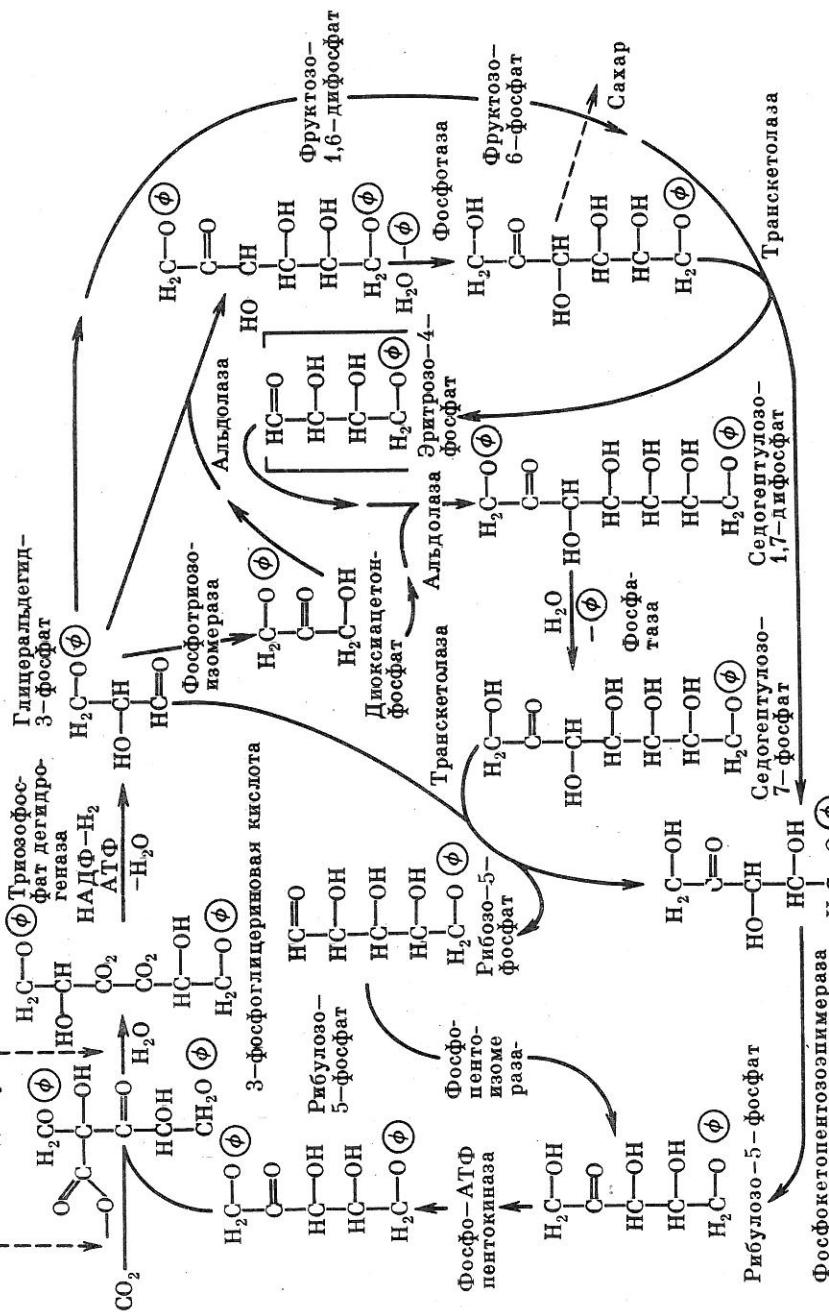
Ответ в общем виде содержится все в той же формуле (5.97). Она определяет возможность и меру проявления термодинамического изотопного эффекта между любыми двумя углеродными атомами, относящимися к рассматриваемой биологической системе. При выполнении исходных для нее условий она не содержит ограничений в отношении того, должны ли сравниваемые по изотопному составу атомы принадлежать разным соединениям или они могут входить в состав одной молекулы.

Таким образом, если существует биохимический путь, связывающий два атома одной и той же молекулы, то между ними как между любым 1-м и  $k$ -м атомом цепи превращений в соответствии с (5.97) может проявиться термодинамический изотопный эффект.

Метаболические процессы в организме во многих случаях должны удовлетворять этому условию. Рассмотрим один из важнейших как с биохимической точки зрения, так и с точки зрения фракционирования изотопов, процесс первичного включения  $\text{CO}_2$  в метabolизм растений. Он протекает, как известно, двумя путями: путем темновой фиксации и путем фотосинтетической ассимиляции  $\text{CO}_2$ . Темновая фиксация происходит посредством реакций карбоксилирования: карбоксилирования пировиноградной кислоты (реакция Вуда и Веркмана),  $\alpha$ -кетоглутаровой (реакции Очоа),  $\gamma$ -аминомасляной кислоты и др. [2]. Поглощаемая

Система карбокси-

— дисмутары



Кислулозо-5-фосфат  
Фосфокетопентозоизомераза

Рис. 6.1. Реакции цикла Кальвина. Воспроизведено из [2]

$\text{CO}_2$  при этом идет на синтез глюкозы. Регенерация акцепторов осуществляется в процессе дыхания. При фотосинтезе начальным актом также является темновая фиксация  $\text{CO}_2$  при помощи подходящих акцепторов: рибулозодифосфата, фосфоэнолпиривата. На свету регенерация акцепторов связана с процессом восстановления. При этом за счет углерода  $\text{CO}_2$  образуются глюкоза и другие органические вещества. Восстановительный этап осуществляется посредством реакции цикла Кальвина – пентозофосфатный путь у так называемых  $C_3$ -растений. Иногда ему предшествует цикл Хетч-Слека – путь дикарбонатных кислот, который встречается наряду с циклом Кальвина у так называемых  $C_4$ -растений.

На рис. 6.1 изображена схема реакций цикла Кальвина. Основное содержание процесса состоит в следующем. Первичным акцептором  $\text{CO}_2$  является рибулозо-1,5-дифосфат (Рб-1,5-ДФ), в результате карбоксилирования которого и реакции дисмутации образуются две молекулы 3-фосфоглицериновой кислоты (ФГК). Одна из них содержит углерод, происходящий от  $\text{CO}_2$ . В результате следующей ферментативной реакции ФГК восстанавливается до глицероалдегид-3-фосфата (ГАФ). Именно здесь используются АТФ и НАДФ, образовавшиеся в световом цикле фотосинтеза [1]. В свою очередь ГАФ изомеризуется в дегидроацетон-фосфат (ДГАФ), после чего обе триозы конденсируются в молекулу фруктозо-1,6-дифосфата. Последующее отщепление фосфата дает фруктозо-6-фосфат, который превращается в глюкозо-6-фосфат. Таким образом, образуются исходные субстраты для синтеза сахарозы, крахмала, а в результате расщепления глюкозы – важные метаболиты других путей биосинтеза. Одновременно в реакциях взаимопревращения фосфорелированных сахаров с различным числом атомов углерода (триоз, тетроз, пентоз, гексоз, седогептулоз) происходит регенерация рибулозо-1,5-дифосфата, знаменующая собой замыкание цикла. Карбоксилирование регенерированного рибулозо-1,5-дифосфата вновь дает фосфоглицериновую кислоту. При этом углерод экзогенной  $\text{CO}_2$  поступает в карбоксильную группу ФГК, а углерод  $\text{CO}_2$ , ассимилированной в предыдущем цикле, оказывается в  $\text{CHON}^-$  и  $\text{CH}_2\text{O}^-$  группах ФГК.

Мы прибегли к этому краткому описанию хорошо известного процесса, чтобы обратить внимание на то, что с внутримолекулярной точки зрения здесь имеет место не замкнутый цикл, а "виток спирали". Если развернуть ее, образуется последовательная цепь превращений, связывающая атомы углерода, находящиеся в различной позиции внутри данной молекулы. Взгляд на цикл Кальвина с этой позиции представлен на рис. 6.2. Реакции пентозофосфатного пути, как показывает анализ этой схемы, генетически связывают между собой углеродные атомы фосфоглицериновой кислоты. Видно также, что метаболические пути, связывающие эти атомы, обратимы. Таким образом, выполняются условия при которых справедлива формула (5.97), описывающая термодинамический изотопный эффект между двумя произвольно выбранными углеродными атомами системы. В данном случае это относится к углеродным атомам одной и той же молекулы. Следовательно, в фосфоглицериновой кислоте

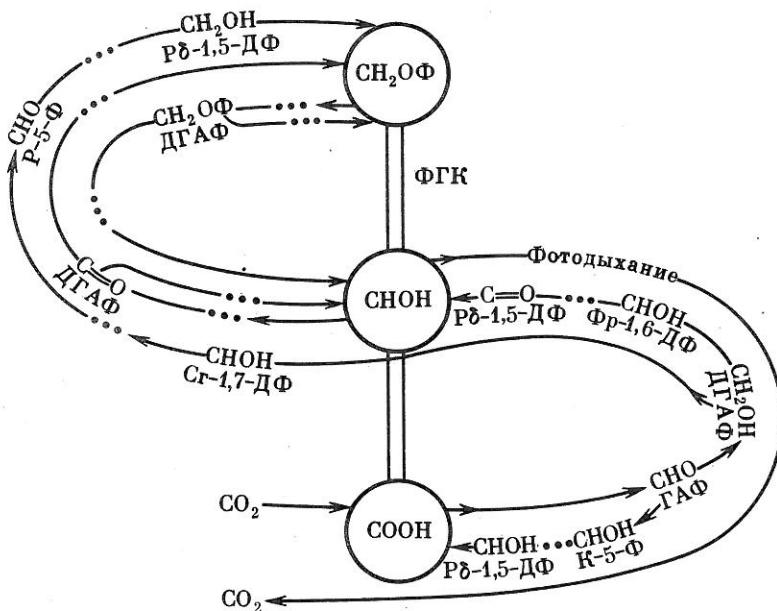


Рис. 6.2. Пути превращения углерода в пентозофосфатном цикле, генетически связывающие углеродные атомы фосфоглицериновой кислоты

Сокращения: Рб-1,5-ДФ – рибулозо-1,5-дифосфат, К-5-Ф – ксилозо-5-фосфат, ГАФ – глицеральдегид-3-фосфат, ДГАФ – дигидроацетонфосфат, Фр-1,6-ДФ – фруктозо-1,6-дифосфат, Р-5-Ф – рибозо-5-фосфат, Сг-1,7-ДФ – седогептулозо-1,7-дифосфат, ФГК – фосфоглицериновая кислота

теоретически может установиться внутримолекулярное термодинамически упорядоченное распределение изотопов.

Этот вывод относится не только к ФГК. Если проследить судьбу углеродного атома СО<sub>2</sub> с момента вхождения его в цикл, можно убедиться, что пути его превращения последовательно проходят через все углеродные позиции каждого промежуточного метаболита цикла.

Установление внутримолекулярного упорядочения в субстрате служит предпосылкой для внутримолекулярного термодинамического упорядочения изотопов в продукте.

Это легко показать в общем виде. Действительно в результате фракционирования изотопов в ферментативной реакции устанавливаются следующие соотношения между изотопными составами соответственных углеродных атомов продукта и субстрата:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{P}_i} = \delta^{13}\text{C}_{\text{S}_0(i)} + \kappa_k \left( \frac{\beta_{\text{P}_i}}{\beta_{\text{S}_i}} - 1 \right) \cdot 10^3 + \Delta_i, \quad (6.4)$$

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{P}_{i+1}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{S}_0(i+1)} + \kappa_k \left( \frac{\beta_{\text{P}_{i+1}}}{\beta_{\text{S}_{i+1}}} - 1 \right) \cdot 10^3 + \Delta_{i+1}.$$

Внутри молекулы продукта изотопный эффект определяется разностью величин  $\delta^{13}\text{C}$  в  $i$ -м и  $(i+1)$ -м положениях:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{P}_i} - \delta^{13}\text{C}_{\text{P}_{i+1}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{S}_0(i)} - \delta^{13}\text{C}_{\text{S}_0(i+1)} + \kappa_k \left( \frac{\beta_{\text{P}_i}}{\beta_{\text{S}_i}} - \frac{\beta_{\text{P}_{i+1}}}{\beta_{\text{S}_{i+1}}} \right) \cdot 10^3 + (\Delta_i - \Delta_{i+1}). \quad (6.5)$$

Пусть внутри молекулы-субстрата изотопное распределение термодинамически упорядочено, т.е.

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{S}_0(i)} = \delta^{13}\text{C}_{\text{S}_0(i+1)} + \kappa_{k-1} \left( \frac{\beta_{\text{S}_i}}{\beta_{\text{S}_{i+1}}} - 1 \right) \cdot 10^3. \quad (6.6)$$

Подставляя (6.6) в (6.5), получим

$$\begin{aligned} \delta^{13}\text{C}_{\text{P}_i} &= \delta^{13}\text{C}_{\text{P}_{i+1}} + \kappa_{k-1} \left( \frac{\beta_{\text{S}_i}}{\beta_{\text{S}_{i+1}}} - 1 \right) \cdot 10^3 + \\ &+ \frac{\kappa_k \beta_{\text{P}_{i+1}}}{\beta_{\text{S}_i}} \left( \frac{\beta_{\text{P}_i}}{\beta_{\text{P}_{i+1}}} - \frac{\beta_{\text{S}_i}}{\beta_{\text{S}_{i+1}}} \right) \cdot 10^3 + (\Delta_i + \Delta_{i+1}) \end{aligned} \quad (6.7)$$

или

$$\begin{aligned} \delta^{13}\text{C}_{\text{P}_i} &= \delta^{13}\text{C}_{\text{P}_{i+1}} + \bar{\kappa} \left( \frac{\beta_{\text{P}_i}}{\beta_{\text{P}_{i+1}}} - 1 \right) \cdot 10^3 + \\ &+ \Delta \kappa_{k,k-1} \left( \frac{\beta_{\text{S}_i}}{\beta_{\text{S}_{i+1}}} - 1 \right) \cdot 10^3 + (\Delta_i - \Delta_{i+1}). \end{aligned} \quad (6.8)$$

Последнее выражение близко по смыслу к формуле (5.97). Но оно имеет более узкое содержание. Из него следует, что при условии термодинамически упорядоченного распределения изотопов внутри молекулы субстрата теоретически становится возможным внутримолекулярное упорядочение в продукте. Реализация этой возможности, как и в случае, описываемом выражением (5.97), зависит от величин  $\Delta\kappa_k$  и  $\Delta_{\text{кинет}}$ . Если последние малы, т.е. величина  $\kappa$  близка для соответствующих ферментативных реакций, а кинетические изотопные эффекты имеют подчиненное значение, то внутримолекулярное распределение изотопов в продукте может оказаться термодинамически упорядоченным, при условии, что оно является таковым в субстрате.

Сказанное выше позволяет еще раз подчеркнуть, что внутримолекулярное термодинамическое упорядочение изотопов является свойством молекул, синтезированных не просто в ходе ферментативной реакции, а в ходе метаболического процесса, осуществляющегося во взаимосвязанной системе ферментов, т.е. практически в организме.

## СЛУЧАИ ОТСУТСТВИЯ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИ УПОРЯДОЧЕННОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ИЗОТОПОВ

Изложенная теоретическая модель позволяет не только объяснить термодинамически упорядоченное распределение изотопов, но и указать на возможные причины его отсутствия.

Необходимая предпосылка термодинамически упорядоченного распределения изотопов в биологических системах – термодинамический изотопный эффект в ферментной реакции. Условием возникновения его является микроскопическая обратимость процесса химической перестройки субстратов в фермент-субстратном комплексе. В общем случае ферментативные реакции могут характеризоваться как термодинамическими, так и кинетическими изотопными эффектами. Какой тип эффекта в каждом случае преобладает, зависит от соотношения скоростей отдельных стадий ферментативной реакции и, прежде всего, от соотношения скоростей распада – образования комплекса и внутрикомплексного превращения. Очевидно, эти соотношения изменяются в зависимости от условий биогенеза и вместе с этим изменяется количественная и качественная картина распределения изотопов в биомолекулах.

Далее, как было показано, термодинамический изотопный эффект в ферментативной реакции – необходимое, но не достаточное условие для установления термодинамически упорядоченного распределения изотопов в произвольно выбранной системе биомолекул, а также внутри биомолекул. Существенным требованием рассмотренной выше модели является необходимость на каждой стадии обратного пути превращения от продукта к предшественнику. Как уже говорилось, для биологических систем характерна цикличность метаболических путей, сопряженность процессов анаболизма и катаболизма. Это делает оправданным использование рассмотренной модели в качестве основы для описания общих закономерностей распределения изотопов в биологических системах. Однако при рассмотрении ограниченных участков путей биосинтеза, а также при исследовании некоторых биосистем *in vitro* условие замкнутости отдельных стадий может не выполняться. На рис. 6.3 показаны два предельных случая – первый, отвечающий рассмотренной выше модели, второй – соответствующий отсутствию обратных путей. Если в первом случае изотопные составы 1-го и *k*-го компонента связаны уже упомянутым соотношением:

$$R_k = R_1 \frac{1}{\alpha_{1,2}} \frac{1}{\alpha_{2,3}} \dots \frac{1}{\alpha_{k-1,k}},$$

то во втором случае это соотношение имеет вид

$$R_k = R_1 \frac{1}{\alpha_{1,2}} \alpha_{k,k+1},$$

т.е. выпадают изотопные эффекты, сопровождающие образование промежуточных метаболитов. Следовательно, нарушается цепочка коэффициентов фракционирования, обуславливающая связь изотопных составов

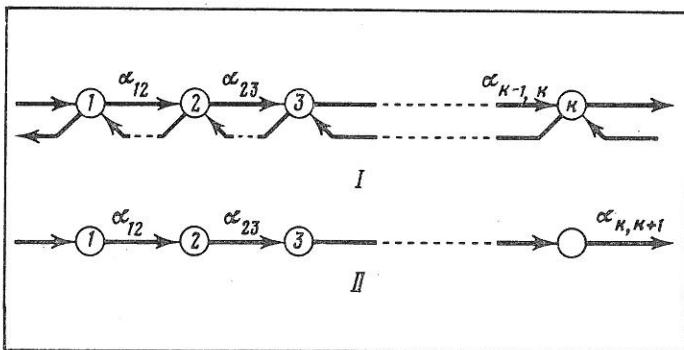


Рис. 6.3. Модель последовательности реакций

I – включающая обратные пути превращения на каждой станции; II – при отсутствии обратных путей

компонентов с величинами их  $\beta$ -факторов. Поэтому во втором случае корреляция между изотопными составами и величинами  $\beta$  может отсутствовать. Таким образом, несмотря на термодинамический характер изотопных эффектов отдельных ферментативных реакций, термодинамически упорядоченное распределение изотопов в системе в целом может не реализоваться.

Следующим важным условием является условие стационарности. Формула (5.78), описывающая разделение изотопов во фракционной колонке, справедлива только при установившемся режиме работы колонки. Поэтому она может быть применена только к стационарным метаболическим системам. Если в процессе биосинтеза происходит существенное изменение скоростей отдельных процессов или соотношений концентраций метаболитов, то это приведет к нарушению распределения изотопов, передаваемого формулой (5.98) и, следовательно, к нарушению термодинамически упорядоченного распределения изотопов. Поэтому в экстремальных обстановках организмы могут показать распределение изотопов, несвойственное им в условиях нормального развития. Такие факты действительно наблюдаются.

При гетеротрофной ассимиляции фрагменты органических соединений, синтезированных вне данного организма, непосредственно включаются в его биологические системы. Очевидно, это должно приводить к нарушениям термодинамически упорядоченного распределения изотопов между и внутри биомолекул гетеротрофов. Имеющиеся данные подтверждают это. Так, аминокислоты из *Chlorella pyrenoidosa* и *Escherichia coli*, выращенных гетеротрофно на глюкозе, совершенно не обнаружили наличие связи  $\delta^{13}\text{C}-\beta_{\Sigma}^{13}\text{C}$ , в то время как для фотосинтезирующих организмов, в том числе для фотосинтезирующей *Chlorella pyrenoidosa*, изотопный состав аминокислот которой был изучен в той же работе [3], упомянутая связь имеет место (рис. 6.4).

Исследование причин отклонения изотопного распределения от термодинамически упорядоченного в определенных случаях может служить

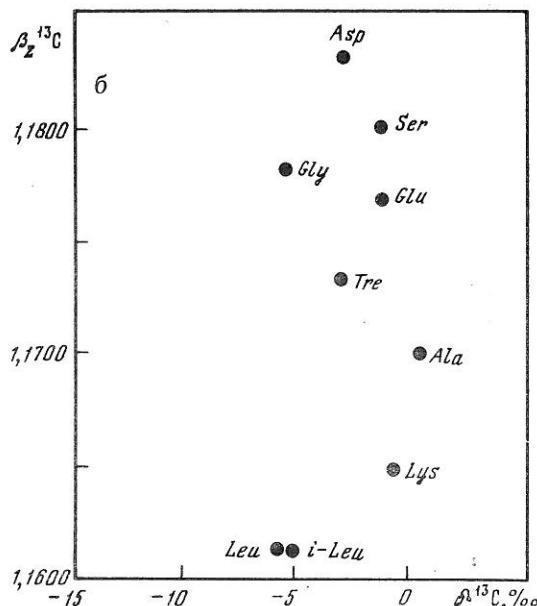
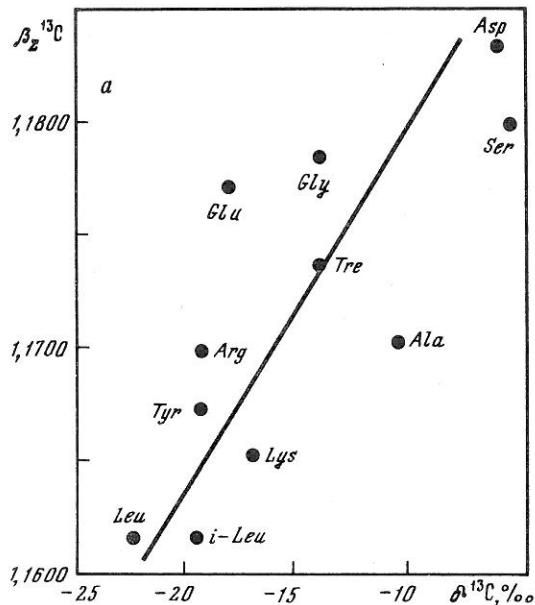


Рис. 6.4. Связь величин  $\beta_2^{13}\text{C}$  и  $\delta^{13}\text{C}$  аминокислот выделенных из фотосинтезирующей культуры Chlorella pyrenoidosa (а) из той же культуры, выращенной гетеротрофно на глюкозе (б)

средством изучения особенностей биосинтеза, обнаружения патологического развития организма и т.п.

С другой стороны, при исследовании большого числа случаев тенденция к термодинамически упорядоченному распределению изотопов должна приобретать все более закономерный характер. В силу отмеченных выше причин термодинамически упорядоченное распределение изотопов может часто отсутствовать внутри молекул данного сорта данного организма. Но оно имеет гораздо больше вероятности проявиться для системы разных биомолекул данного организма или внутри молекул данного сорта из множества организмов. Вот почему термодинамически упорядоченное распределение изотопов особенно существенно для геохимических объектов, представляющих собой результат усреднения вещественного состава многих индивидов разных популяций.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ленинджер А. Биохимия. М.: Мир, 1974.
2. Рубин Б.А., Гавриленко В.Ф. Биохимия и физиология фотосинтеза. М.: Изд-во МГУ, 1977.
3. Abelson P.H., Hoering T.C. Carbon isotope fractionation in formation of amino acids by photosynthetic organisms. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1961, 47, N 5, p. 623–632.

## Глава VII ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ НЕКОТОРЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

### ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ДЕКАРБОКСИЛИРОВАНИЕ ПИРУВАТА

В связи с изложенными представлениями о причинах биологического фракционирования изотопов интересно рассмотреть полученные недавно М. Де Ниро и С. Эпстайном [2] экспериментальные данные о фракционировании изотопов в процессе биосинтеза липидов. Этим данным, как мы покажем, можно дать иную интерпретацию, чем это сделали авторы работы.

Еще в 1960 г. П. Абельсон и Т. Хоеринг [1] установили, что липиды, синтезируемые микроорганизмами, растущими на глюкозе, обеднены изотопом  $^{13}\text{C}$  относительно исходного углерода глюкозы. Биосинтез липидов осуществляется в этом случае путем гликолитического расщепления глюкозы до пирувата в результате реакций пути Эмбдена–Мейергофа, последующего декарбоксилирования и окисления пирувата до ацетата и конденсации последнего в молекулярные структуры липидов.

М. Де Ниро и С. Эпстайн попытались установить, на каком этапе пути превращения углерода глюкозы в углерод липидов происходит фрак-

Таблица 7.1

Влияние источника углерода на изотопный состав липидной фракции *E.coli*  
(по [2])

Источник углерода	$\delta^{13}\text{C}$ , ‰		Источник углерода	$\delta^{13}\text{C}$ , ‰	
	источник углерода	липиды		источник углерода	липиды
Глюкоза	-9,5	-15,7 -16,3	Ацетат натрия	-20,1	-21,5 -20,7
Пищевая крахмал	-20,5	-28,9 -28,9			

Примечание. Изучались две культуры отдельно для каждого типа исходного углерода.

ционирование изотопов, ответственное за наблюдаемую обедненность липидов изотопом  $^{13}\text{C}$ . Заметим сразу, что уже в самой постановке задачи М. Де Ниро и С. Эпстайн исходили из традиционного представления о существовании отдельных "барьеров" фракционирования на путях биосинтеза. С целью ответа на поставленный вопрос экспериментаторы использовали в качестве исходного вещества при выращивании *Escherichia coli* один из предшественников на пути биосинтеза липидов: глюкозу, пищевую крахмал или ацетат. Результаты экспериментов показаны в табл. 7.1.

В качестве примечания к табл. 7.1 отметим, что исходные глюкоза, пищевую крахмал и ацетат являются независимыми химическими препаратами. Существенна здесь только мера отличия изотопного состава липидов от изотопного состава соответствующего источника. В случае, когда источником углерода служила глюкоза, липиды обеднены изотопом  $^{13}\text{C}$  на 6–7‰, в случае пищевого крахмала – на 8‰, в случае ацетата – на 0,5–1,5‰. М. Де Ниро и С. Эпстайн сделали вывод, что изотопное фракционирование связано со стадией декарбоксилирования и окисления пищевого крахмала до ацетил-КоА. На стадии образования ацетата из глюкозы изотопный эффект, по их мнению, отсутствует, поскольку липиды практически одинаково обеднены изотопом  $^{13}\text{C}$  по отношению к обоим источникам. То же самое касается стадии образования липидов из ацетата.

Далее М. Де Ниро и С. Эпстайн предприняли эксперимент *in vitro* с тем, чтобы определить, с каким конкретно атомом пищевого крахмала связана предполагаемый изотопный эффект (табл. 7.2). Существо их эксперимента в этой части состояло в следующем. Исходный пищевый крахмал вводился в реакцию с *пищеватдекарбоксилазой*. Затем анализировали изотопный состав образующих ацетальдегида и  $\text{CO}_2$ , причем метильный и карбоксильный углерод ацетальдегида анализировались отдельно. Проводилось сравнение изотопного распределения в двух случаях: 1) когда ферментная реакция доводилась до полного завершения, полного исчерпания пищевого крахмала (*A* и *E*); 2) в самой начальной стадии реакции при 0,5–1,5 % превращения пищевого крахмала в продукт (*B*, *C*, *D*, *F*). Последний опыт проводился при разных температурах.

Таблица 7.2

## Изотопные эффекты\* пируватдекарбоксилазы (по [2])

Эксперимент	Условия эксперимента	$\delta^{13}\text{C}$ , ‰	
		ацетальдегид	двуокись углерода
A	100%-ная реакция	$-20,6 \pm 0,4$	$-22,5 \pm 0,3$
B	15°C, 0,5%-ная реакция	$-26,5 \pm 0,2$	$-28,1 \pm 0,5$
C	25°C, 1,4%-ная реакция	$-28,5 \pm 0,2$	$-28,8 \pm 0,1$
D	35°C, 0,8%-ная реакция	$-30,2 \pm 0,7$	$-30,2 \pm 0,5$
		Метильный углерод	Карбонильный углерод
F	100%-ная реакция	$-20,1 \pm 0,6$	$-19,9 \pm 0,3$
E	25°C, 1,9%-ная реакция	$-21,1 \pm 0,6$	$-34,0 \pm 0,4$
			$-22,3 \pm 0,2$
			$-28,8 \pm 0,1$

\* В работе [2] эти эффекты названы кинетическими.

Очевидно, что в первом случае при 100%-ном выходе реакций продукт приобретает изотопный состав, идентичный исходному, т.е. измерение внутримолекулярного распределения в ацетальдегиде и  $\text{CO}_2$  покажет внутримолекулярное распределение в исходном пирувате (*E*). Во втором случае должен проявиться в чистом виде присущий реакции изотопный эффект. Надо сказать, что М. Де Ниро и С. Эпстайн заведомо называют этот эффект кинетическим, хотя сама работа не дает для этого основания. По-видимому, просто не предполагалась возможность существования биологических изотопных эффектов какой-либо иной природы.

Результаты экспериментов, представленные в табл. 7.2, М. Де Ниро и С. Эпстайн интерпретируют следующим образом. Ацетальдегид, образовавшийся в 1%-ной реакции при температуре 25°C (эксперимент C), на 7,9‰ легче, чем исходный пируват (эксперимент A), имеющий  $\delta^{13}\text{C} = -20,6\text{‰}$ . Анализ каждого из трех углеродных атомов пирувата (эксперимент E) и продуктов 1%-ной реакции при 25°C (эксперимент F) показывает, что обеднение альдегида изотопом  $^{13}\text{C}$  преимущественно связано с карбоксильным углеродным атомом.

Исходя из этих наблюдений, М. Де Ниро и С. Эпстайн пришли к следующим выводам.

1. В процессе превращения глюкозы в пируват изотопный эффект мал или вообще отсутствует.

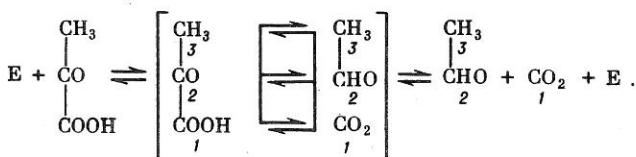
2. Окисление пирувата до ацетил-КоА посредством пируватдегидрогеназы приводит к уменьшению содержания  $^{13}\text{C}$  в ацетиле относительно пирувата, причем величина обеднения изотопом  $^{13}\text{C}$  определяется температурно-зависимым кинетическим изотопным эффектом. Обеднение изотопом  $^{13}\text{C}$  ацетила-КоА связано с карбонильным углеродным атомом, в то время как метильная группа наследует изотопный состав глюкозы.

3. Включение обедненной изотопом  $^{13}\text{C}$  ацетильной группы в липидные компоненты ответственно за обеднение изотопом  $^{13}\text{C}$  липидной фракции. Различие  $\delta^{13}\text{C}$  между метильной и карбонильной группами ацетила наследуется происходящими из них углеродными атомами липидных компонентов.

Эти выводы, касающиеся важных особенностей биосинтеза липидов, являются логическими следствиями рассмотрения результатов экспериментов в рамках традиционного представления о кинетической природе биологических изотопных эффектов.

Рассмотрение этих же результатов в рамках предложенной теории биологического фракционирования изотопов приводит к другим выводам.

Ферментативный процесс, исследованный М. Де Ниро и С. Эпстайном, имеет следующую схему:



Условия эксперимента, при которых производилась оценка разделения изотопов между углеродными атомами пирувата и ацетальдегида, отвечают модели изолированной ферментативной системы субстрат–продукт при низкой ( $1,0\text{--}1,5\%$ ) степени завершенности реакции ( $f \ll \ll 1$ ). Эффект переноса отсутствует. Принципиально возможны изотопные эффекты термодинамической и кинетической природы. Разделение изотопов описывается формулой

$$\delta^{13}\text{C}_{P_i} = \delta^{13}\text{C}_{S_{0i}} + \kappa \left( \frac{\beta_{P_i}}{\beta_{S_i}} - 1 \right) \cdot 10^3 + \Delta \lambda_i.$$

Изотопные составы каждого из углеродных атомов пирувата ( $\delta_{S_{0i}}^{13}\text{C}$ ), ацетальдегида и  $\text{CO}_2$  ( $\delta_{P_i}^{13}\text{C}$ ) измерены. Коэффициент  $\kappa$  характеризует реакцию в целом, т.е. он одинаков при трансформации углерода во всех трех положениях. Величины термодинамических изотопных факторов  $\beta_{P_i}$  и  $\beta_{S_i}$ , вычисленные при помощи аддитивного метода, имеют следующие значения:

$$\beta_{\text{COOH}} = L_{\text{C-C}} + L_{\text{C-O}} + L_{\text{C=O}} + l_{\text{C=O}} + l_{\text{C-C}} = 1,2019,$$

(пируват)

$$\beta_{\text{CO}} = 2L_{\text{C-C}} + L_{\text{C=O}} + l_{\text{C=O}} + l_{\text{C-O}} = 1,1933,$$

(пируват)

$$\beta_{\text{CH}_3} = 3L_{\text{C-H}} + L_{\text{C-C}} + l_{\text{C=O}} + l_{\text{C-O}} = 1,1357,$$

(пируват)

$$\begin{aligned}\beta_{\text{CO}_2} &= 2L_{\text{C=O}} = 1,1916; \\ \beta_{\text{CHO}} &= L_{\text{C-C}} + L_{\text{C=O}} + L_{\text{C-H}} = 1,1706, \\ &\quad (\text{ацетальдегид}) \\ \beta_{\text{CH}_3} &= 3L_{\text{C-H}} + L_{\text{C-C}} + L_{\text{C=O}} = 1,1344. \\ &\quad (\text{ацетальдегид})\end{aligned}$$

Кинетический изотопный эффект может иметь место при разрыве связи между карбонильным и карбоксильным углеродом пирувата. Вероятность обогащения углерода продукта легким изотопом по обеим сторонам разрываемой связи в первом приближении одинакова, т.е.  $\Delta_{(\text{COOH})} \approx \Delta_{(\text{CO})} \approx \Delta_\lambda$ . Метильный углерод переходит без перестройки связей. Таким образом, для трех атомов углерода имеем следующую систему:

$$\begin{aligned}-28,8 &= -22,3 + \kappa \left( \frac{1,1916}{1,2019} - 1 \right) \cdot 10^3 + \Delta_\lambda, \\ -34,0 &= -19,9 + \kappa \left( \frac{1,1706}{1,1933} - 1 \right) \cdot 10^3 + \Delta_\lambda, \\ -21,2 &= -20,1 + \kappa \left( \frac{1,1344}{1,1357} - 1 \right) \cdot 10^3.\end{aligned}$$

Решая совместно первые два уравнения, находим  $\kappa = 0,73$  и  $\Delta_\lambda = -0,3\%$ .

Сопоставление расчетной величины кинетического изотопного эффекта ( $-0,3\%$ ) с величинами наблюдаемых изотопических смещений ( $-6,5\%$  — при переходе  $\text{COOH} \rightarrow \text{CO}_2$  и  $-14,1\%$  — при переходе  $\text{CO} \rightarrow \text{CHO}$ ) показывает, что вклад кинетической компоненты в общую величину изотопного эффекта в этой ферментативной реакции незначителен.

Величина  $\kappa$  имеет разумное значение — она положительна и заключена в пределах  $0 \leq \kappa \leq 1$ , предписываемых теорий. Подстановка полученного значения  $\kappa$  в третье уравнение дает в пределах ошибки эксперимента тождество левой и правой частей:  $-21,2 \approx -20,9$ , т.е.  $\kappa = 0,73$  независимо удовлетворяет и третьему уравнению.

В табл. 7.3 экспериментальные данные, полученные М. Де Ниро и С. Эпстайном, приведены вместе с величинами  $\beta_i$  факторов соответствующих фрагментов. Видно, что изменение изотопного состава углерода в ацетальдегиде и  $\text{CO}_2$  по сравнению с изотопным составом соответствующего углерода в пирувате находится в прямой связи с соотношением их  $\beta_i$  факторов. Если вычислить изотопный состав углеродных атомов ацетальдегида и  $\text{CO}_2$  в предположении, что изотопный эффект имеет чисто термодинамическую природу (при  $\kappa = 0,73$ ), то полученные величины оказываются весьма близкими к измеренным экспериментально.

Это количественное согласие, на наш взгляд, является хорошим доводом в пользу предложенного выше механизма биологического фракционирования изотопов.

Таблица 7.3

Внутримолекулярное распределение изотопов углерода в пирувате и полученных из него (в результате ферментной реакции с пируватдегидрогеназой) ацетальдегиде и  $\text{CO}_2$

Пируват	$\text{CH}_3$	— $\text{CO}$	— $\text{COOH}$
$\beta_i$	1,1357	1,1933	1,2019
$\delta^{13}\text{C}_{\text{эксп}}$	-20,1	-19,9	-22,3
Ацетальдегид, $\text{CO}_2$	$\text{CH}_3$	— $\text{CHO}$	$\text{CO}_2$
$\beta_i$	1,1344	1,1706	1,1917
$\delta^{13}\text{C}_{\text{эксп}}$	-21,1	-34,0	-28,8
$\delta^{13}\text{C}_{\text{расч}}$ ( $k = 0,73$ )	-20,9	-33,9	-28,5

Примечание. Экспериментальные данные М. Де Ниро и С. Эпстайна [2]; расчетные величины  $\delta^{13}\text{C}$  определены из соотношений  $\beta$ -факторов соответствующих углеродов продукта и предшественника при  $k = 0,73$ .

В этой связи иной характер приобретают и те выводы, которые можно сделать на основе экспериментов М. Де Ниро и С. Эпстайна.

1. Нет основания полагать, что на стадии превращения глюкозы в пируват изотопное фракционирование отсутствует. Нетрудно убедиться, рассчитав соответствующие  $\beta_i$ -факторы, что между углеродными атомами пируата и их предшественниками в составе глюкозы должны иметь место изотопические смещения (табл. 7.4). Дело, однако, в том, что  $\beta_{\Sigma}$ -факторы глюкозы и пируата практически совпадают. Поэтому, несмотря на внутримолекулярные смещения, изотопный состав молекул глюкозы и пируата в целом должен быть близок. Это наблюдается в эксперименте и создает видимость отсутствия фракционирования на этом этапе.

2. Ацетальдегид и ацетат имеют заметно более низкие значения  $\beta_{\Sigma}$ -факторов (см. табл. 7.4). Поэтому должно происходить обеднение углерода ацетата в целом по сравнению с углеродом пируата. Отсюда создается впечатление, что именно на этой стадии происходит фракционирование изотопов. На самом деле она принципиально (в смысле содержания процесса фракционирования) ничем не отличается от предыдущей.

Заметная величина изотопного смещения между альдегидным углеродом ацетальдегида и карбонильным углеродом пируата заставила М. Де Ниро и С. Эпстайна предположить, что этот эффект занимает особое место в процессе фракционирования изотопов при биогенезе липидов. В нашей интерпретации он является вполне заурядным. Изотопические смещения аналогичной природы имеются и по другим углеродным позициям (см. табл. 7.3). Более заметная величина его обусловлена просто более существенным различием  $\beta_i$ -факторов карбонильного и альдегидного углерода по сравнению с различием  $\beta_i$ -факторов в других углеродных позициях.

3. Основываясь на близости изотопного состава углерода ацетата и липидов, М. Де Ниро и С. Эпстайн сделали вывод, что на стадии синтеза

Таблица 7.4

Термодинамические изотопные факторы соединений, предшествующих липидам на пути биосинтеза из глюкозы

	$\beta_i$	$\beta_{\Sigma}$
Глюкоза	$\text{CH}_2\text{OH} \longrightarrow (\text{CHOH})_4 \longrightarrow \text{CHO}$ 1,1611            1,1820            1,1735	1,1771
Пируват	$\text{CH}_3 \longrightarrow \text{CO} \longrightarrow \text{COOH}$ 1,1357            1,1933            1,2019	1,1769
Ацетат	$\text{CH}_3 \longrightarrow \text{COOH}$ 1,1363            1,1973	1,1668
Ацетальдегид	$\text{CH}_3 \longrightarrow \text{CHO}$ 1,1344            1,1706	1,1525
Липиды	$\text{COOH} \longrightarrow \dots \text{CH}_2 \longrightarrow \text{CH}_2 \dots \text{CH}_3$ 1,1985            1,522            1,1522    1,1329	

липидных структур из ацетила-КоА фракционирование изотопов отсутствует и, следовательно, углеродные атомы липидов наследуют изотопный состав метильного и карбоксильного углерода ацетата, за счет которых они происходят. Однако отсутствие заметных различий между изотопным составом углерода липидов и ацетата не означает, как и в случае глюкозы и пирувата, отсутствия фракционирования изотопов. Величины  $\beta_{\Sigma}$ -факторов липидов лежат в том же диапазоне значений, что и  $\beta_i$ -факторы ацетальдегида. Поэтому следует ожидать, что углерод их в целом будет иметь близкий изотопный состав. Однако в отдельных углеродных позициях могут осуществляться заметные изотопические смещения. Соотношение  $\beta_i$ -факторов таково, что  $\text{CH}_2$ -группы липидов, происходящие за счет карбоксильного углерода ацетата, должны обедняться изотопом  $^{13}\text{C}$ , а  $\text{CH}_2$ -группы, происходящие за счет метильного углерода ацетата, — обогащаться изотопом  $^{13}\text{C}$ .

Следует отметить в заключение, что результаты эксперимента М. Де Ниро и С. Эпстайна хорошо иллюстрируют теоретическое положение о том, что в изолированной ферментативной реакции фракционирование изотопов осуществляется только между углеродом-продуктом и углеродом-предшественником, но при этом не может быть достигнуто термодинамически упорядоченное распределение изотопов внутри молекулы продукта. Последнее — свойство метаболических биосистем, следствие более высокого метаболического уровня фракционирования изотопов. Действительно, несмотря на то что ацетальдегид и  $\text{CO}_2$  являются продуктами ферментативной реакции, внутримолекулярное распределение изотопов углерода в ацетальдегиде и между ацетальдегидом и  $\text{CO}_2$  совершенно не соответствует величинам  $\beta_i$ -факторов. Карбонильный углерод, которому отвечает сравнительно высокое значение  $\beta_i$ -фактора ( $\beta_i = 1,1706$ ), обеднен изотопом  $^{13}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C} = -34,0\text{‰}$ ), в то время как метильный углерод с низким значением  $\beta_i$ -фактора ( $\beta_i = 1,1344$ ) обогащен тяжелым изотопом ( $\delta^{13}\text{C} = -21,1\text{‰}$ ) как относительно карбо-

нильного углерода, так и углерода  $\text{CO}_2$  ( $\delta^{13}\text{C} = -28,8\text{\%о}$ ,  $\beta_i = 1,1916$ ). Из этого следует сделать вывод об определенной ограниченности биохимических экспериментов *in vitro* в качестве моделей фракционирования изотопов в живых организмах.

### МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЭТАНОЛА ДО УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

Дж. Ринальди, В. Майншайн и Дж. Хейс [3] исследовали изотопный состав метильного и карбоксильного углерода уксусной кислоты, образующейся при микробиологическом окислении этанола. Эксперимент состоял в следующем. Чистая культура *Acetobacter suboxydans* выращивалась на 2%-ном растворе синтетического этанола при  $30^\circ\text{C}$  в течение 72 ч. Этanol служил для микроорганизмов единственным источником энергии. В результате опыта образовалось 0,0101 мол. уксусной кислоты из 0,343 мол. исходного этанола, 0,0242 мол. этанола осталось неиспользованным.

Этанол, использованный в опыте, был получен абиогенно, путем гидратации этилена. Анализ внутримолекулярного распределения изотопов углерода показал, что гидроксильный углерод исходного этанола на  $4,6\text{\%о}$  беднее изотопом  $^{13}\text{C}$ , чем метильный углерод (табл. 7.5).

В уксусной кислоте, полученной в результате микробиологического окисления этанола, внутримолекулярное распределение изотопов оказалось обратным — карбоксильный углерод на  $3,8\text{\%о}$  обогащен изотопом  $^{13}\text{C}$  по сравнению с метильным углеродом.

Вывод авторов эксперимента состоял в том, что карбоксильный углерод ацетильной группы КоA обладает способностью обогащаться изотопом  $^{13}\text{C}$ . Механизм этого процесса в работе Дж. Ринальди с соавторами не обсуждается.

Рассмотрение результатов, представленных в табл. 7.5, не создает на первый взгляд впечатления, что измеренные изотопные составы углерода находятся в какой-либо связи с величинами соответствующих  $\beta$ -факторов. Углероды метильных групп этанола и уксусной кислоты заметно отличны по изотопному составу, хотя термодинамические изотопные факторы их практически одинаковы. Напротив, изотопный состав карбоксильного углерода ацетата совпадает с изотопным составом гидроксильного углерода этанола, в то время как величины соответствующих  $\beta_i$ -факторов существенно различны. Уксусная кислота в целом обеднена изотопом  $^{13}\text{C}$ , хотя она характеризуется более высоким значением  $\beta_{\Sigma}$ -фактора, чем этанол. Тем не менее, как мы увидим, наблюдаемое распределение изотопом может быть описано теоретическими соотношениями, выведенными выше.

Процесс фракционирования изотопов в данном случае осложнен двумя обстоятельствами. Во-первых, биохимическое окисление этанола в живой клетке сопряжено с прохождением вещества через клеточные стенки. Следовательно, возможны изотопные эффекты переноса. Во-вторых, измерение изотопного состава продукта относится к моменту, когда была превращена заметная часть этанола (около 30%), т.е. нельзя принять

Таблица 7.5

Внутримолекулярное распределение изотопов углерода в исходном этаноле и уксусной кислоте, полученной из этанола путем микробиологического окисления

Этанол	$\text{CH}_3\text{—CH}_2\text{OH}$	$\Sigma$	Уксусная кислота	$\text{CH}_3\text{—COOH}$	$\Sigma$
$\beta^{13}\text{C}$	1,1332	1,1582	1,1457	$\beta^{13}\text{C}$	1,1360
$\delta^{13}\text{C}_{\text{эксп}}$	-25,5	-30,1	-27,8	$\delta^{13}\text{C}_{\text{эксп}}$	-34,6

$\beta^{13}\text{C}$	1,1360	1,1972	1,1666
$\delta^{13}\text{C}_{\text{эксп}}$	-34,6	-30,8	-32,7

условие  $f \ll 1$  и необходимо считаться с изменением изотопного состава метаболитов в ходе реакции.

В других отношениях микробиологический эксперимент Дж. Ринальди с соавторами представляет благоприятные возможности для анализа процесса фракционирования изотопов. Уксуснокислое брожение с *Acetobacter suboxydans* происходит без образования каких-либо побочных продуктов. Авторы эксперимента подтверждают это указанием на существование точного изотопного баланса углерода между исходным этанолом, с одной стороны, и неиспользованным этанолом и уксусной кислотой — с другой (долей углерода, идущего на увеличение биомассы микробов, можно пренебречь):

$$(-28,4) (0,0343) = (-26,6) (0,0242) + (0,0101) (-32,7).$$

Уксусная кислота является конечным продуктом. Она не подвергается дальнейшему окислению. Ее метильный углерод происходит за счет метильного углерода этанола, а карбоксильный углерод — из гидроксильного углерода этанола.

Процесс биохимического окисления этанола можно описать ферментативной реакцией, схема которой изображена на рис. 7.1. Модель, отвечающая данному случаю, была рассмотрена в соответствующем разделе главы V.

Изотопный состав вещества, испытавшего наряду с биохимическим превращением перенос через клеточные мембранны, связан с изотопным составом исходного метаболита соотношением (5.63).

Коэффициент фракционирования в данном случае определяется соотношением:

$$\frac{1}{\alpha_e \alpha_{TR}} = 1 + \kappa \left( \frac{\beta_p}{\beta_s} - 1 \right) + (\Delta_\lambda + \Delta_{TR}) \cdot 10^{-3}. \quad (7.1)$$

Поскольку в рассматриваемом опыте было превращено 30% этанола от первоначального количества, необходимо использовать модель, учитывающую изменение изотопного состава субстрата по мере его расходования. Фракционирование изотопов в данной модели описывается соотношением (см. (5.70) в главе V)

$$\frac{R_p(t)}{R_{S_0}} = \frac{1}{f} \left[ 1 - (1-f)^{\frac{1}{\alpha_e \alpha_{TR}}} \right]. \quad (7.2)$$

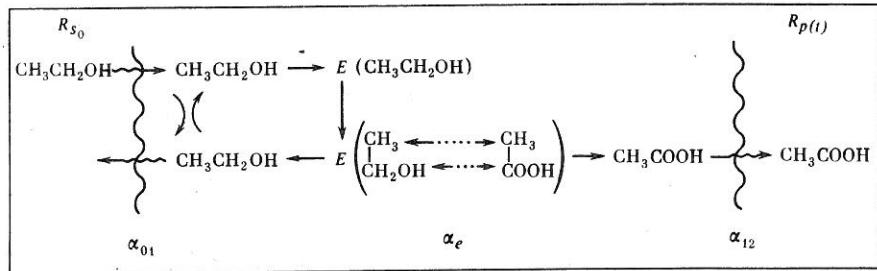


Рис. 7.1. Модель процесса биохимического окисления этанола до уксусной кислоты

Переходя к величинам  $\delta^{13}\text{C}$  и учитывая выписанные выше соотношения, получим выражение, которое устанавливает связь между изотопными составами продукта и субстрата в следующем виде:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{P}_i(t)} = \delta^{13}\text{C}_{\text{S}_{0_i}} + \left\{ \frac{1}{f} \left[ \frac{1 + \kappa \left( \frac{\beta_{\text{P}_i}}{\beta_{\text{S}_i}} - 1 \right) + (\Delta_{\lambda_i} + \Delta_{TR_i}) \cdot 10^{-3}}{1 - (1 - f)} \right] - 1 \right\} \cdot 10^3. \quad (7.3)$$

Для реакции, изображенной на рис. 7.1, могут быть составлены два уравнения типа (7.3): отдельно для метильного углерода этанола, переходящего в метильный углерод уксусной кислоты, и гидроксильного углерода этанола, переходящего в карбоксильный углерод уксусной кислоты.

Оба уравнения должны содержать одинаковую величину  $\kappa$ . То же самое касается величины  $\Delta_{TR}$ , так как в процессе переноса кинетические преимущества изотопно-легкой молекулы по сравнению с молекулой, содержащей изотоп  $^{13}\text{C}$  в одном из положений, не зависит от того, в какой именно структурной группе содержится изотоп  $^{13}\text{C}$ . Меньшая определенность имеется в отношении возможных кинетических изотопных эффектов. Очевидно, кинетический изотопный эффект, если он имеет место, должен быть больше по гидроксильному атому углерода, по которому происходит перестройка связей, чем по метильному. Величины  $\beta_i$ -факторов изотопных форм, участвующих в реакции, имеют следующие численные значения:

$$\beta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3(\text{этанол})} = 3L_{\text{C}-\text{H}} + L_{\text{C}-\text{C}} + l_{\text{C}-\text{O}} = 1,1332,$$

$$\beta^{13}\text{C}_{\text{CH}_2\text{OH}(\text{этанол})} = 2L_{\text{C}-\text{H}} + L_{\text{C}-\text{C}} + L_{\text{C}-\text{O}} = 1,1582,$$

$$\beta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3(\text{укс.кислота})} = 3L_{\text{C}-\text{H}} + L_{\text{C}-\text{C}} + l_{\text{C}-\text{O}} + l_{\text{C}=\text{O}} = 1,1360,$$

$$\beta^{13}\text{C}_{\text{COOH}(\text{укс.кислота})} = L_{\text{C}-\text{C}} + L_{\text{C}-\text{O}} + L_{\text{C}=\text{O}} = 1,1972.$$

Степень завершенности реакции  $f = \frac{0,0101}{0,0343} = 0,3$ .

Таким образом, имеем систему уравнений:

$$-34,6 = -25,5 +$$

$$+ \left\{ \frac{1}{0,3} \left[ 1 - (1 - 0,3)^{1+\kappa} \left( \frac{1,1360}{1,1332} - 1 \right) + (\Delta_{TR} + \Delta_{(2)\lambda}) \cdot 10^{-3} \right] - 1 \right\} \cdot 10^3,$$

$$-30,8 = -30,1 +$$

$$+ \left\{ \frac{1}{0,3} \left[ 1 - (1 - 0,3)^{1+\kappa} \left( \frac{1,1972}{1,1582} - 1 \right) + (\Delta_{TR} + \Delta_{(1)\lambda}) \cdot 10^{-3} \right] - 1 \right\} \cdot 10^3.$$

После преобразований эта система сводится к следующим двум уравнениям:

$$-11,0 = 2,5\kappa + \Delta_{TR} + \Delta_{(2)\lambda},$$

$$-0,8 = 33,7\kappa + \Delta_{TR} + \Delta_{(1)\lambda}.$$

Присутствие четырех неизвестных делает систему неопределенной.

Для того чтобы оценить насколько согласуются наблюдаемые изотопные эффекты с теоретической моделью, упростим задачу. Примем равенство кинетических изотопных эффектов по первому и второму атомам углерода:  $\Delta_{(1)\lambda} = \Delta_{(2)\lambda}$  (в частном случае они могут быть равны нулю) и будем рассматривать суммарный нетермодинамический изотопный эффект  $\Delta$ , включающий кинетический изотопный эффект и эффект переноса. Посмотрим, получаются ли при этом правдоподобные значения параметров процесса фракционирования. Решение системы в этом случае дает  $\kappa = 0,33$  и  $\Delta = -11,8\%$ . Значение коэффициента  $\kappa$  положительно и заключено между 0 и 1, т.е. удовлетворяет требованиям, которые диктуются физическим смыслом величины  $\kappa$ . Отрицательное значение  $\Delta$  также согласуется с ее физическим смыслом, поскольку в процессе переноса (и в результате кинетического изотопного эффекта) продукт обедняется тяжелым изотопом.

Таким образом, экспериментальные данные могут быть принципиально согласованы с теоретической моделью.

Процесс фракционирования интерпретируется следующим образом. В результате собственно ферментативной реакции должны были бы получиться величины  $\delta^{13}\text{C}$ , близкие к следующим<sup>1</sup>:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3} = -25,5 + 0,33 \left( \frac{1,1360}{1,1322} - 1 \right) \cdot 10^3 = -24,7\%,$$

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{COOH}} = -30,1 + 0,33 \left( \frac{1,1972}{1,1582} - 1 \right) \cdot 10^3 = -20\%.$$

<sup>1</sup> Запись числовых значений с точностью до знака после запятой не говорит о соответствующей точности оценок. Это сделано, чтобы сохранить формальные арифметические соответствия.

При этом уксусная кислота была бы обогащена изотопом  $^{13}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{COOH}} = -22,3\%$ ) по сравнению с исходным этанолом в согласии с соотношением  $\beta_{\Sigma}$ -факторов этих соединений. Однако в результате изотопного эффекта переноса и, возможно, в определенной доле кинетического изотопного эффекта величины  $\delta^{13}\text{C}$  оказались смещенными в сторону более отрицательных значений:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3} = -24,7 - 11,8 = -36,5\%,$$

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{COOH}} = -20,10 - 11,8 = -31,8\%.$$

Эти значения, а также значение  $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{COOH}} = -34,3\%$  должны были характеризовать изотопный состав углерода уксусной кислоты в ее первых порциях (при  $f \ll 1$ ). Поскольку в ходе микробиологического окисления этанола была превращена значительная часть субстрата, наблюдаемые изотопные эффекты оказались несколько редуцированными. В результате были зафиксированы значения  $\delta^{13}\text{C}$  уксусной кислоты, приведенные в табл. 7.5.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Abelson P., Hoering T. Carbon isotope fractionation in amino acids by photosynthetic organisms. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1961, 47, N 5, p. 623.
2. DeNiro M., Epstein S. Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis. — Science, 1977, 197, N 4300, p. 261.
3. Rinaldi G., Meinschein W.G., Hayes J.M. Carbon isotopic fractionations associated with acetic acid production by Acetobacter suboxydans. Biomed. Mass Spectrom., 1974, 1(6), p. 412.

### Глава VIII

## ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ИЗОТОПОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЦИКЛАХ

### ЦИКЛ КАЛЬВИНА

#### $\text{C}_3$ -растения

Цикл Кальвина рассматривался выше в связи с обсуждением механизма возникновения внутримолекулярных изотопных эффектов. Реакции этого цикла занимают особое место в биологическом фракционировании изотопов, поскольку в этих реакциях происходит первичная ассимиляция неорганического углерода и закладывается различие между изотопным составом углерода автотрофов и исходной  $\text{CO}_2$ .

Как отмечалось в главе II, наземные растения, осуществляющие фотосинтез посредством цикла Кальвина, характеризуются изотопным составом в диапазоне от  $-22$  до  $-34\%$ . В большинстве случаев изотопный состав высших растений лежит в пределах величин  $\delta^{13}\text{C}$  от  $-24$  до  $-28\%$ . Изотопный состав атмосферной углекислоты принят в среднем равным  $-7\%$  [26], но в приземном слое воздуха внутриконтиненталь-

ных районов он ближе к — 9 %. [19]. Таким образом, наземные растения  $C_3$ -типа обогащены изотопом  $^{13}C$  относительно исходной углекислоты на 15—20 %. Как известно, термин  $C_3$ -растения (в отличие от растений  $C_4$ -типа) отражает то обстоятельство, что первичным устойчивым продуктом фиксации  $CO_2$  в них является трехуглеродное соединение — фосфоглицериновая кислота (ФГК).

Ассимиляция внешней  $CO_2$  включает два процесса, с которыми может быть связано фракционирование изотопов: а) прохождение  $CO_2$  через клеточную стенку и растворение в цитоплазме, б) энзиматическое превращение углерода  $CO_2$  в углерод органического соединения.

### Энзиматическое карбоксилирование рибулозодифосфата *in vitro*

Первичная реакция цикла Кальвина состоит в карбоксилировании рибулозо-1,5-дифосфата с выходом двух молекул 3-фосфоглицериновой кислоты.

Эта реакция может быть проведена *in vitro*. Впервые соответствующий эксперимент с целью изучения фракционирования изотопов углерода был поставлен Р. Парком и С. Эпстайном [42]. Они использовали систему, содержащую фермент рибулозокарбоксилазу, рибулозо-1,5-дифосфат (РБДФ) и бикарбонатный буфер. В ходе эксперимента происходило полное превращение рибулозодифосфата в фосфоглицериновую кислоту (ФГК), а углерод бикарбонатного буфера использовался приблизительно на 0,3%. Полученные экспериментальные результаты представлены в табл. 8.1.

Трифосфоглицериновая кислота оказалась обеднена изотопом  $^{13}C$  в обоих проведенных опытах. На пять шестых ее углерод наследует изотопный состав углерода рибулозодифосфата, а на одну шестую — изотопный состав углерода, происходящего за счет  $CO_2$ . Вычисление изотопного состава последнего из уравнения материального баланса дало для опыта I величину  $\delta^{13}C = -22,8 \text{ ‰}$  (обеднение изотопом  $^{13}C$  на 17,4 %), а для опыта II —  $\delta^{13}C = -14,9 \text{ ‰}$  (обеднение изотопом  $^{13}C$  на 14,7 %). Дополнительно к этому, как полагали Р. Парк и С. Эпстайн [42], имеет место изотопный эффект в процессе прохождения  $CO_2$  через клеточную стенку. Они исследовали изотопный состав углерода углекислоты, растворенной в клеточной цитоплазме. Он оказался смещен в сторону обогащения легким изотопом ( $\delta^{13}C = -13,6 \text{ ‰}$ ) относительно углерода атмосферной углекислоты ( $\delta^{13}C = -7 \text{ ‰}$ ). Суммировав изотопные эффекты на стадии поступления  $CO_2$  в клеточную жидкость (~7 %) и в процессе энзиматического карбоксилирования (~17 %), Р. Парк и С. Эпстайн получили величину, достаточную для объяснения обогащенности растений легким изотопом в наблюдаемом диапазоне.

В этой связи Р. Парк и С. Эпстайн [42] сформулировали известное заключение о том, что основное биологическое фракционирование изотопов имеет место на стадии образования фосфоглицериновой кислоты, являющейся первым устойчивым продуктом фотосинтеза.

Таблица 8.1.

Изотопный состав углерода реагентов и продуктов ферментативной фиксации  $\text{CO}_2$  (по [42])

Материал	$\delta^{13}\text{C}$ , ‰	
	опыт I	опыт II
Рибулозо-1,5-дифосфат	-13,7	-13,7
Общая $\text{CO}_2$ , растворенная в реакционной смеси	-5,4	-0,2
Трифосфоглицериновая кислота	-15,2	-13,9

Долгое время опыты, подобные тем, которые провели Р. Парк и С. Эпстайн, никем не воспроизводились. Лишь 13 лет спустя, в связи с открытием принципиальных изотопных различий между растениями  $C_3$ - и  $C_4$ -типов, Т. Виллан с соавторами [51] повторил опыт с карбоксилированием рибулозодифосфата *in vitro*. Используя рибулозокарбоксилазу, выделенную из сорго (растение  $C_4$ -типа), они получили величину фракционирования — 42,9‰ при 24°C и — 26,1‰ при 18°C (относительно углерода  $\text{HCO}_3^-$ ). Вслед за этим опыты с ферментативным карбоксилированием рибулозодифосфата были проведены еще рядом исследователей. В разных опытах получались совершенно различные коэффициенты фракционирования. Поразительными были результаты, полученные В. Делинсом, Х. Лерманом, А. Нато и А. Мойсом [16]. Они обнаружили в одном из опытов с рибулозокарбоксилазой, выделенной из шпината, фракционирование изотопов, достигающее — 98,7‰. В других случаях величина фракционирования колебалась от —48 до —83,6‰ (табл. 8.2). Эксперименты, проведенные Дж. Кристеллером и другими [13], с карбоксилазой, выделенной из семян сои, дали в температурном интервале 15—35°C величины фракционирования от —35,8 до —37,6‰ (относительно  $\text{HCO}_3^-$ ). В опытах М. Эстеп с соавторами [18], использовавшими препараты рибулозодифосфаткарбоксилазы, выделенной из разных организмов, были установлены величины изотопного эффекта в диапазоне от —34,3 до —51,1‰ (относительно бикарбоната).

Следует отметить, что в результатах экспериментов подобного типа присутствует некоторая неопределенность, связанная с оценкой изотопного состава исходной углекислоты. Практически исследователи используют бикарбонат. Изотопный состав его углерода служит отправным для оценки величины фракционирования. В растворе при 25°C 98% углекислоты присутствует в виде  $\text{HCO}_3^-$ -иона. Однако в реакции карбоксилирования рибулозодифосфата участвует, как известно, не бикарбонат-ион, а молекула  $\text{CO}_2$ . Поэтому реакции энзиматического карбоксилирования предшествует стадия перехода углерода  $\text{HCO}_3^-$  в  $\text{CO}_2$ . Как термодинамический, так и кинетический изотопный эффект, связанный с этим переходом, обедняет  $\text{CO}_2$  изотопом  $^{13}\text{C}$  по сравнению с бикарбонатом. В работе Р. Парка и С. Эпстайна и в ряде других это обстоятельство не учитывалось. Позже [13, 51, 18] стали вводить поправку, отвечающую константе изотопного равновесия между

Таблица 8.2

Результаты экспериментов с энзиматическим карбоксилированием рибулозо-1,5-дифосфата *in vitro* (по [16])

	Растение, из которого извлечены ферменты	
	шпинат	кукуруза
Удельная активность препарата, μ моль СО <sub>2</sub> /мг	14	14

ч

Изотопный состав ФГК, ‰	-19,4 -20,2	-24,3 -27,8	-23,6 -24,0
Изотопный состав зафиксированного углерода, ‰	-53,4 -58,2	-88,8 -103,0	-78,8 -81,0
Изотопное разделение Δ, ‰	-48,0 -52,8	-83,6 -98,7	-73,4 -75,8

При мечании. Исходный рибулозо-1,5-дифосфат (РБДФ) имел δ<sup>13</sup>C = -12,6‰. Изотопный состав бикарбонатного буфера: δ<sup>13</sup>C<sub>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></sub> = -5,66‰. Изотопный состав зафиксированного углерода вычислялся из уравнения

$$5/6 \delta^{13}\text{C}_{\text{РБДФ}} + 1/6 \delta^{13}\text{C}_{\text{фикс}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{ФГК}}.$$

Изотопное разделение вычислялось по формуле:

$$\Delta = \frac{(\delta^{13}\text{C}_{\text{фикс}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{HCO}_3^-})}{(1 - \delta^{13}\text{C}_{\text{HCO}_3^-} \cdot 10^{-3})}.$$

Два результата в каждой клетке относятся к двум опытам с декарбоксилированием одного и того же препарата. В случае шпината проведены также эксперименты с двумя независимо приготовленными препаратами.

НСО<sub>3</sub><sup>-</sup> и СО<sub>2</sub>. В равновесии растворения СО<sub>2</sub> обедняется на 8‰ относительно НСО<sub>3</sub><sup>-</sup> при 25°C [39, 49]. Поэтому в работах [13, 51, 18] измеренные изотопные эффекты уменьшены на 8–9‰ (в зависимости от температуры, при которой проводился опыт). На эту же величину автоматически уменьшены обсуждаемые в этих работах данные других исследователей. Надо, однако, сказать, что, хотя обмен между СО<sub>2</sub> и НСО<sub>3</sub><sup>-</sup> протекает достаточно быстро (константа скорости гидрирования СО<sub>2</sub> при 25°C составляет 0,0375 сек<sup>-1</sup> [24, 21]) и изотопное равновесие достигается за время меньше 1 ч, нет доказательств, что в условиях упомянутых экспериментов действительно достигается равновесие изотопного обмена. Существование вызванного реакцией направленного потока углекислоты может привести к изотопным эффектам, отличным от равновесных. Это необходимо иметь в виду, принимая оценки коэффициентов фракционирования, сделанные авторами работы [18]. Диапазон вариаций величин фракционирования изотопов в процессе карбоксилирования РБДФ (относительно СО<sub>2</sub>) вычислен ими в пределах от -26,1 до -42,9‰. Средняя величина близка к -35,0‰. С учетом результатов, полученных всеми исследователями, диапазон вариаций составляет от -5 до -90‰.

Таким образом, экспериментальное изучение процесса карбоксилирования рибулозодифосфата *in vitro* показало значительное обогащение ассимилируемого углерода легким изотопом по сравнению с углеродом неорганического субстрата. Характерной чертой полученных результатов является: 1) слишком большая величина изотопного эффекта *in vitro*, существенно превышающая величину наблюдаемого обогащения растений легким изотопом; 2) неустойчивость изотопного эффекта, вариации которого в различных экспериментах намного превышают диапазон вариаций изотопного состава углерода растений в природе.

### Теоретический анализ фракционирования изотопов в цикле Кальвина

Процесс карбоксилирования протекает в несколько стадий [5]. Вначале происходит изомеризация рибулозодифосфата. Затем – собственно реакция карбоксилирования с образованием промежуточного продукта 2-карбокси-3-кетопентотил-1,5-дифосфата. Заключительная стадия приводит к образованию двух молекул фосфоглицериновой кислоты. Если промежуточные стадии являются обратимыми, то можно воспользоваться соотношениями типа (5.52), непосредственно связующими изотопный состав углеродных атомов трифосфоглицериновой кислоты и исходного рибулозо-1,5-дифосфата. Анализ этих соотношений показывает, что в результате реакции должно возникнуть определенное различие внутримолекулярного распределения изотопов между углеродными атомами ФГК и атомами – предшественниками в рибулозодифосфате. Термодинамические изотопные эффекты в сумме должны привести к небольшому обогащению суммарного углерода ФГК тяжелым изотопом (приблизительно на 2%, при  $\kappa = 0,5$ ).

Эксперименты *in vitro* не позволяют наблюдать полной картины изотопических смещений между углеродом-продуктом и углеродом-предшественником, поскольку по условиям эксперимента рибулозо-1,5-дифосфат используется полностью. В этом случае изотопный состав его углерода воспроизводится в соответствующих позициях углерода в ФГК. Единственный изотопный эффект, который может наблюдаться, отвечает присоединению углерода  $\text{CO}_2$  ко 2-ому атому изомеризованного рибулозодифосфата:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2} = \delta^{13}\text{C}_{\text{COOH}} + \kappa \left( \frac{1,2017}{1,1916} - 1 \right) 10^3 + \Delta_\lambda.$$

Термодинамическая компонента этого изотопного эффекта мала и отвечает небольшому обогащению карбоксильного углерода изотопом  $^{13}\text{C}$  относительно исходной  $\text{CO}_2$ . Следовательно, наблюдаемое в экспериментах *in vitro* обогащение ассимилированного углерода ФГК легким изотопом обусловлено кинетическим изотопным эффектом  $\Delta_\lambda$ .

Однако неизвестно, осуществляется ли в организмах фракционирование изотопов в процессе ассимиляции  $\text{CO}_2$  точно таким же образом, как это имеет место при ферментативном карбоксилировании рибулозодифосфата *in vitro*. Сомнения обусловлены упомянутыми осо-

бенностями полученных в эксперименте результатов, а именно большой величиной и широким диапазоном колебаний измеренных величин фракционирования.

Если даже не принимать в расчет аномально высоких значений фракционирования (50–80‰) и исходить из средней величины  $\Delta C_{\text{орг}} - CO_2 = -35\%$  [13, 18], то следовало бы ожидать, что изотопный состав  $C_3$ -растений в среднем будет около  $-42,0\%$ . Однако эта величина лежит далеко за пределами действительно наблюдаемого диапазона  $\delta^{13}C$   $C_3$ -растений. К этому следует добавить возможный изотопный эффект при внедрении  $CO_2$  из воздуха в клеточную жидкость. Р. Парк и С. Эпстайн считали, что эффект такого рода составляет приблизительно  $-7\%$  [42]. Т. Вилан с соавторами [51] подвергли сомнению данные Р. Парка и С. Эпстайна, ссылаясь на работы, в которых показано отсутствие фракционирования между газообразной и растворенной  $CO_2$  [17, 39, 49]. Последний, действительно, составляет лишь 1,0009 при  $25^\circ C$ , как это было показано еще Г. Тоддом и др. [46]. Однако это не является аргументом, поскольку в этом случае речь идет о равновесии изотопного обмена в системе  $CO_2$  (газ) –  $CO_2$  (раствор). Между тем в процессе улавливания  $CO_2$  из воздуха возможны кинетические изотопные эффекты, обусловленные преимущественной диффузией и преимущественной сорбцией изотопнолегкой  $CO_2$  [6]. Таким образом, только величины порядка  $-40 + -50\%$ , если бы они наблюдались в растениях, можно было бы считать согласующимися с результатами, полученными в экспериментах *in vitro*.

Другой существенный момент – исключительная изменчивость величины фракционирования, отмечавшаяся в опытах *in vitro*. Диапазон колебаний величин изотопных эффектов составляет от  $-5$  до  $-90\%$  (относительно расчетной величины  $\delta^{13}C_{CO_2}$ ). Даже в одной серии экспериментов, авторы которых в качестве цели работы ставили получение "воспроизводимых результатов... путем тщательного контролирования реакционных условий" [18, с. 680], разброс величин фракционирования составил от  $-25,5$  до  $-42,3\%$  (по отношению к расчетной  $\delta^{13}C_{CO_2}$ ). Это превосходит весь диапазон колебаний изотопного состава  $C_3$ -растений, произрастающих на суще, хотя на последний оказывает влияние огромное количество других факторов, включая вариации изотопного состава исходной углекислоты.

Совершенно очевидно, что имеется какое-то существенное различие между фракционированием изотопов в случае, когда процесс протекает в живом организме и в условиях лабораторного эксперимента.

М. Эстеп и другие [18] признают, что изотопные эффекты реакций карбоксилирования РбДФ *in vitro* "слишком велики" и предлагают несколько объяснений. Они отмечают, что в живых организмах изотопный эффект может быть занижен по той причине, что концентрация  $CO_2$  в атмосфере находится на уровне, не насыщающем рибулозодифосфаткарбоксилазу. Однако тогда в условиях высокой концентрации  $CO_2$  должны были бы встречаться индивиды, изотопный состав которых отвечал бы "максимальному" фракционированию ( $\delta^{13}C = -40 + -50\%$  и ниже). В природе среды с высокой концентрацией  $CO_2$  встречаются достаточно часто, например в почвах, однако организмы с подобным изотоп-

ным составом не отмечались. Кроме того, известны многочисленные лабораторные опыты, в которых организмы выращивались в условиях обильного снабжения  $\text{CO}_2$  при концентрациях (5–10%), значительно превышающих концентрацию  $\text{CO}_2$  в атмосфере [15]. И в этом случае организмы имели обычно изотопный состав – 20÷–25%.

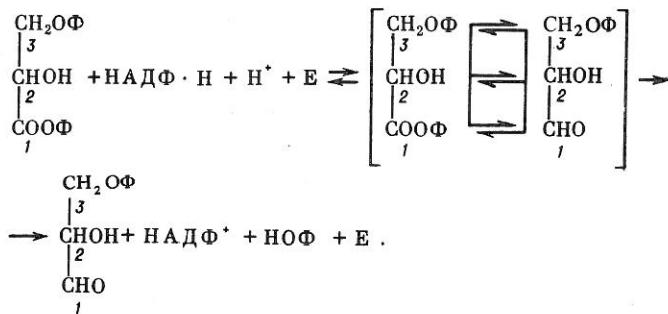
Далее те же авторы упоминают со ссылкой на работу Г. Келли [27] о "возможности существования иных автокаталитических путей фиксации  $\text{CO}_2$ , которые могли бы частично объяснить довольно большое различие между изотопным фракционированием *in vivo* и *in vitro* [18, с. 686]. Действительно, существование параллельного пути фиксации  $\text{CO}_2$  с меньшим коэффициентом фракционирования могло бы снизить обогащение легким изотопом организма в целом. Однако тогда должны были бы возникнуть большие различия в изотопном составе отдельных соединений и биохимических фракций, обусловленные существованием путей, берущих начало от резко отличающихся по изотопному составу форм ассимилированного углерода. Между тем при исследовании межмолекулярного и внутримолекулярного распределения изотопов в биологических объектах такие изотопные различия (порядка 40÷–50%) не обнаруживались (см. гл. IV).

Вообще нужно сказать, что любой фактор, редуцирующий величину изотопного обогащения растений, неизбежно должен приводить одновременно (в силу неизбежной вариабельности этого фактора в естественных условиях) к увеличению диапазона вариации изотопного состава растений. Трудность состоит как раз в том, чтобы примирить большие изотопные эффекты и большой разброс их *in vitro* с гораздо меньшими величинами обогащенности и одновременно более узким диапазоном вариаций изотопного состава растений в природе.

Возможно, наиболее логичный, хотя и кажущийся парадоксальным, путь устранения этого противоречия – принять, что изотопные эффекты в реакции карбоксилирования РБДФ, совершающейся в организме, малы т.е. признать, что опыты *in vitro* в данном случае не адекватны процессу *in vivo*. Такой вывод не лишен правдоподобности по ряду причин. Дж. Бар и Р. Йенсен [7] недавно показали, что фермент рибулозодифосфаткарбоксилаза *in vivo* характеризуется константой  $K$  ( $\text{CO}_2$ ), существенно отличающейся от таковой для очищенного препарата. В работе [18] допускается, что это может послужить причиной возникновения равновесного изотопного эффекта *in vivo*. Как было показано выше, теоретическая величина термодинамического изотопного эффекта реакции карбоксилирования мала. В соответствии с нашими оценками величины  $\beta^{13}\text{C}$  должно иметь место небольшое (2–4%) обогащение карбоксильного углерода изотопом  $^{13}\text{C}$  относительно  $\text{CO}_2$ . Недавно М. О'Лери и К. Япп [32] экспериментально показали, что в равновесной реакции декарбоксилирования (исследовалось декарбоксилирование изолимонной кислоты при помощи фермента изоцитратдегидрогеназы) карбоксильный углерод обогащается изотопом  $^{13}\text{C}$  на 2,7% по отношению к  $\text{CO}_2$ . Заметим, что это еще раз подтверждает справедливость применяемого нами расчетного метода оценки термодинамических изотопных эффектов в реакциях органических соединений. По недоразумению авторы

сочли полученные ими результаты противоречащими нашей точке зрения. Они пишут: "... Галимов<sup>1</sup> недавно предположил, что изотопные отношения в биологических системах являются скорее следствием равновесных, а не кинетических изотопных эффектов. Величина равновесного изотопного эффекта карбоксилирования (т.е. +2,7%, Э.Г.) указывает, что если бы изотопное равновесие достигалось на стадии карбоксилирования при фотосинтезе, растения были обогащались изотопом  $^{13}\text{C}$  по отношению к  $\text{CO}_2$  атмосфере, т.е. как раз в противоположность тому, что наблюдается" [32, с. 159]. Но мы как раз не считаем, что обогащение углерода растений обусловлено изотопным эффектом на стадии карбоксилирования. Если иметь в виду только термодинамический изотопный эффект, то включение  $\text{CO}_2$  в виде карбоксильной группы первичного акцептора должно быть связано, как уже говорилось, с небольшим обогащением карбоксильного углерода изотопом  $^{13}\text{C}$ . Обогащение же органического углерода легким изотопом должно иметь место на стадиях восстановления карбоксильного углерода.

Первичный продукт фотосинтеза — 3-фосфоглицериновая кислота — после фосфорелирования до 1,3-дифосфоглицериновой кислоты преобразуется в глицеральдегид-3-фосфат при участии НАДФ Н и фермента глицеральдегидфосфатдегидрогеназы [5]:



На этой стадии происходит восстановление карбоксильного углерода. Изотопный эффект выражается соотношением

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{P}(1)} = \delta^{13}\text{C}_{\text{S}_0(1)} + \kappa \left( \frac{1,1738}{1,2004} - 1 \right) \cdot 10^3 + \Delta_{\lambda(1)}$$

или

$$\Delta_{\text{СНО}-\text{СООН}} = -22 \kappa + \Delta_{\lambda(1)}.$$

Термодинамический изотопный эффект этой реакции предполагает обогащение ассимилируемого углерода изотопом  $^{12}\text{C}$ , соизмеримое с наблюдаемым в растениях. Реализация термодинамического изотопного эффекта требует выполнения условий, сформулированных в главе V. Эти условия, вероятно, выполняются в цикле Кальвина, функционирующем в  $\text{C}_3$ -растениях.

<sup>1</sup> Ссылка на работу [20].

Таким образом, обогащенность  $C_3$ -растений легким изотопом относительно исходной  $CO_2$  объяснима и без того, чтобы в первичной реакции фотосинтеза — карбоксилировании рибулозидифосфата — происходило обогащение ассимилируемого углерода изотопом  $^{12}C$ . Напротив, предполагается даже некоторое обеднение его (на 2–4%) легким изотопом. Поэтому вопрос о природе изотопных эффектов на стадии фотосинтетической фиксации углерода следует считать открытым. Соотношение термодинамических и кинетических изотопных эффектов в этом процессе может быть выявлено лишь с помощью экспериментов, учитывающих все аспекты проблемы.

#### ЦИКЛ ХЕТЧ–СЛЕКА

В 60-х г. было установлено, что не во всех случаях первичным продуктом фиксации  $CO_2$  при фотосинтезе является 3-углеродное соединение — фосфоглицериновая кислота. В ряде растений экзогенный углерод входит в начале в состав 4-углеродных соединений: щавелевоуксусной и яблочной кислот [3, 29]. В связи с этим стали выделять растения с  $C_3$ -типом и с  $C_4$ -типом фотосинтеза. Типичными  $C_4$ -растениями являются кукуруза, сорго, сахарный тростник. В суккулентах, как оказалось, действуют оба типа фотосинтеза, причем в зависимости от длины светового дня и ряда других условий происходит переход от одного типа преимущественного усвоения  $CO_2$  [37, 38] к другому.

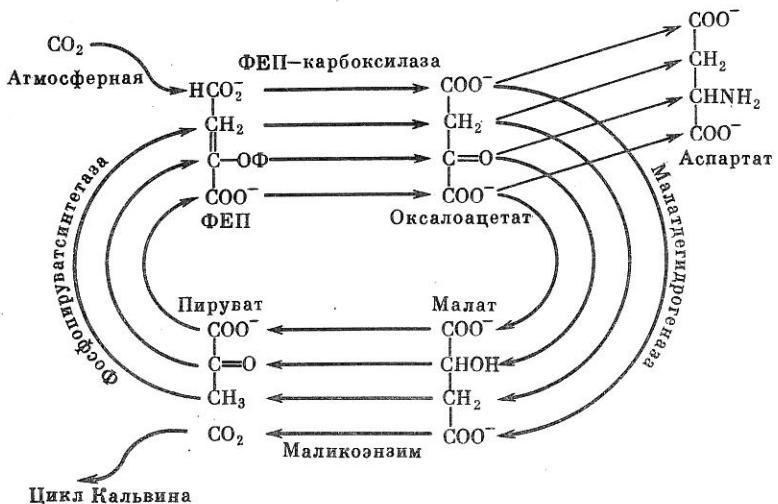
Существует целый ряд физиологических различий между  $C_3$ - и  $C_4$ -растениями. Уже давно было установлено, что такие растения, как кукуруза или сахарный тростник, обладают очень низкой пороговой концентрацией  $CO_2$  (7–9 частей на миллион (ч.н.м.) по сравнению с обычными 60–150 ч.н.м.) [40]. Вообще для  $C_4$ -растений характерен весьма экономный режим ассимиляции углекислоты.

Замечательной особенностью  $C_4$ -растений является отсутствие или весьма низкая скорость фотодыхания и — как следствие этого — высокая продуктивность фотосинтеза [31, 25]. Коэффициент фотодыхания для  $C_4$ -растений лежит в пределах 1,05–1,1, в то время как для  $C_3$ -растений характерны отношения 3,0 и выше [53].

Существует ряд специфических особенностей в строении хлоропластов и анатомии хлорофиллоносной клетки растений  $C_4$ -типа [30, 50, 47].

Физиологические особенности растений  $C_4$ -типа рассматривают как результат возникшей в ходе эволюции адаптации к условиям внешней среды [28, 45]. Растения  $C_4$ -типа, обладающие экономичным газо- и водообменом, лучше могут приспособиться к условиям жаркого засушливого климата. Большинство растений  $C_4$ -типа действительно произрастают в тропических районах и в зонах пустынь [45].

Исследования показали, что в растениях  $C_4$ -типа наряду с циклом Кальвина функционирует цикл, получивший название цикла Хетч–Слека [22, 23]. Первичным акцептором  $CO_2$  в этом цикле является фосфоенолпирват (ФЕП) (рис. 8.1). Фермент фосфоенолпирваткарбоксилаза катализирует присоединение  $CO_2$ . В итоге образуется щавелевоуксусная кислота. Последняя восстанавливается до яблочной кислоты. Переаминирование приводит к образованию аспарагиновой кислоты. Эти четы-



Р и с. 8.1. Цикл Хетч–Слека

рехуглеродные дикарбоновые кислоты в растениях  $C_4$ -типа содержат приблизительно 90% меченого углерода в первые 6 с после экспозиции к  $^{14}CO_2$ . В  $C_3$ -растениях в течение такого же времени экспозиции более 90%  $^{14}C$  локализуется в фосфоглицериновой кислоте и фосфатах сахаров [29, 12]. Иногда наиболее распространенным метаболитом среди продуктов первичной фиксации  $CO_2$  оказывается аланин [28].

Цикл Хетч–Слека замыкается декарбоксилированием органических кислот и регенерацией фосфоенолпиривата. Выделяющаяся при этом  $CO_2$  рефиксируется в цикле Кальвина.

### Изотопный состав углерода $C_4$ -растений и суккулентов

Отличительной особенностью  $C_4$ -растений оказалось их резкое отличие от растений  $C_3$ -типа по изотопному составу углерода. Если наземные растения  $C_3$ -типа обогащены изотопом  $^{13}C$  в большинстве случаев на 15–20%, относительно атмосферной углекислоты, то растения  $C_4$ -типа – всего на 2–8%.

М. Бендер [9], по-видимому, первой высказала предположение о том, что относительная обедненность легким изотопом некоторых растений (кукурузы, сахарного тростника) связана с функционированием в этих растениях цикла Хетч–Слека. Б. Смит и С. Эпстайн [45], исследовавшие значительную коллекцию наземных растений, показали, что их изотопные составы образуют два практически не перекрывающиеся диапазона значений  $\delta^{13}C$ . Растения  $C_3$ -типа относятся к категории высокообогащенных изотопом  $^{13}C$ , с  $\delta^{13}C$  от –23,2 до –34,3%. Растения  $C_4$ -типа составляют категорию низкообогащенных легким изотопом растений с  $\delta^{13}C$  от –5,6% до –18,6%. Пониженная обогащенность изотопом  $^{13}C$  оказалась

характерной для CO<sub>2</sub> в почвах плантаций растений C<sub>4</sub>-типа [33] (по сравнению с почвенной CO<sub>2</sub> из района, где культивируются преимущественно C<sub>3</sub>-растения [19]). Низкая обогащенность углерода изотопом <sup>13</sup>C, подобная современным C<sub>4</sub>-растениям, была установлена также в ископаемых формах растений этого типа [48]. Растения одного и того же семейства и даже вида могут принадлежать как к C<sub>3</sub>, так и C<sub>4</sub>-типу. Изотопный состав растений одного и того же вида в этих случаях существенно различен в зависимости от того, какой тип фотосинтетической фиксации углерода в них имеет место [45].

Суккуленты имеют изотопный состав, промежуточный по отношению к C<sub>3</sub>- и C<sub>4</sub>-растениям [41, 34, 10]. Изотопный состав их может изменяться в зависимости от окружающей обстановки [11] и длины фотопериода [37]. Лабораторные эксперименты показали, что суккуленты, выращиваемые в течение длинного светового дня, когда активен цикл Кальвина, близки по изотопному составу к C<sub>3</sub>-растениям. При коротком фотопериоде, когда активен цикл Хетч–Слека, суккуленты приближаются по изотопному составу к C<sub>4</sub>-растениям [37]. Х. Лерман с соавторами [36] исследовали кислую вытяжку, содержащую преимущественно продукты первичной фиксации углерода в цикле Хетч–Слека. Она имела изотопный состав от –10,8 до –13,5‰, в то время как нерастворимая фракция (преимущественно целлюлоза) имела δ<sup>13</sup>C от –16,5 до –18,5‰. Данные относятся к растению–суккуленту. Авторы отмечают, что изотопный состав фракции варьирует в зависимости от относительной интенсивности процессов фиксации углерода путем карбоксилирования РБДФ и ФЕП в исследованном растении. Т. Вилан с соавторами [50] произвели сравнительный анализ ряда компонентов и промежуточных метаболитов из C<sub>4</sub>-растения (сорго) и C<sub>3</sub>-растения (хлопка). Все исследованные компоненты первого оказались изотопически тяжелее. Изотопный состав листьев в сорго в целом составил –10,9, а хлопка –27,0‰. Наиболее изотопически тяжелым метаболитом в сорго оказался малат: –7,8‰. Из других промежуточных метаболитов аспарагиновая кислота имела –9,9‰, глутаминовая –11,5, аланин – 9,3, янтарная кислота –9,6‰. Глюкоза в сорго составила –9,9 по сравнению с –24,6‰ в хлопке, белки в целом в сорго –10,2‰, в хлопке –27,9‰. В то же время липидная фракция оказалась относительно обогащена изотопом <sup>13</sup>C. Липиды имели δ<sup>13</sup>C = –16,1‰.

Таким образом, в растениях C<sub>4</sub>-типа обеднены изотопом <sup>13</sup>C продукты первичной фиксации углерода в цикле четырехуглеродных кислот. В меньшей степени, но существенно по отношению к C<sub>3</sub>-растениям обеднены также продукты рефиксации углекислоты в цикле Кальвина. Это определяет относительную обедненность изотопом <sup>13</sup>C углерода, поступающего на все метаболические пути C<sub>4</sub>-растения. Однако при биосинтезе липидов происходит их обогащение изотопом <sup>13</sup>C относительно углеводов приблизительно в такой же степени, как и в C<sub>3</sub>-растениях. Очевидно, межмолекулярное распределение изотопов в тех биохимических фракциях, биосинтез которых одинаков в C<sub>3</sub>- и C<sub>4</sub>-растениях, должно быть подобным. В нашей лаборатории был изучен изотопный состав компонентов липидной фракции C<sub>4</sub>-растения [1]. Липиды экстрагировались из по-

Таблица 8.3

Изотопный состав углерода компонентов липидной фракции кукурузы и величины  $\beta^{13}\text{C}$  соответствующих соединений

Номер фракции на хроматограмме	Компонент	$\delta^{13}\text{C}, \text{\%}$	$\beta^{13}\text{C}$
	Початки кукурузы в целом	-11,9	-
	Липиды в целом	-16,3	-
	Остаток после экстракции	-11,1	-
1	Полярные липиды	-17,0	-
2	Неидентифицировано	-19,7	-
3	Моноглицериды	-18,2	1,1562
4	Диглицериды	-18,9	1,1562
5	Стерины	-17,0	1,1590
6	Жирные кислоты	-21,5	1,1540
7	Неидентифицировано	-18,1	-
8	Триглицериды	-21,0	1,1548
9	Неидентифицировано	-25,4	-
10	Воски	-25,0	1,1527
11	Углеводороды	-25,7	1,1520

П р и м е ч а н и е. Подробности методики разделения компонентов липидной фракции и оценки  $\beta^{13}\text{C}$  см. в гл. IV и в работе [2].

чатков кукурузы восковой спелости. Результаты изотопного анализа воспроизведены в табл. 8.3.

Соотношение изотопных составов отдельных компонентов отражает тенденцию к термодинамически упорядоченному распределению изотопов точно так же, как это имеет место в липидной фракции  $\text{C}_3$ -растений [2].

Таким образом, вопрос об особенностях изотопного состава  $\text{C}_4$ -растений сводится к рассмотрению особенностей фракционирования изотопов в тех реакционных циклах, в которых производится ассимиляция углекислоты.

#### Фракционирование изотопов в процессе энзиматического карбоксилирования фосфоенолпирувата *in vitro*

Как отмечалось, большинство исследователей связывают биологическое фракционирование изотопов с первичной реакцией включения внешней  $\text{CO}_2$  в биологический цикл. В цикле Кальвина таковой является реакция карбоксилирования рибулозо-1,5-дифосфата, в цикле Хетч–Слека – карбоксилирование фосфоенолпирувата (ФЕП). Был предпринят ряд экспериментов с целью изучения фракционирования изотопов углерода при энзиматическом карбоксилировании ФЕП.

Т. Вилан с соавторами [51] произвели карбоксилирование ФЕП при помощи фосфоенолпируваткарбоксилазы, выделенной из листьев сорго. Температура поддерживалась равной  $24^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}=8,5$ . Реакционная смесь содержала также малатдегидрогеназу и  $\text{HCO}_3^-$ . В опыте происходило

Таблица 8.4

Фракционирование изотопов углерода при энзиматическом карбоксилировании ФЕП *in vitro*

Растение, из которого выделен фермент ФЕП-карбоксилаза	$\delta^{13}\text{C}$ , ‰			$\Delta C_{\text{фикс}} - \text{HCO}_3^-$	Литературный источник
	$\text{HCO}_3^-$	ФЕП	малат		
Кукуруза	-31,25	-19,17	-22,31	-0,51	[44]
"	-31,10	-19,20	-23,31	-3,55	[44]
"	-5,7	-18,7	-16,6	-4,6	[16]
"	-5,7	-18,7	-15,8	-1,3	[16]
Сорго	-29,1	-21,2	-23,9	-2,9	[51]
"	-29,1	-19,1	-22,2	-2,5	[51]
Среднее				-2,6	

полное превращение ФЕП. Доля использованного бикарбоната составляла 0,2%. Аналогичные опыты с фосфоэнолпируваткарбоксилазой, выделенной из  $C_4$ -растений, были проведены В. Дилинсом и другими [16], а также П. Рейбахом и М. Бенедиктом [44].

Изотопный состав фиксируемого углерода вычислялся из уравнения

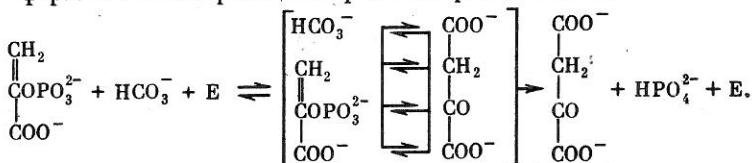
$$\delta^{13}\text{C}_{\text{фикс}} = 4\delta^{13}\text{C}_{\text{малат}} - 3\delta^{13}\text{C}_{\text{ФЕП}}.$$

В отличие от рибулозо-1,5-дифосфата при энзиматическом карбоксилировании ФЕП активной формой является не молекула  $\text{CO}_2$ , а бикарбонат-ион [38]. Поэтому энзиматическое фракционирование непосредственно определяется из соотношения

$$\Delta = \delta^{13}\text{C}_{\text{фикс}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{HCO}_3^-}.$$

Результаты экспериментов, представленные в табл. 8.4, показывают следующее: 1) величина изотопного эффекта при карбоксилировании ФЕП *in vitro* несравненно меньше, чем при карбоксилировании РБДФ, в среднем она составляет  $-2,6\text{\%}$ ; 2) разброс данных, полученных в разных опытах и разными исследователями, не превышает  $\pm 2\text{\%}$  (эта величина находится в пределах расчетной ошибки эксперимента:  $\pm 4,4\text{\%}$  [50]), т.е. в отличие от экспериментов с РБДФ результаты хорошо воспроизводятся.

Оценим теоретическую величину энзиматического изотопного эффекта в ферментативной реакции карбоксилирования ФЕП:



Поскольку происходит полное превращение пирувата, изотопный эффект *in vitro* возможен только по карбоксильному углероду оксало-ацетата, происходящему от  $\text{CO}_2$ , т.е.

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{COOH}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{HCO}_3^-} + \kappa \left( \frac{1,2000}{1,2058} - 1 \right) \cdot 10^3 + \Delta_\lambda$$

или

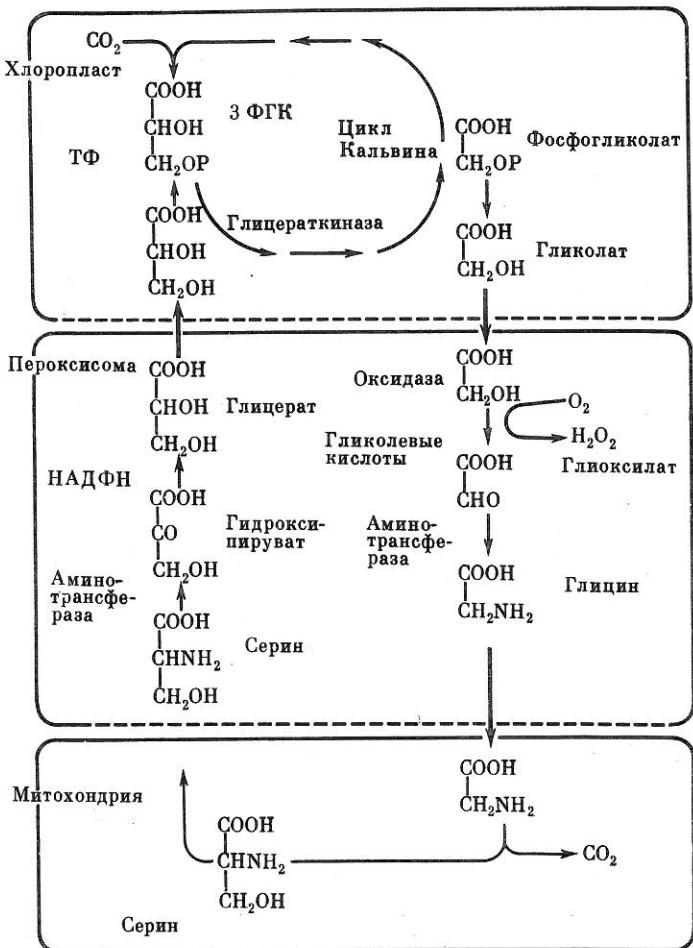
$$\Delta_{\text{COOH-HCO}_3^-} = -4,8 \kappa + \Delta_\lambda .$$

Если принять  $\kappa \approx 0,5$ , термодинамический изотопный эффект реакции составит  $-2,4\%$ . Это почти точно отвечает величинам изотопных эффектов, наблюдавшихся экспериментально.

### Причины различия изотопного состава углерода $\text{C}_3$ и $\text{C}_4$ -растений

Наиболее просто рассматривать различия в изотопном составе  $\text{C}_3$ - и  $\text{C}_4$ -растений как следствие различного фракционирования изотопов первичных реакциях фотосинтеза. Действительно, при карбоксилировании РБДФ, представляющем первичную реакцию фотосинтеза  $\text{C}_3$ -растений, установлено *in vitro* весьма значительное обогащение фиксируемого углерода легким изотопом, в то время как существенно менее обогащенным легким изотопом  $\text{C}_4$ -растениям соответствует первичная реакция карбоксилирования ФЕП, сопровождаемая небольшим изотопным эффектом. Правда в  $\text{C}_4$ -растениях цикл Хетч–Слека сопряжен с циклом Кальвина, так что углекислота, высвобождающаяся при декарбоксилировании первичных 4-углеродных органических кислот в цикле Хетч–Слека, рефикссируется в цикле Кальвина путем карбоксилирования рибулозодифосфата. Причем известно, что рибулозодифосфаткарбоксилаза, оперирующая в растениях  $\text{C}_4$ -типа, обусловливает при карбоксилировании РБДФ *in vitro* изотопные эффекты приблизительно той же величины и диапазона вариаций, что и аналогичный фермент, выделенный из  $\text{C}_3$ -растения [16, 51] (ср. например, данные для кукурузы и шпината в табл. 8.2). Однако ход рассуждений здесь следующий. В первичной реакции карбоксилирования ФЕП изотопный эффект составляет около  $-3\%$ . Поэтому первично фиксируемый углерод имеет изотопный состав около  $-10\%$  (при изотопном составе атмосферной  $\text{CO}_2 - 7\%$ )<sup>1</sup>. Этот изотопный состав наследует  $\text{CO}_2$ , образующаяся в ходе декарбоксилирования органических кислот в цикле Хетч–Слека. Высвобожденная углекислота рефикссируется в цикле Кальвина с изотопным эффектом (значительным), присущим реакции карбоксилирования РБДФ. Но, по-

<sup>1</sup> Следует отметить следующую деталь. При карбоксилировании ФЕП активной формой является  $\text{HCO}_3^-$  [38]. В цитоплазму же поступает из окружающей атмосферы двуокись углерода. Поэтому необходимо иметь в виду возможное фракционирование изотопов в системе  $\text{CO}_2 - \text{HCO}_3^-$ . Если принять, как это делалось в случае экспериментов *in vitro* с РБДФ, что в указанной системе имеет место равновесное распределение изотопов, то изотопный состав  $\text{HCO}_3^-$  при  $25^\circ\text{C}$  должен быть смешен на  $8,2\%$  в сторону положительных значений  $\delta^{13}\text{C}$  относительно  $\text{CO}_2$ . Тогда углерод, фиксируемый  $\text{C}_4$ -растениями, должен иметь  $\delta^{13}\text{C} - 1 \div -3\%$ , т.е. быть изотопически тяжелее углерода атмосферной углекислоты. Понятно, что это не так. Но тогда и в случае экспериментов с карбоксилированием РБДФ сомнительно, чтобы можно было использовать поправку на  $8,2\%$ , при помощи которой несколько уменьшается большое несоответствие природного разделения изотопов и наблюдаемого в этой реакции *in vitro*.



Р и с. 8.2. Схема превращения гликолата. Воспроизведено из [5]

скольку пул этой углекислоты невелик и она практически полностью потребляется, результирующего обогащения изотопом <sup>14</sup>C продуктов реакций в цикле Кальвина не происходит и растение в целом остается обедненным легким изотопом. Подобное объяснение в той или иной модификации было предложено рядом исследователей [35, 51, 44].

Возможно, однако, и другое объяснение, если развить альтернативу, предложенную в предшествующем разделе для объяснения изотопного эффекта в цикле Кальвина. Обогащение фиксируемого углерода можно связать в принципе не с кинетическим изотопным эффектом карбоксилирования РБДФ, а с термодинамическим изотопным эффектом на стадиях восстановления ассимилированного углерода. Для того чтобы этот эффект мог реализоваться, необходимо, чтобы существовал (как показано в главе V) обратный реакционный путь от продукта к предшествен-

нику. В этом пункте как раз может быть заключено ключевое различие в характере фракционирования изотопов в растениях  $C_3$ - и  $C_4$ -типа, так как в  $C_3$ -растениях такой путь имеется, в то время как в  $C_4$ -растениях такого пути нет или он выражен слабо. Обратный путь, о котором идет речь, есть – фотодыхание.

Субстратом фотодыхания служат первичные продукты фотосинтеза, образующиеся в цикле Кальвина [5]. Известен так называемый гликолатный путь окисления до  $CO_2$  восстановленных первичных продуктов фотосинтеза (рис. 8.2). Как уже упоминалось, отсутствие или очень слабое фотодыхание является специфической чертой  $C_4$ -растений [31]. Поэтому в  $C_3$ -растениях изотопный эффект, сопровождающий восстановление углерода в цикле Кальвина, реализуется и приводит к обогащению биологического углерода в целом легким изотопом, в то время как аналогичный термодинамический изотопный эффект на аналогичных стадиях в  $C_4$ -растениях не может реализоваться. Это рассуждение позволяет объяснить различие в изотопном составе  $C_3$ - и  $C_4$ -растений в рамках тех общих принципов, которые развиваются в этой работе.

Вопрос о том, справедливы ли подобные предположения или упомянутый кинетический изотопный эффект играет приписываемую ему роль, по-видимому, можно разрешить при помощи эксперимента над  $C_3$ -растением в условиях ингибиированного фотодыхания. Если обогащенность растения изотопом  $^{12}C$  обусловлена изотопным эффектом в процессе первичной фиксации  $CO_2$ , то ингибирование фотодыхания принципиально не должно оказать влияния на изотопный состав растения. Если же справедливо предположение об обогащении углерода изотопом  $^{12}C$  на стадии восстановления, то ингибирование фотодыхания должно привести к обеднению  $C_3$ -растений легким изотопом до уровня, характерного для растений  $C_4$ -типа. Подобный эксперимент, вероятно, способен разрешить узловую альтернативу, касающуюся вопроса о причинах изотопного эффекта между биологическим углеродом и углеродом внешней  $CO_2$ .

### ЦИКЛ КРЕБСА

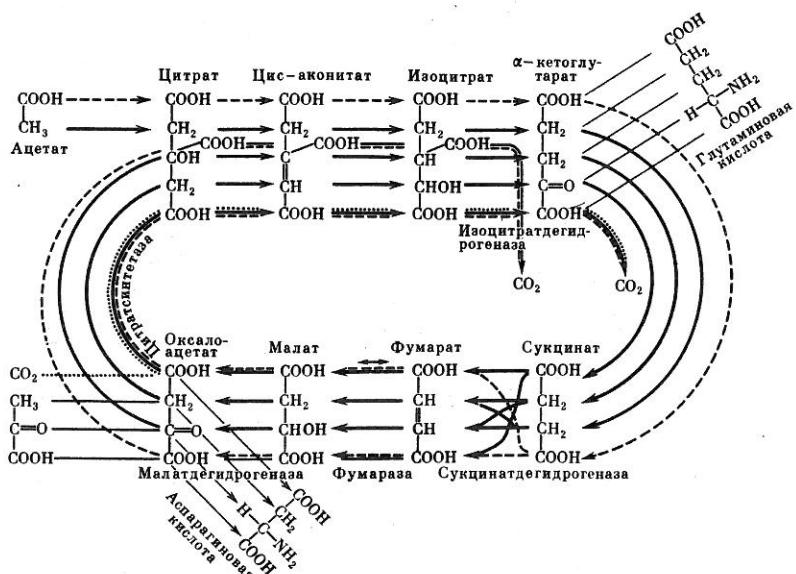
Цикл Кребса (трикарбоновых кислот) лежит, как известно, в основе процесса дыхания. Ацетильные группы, образующиеся при катаболизме липидов, белков и углеводов, окисляются в этом цикле (его называют также циклом лимонной кислоты или циклом Кребса) до  $CO_2$ . Высвобождающаяся энергия запасается в виде АТФ [4].

Ацетат вступает в реакции цикла, конденсируясь с шавелевоуксусной кислотой (оксалоацетатом). Исходным продуктом является лимонная кислота (цитрат). Дальнейшие превращения ее в цикле приводят к отщеплению двух углеродных атомов в виде  $CO_2$  и регенерации оксалоацетата.

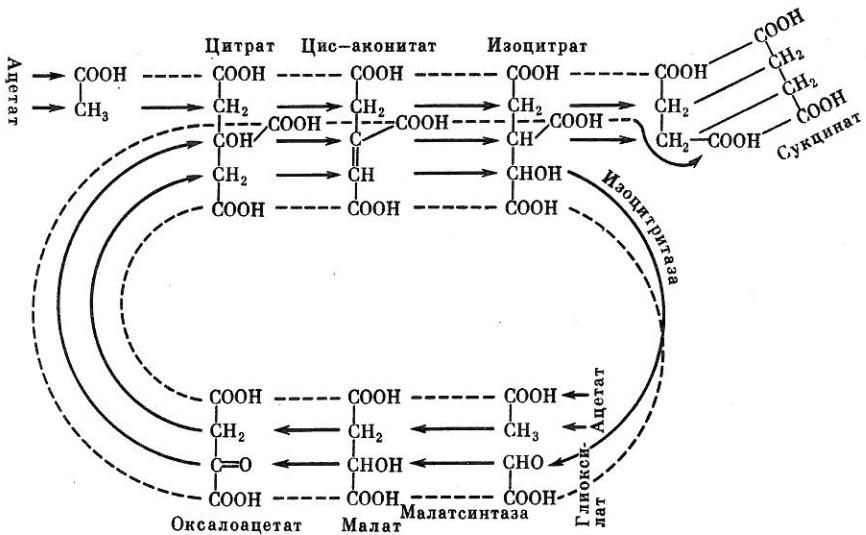
У некоторых организмов, использующих ацетат не только в качестве источника энергии, но и в качестве исходного метаболита для синтеза биохимических компонентов, функционирует глиоксилатный цикл [4].

На рис. 8.3 и 8.4 цикл Кребса и глиоксилатный цикл изображены в форме, удобной для прослеживания путей углеродных атомов.

Карбоксильный углерод ацетата (пунктирная линия) переходит от



Р и с. 8.3. Цикл Кребса



Р и с. 8.4. Глиоксилатный цикл

одного метаболита цикла к другому, неизменно оставаясь в форме карбоксила. В конечном счете этот углерод удаляется в виде  $\text{CO}_2$  в результате декарбоксилирования изоцитрата и  $\alpha$ -кетоглутарата.

Гораздо более прихотливый путь совершает углерод метильной группы ацетата. Каждый оборот цикла представляет для него виток спирали, приводящей к появлению этого углерода в положении, соседнем тому,

которое он занимал в данном соединении в предшествовавшем цикле. В конечном счете этот углерод, так же как карбоксильный углерод ацетата, сбрасывается в виде  $\text{CO}_2$  через карбоксильные группы изолимонной и  $\alpha$ -кетоглутаровой кислот.

Рассмотрение цикла трикарбоновых кислот дает повод вновь обратиться к уравнению (5.97). Из него следует, что если термодинамические изотопные факторы сравниваемых между собой соединений или углеродных атомов равны, т.е.  $\beta_1 = \beta_k$ , то термодинамическая компонента изотопного эффекта отсутствует (ввиду равенства нулю первого члена в правой части). Однако при этом изотопные различия термодинамического происхождения между  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\delta^{13}\text{C}$  могут иметь место, если в промежуточных метаболитах рассматриваемый углерод входит в иные группировки, чем в 1-м и  $k$ -м положениях. Это связано с тем, что в этом случае  $\beta_i \neq \beta_{i+1}$  и при условии  $\Delta\kappa_i \neq 0$ , второй член, содержащий  $\beta$ -факторы промежуточных метаболитов, отличен от нуля. Примером могут служить углеродные атомы  $\text{CH}_2$ -групп  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты. Они связаны между собой цепью превращений в цикле: углерод  $\text{CH}_2$ -группы, смежной с карбоксилем, проходит путь  $\text{CH}_2$  (сукцинат) –  $\text{CH}$  (фумарат) –  $\text{CHON}$  (малат) –  $\text{CO}$  (оксалоацетат) –  $\text{HCO}$  (цитрат) –  $\text{C}(\text{цисанонитат})$  –  $\text{HC}$  (изоцитрат) и возвращается в другую  $\text{CH}_3$ -группу,  $\alpha$ -кетоглутарата, соседнюю с исходной.

Если химическое окружение углерода одинаково не только в сопоставляемых соединениях, но и не изменяется в промежуточных метаболитах, тогда в формуле (5.97) не только  $\beta_1 = \beta_{k_1}$ , но и  $\beta_i = \beta_{i+1}$ , и оба члена, зависящие от термодинамических изотопных факторов, обращаются в нуль. Возможны лишь изотопные эффекты, связанные с транспортом вещества, и кинетические изотопные эффекты. Примером такой ситуации может служить путь карбоксильного углерода ацетата, остающегося в карбоксильной форме во всех метаболитах цикла вплоть до исключения из цикла в виде  $\text{CO}_2$ .

Соединения цикла лимонной кислоты представляют, таким образом, замечательную возможность оценить относительное значение изотопных эффектов разной природы.

К сожалению, изотопное распределение в этой системе до сих пор экспериментально не изучалось.

Так как углерод, происходящий от метильной группы ацетата, "обегает" последовательно все позиции углерода в соединениях цикла, за исключением "карбоксильной линии", а последняя, в свою очередь, представляет путь карбоксильного углерода ацетата, как будто бы выполняются условия установления внутримолекулярного термодинамически упорядоченного распределения изотопов в соединениях цикла (в той мере, в какой оно имеется в исходном ацетате). Однако для этого необходимо также выполнение условия замкнутости стадий, что для цикла Кребса в целом проблематично.

Можно косвенным образом оценить характер фракционирования изотопов в цикле, учитывая, что метаболиты цикла лимонной кислоты служат предшественниками ряда аминокислот, изотопный состав которых изучен (см. табл. 8.5).

Таблица 8.5

Сравнение изотопного состава глутаминовой и аспарагиновой кислот ряда организмов

Организм		Глутаминовая	Аспарагиновая	$\Delta_{\text{glu-as}}$
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	В целом	-18,7	-6,6	-12,1
	Карбоксил	-8,8	+2,2	-11,0
	Остаток	-21,1	-15,6	-5,5
<i>Anacystis nidulans</i>	В целом	-11,1	-9,7	-1,4
	Карбоксил	+11,7	+2,8	+8,9
	Остаток	-16,7	-22,1	+5,4
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	В целом	-22,6	-12,3	-10,3
	Карбоксил	-5,6	-0,8	-4,8
	Остаток	-26,6	-24,3	-2,3
<i>Chromatium sp.</i>	В целом	-15,6	-21,8	+6,2
	Карбоксил	+2,2	-15,9	+18,1
	Остаток	-20,1	-27,6	+7,5
<i>Euglena gracilis</i>	В целом	-17,3	-9,6	-7,7
	Карбоксил	-0,2	+1,0	-1,2
	Остаток	-21,5	-20,3	-1,2
<i>Gracilaria sp.</i>	В целом	-17,2	-14,4	-2,8
	Карбоксил	-8,4	-5,3	-3,1
	Остаток	-19,3	-18,4	-0,9

Приложение. Данные Ф. Абельсона и Т. Хоеринга (см. ссылку [1] в главе VII).

Глутаминовая кислота образуется путем прямого аминирования  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты. Все пять углеродных атомов  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты переходят в соответствующие атомы глутаминовой кислоты. Карбоксильные группы глутаминовой кислоты происходят за счет карбоксильных групп  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты.

Щавелевоуксусная кислота является предшественником аспарагиновой кислоты.

Углерод одной из карбоксильных групп щавелевоуксусной кислоты происходит за счет углерода карбоксильной группы  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты, а углерод другой карбоксильной группы щавелевоуксусной кислоты по ходу цикла является предшественником углерода второй карбоксильной группы  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты.

Казалось бы, карбоксильные углероды аспарагиновой и глутаминовой кислот должны быть весьма близки по изотопному составу. Однако, как видно из табл. 8.5, различия между ними в пределах каждого организма существенны. В данном случае термодинамическая компонента изотопных эффектов промежуточных ферментативных реакций близка к нулю (различия  $\beta$ -факторов могут иметь порядок, не превышающий величины изотопических чисел связей типа  $I_{C-X}$ ). Следовательно, наблюдаемые отклонения не связаны с какой-либо неопределенностью в оценках или характере проявления термодинамических изотопных эффектов. Напротив, они отражают масштаб тех неопределенностей, кото-

рые могут быть внесены в термодинамически упорядоченное распределение изотопов.

Еще одно наблюдение представляет интерес. После потери карбоксильной группы оставшиеся четыре углеродных атома  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты служат предшественниками соответствующих углеродных атомов щавелевоуксусной кислоты. В процессе декарбоксилирования может иметь место кинетический изотопный эффект. Результатом его должно быть обогащение выделяющейся углекислоты и четырехуглеродного фрагмента легким изотопом по сравнению с  $\alpha$ -кетоглутаровой кислотой, оставшейся нерасщепленной и отвечающей на образование глутаминовой кислоты. Если кинетический изотопный эффект этого типа играет преобладающую роль, а термодинамические изотопные эффекты несущественны, то щавелевоуксусная кислота и вслед за ней аспарагиновая кислота должны быть обогащены легким изотопом по сравнению с глутаминовой кислотой. Напротив, если энзиматические реакции цикла сопровождаются термодинамическими изотопными эффектами, связанными с окислением  $\text{CH}_2$ - и карбоксильного углерода  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты до соответственно карбонильного и карбоксильного углерода щавелевоуксусной кислоты, аспарагиновая кислота должна быть изотопически тяжелее, чем глутаминовая, так как величины  $\beta$ -факторов карбоксильного и карбонильного углерода больше, чем соответственно карбонильного и  $\text{CH}_2$ -углерода.

Из табл. 8.5 видно, что в пяти из шести исследованных организмов аспарагиновая кислота изотопически тяжелее глутаминовой. Таким образом, проявляется термодинамическая природа ферментативных изотопных эффектов, но они заметно затушеваны. Причин этому может быть несколько. Одна из них, очевидно, состоит в наличии ответвлений и соответственно в наличии анаплеротических реакций, компенсирующих убыль промежуточных метаболитов цикла. Подобной реакцией служит реакция Вуда—Веркмана, вводящая углекислоту непосредственно в цикл Кребса путем конденсации ее с пируватом. Наличие этого пути не является причиной собственно обогащенности карбоксильного углерода тяжелым изотопом, как это предполагалось в свое время Ф. Абельсоном и Т. Хоерингом [1, см. главу VII], но может обусловить вариации  $\delta^{13}\text{C}$ , зависящие от интенсивности функционирования этого пути и текущего изотопного состава  $\text{CO}_2$  в цитоплазме.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Галимов Э.М., Кодина Л.А., Богачева М.П. и др. Исследование распределения изотопов углерода в биогенных соединениях. — В кн.: Тр. VIII Междунар. конгр. по орган. геохимии/Под ред. А.В. Сидоренко, М., Наука, 1977, т. 3.
2. Галимов Э.М., Ширинский В.Г. Упорядоченное распределение изотопов углерода в индивидуальных соединениях и компонентах липидной фракции организмов. — Геохимия, 1975, № 4.
3. Картилов Ю.С. Распределение радиоактивного углерода  $^{14}\text{C}$  среди продуктов фотосинтеза кукурузы. — Тр. Казахс. с.-х. ин-та, 1960, т. 41, вып. I.
4. Ленинджер А. Биохимия. М.: Мир, 1974.
5. Рубин Б.А., Гавриленко В.Ф. Биохимия и физиология фотосинтеза. М.: Изд-во МГУ, 1977.

6. Baertschi P. Die Fraktionierung der Kohlenstoffisotopen bei der Absorption von Kohlendioxide. — *Helv. chim. acta*, 1952, 35, p. 1030–1036.
7. Bahr J.T., Jensen R.G. Ribulose dephosphate carboxylase from freshly ruptured spinach chloroplasts having an in vivo  $K_m(\text{CO}_2)$ . — *Plant. Physiol.*, 1974, 53, p. 39–44.
8. Bassham J.A., Calvin M. The path of carbon in photosynthesis. N.J.: Prentice-Hall, 1957.
9. Bender M.M. Mass-spectrometric studies of carbon 13 variations in corn and other grasses. — *Amer. J. Sci., Radiocarbon Suppl.*, 1968, 10, p. 468–472.
10. Bender M.M., Rohuani I., Vines H.M., Black C.C.  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ration changes in crassulacean acid metabolism plants. — *Plant. Physiol.*, 1973, 52, p. 427–430.
11. Black C.C. Photosynthetic carbon fixation in relation to net  $\text{CO}_2$  uptake. — *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 1973, 24, p. 280.
12. Chen T.M., Brown R.H., Black C.C. Photosynthetic  $^{14}\text{CO}_2$  fixation products and activities of enzymes related to photosynthesis in bermudagrass and other plants. — *Plant Physiol.*, 1971, 47, p. 199.
13. Christeller J.T., Lang W.A., Troughton J.H. Isotope discrimination by ribulose-1,5-diphosphate carboxylase. — *Plant Physiol.*, 1976, 57, p. 580–582.
14. Craig H. The geochemistry of the stable carbon isotopes. — *Geochim. et cosmochim. acta*, 1953, 3, p. 53–92.
15. Degens E.T., Guillard R.R.L., Sackett W.M., Hellebust J.A. Metabolic fractionation of carbon isotopes in marine plankton. — I. Temperature and respiration experiments. — *Deep-Sea Res.*, 1968, 15, p. 1–9.
16. Deleens V., Lerman J.C., Nato A., Moyse A. Carbon isotope discrimination by carboxylating reactions in  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_4$  and CAM plants. — In: Ed. M. Avron. Proc. of the Third Intern. Congr. on Photosynthesis/Amsterdam. Elsevier, 1974, p. 1267–1276.
17. Deuser W.G., Degens E.T. Carbon isotope fractionation in the system  $\text{CO}_2$  (gas) –  $\text{CO}_2$  (aqueous) –  $\text{HCO}_3^-$  (aqueous). — *Nature*, 1967, 215, p. 1033–1035.
18. Estep M.F., Tabita F.R., Parker L., Ch. van Baalen. Carbon isotope fractionation by Ribulose – 1–5-Biphosphata Carboxylase from various organisms. — *Plant Physiol.*, 1978, 61, N 4, p. 680.
19. Galimov E.M. Carbon isotopes of soil  $\text{CO}_2$ . — *Geochem. Intern.* 1966, 3, N 5, p. 889–897.
20. Galimov E.M. Organic geochemistry of carbon isotopes. — In: Advances in organic geochemistry/Ed. B. Tissot, F. Biennier. Paris: Technip, 1973, p. 439–452.
21. Gibbons B.H., Edsall J.T. Rate of hydration of carbon dioxide and dehydration of carbonic acid at 25°. — *J. Biol. Chem.*, 1963, 238, N 10, p. 3502–3507.
22. Hatch M.D., Slack C.R. Photosynthesis by sugarcane leaves: A new carboxylation reaction and pathway of sugar formation. — *Biochem. J.*, 1966, 101, N 1, p. 103.
23. Hatch M.D., Slack C.R. Photosynthetic  $\text{CO}_2$ -fixation pathways. — *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, 1970, 21, p. 141–162.
24. Ho C., Sturtevant J.M. The kinetics of the hydration of carbon dioxide at 25°. — *J. Biol. Chem.* 1963, 238, N 10, p. 3499–3501.
25. Jackson W.H., Volk R.J. Photorespiration. — *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, 1970, 21, p. 385.
26. Keeling C. The concentration and isotopic abundances of carbon dioxide in rural and marine air. — *Geochim. et cosmochim. acta*, 1961, 24, p. 277–298.
27. Kelly G.J., Letzko E., Gibbs M. Regulatory aspects of photosynthetic carbon metabolism. — *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, 1976, 21, p. 181–205.
28. Kennedy R.A., Laetsch W.M. Plant species intermediate for  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_4$  photosynthesis. — *Science*, 1974, 184, N 4141, p. 1087–1088.
29. Kortschak H.P., Harrt C.E., Burr G.O. Carbon dioxide fixation in sugarcane leaves. — *Plant Physiol.*, 1965, 40, N 2, p. 209–213.
30. Laetsch W.M. Relationship between chloroplast structure and photosynthetic carbon fixation pathways. — *Sci. Progr.*, 1969, 57, p. 323–351.
31. Laing W.H., Forde B.J. Comparative photorespiration in Amaranthus, soybean and corn. — *Planta (Berl.)*, 1971, Bd. 98, S. 221.
32. O'Leary M.H., Yapp C.J. Equilibrium carbon isotope effect on a decarboxylation reaction. — *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1978, 80, N 1, p. 155–160.

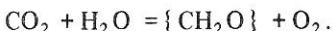
33. Lerman J.C. Soil CO<sub>2</sub> and groundwater: Carbon isotope composition. — In: Proc. 8th Intern. Conf. Radiocarbon Dating/Ed. T.A. Rafter, T. Grant-Taylor. Wellington: Roy. Soc. N.Z., 1972, p. D93–D105.
34. Lerman J.C. Variation in the carbon isotope composition of a plant with crassulacean acid metabolism. — Plant Physiol., 1974, **53**, p. 581–584.
35. Lerman J.C. How to interpret variations in the carbon isotope ratio of plants. — In: Proc. Symp. Environ. Biol. Contr. Photosynthesis. Belgium, 1974, Aug. 26–30. Preprint, 1974.
36. Lerman J.C., Delleens E., Nato A., Moyse A. Variations in the carbon isotope composition of a plant with crassulacean acid metabolism. — Plant Physiol., 1974, **53**, p. 581–584.
37. Lerman J.C., Queiroz O. Carbon fixation and isotope discrimination by a crassulacean plant: Dependence on the photoperiod. — Science, 1974, **183**, p. 1207.
38. Maruyama H., Easterday R.L., Chang H.C., Lane M.D. The enzymatic carboxylation of phosphoenolpyruvate. — J. Biol. Chem., 1966, **241**, N 10, p. 2405–2412.
39. Mook W.G., Bommerson J.C., Staverman W.H. Carbon isotope fractionation between dissolved bicarbonate and gaseous carbon dioxide. — Earth and Planet. Sci. Lett., 1974, **22**, p. 169–176.
40. Moss D.M. The limiting carbon dioxide concentration for photosynthesis. — Nature, 1962, **193**, p. 587.
41. Osmond C.B., Allaway W.G., Sutton B.G. et al. Carbon isotope discrimination in photosynthesys of CAM plants. — Nature, 1973, **246**, p. 41.
42. Park R., Epstein S. Carbon isotope fractionation during photosynthesis. — Geochim. et cosmochim. acta, 1960, **21**, p. 110–126.
43. Park R., Epstein S. Metabolic fractionation of <sup>13</sup>C and <sup>12</sup>C in plants. — Plant Physiol., 1961, **36**, p. 133–138.
44. Reibach P.H., Benedict C.R. Fractionation of stable carbon isotopes by phosphoenolpyruvate carboxylase from C<sub>4</sub> plants. — Plant Physiol., 1977, **59**, N 4, p. 564–568.
45. Smith B.N., Epstein S. Two categories of <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C ratios for higher plants. — Plant Phys., 1971, **47**, p. 380–384.
46. Thode H.G., Shima M., Rees C.E., Krishnamurt K.V. Carbon-13 isotope effects in systems containing carbon dioxide, bicarbonate, carbonate and metal ions. — Canad. J. Chem., 1965, **43**, N 3, p. 582–595.
47. Tregunna E.B., Smith B.N., Berry J.A., Downton W.J.S. Some methods for studing the photosynthetic taxonomy of the angiosperms. — Canad. J. Bot., 1970, **48**, p. 1209–1214.
48. Troughton J.H., Wells P.V., Mooney H.A. Photosynthetic mechanisms and paleoecology from carbon Isotope ratios in ancient specimens of C<sub>4</sub> and CAM plants. — Science, 1974, **185**, N 4151, p. 610.
49. Wendt I. Fractionation of carbon isotopes and its temperature dependence in the system CO<sub>2</sub>-gas–CO<sub>2</sub> in solution and HCO<sub>3</sub>–CO<sub>2</sub> in solution. — Earth and Planet. Sci. Lett., 1968, **4**, N 1, p. 64–68.
50. Whelan T., Sackett W.M., Benedict C.R. Carbon isotope discrimination in a plant possessing the C<sub>4</sub> dicarboxylic acid pathway. — Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1970, **41**, p. 1205–1210.
51. Whelan T., Sackett W.M., Benedict C.R. Enzymatic fractionation of carbon isotopes by phosphoenolpyruvate carboxylasa. — Plant Physiol., 1973, **51**, p. 1051–1054.
52. Woo K.C., Anderson J.M., Boardman N.K. et al. Deficient photosystem II in agranal bundle sheath chloroplast of C<sub>4</sub> plants. — Proc. Mat. Acad. Sci. USA, 1970, **67**, p. 18–25.
53. Zelitch I., Day P.R. The effect of net photosynthesis of pedigree selection for low and high rates of photorespiration in tobacco. — Plant Physiol., 1973, **52**, p. 33–37.

*Глава IX*  
**БИОЛОГИЧЕСКОЕ ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ  
ИЗОТОПОВ КИСЛОРОДА**

**$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  БИОЛОГИЧЕСКОГО КИСЛОРОДА**

Рассмотренные выше принципы биологического фракционирования изотопов, очевидно, применимы не только к изотопам углерода, но и к изотопам других элементов. Однако в зависимости от химических свойств элемента соотношения между изотопными эффектами различной природы для разных элементов могут быть весьма разными.

Кислород является единственным элементом, присутствующим во всех компонентах суммарного уравнения фотосинтеза:



Представление об изотопных составах этих компонентов можно получить из имеющихся геохимических данных и результатов немногих специальных биологических экспериментов.

Изотопный состав кислорода атмосферной углекислоты составляет в среднем величину  $\delta^{18}\text{O} = +41\text{‰}$  [5]. В водной среде кислород углекислоты находится в изотопном равновесии с кислородом воды. Коэффициент разделения изотопов кислорода в системе  $\text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O}$  составляет 1,0412 при  $25^\circ\text{C}$  [21]. Иначе говоря, углекислота обогащена изотопом  $^{18}\text{O}$  приблизительно на  $+40\text{‰}$  относительно кислорода воды.

Изотопный состав морской воды близок к  $\delta^{18}\text{O} = 0,0\text{‰}$  (стандарт SMOW, см. главу I) и относительно постоянен. Изотопный состав внутриконтинентальных вод колеблется в широком диапазоне — от  $+30\text{‰}$  в замкнутых водоемах аридных зон до  $-50\text{‰}$  в приполярных районах [4]. Зависимость изотопного состава углекислоты от изотопного состава воды ввиду изотопного обмена кислорода предопределяет корреляцию между изотопным составом воды и кислорода водных растений, в ней обитающих [12]. Изотопный состав исследованных водных растений колеблется от  $\delta^{18}\text{O} = +14,2\text{‰}$  до  $+28,3\text{‰}$  [12]. Различие между изотопным составом воды и кислорода водных растений, как показали С. Эпстайн и П. Томсон [12], довольно устойчиво и составляет приблизительно  $+28\text{‰}$ .

Вода, испаряющаяся с поверхности океана, обеднена изотопом  $^{18}\text{O}$ . Поэтому атмосферная влага, метеорные и грунтовые воды, т.е. в конечном счете вода, питающая наземные растения, изотопически легче океанической воды. Метеорные воды закономерно обедняются изотопом  $^{18}\text{O}$  с увеличением амплитуды местности и географической широты. В тропиках осадки имеют  $\delta^{18}\text{O}$  от 0 до  $-5\text{‰}$ , в умеренном поясе от  $-5$  до  $-15\text{‰}$ , в полярных широтах — менее  $-15\text{‰}$  [7]. С другой стороны, вследствие испарения влаги с поверхности листьев внутриклеточная вода в растениях обогащена тяжелым изотопом кислорода [8, 14]. Чем активнее испарение (транспирация), тем значительнее

Рис. 9.1. Зависимость  $\delta^{18}\text{O}$  растений от географической широты. Воспроизведено из [18]

последний эффект. Этим объясняется наблюдавшаяся рядом исследователей зависимость  $\delta^{18}\text{O}$  растений от влажности [13, 18] ( $\sim 2\%$  на 10%-ное изменение влажности) и температуры [15, 17]. Интересно привести зависимость средней величины  $\delta^{18}\text{O}$  растений от географической широты [18] (рис. 9.1). Она отражает конкуренцию двух упомянутых процессов. В высоких широтах образцы обеднены изотопом  $^{18}\text{O}$ , поскольку здесь и эффективность транспирации низкая, и осадки изотопически легкие. В средних широтах сочетаются сравнительно высокая эффективность транспирации с умеренной обедненностью осадков изотопом  $^{18}\text{O}$ . В тропических районах из-за высокой влажности обогащенность растений изотопом  $^{18}\text{O}$  падает, несмотря на то что осадки здесь относительно изотопически тяжелые.

В целом наземные растения характеризуются изотопным составом органического кислорода в диапазоне  $\delta^{18}\text{O}$  от +15 до +35% [12, 15, 17, 18].

Кислород атмосферы обогащен изотопом  $^{18}\text{O}$  на +23,5% [19] по сравнению с кислородом воды мирового океана (эффект Дола). Однако эту величину нельзя отождествлять с величиной соответствующего биологического изотопного эффекта. Изотопный состав кислорода атмосферы определяется балансом кислорода, выделяющегося при фотосинтезе, а также потребляемого при дыхании и в процессах окисления [10, 16]. Известно, что кислород в контакте с растениями обогащается изотопом  $^{18}\text{O}$ . М. Дол и Дж. Дженкс [11] нашли, что кислород, выделяемый при фотосинтезе, имеет изотопный состав, соответствующий изотопному равновесию между молекулярным кислородом и водой (т.е. обогащен  $^{18}\text{O}$  относительно воды приблизительно на 8%). Высказывалось мнение, что собственно кислород фотосинтеза совпадает с изотопным составом воды, а наблюдаемое обогащение биогенного кислорода изотопом  $^{18}\text{O}$  обусловлено только преимущественным потреблением изотопно-легкого кислорода в процессе дыхания [1, 2]. Г. Лейн и М. Дол [16], исследовавшие фракционирование изотопов кислорода в процессе дыхания, установили, что изотопы кислорода фракционируются различными организмами с фактором, колеблющимся от 1,006 до 1,029 при среднем значении 1,016. Так или иначе качественно можно принять, что молекулярный кислород занимает по изотопному составу промежуточное положение между водой и органическим кислородом.

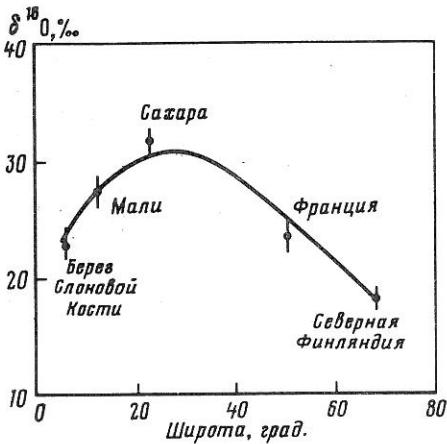


Таблица 9.1

Фракционирование изотопов в ходе экспериментального выращивания растения (пшеницы) в закрытой камере [9]

	$\delta D_{SMOW}$ , ‰	$\delta^{18}O_{SMOW}$ , ‰	$\delta^{13}C_{PDB}$ , ‰
Эксперимент с $CO_2$ "нормального" изотопного состава			
$CO_2$			
на входе		+6,5	-39,6
на выходе		+33,3	-39,4
Вода			
на входе	-52	-8,1	
на выходе	-52	-8,4	
выделенная из растения	-2	-0,8	
Целлюлоза	-13	+26,8	-57,2*
Эксперимент с $CO_2$ , обогащенный $^{18}O$			
$CO_2$			
на входе		+985	-37,3
на выходе		+160	Не опр.
Вода			
на входе	-52	-8,0	
на выходе	-51	-8,3	
выделенная из растения	-7	+13,2	
Целлюлоза	-16	+35,4	-53,6

\* Необычный изотопный состав углерода растений объясняется обогащенностью питающей углекислоты легким изотопом. Если бы вместо  $\delta^{13}C = -39.6\%$  питающая углекислота имела величину  $\delta^{13}C = -7\%$ , характерную для атмосферной  $CO_2$ , растение имело бы величину  $\delta C^{13} = -24\%$ , типичную для наземных растений.

М. Де Ниро и С. Эпстайн [9]<sup>1</sup> исследовали распределение изотопов кислорода в воде,  $CO_2$  и целлюлозы растения (пшеницы), выращенного в закрытой камере, при контролируемых условиях. Проведены были серии экспериментов. В одном из них использовалась углекислота с "нормальным" изотопным составом, в другом – резко обогащенная изотопом  $^{18}O$  (табл. 9.1).

В эксперименте, моделирующем обычные природные условия, было установлено следующее: 1) кислород целлюлозы обогащен изотопом  $^{18}O$  относительно воды и обеднен относительно углекислоты (на выходе); 2) кислород воды, выделенной из растения, обогащен изотопом  $^{18}O$  относительно грунтовой воды; 3) углекислота на выходе обогащена изотопом  $^{18}O$  относительно углекислоты на входе.

Наблюдаемая в эксперименте обогащенность внутриклеточной воды тяжелыми изотопами кислорода и водорода иллюстрирует изотопный эффект, обусловленный транспирацией.

Кислород целлюлозы обогащен изотопом  $^{18}O$  на 28%, относительно внутриклеточной воды, т.е. коэффициент фракционирования изотопов

<sup>1</sup> Благодарю С. Эпстайна и М. Де Ниро за ознакомление меня с работой [9] до ее опубликования.

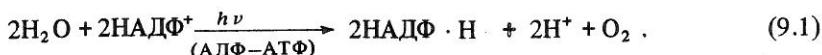
между органическим веществом и водой оказался для исследованного наземного растения таким же, как для водных растений.

В эксперименте с обогащенной  $\text{CO}_2$  ( $^{18}\text{O}$  от 160 до 985‰) изотопный состав целлюлозы изменился на сравнительно небольшую величину (8,6 ‰). Приблизительно на такую же величину (14‰) изменился изотопный состав внутриклеточной воды. Иначе говоря, разная обогащенность питающей углекислоты изотопом  $^{18}\text{O}$  слабо повлияла на изотопный состав растения. Из этого был сделан вывод, что "кислород, происходящий из двуокиси углерода, полностью обменивается с водой в растении за время, в течение которого образуется целлюлоза" [9]. Обмен, по мнению авторов цитируемой работы, происходит еще до включения  $\text{CO}_2$  в 3-фосфоглицериновую кислоту. Однако они допускают, что он может происходить и в ходе биосинтеза целлюлозы, на стадии D-глицеральдегидфосфата.

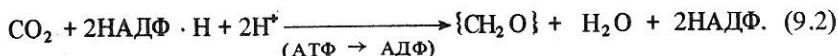
Молекулярный кислород в этом эксперименте не исследовался, но, как уже упоминалось, он имеет изотопный состав, промежуточный между изотопным составом кислорода, воды и биомассы растения. Таким образом, компоненты суммарной реакции фотосинтеза располагаются в следующий ряд по направлению возрастания содержания изотопа  $^{18}\text{O}$ : внутриклеточная вода — молекулярный кислород — органический кислород — углекислота.

### ПРИРОДА ИЗОТОПНЫХ ЭФФЕКТОВ КИСЛОРОДА В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

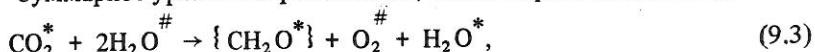
Известны основные процессы, определяющие путь кислорода при фотосинтезе и дыхании [3]. Под действием света происходит фотоокисление воды и выделение свободного кислорода:



Восстановительный потенциал и энергия АТФ, запасенная в этой реакции, расходуется далее на стадии восстановления углерода  $\text{CO}_2$ .



Суммарное уравнение фотосинтеза, таким образом, имеет вид

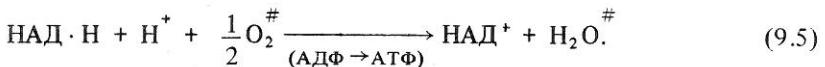


где одинаковые значки показывают генетическую связь атомов кислорода.

В процессе дыхания происходит окисление органических соединений. В цикле Кребса осуществляется полное дегидрирование уксусной кислоты [3]:



а в реакциях сопряженного с дыханием окислительного фосфорилирования ← перенос электронов к молекулярному кислороду по реакции



Суммарная реакция дыхания отсюда



Если бы не было изотопных эффектов, сопровождающих указанные процессы, то следовало бы ожидать, что изотопный состав органического кислорода ( $\delta^{18}\text{O}_{\text{орг}}$ ) в соответствии с уравнением (9.3) будет отвечать изотопному составу кислорода  $\text{CO}_2$ . Из-за частичной рефиксации расpirаторной углекислоты (уравнение 9.4) величина  $\delta^{18}\text{O}_{\text{орг}}$  должна была бы быть несколько сдвинута в сторону изотопного состава кислорода воды. Однако в системе  $\text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O}$  происходит быстрый изотопный обмен кислорода [6]. Как показал описанный выше эксперимент [9], изотопное равновесие между  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  успевает установиться раньше, чем  $\text{CO}_2$  вовлекается в биосинтез. Поскольку содержание воды чамного превосходит содержание всех других компонентов, участвующих в метаболизме, включая  $\text{CO}_2$ , изотопный состав последней будет определяться изотопным составом воды плюс коэффициент фракционирования между  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{CO}_2$  при данной температуре. Иначе говоря, изотопный состав, исходный для биосинтеза  $\text{CO}_2$ , не должен зависеть от изотопного состава внешней  $\text{CO}_2$ , в частности от добавки рефиксированной расpirаторной  $\text{CO}_2$ . Тем не менее изотопный состав органического кислорода не совпадает с изотопным составом кислорода  $\text{CO}_2$ . Он отличается от последнего на  $-14\%$  и на  $+28\%$  — от изотопного состава кислорода воды (углекислота при  $25^\circ\text{C}$  обогащается изотопом  $^{18}\text{O}$  на  $+42\%$  относительно воды). С. Эпстайн с соавторами [9, 12] полагают, что величину  $+28\%$  можно объяснить, приняв, что кислород целлюлозы складывается за счет кислорода  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{CO}_2$  в пропорции один к двум. Альтернативное объяснение состоит в том, что кислород целлюлозы происходит за счет  $\text{CO}_2$ , но между  $\text{CO}_2$  и органическим кислородом имеет место фракционирование изотопов.

Точно так же должно иметь место фракционирование изотопов между органическим кислородом и свободным молекулярным кислородом в суммарном процессе фотосинтез плюс дыхание. В противном случае в соответствии с уравнениями (9.3) и (9.6) изотопный состав молекулярного кислорода совпадал бы с изотопным составом кислорода воды.

Имеющихся сегодня экспериментальных данных недостаточно для того, чтобы сколько-нибудь всесторонне рассмотреть вопрос о природе биологических изотопных эффектов кислорода. Ограничимся ниже лишь доказательством того, что наблюдаемое распределение изотопов кислорода в компонентах суммарного уравнения фотосинтеза в принципе согласуется с представлением о преимущественно термодинамической природе изотопных эффектов в биологических системах.

Обратимся к рассмотрению возможных термодинамических изотопных эффектов кислорода в органических соединениях, основываясь на величинах изотопических чисел связей  $\beta^{18}\text{O}$ , выведенных в главе III.

Органические соединения биологических компонентов включают атом кислорода в следующих структурных позициях.

Белки содержат кислород в пептидной связи. Атом кислорода образует с углеродом связь ( $\text{O} = \text{C}$ )  $\sigma\pi_{sp_2-sp_2}$ , характеризующуюся изотопическим числом, равным 0,105. Кроме того, два атома кислорода входят в состав карбоксильных групп аминокислот, если они содержатся в аминокислотных остатках (остатки двухосновных аминокислот). Один из этих атомов характеризуется  $\beta^{18}\text{O} = 1,105$ , другой  $-\beta^{18}\text{O} = 1 + L_{\text{O}-\text{C}} + L_{\text{O}-\text{H}} = 1,097$ . В среднем величины  $\beta_{\Sigma}^{18}\text{O}$  белковых молекул должны быть близки к 1,100.

В молекулах сахаров кислородный атом присутствует в состоянии  $sp_3$ -гибридизации орбиталей и образует  $\sigma$ -связи с  $sp_3$ -гибридизированным атомом углерода и атомом водорода. Величина  $\beta^{18}\text{O}$  в этом случае равна 1,097. Один из шести атомов кислорода (в гексозах) образует связь ( $\text{O}=\text{C}$ )  $\sigma\pi_{sp_2-sp_3}$  в альдозах ( $\beta^{18}\text{O} = 1,105$ ) или при пиранозной связи ( $\text{O}=\text{C}$ )  $\sigma\pi_{sp_3-sp_3}$  ( $\beta^{18}\text{O} = 1,130$ ). Таким образом,  $\beta_{\Sigma}^{18}\text{O}$ -факторы сахаров, так же как и белков, имеют значения, близкие или большие, чем 1,100.

В липидах кислород присутствует в карбоксильных, кето- и спиртовых группах. Величины  $\beta^{18}\text{O}$  имеют значения 1,098–1,105. Кислород эфирных групп характеризуется более высоким значением  $\beta$ -фактора (1,130).

В лигнине значительная часть атомов кислорода находится в составе метоксильных групп. Величина  $\beta^{18}\text{O}$  кислорода  $\text{OCH}_3^-$  групп равна 1,130. Поэтому лигнин, вероятно, должен быть несколько обогащен тяжелым изотопом кислорода по сравнению с другими биохимическими компонентами. В целом  $\beta$ -факторы соединений, входящих в состав липидной фракции и лигнина, характеризуются величинами 1,100–1,110.

Несложно вычислить величину  $\beta^{18}\text{O}$  целлюлозы, данные по изотопному составу кислорода которой обсуждались выше. Она равна 1,1086 (без учета влияния дальнего окружения).

Сопоставим между собой величины  $\beta$ -факторов, характеризующие компоненты системы  $\text{CO}_2 - \text{H}_2\text{O} - \{\text{CH}_2\text{O}\} - \text{O}_2$ . Как видно из табл. 9.2, величины  $\beta^{18}\text{O}$  возрастают в направлении вода – молекулярный кислород – органический кислород – углекислота, т.е. как раз в том направлении, в каком возрастает наблюдаемая обогащенность их изотопом  $^{18}\text{O}$ . Вероятно, не следует переоценивать доказательную силу этого совпадения, имея в виду возможность других факторов, которые могут контролировать распределение изотопов кислорода в упомянутой системе. Однако показательным является тот факт, что соотношения термодинамических изотопных факторов органического, молекулярного кислорода, воды и  $\text{CO}_2$  отвечают таким соотношениям их изотопных составов, которыми они в действительности характеризуются в биосистемах.

Решающее значение для оценки роли термодинамических изотопных

Таблица 9.2

Величины  $\beta^{18}\text{O}$ -факторов соединений, образующих систему  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} = \{\text{CH}_2\text{O}\} + \text{O}_2$  (при  $300^\circ\text{K}$ ) (см. табл. 3.18 и 3.19)

Соединение	$\beta^{18}\text{O}$	Соединение	$\beta^{18}\text{O}$
$\text{H}_2\text{O}$	1,0734 <sup>1</sup>	$\{\text{CH}_2\text{O}\}$ -целлюлоза	1,1086
$\text{O}_2$	1,0818	$\text{CO}_2$	1,1175

<sup>1</sup> Указано значение  $\delta^{18}\text{O}$  для жидкой воды, согласно Дж. О'Нилу и Л. Адами [20], с учетом ревизии, сделанной ими позже для фракционирования в системе  $\text{CO}_2 - \text{H}_2\text{O}$  [21].

Таблица 9.3

$\beta_i^{18}\text{O}$ -факторы кислорода некоторых структурных групп

Структурная группа, связь	$\beta_i^{18}\text{O}$	Структурная группа, связь	$\beta_i^{18}\text{O}$
$\text{C}-\text{O}-\text{H}$ , гидроксильная	1,097	$\text{C}-\text{O}-\text{C}$ , эфирная	1,130
$\text{C}=\text{O}$ , карбоксильная	1,105		

эффектов в биологическом фракционировании изотопов кислорода имело бы изучение межмолекулярных и внутримолекулярных изотопных эффектов кислорода в органических соединениях. Величины  $\beta^{18}\text{O}$  разных биохимических компонентов, как показывает рассмотрение, проведенное выше, отличаются незначительно. Поэтому, вероятно, изотопный состав кислорода их будет сравнительно близок.

Более существенными должны быть внутримолекулярные изотопные эффекты. Как видно из табл. 9.3,  $\beta_i^{18}\text{O}$ -факторы гидроксильного и карбоксильного кислорода и кислорода, образующего эфирную связь, отличаются на величины, которые должны обеспечить существенное и вполне определенное различие в их изотопном составе.

#### ЛИТЕРАТУРА

- 1 Виноградов А.П., Кутюрин В.М. К вопросу о механизме дегидрирования воды в процессе фотосинтеза. – В кн.: V Междунар. биохим. конгр. "Механизм фотосинтеза". Симп. VI. М.: Изд-во АН СССР. 1962.
- 2 Кутюрин В.М. Водное происхождение кислорода фотосинтеза и изменчивость изотопного состава кислорода, выделяемого растениями. – В кн.: Очерки современной геохимии и аналитической химии. М.: Наука, 1972.
- 3.Лениндженер А. Биохимия. М. Мир, 1974.
- 4.Ферронский В.И., Дубинчук В.Т., Поляков В.А. и др. Природные изотопы в гидросфере. М.: Недра, 1975.
- 5.Boettlinga Y., Craig H. Oxygen isotope fractionation between  $\text{CO}_2$  and water, and the isotopic composition of marine atmospheric  $\text{CO}_2$ . – Earth and Planet. Sci. Lett., 1969. 5, N 5, p. 285–295.
- 6.Cohn M., Urey H.C. Oxygen exchange reactions of organic compounds and water. – J. Amer. Chem. Soc., 1938, 60, N 3, p. 679–687.

7. Craig H., Gordon L. Deuterium and oxygen-18 variations in the ocean and the marine atmosphere. — In: Stable isotopes in oceanographic studies and paleotemperatures. Spoleto, 1965, p. 9–130.
8. Craig H., Gordon L.I., Horibe Y. Isotopic exchange effects in the evaporation of water. 1. Low-temperature experimental results. — J. Geophys. Res., 1963, 68, N 17, p. 5079–5087.
9. DeNiro M.J., Epstein S.  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  ratios of terrestrial plant cellulose are independent of the  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  ratio of atmospheric carbon dioxide. — Science, 1979.
10. Dole M. The oxygen isotope cycle in nature. — In: Proc. 2nd Conf. Nucl. Proces. Geol. Sett., 1955, p. 13–19.
11. Dole M., Jenks J. Isotopic composition of photosynthetic oxygen. — Science, 1944, 100, p. 409.
12. Epstein S., Thomson P., Yapp C.J. Oxygen and hydrogen isotopic ratios in plant cellulose. — Science, 1977, 198, N 4323, p. 1209–1215.
13. Ferhi A.M., Long A., Lerman J.C. Stable isotopes of oxygen in plants – a possible paleohygrometer. — In: Hydrology and water resources in Arizone and Southwest, 1977, 7, p. 191–198.
14. Gonfiantini R., Gratzien S., Tongiorgi E. Oxygen isotopic composition of water in leaves: Isotopes and radiation in soil–plant nutrition studies. Vienna: IAEA, 1965, p. 405–410.
15. Gray J., Thomson P. Climatic information from  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  ratios of cellulose in tree rings. — Nature, 1976, 262, p. 481–482.
16. Lane G.A., Dole M. Fractionation of oxygen isotopes during respiration. — Science, 1956, 123, p. 574.
17. Libby L.M., Pandolfi L.I., Payton P.H. et al. Isotopic tree thermometers. — Nature, 1976, 261, p. 284–288.
18. Long A., Lerman J.C., Ferhi A. Oxygen-18 in tree rings: paleothermometers or paleohygrometers? — In: Short Papers 4th Intern. Conf. Geochronology, Cosmochronology, Isotope Geology, Snowmass—at—Aspen (USA), 1978, Aug. 20–25, p. 253–254.
19. Kroopnick P., Craig H. Atmospheric oxygen: isotopic composition and solubility fractionation. — Science, 1972, 175, p. 54.
20. O'Neil J.R., Adami L.H. The oxygen isotope partition function ratio of water and the structure of liquid water. — J. Phys. Chem., 1969, 73, N 6, p. 1553–1558.
21. O'Neil J.R., Adami L.H., Epstein S. Revised value for the  $^{18}\text{O}$  fractionation between  $\text{CO}_2$  and  $\text{H}_2\text{O}$  at 25°C. — J. Res. U.S. Geol. Surv., 1975, 3, N 5, p. 623–624.

## Глава X

### НОВЫЕ ИЗОТОПНЫЕ КРИТЕРИИ ПРИ РЕШЕНИИ ПРОБЛЕМ ГЕНЕЗИСА ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В ПРИРОДЕ

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ИЗОТОПОВ В АБИОГЕННЫХ АНАЛОГАХ НЕКОТОРЫХ БИОГЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Многие органические соединения, присущие биологическим системам, могут быть синтезированы химически, без участия организмов. Так, могут быть абиогенно синтезированы как в лаборатории, так и в природе различные оксикислоты, аминокислоты и другие, более сложные соединения. В химическом отношении они неотличимы от своих биогенных аналогов, однако изотопный состав их может существенно различаться.

Изотопный состав определяется изотопным составом исходного вещества и фракционированием изотопов в процессе формирования соединения. Изотопный состав абиогенно синтезированных соединений может широко варьировать в зависимости от характера и происхождения веществ, послуживших их источником. Высокомолекулярные органические соединения биологического происхождения имеют более определенный диапазон вариаций изотопного состава углерода: как правило, в пределах от  $-15$  до  $-35\text{‰}$ . Но могут встречаться биологические соединения с изотопным составом, существенно отклоняющимся от этого диапазона. Поэтому изотопный состав углерода соединения, взятого как целое, не может служить надежным критерием для распознавания его биологического или небиологического происхождения.

Материал предшествующих глав дает основание ожидать, однако, что в системах органических соединений (между отдельными соединениями) или внутри одного соединения (между отдельными структурными группами) распределение изотопов в биогенных и абиогенных веществах должно быть принципиально различным. Биологическая специфичность механизма, приводящего к термодинамически упорядоченному распределению изотопов углерода в биомолекулах, предполагает, что в абиогенных органических соединениях такое упорядоченное распределение не должно иметь места.

С целью экспериментальной проверки этого положения было проведено исследование внутримолекулярного распределения изотопов углерода в ряде биологических соединений и их абиогенно синтезированных аналогах [3].

Исследовался ряд соединений, выделенных из живых организмов, а именно: транс-анетол, изоэвгенол, ванилин, анисовая кислота. Все они содержат одну и ту же группу — метоксильную ( $-\text{OCH}_3$ ). Те же соединения были синтезированы в технических условиях. При этом метоксильная группа присоединилась путем обработки соответствующего фенольного предшественника диметилсульфатом, полученным из метилового спирта.

От каждого соединения количественно отщеплялась его метоксильная группа, а затем измерялся ее изотопный состав и изотопный состав углерода соединения в целом. Иначе говоря, все соединения сопоставлялись по величине внутримолекулярного изотопного эффекта по метоксильной группе.

Результаты этого опыта представлены в табл. 10. 1. Оказалось, что в биогенных соединениях наблюдается небольшое, приблизительно одинаковое для различных соединений обогащение легким изотопом углерода  $\text{OCH}_3$ -группы. Оно соответствует несколько меньшему значению  $\beta_i$ -фактора  $\text{OCH}_3$ -группы ( $\beta_i = 1,141$ ) по сравнению с  $\beta_{\Sigma}$ -факторами соответствующих соединений. Последние составляют приблизительно  $1,155$ — $1,160$ .

В синтетических аналогах углерод метоксильной группы резко обогащен изотопом  $^{12}\text{C}$ , в существенно различной степени — в отдельных соединениях и без всякой связи с величинами  $\beta$ -факторов. Исходный для углерода метоксильных групп синтетических соединений углерод метилового спирта имел  $\delta^{13}\text{C} = -34,5\text{‰}$ . Углерод  $\text{OCH}_3$ -группы обогащен изо-

Таблица 10.1

Внутримолекулярный изотопный эффект по углероду в некоторых биогенных соединениях и их синтетических аналогах

Соединение	Структура	1	2	1	2
Анестол OCH <sub>3</sub> -группа				Синтетическое	Биогенное
		-32,2	-36,5	-28,0	-2,9
		-68,7		-30,9	
Эвгенол OCH <sub>3</sub> -группа		-27,7	-22,0	-30,8	-3,2
		-49,7		-34,0	
Ванилин OCH <sub>3</sub> -группа		-29,0	-15,4	-29,9	-2,8
		-44,4		-32,7	
Анисовая кислота OCH <sub>3</sub> -группа		-30,7	-62,6	-	
		-93,3		-	
Примечание: 1 – $\delta^{13}\text{C}$ , ‰; 2 – $\delta^{13}\text{C}_{\text{OCH}_3} - \delta^{13}\text{C}$ в целом.					

топом  $^{12}\text{C}$  сверх этой величины. Исходя из кинетических соображений, следует ожидать обогащения легким изотопом углерода структурной группы, присоединяемой к органической молекуле в процессе абиогенного синтеза, в то время как в биомолекулах углерод любой структурной группы может быть как обогащен, так и обеднен легким изотопом, в зависимости от соотношения величин термодинамических изотопных факторов ( $\beta_i$  -факторов) углеродных структур, входящих в состав молекулы.

Это различие наглядно проявляется при сравнении биогенной и технической уксусной кислоты ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ). Величина  $\beta_i$ -фактора метильной группы (1,131) значительно меньше, чем карбоксильной (1,197). Поэтому в биогенной уксусной кислоте в соответствии с принципом термодинамического упорядочения изотопов карбоксильный углерод должен быть изотопно тяжелее метильного. Эксперимент подтвердил это предсказание. Как упоминалось в главе IV, в биогенной уксусной кислоте (выделенной из яблочного сидра [31]) карбоксильная группа приблизительно на 20% обогащена изотопом  $^{13}\text{C}$ , чем метоксильная. Это соответствует большей величине  $\beta_i$ -фактора карбоксильного углерода (1,197) по сравнению с  $\beta_i$ -фактором метильного углерода (1,131).

Совершенно противоположным оказалось внутримолекулярное распределение изотопов в технической уксусной кислоте (табл. 10.2). Ее получали путем окисления углеводородов, в частности этилена. В этом случае в карбоксильной группе оказалось меньше изотопа  $^{13}\text{C}$ , чем в метильной. Причем степень обеднения была различной в зависимости от

Таблица 10.2

Внутримолекулярное распределение изотопов углерода в синтетической уксусной кислоте

Способ получения уксусной кислоты	$\delta^{13}\text{C}$ , ‰		$\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3} - \delta^{13}\text{C}_{\text{COOH}}$	Литературный источник
	$\text{CH}_3$	$\text{COOH}$		
Этилен—этанол—ацетальдегид—уксусная кислота	-39,5	-40,4	+0,8	[35]
Окисление пропан + бутан	-35,4	-40,6	+10,2	[35]
Этан—этилен—этилсульфат—диэтилсульфат—этанол—ацетальдегид—уксусная кислота	-15,1	-44,4	+29,2	[31]

способа получения уксусной кислоты и варировалась от 1 до 20%. Обедненность карбоксильной группы технически синтезированной уксусной кислоты изотопом  $^{13}\text{C}$  согласуется с ожидаемым кинетическим изотопным эффектом в процессе окисления.

Важно было проверить, произойдет ли вообще какое-либо внутримолекулярное разделение изотопов в абиогенном соединении, если предотвратить кинетический изотопный эффект. С этой целью была синтезирована абиогенным путем аминокислота — глицин ( $\text{CH}_3\text{H}_2\text{COOH}$ ) [3]. Синтез проводили изmonoуглеродного соединения ( $\text{CH}_3\text{NO}_2$ ), с тем чтобы как карбоксильная, так и метильная группа глицина имела один и тот же углерод в качестве исходного. Путь синтеза был выбран таким образом, чтобы по возможности не возникло каких-либо кинетических преимуществ по отношению к разделению изотопов в процессе синтеза одной из углеродных структур. Когда полученная в конечном счете аминокислота была проанализирована, оказалось, что изотопный состав углерода обеих ее структурных групп идентичен несмотря на заметно различающиеся величины соответствующих  $\beta_i$ -факторов. Внутримолекулярный изотопный обмен в процессе синтеза этого абиогенного соединения не имел места.

Итак, выявляется принципиальное различие во внутримолекулярном распределении изотопов углерода в биологических и абиогенно синтезированных органических соединениях. В первом случае имеется тенденция к упорядоченному распределению изотопов в соответствии с величинами термодинамических изотопных факторов. Во втором случае изотопные эффекты не упорядочены по величине и знаку, а зависят от частных условий и способа синтеза данного соединения.

### ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ИЗОТОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ В НЕБИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Установленные выше различия в изотопной композиции биогенных и искусственно синтезированных соединений могут служить основанием для формулировки нового способа распознавания биологической или небиологической природы органических соединений. Разумеется, термодинамические изотопные эффекты присущи не только биологическим системам. В природе существует много процессов, в которых имеет место изо-

топный обмен и проявляются термодинамические изотопные эффекты.

Примером реакции, в которой достаточно быстро устанавливается изотопное равновесие, является система  $\text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O}$ . Равновесие изотопного обмена по кислороду достигается при  $25^\circ\text{C}$  за время менее 1 ч [21]. При медленном осаждении карбонатов достигается также равновесие в системе  $\text{CaCO}_3 \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O}$ . Константа равновесия изотопного обмена этой системы и ее температурная зависимость не только вычислена теоретически, но и хорошо изучена экспериментально [23]. Поэтому изотопный состав карбонатов можно использовать для весьма точного определения температуры той водной среды, в которой происходило их осаждение, в частности определения температур древних осадочных бассейнов. Это так называемый метод палеотемператур.

Достаточно быстро достигается также изотопное равновесие по углероду в системе  $\text{CaCO}_3 - \text{CO}_2$  [30]. Эта система важна в геохимическом отношении. Благодаря определенной величине термодинамического изотопного эффекта между атмосферной углекислотой и осадочными карбонатами изотопный состав последних отражает изотопный состав углерода атмосферной углекислоты прошлых геологических эпох. Исследование вариаций изотопного состава углерода карбонатов разного геологического времени позволяет восстановить характер изменений изотопного состава атмосферной  $\text{CO}_2$  — этого важнейшего члена геохимического цикла углерода в геологической истории Земли [9].

Однако в отсутствие катализаторов быстрый изотопный обмен при нормальных условиях является скорее исключением, чем правилом. Уже в такой простой системе, как  $\text{CO}_2 - \text{CH}_4$  изотопное равновесие по углероду не достигается при  $25^\circ\text{C}$  в течение длительного геологического времени. При исследовании углекислоты и метана из газового включения в минерале магматической породы, выведенной в близповерхностное положение в девонское время (около 400 млн лет назад), оказалось, что различие в изотопном составе их углерода все еще не отвечает температурным условиям залегания этой породы [10]. Даже при  $500^\circ\text{C}$  в лабораторных условиях не отмечали наступление равновесия в системе  $\text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{CH}_4$  [33].

Атомы, принадлежащие углеродному скелету молекул органических соединений, обмениваются с еще большим трудом. Исследования [13], проведенные с простейшими углеводородными соединениями, показали, что изотопный состав их до температур порядка  $300^\circ\text{C}$  практически не изменяется (табл. 10.3). Лишь при температуре около  $500^\circ\text{C}$  наблюдается заметное изменение изотопного состава углерода. Но оно вызвано, по-видимому, не изотопным обменом, а начинающимся при этих температурах реакциями образования олефинов с последующим формированием полимеризованного углеродистого вещества, что, очевидно, сопровождается кинетическим изотопным эффектом. В результате все компоненты газовой смеси обогащаются изотопом  $^{13}\text{C}$ .

Низкая скорость изотопного обмена углерода в органических соединениях — характерное свойство абиогенных систем. Чем сложнее органическое соединение, тем, как правило, более затруднен изотопный обмен углерода. Из этого следует, во-первых, что термодинамические изотопные эффекты не присущи абиогенным системам органических соедине-

Таблица 10.3

Изменение изотопного состава в смеси  $\text{CH}_4 - \text{C}_2\text{H}_6 - \text{C}_3\text{H}_8 - \text{C}_4\text{H}_{10}$ , выдерживавшейся в закрытой системе в течение 4 ч при различных температурах [13]

Углеводороды	$\delta^{13}\text{C}, \text{\%}$			
	20°С	150°С	300°С	500°С

Опыт 1. Исследованные углеводороды растворены в нефти при давлении 200 атм

$\text{CH}_4$	-41,5	-41,4	-40,7	-36,8
$\text{C}_2\text{H}_6$	-32,3	-32,2	-32,0	-29,5
$\text{C}_3\text{H}_8$	-26,6	-26,8	-26,2	-19,9
$\text{C}_4\text{H}_{10}$	-26,3	-26,4	-26,4	-21,0

Опыт 2\*. Углеводороды образуют газовую смесь в присутствии паров воды, первоначальное давление 1 атм

$\text{CH}_4$	-41,5	-40,5	-41,2	-36,3
-	-	-41,4	-40,8	-35,6
$\text{C}_2\text{H}_6$	-32,3	-32,0	-31,6	-31,0
-	-	-31,9	-31,2	-
$\text{C}_3\text{H}_8$	-26,6	-26,1	-27,4	-26,7
-	-26,1	-26,1	-27,5	-26,9
$\text{C}_4\text{H}_{10}$	-26,2	-26,4	-26,7	-24,1
-	-26,7	-26,0	-27,1	-24,3
Сумма углеводородов	-32,4	-32,6	-32,4	-27,8
	-32,6	-32,2	-31,5	-28,6

\*Два значения в каждой клетке соответствуют параллельным экспериментам.

ний. Это справедливо во всяком случае для гомогенных систем. Во-вторых, из этого следует, что установившееся распределение изотопов может сохраняться в органических соединениях при не слишком высоких температурах (200–250°С) в течение длительного геологического времени.

#### ИЗОТОПНЫЕ КРИТЕРИИ ДЛЯ РАСПОЗНАВАНИЯ БИОГЕННЫХ И АБИОГЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Принимая во внимание сказанное в отношении изотопных эффектов в биологических и небиологических системах, можно указать три уровня, на которых изотопный анализ может быть использован для идентификации биологического или небиологического происхождения вещества.

Первый — это оценка природы вещества на основе определения суммарного изотопного состава его углерода и сопоставления его с характерным диапазоном вариаций для веществ биологического происхождения. Иногда такая оценка оказывается результативной, но в целом она неоднозначна так как часто совершенно разные процессы могут приводить к образованию веществ с приблизительно одинаковым изотопным составом. Например, еще в ранних работах по геохимии изотопов углерода было установлено, что изотопный состав углерода нефти близок к изо-

топному составу углерода живых организмов. Казалось, что найдено решающее доказательство происхождения нефти за счет ископаемого органического вещества. Через некоторое время, однако, выяснилось, что абиогенно синтезированные углеродистые вещества близкой к нефти химической природы, в частности, битумоиды, встречающиеся в магматических породах, имеют практически такой же изотопный состав, как и нефти [11]. Так что изотопный критерий, примененный на уровне сопоставления суммарного углерода веществ фактически ничего не дал для решения проблемы происхождения нефти. Ниже мы вернемся к этой проблеме, чтобы показать иной подход к ее решению.

Обнаружение термодинамически упорядоченного распределения изотопов в биологических системах открыло возможность формулировки более тонкого изотопного критерия для индентификации природы органических соединений, который имеет в свою очередь, два уровня. Прежде всего возможность возникновения в ферментативных реакциях термодинамических изотопных эффектов, обусловливает при определенных условиях термодинамически упорядоченное распределение изотопов между биокомпонентами. Отсюда возможность формулировки следующего критерия. Если имеется система органических соединений, то проявление закономерной связи их изотопных составов с величинами соответствующих  $\beta_{\Sigma}$ -факторов указывает на биологическое происхождение совокупности этих соединений. Чем больше соединений принято в рассмотрение и чем теснее связь, тем более значимым будет этот вывод [7].

Однако нельзя исключить, что в некоторых процессах гетерогенного катализа могут возникнуть изотопные эффекты того же типа, что и в ферментных реакциях. Ферментные реакции относятся по классификации Г.К. Борескова [2] к каталитическим процессам, в которых промежуточное взаимодействие реагентов с катализатором протекает "слитно". В то же время по слитному механизму протекают не только ферментные, но и многие жидкофазные реакции, катализируемые комплексами металлов. Возможно, в некоторых случаях здесь удовлетворяются условия, обеспечивающие внутрикомплексный термодинамический изотопный эффект, аналогичный термодинамическому изотопному эффекту ферментного процесса.

Короче говоря, хотя связь между изотопным составом и величинами  $\beta$ -факторов в системе органических соединений является весьма сильным признаком биологического происхождения вещества, нельзя исключить, что в некоторых случаях подобная связь может устанавливаться не только биологическим путем, но и в процессе гетерогенного катализа.

По-видимому, высшим критерием для распознавания биологических и небиологических соединений может служить характер внутримолекулярного распределения изотопов.

Как было показано в предшествующих главах, упорядоченное распределение изотопов в биосистемах осуществляется на двух уровнях. Первый уровень отвечает разделению изотопов в изолированном ферментативном процессе. На этом уровне устанавливается отвечающее величинам  $\beta$ -факторов соотношение изотопов между непосредственным пред-

шественником и продуктом реакции. Например, между карбонильным углеродом пирувата и происходящим из него альдегидным углеродом ацетальдегида в реакции декарбоксилирования пирувата (см. с. 159). Но внутримолекулярное термодинамически упорядоченное распределение изотопов в ацетальдегиде (между альдегидным и метильным углеродом) в результате одной этой реакции установиться не может. Для этого необходимо наличие взаимосвязанной системы ферментных реакций, характеризующихся прямыми и обратными путями превращений. Иначе говоря, внутримолекулярное упорядочение изотопов реализуется в системе более высокого порядка, чем изолированная ферментная реакция, а именно в метаболирующей системе, т.е. в организме.

Соединение, имеющее термодинамически упорядоченное распределение изотопов, должно было образоваться не просто в результате некоторой катализитической реакции, в том числе биохимической реакции, но обязательно участвовать в биологических циклах организма.

Это придает внутримолекулярному изотопному критерию особую ценность в аспекте применения к проблемам происхождения жизни. В самом деле, любая отдельно взятая реакция, в том числе катализируемая ферментом, еще не является биологическим процессом. С другой стороны, система ферментных реакций, характеризующихся упомянутыми выше признаками, представляет простейшую модель биологического процесса. Очевидно, для того чтобы подобная метаболическая система могла возникнуть в ходе естественной эволюции, т.е. в ходе естественного отбора, она должна, как указывает А.И. Опарин [15], быть фазово-обособленной. В сущности, она отвечает минимальным требованиям, которым должно удовлетворять понятие организма. По-видимому, возникновение этой системы знаменует ту грань, которая отличает живое от неживого. При таком определении мы сразу же можем указать критерий для обнаружения подобных систем — внутримолекулярное термодинамически упорядоченное распределение изотопов.

В отличие от других диагностических признаков биогенного вещества (оптическая активность, типоморфность структур), упорядоченное внутримолекулярное распределение изотопов может быть свойственно любым биомолекулам независимо от их состава, стереохимии и т.п. Поэтому внутримолекулярное распределение изотопов, является, по-видимому, наиболее глубоким признаком, который может быть положен в основу распознавания биогенных и абиогенных структур.

С другой стороны, в самих биологических системах установление термодинамически упорядоченного внутримолекулярного распределения изотопов сопряжено, как показано в главе V, с рядом ограничивающих условий: обратимостью превращений на путях, связывающих биосинтез всех частей данного соединения, стационарностью системы соответствующих реакций, отсутствием заметных кинетических изотопных эффектов и эффектов переноса в цепях превращения. Поэтому в отдельно взятых биомолекулах внутримолекулярное термодинамически упорядоченное распределение изотопов часто может быть нарушенным. Следовательно, практический метод должен быть основан на изучении внутримолекулярного изотопного эффекта по множеству молекул. Поскольку пря-

мое исследование внутримолекулярного изотопного распределения в органическом соединении представляет сложную аналитическую задачу, можно использовать упрощенные варианты метода, основанные на изучении изотопного состава характерных структурных групп.

Например, углерод карбоксильных групп биомолекул в соответствии с принципом термодинамически упорядоченного распределения изотопов должен быть обогащен тяжелым изотопом. Хотя в отдельных соединениях возможны отклонения от этого правила, в среднем для биомассы оно должно соблюдаться. Карбоксильный углерод, в тех случаях когда образование карбоксильных групп явилось результатом абиогенного окисления, не должен обнаруживать обогащенности изотопом  $^{13}\text{C}$ . Напротив, вследствие кинетического изотопного эффекта карбоксильный углерод скорее должен быть обогащен легким изотопом. Поэтому декарбоксилование и изучение соотношения изотопных составов карбоксильного и остаточного органического углерода, очевидно, может использоваться для выявления процессов абиогенного окисления органического вещества, а при определенных условиях — для распознавания биогенной и абиогенной форм органических соединений вообще.

### РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОТОПОВ В ПРОДУКТАХ РЕАКЦИИ ФИШЕРА-ТРОПША

В начале этого раздела уже делался сравнительный анализ биогенных и абиогенных химических аналогов в связи с вопросом об особенностях их внутримолеулярного распределения изотопов.

Рассмотрим еще несколько примеров, представляющих интерес с точки зрения изотопных характеристик веществ, которые, возможно, участвовали в образовании предбиологических систем.

Процесс Фишера–Тропша рассматривается обычно как наиболее вероятная химическая модель абиогенного синтеза органических соединений в природе. Это касается как возможного образования органических соединений в космических условиях, например, присутствующих в углистых хондритах, так и углеводородов и битумов, встречающихся в изверженных породах.

Фракционирование изотопов углерода в процессе Фишера–Тропша было исследовано М. Лансетом и Э. Андерсон [27]. Опыт производился при  $400^\circ\text{K}$ , давлении  $1 \text{ кгс}/\text{см}^2$ , с эквимолярными объемами  $\text{CO}$  и  $\text{H}_2$  в присутствии кобальтового катализатора.

В ходе реакции образуются как окисленные, так и восстановленные продукты. Большая часть кислорода  $\text{CO}$  переходит в  $\text{H}_2\text{O}$ , но некоторая часть входит в двуокись углерода, содержание которой в продуктах реакции составляет несколько десятых долей процента. Среди восстановленных продуктов преобладает метан (69–88% к концу реакции). Содержание углеводородов, летучих при  $400^\circ\text{K}$  ( $\text{C}_{2+}$ ), достигает к концу эксперимента приблизительно 3%. Часть полимеризованных органических соединений (около 1,5%), не возгоняющихся при температуре  $400^\circ\text{K}$ , остается на катализаторе (кокс). Результаты изотопного анализа углерода продуктов реакции приведены на рис. 10.1.

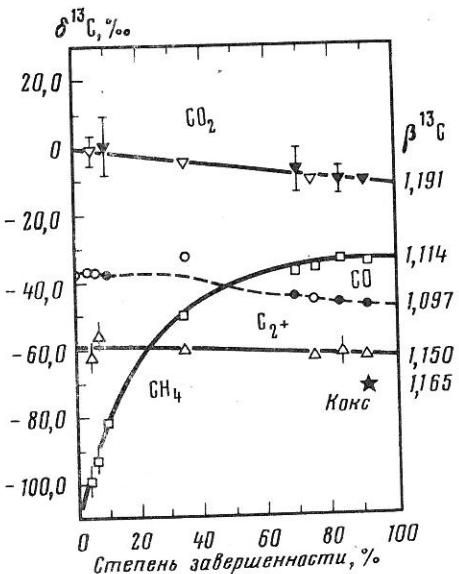


Рис. 10.1. Распределение изотопов в продуктах реакции Фишера–Тропша

Двуокись углерода, образующаяся в процессе Фишера–Тропша, приблизительно на 35,5% $\text{\AA}$  обогащена изотопом  $^{13}\text{C}$  относительно углерода исходной  $\text{CO}$ . Причем это различие остается более или менее постоянным в ходе реакции. Углерод фракции  $\text{C}_{2+}$ , напротив, обогащен легким изотопом приблизительно на 19,9% $\text{\AA}$ . Высокомолекулярный продукт, остающийся на катализаторе, характеризуется еще большим обогащением легким изотопом — на 33,3% $\text{\AA}$  относительно углерода  $\text{CO}$ . Максимально обогащен легким изотопом

углерод метана, образующегося в начале реакции. В этот момент разница между изотопным составом углерода  $\text{CO}_2$  и  $\text{CH}_4$  достигает 100% $\text{\AA}$ , а углерода  $\text{CO}$  и  $\text{CH}_4$  — 60% $\text{\AA}$ . По мере развития реакции метан быстро обедняется легким изотопом. Поскольку метан — преобладающий продукт реакции, изотопный состав его начинает приближаться к изотопному составу исходной  $\text{CO}$ .

В правой части рис. 10.1 показаны значения  $\beta$ -факторов участвующих в процессе соединений. Для фракции  $\text{C}_{2+}$  принята величина  $\beta$ -фактора 1,150, характеризующая в среднем низкомолекулярные углеводороды. "Кокс" можно охарактеризовать величиной  $\beta$ -фактора, соответствующей полимеризованным углистым веществам, для которых расчет дает  $\bar{\beta} = 1,165$  [6, с. 129].

Сопоставление величин  $\delta^{13}\text{C}$  и величин  $\beta$ -факторов, характеризующих продукты реакции Фишера–Тропша, показывает, что между ними нет никакого соответствия, что и следовало ожидать для продуктов абиогенного синтеза.

### РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОТОПОВ В ПРОДУКТАХ СИНТЕЗА В ЭЛЕКТРИЧЕСКОМ РАЗРЯДЕ

В разряде высоковольтной электрической дуги из смеси  $\text{CH}_4$ ,  $\text{NH}_3$  и  $\text{H}_2\text{O}$  образуются аминокислоты. Опыты такого рода были, как известно, впервые произведены С. Миллером. В лаборатории Димереса (исследовательский центр НАСА, Калифорния) был проанализирован изотопный состав углерода синтезированных таким способом аминокислот и отдельно их карбоксильного углерода. В табл. 10.4 приведены экспериментальные данные, предоставленные мне доктором Ш. Чангом. Как видно

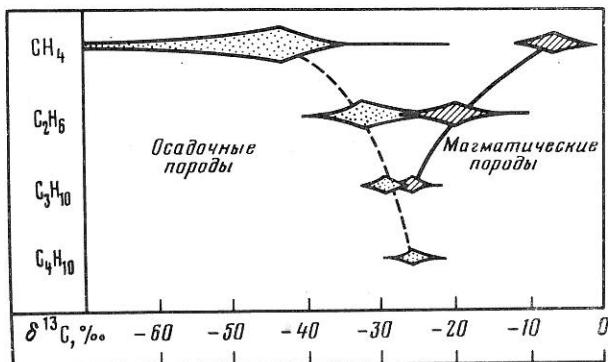


Рис. 10.2. Изотопный состав углерода природных углеводородов, происходящих из биологического источника и синтезированных абиогенно в магматических породах

из табл. 10.4, углерод аминокислот обогащен легким изотопом по отношению к исходному углероду метана. Термодинамический изотопный эффект в этой системе должен был бы, напротив, привести к обогащению аминокислот тяжелым изотопом, поскольку  $\beta$ -фактор метана характеризуется величиной 1,114, а аминокислоты в среднем — величиной 1,175. Соответственно биогенный метан всегда изотопически легче биогенных аминокислот.

Контраст между изотопными характеристиками абиогенно синтезированных аминокислот и их биогенными аналогами подчеркивается также противоположным соотношением изотопных составов суммарного и карбоксильного углерода. Карбоксильный углерод аминокислот, синтезированных в электрическом разряде, обогащен легким изотопом, т.е. изотопный эффект имеет знак, обратный тому, который отвечает соотношению  $\beta$ -факторов ( $\beta^{13}\text{C} = 1,175$  для суммарного углерода аминокислот и  $\beta^{13}\text{C} = 1,197$  — для карбоксильного углерода). В биогенных аминокислотах в соответствии с соотношением  $\beta$ -факторов карбоксильный углерод, как правило, изотопически тяжелый.

Если электрический разряд производится в среде чистого метана, то образуются более высокомолекулярные углеводороды. Как видно из

Таблица 10.4

Изотопный состав углерода продуктов абиогенного синтеза в электрическом разряде (данные Ш. Чанга)

Реагенты	Тип разряда	Продукт	$\delta^{13}\text{C}_{\text{прод}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{реаг}}$
CH <sub>4</sub>	Низковольтный	Углеводороды C <sub>2</sub> —C <sub>5</sub>	от -3,2 до -0,9
	Высоковольтный	Углеводороды C <sub>2</sub> —C <sub>5</sub>	от -8,8 до -6,3
CH <sub>4</sub> , NH <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> O	Низковольтный	Аминокислоты	
		Общий углерод	от -4,5 до -2,1
		Карбоксильный углерод	от -9,6 до -2,7

табл. 10.4, синтезированные углеводороды  $C_2-C_5$  обогащены легким изотопом.

Между тем термодинамические изотопные факторы углеводородов  $C_2-C_5$  выше (1,130–1,150), чем у метана, т.е. в случае термодинамического изотопного эффекта следовало бы ожидать обогащенности высокомолекулярных углеводородов изотопом  $^{13}C$ . Именно такое распределение изотопов мы наблюдаем в углеводородах, происходящих из биологических источников. В газах осадочных пород в ряду  $CH_4-C_2H_6-C_3H_8-C_4H_{10}$  происходит последовательное увеличение содержания изотопа  $^{13}C$  от метана к высшим углеводородам [6] (рис. 10.2).

Интересно отметить, что обратный абиогенный характер распределения изотопов в углеводородах также встречен в природных условиях. Инверсионное распределение было обнаружено впервые в газовых включениях минералов магматических пород Кольского полуострова [6, 10].

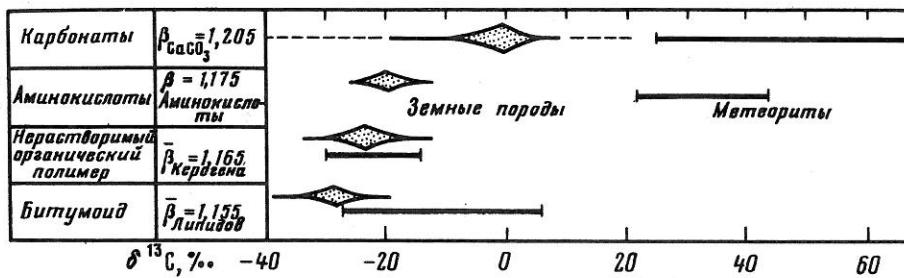
### ИЗОТОПНЫЙ СОСТАВ УГЛЕРОДИСТЫХ КОМПОНЕНТОВ УГЛИСТЫХ ХОНДРИТОВ

Изотопный состав углерода углистых хондритов интересен в двух отношениях.

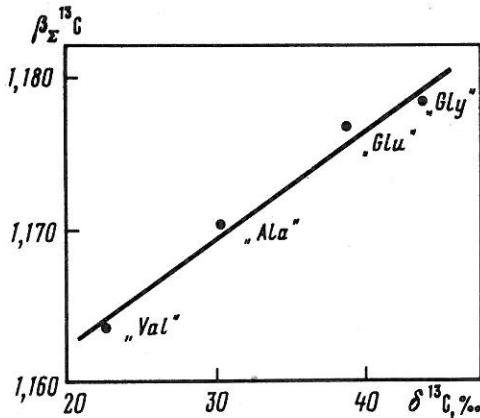
1. Углистые хондриты, в отличие от метеоритов других типов, обогащены летучими. Они содержат от десятых долей (тип III) до нескольких весовых процентов углерода и воды (тип I), в то время как содержание углерода в других типах метеоритов не превышает 0,02–0,04%, а содержание воды еще меньше [14]. Уникальной особенностью их является присутствие разнообразных органических соединений, включая аминокислоты, ароматические полимеры, некоторые оксикислоты, порфирины и пр. [22, 24, 25, 28, 29 и др.]. Поэтому происхождение этих космических тел и природа органических соединений в них представляет значительный научный интерес.

2. По целому ряду параметров состав вещества углистых хондритов ближе к составу вещества Земли (точнее земной коры), чем состав метеоритов любых других типов. Это позволило автору в свое время высказать предположение о том, что Земля на последних этапах ее формирования была сложена веществом типа углистых хондритов [12]. Подобная возможность в тех или иных вариантах обсуждалась в последующем многими исследователями [16, 32, 34], причем в последнее время на основе новых данных удалось развить и детализировать эту гипотезу [1]. Из нее, между прочим, следует, что на поверхности Земли изначально существовала достаточно высокая концентрация восстановленных форм углерода, включая многие органические соединения, которые могли иметь предбиологическое значение. Это обстоятельство придает особый интерес изучению характера изотопного распределения в органическом веществе углистых хондритов.

Еще в 1954 г. Дж. Боато [18] показал, что углистые хондриты имеют необычные, отличные от других типов метеоритов, изотопные составы углерода и водорода. Причем, как упоминалось, именно эти составы



Р и с. 10.3. Диапазоны вариаций изотопного состава углеродных компонентов углистых хондритов в сравнении с диапазоном вариаций соответствующих земных веществ (в левой части приведены усредненные значения их  $\beta^{13}\text{C}$ -факторов)



Р и с. 10.4. Сопоставление изотопного состава углерода и  $\beta^{13}\text{C}$ -факторов индивидуальных аминокислот, выделенных из углистого хондрита Мерчисон

лучше всего согласуются с оценками среднего изотопного состава тех же элементов в верхней оболочке Земли [5]. В настоящее время имеется довольно обширная литература, посвященная исследованию вещества углистых хондритов, в том числе изотопного состава различных форм углерода в них [4, 17, 19, 20, 26]. На рис. 10.3 диапазоны вариаций  $\delta^{13}\text{C}$  для некоторых форм углерода углистых хондритов сопоставлены с диапазонами вариаций соответствующих земных форм углерода и величинами  $\beta^{13}\text{C}$ , характеризующими эти формы.

Из этого сопоставления следует: 1) вариации  $\delta^{13}\text{C}$  в каждой форме и изотопные различия между отдельными формами в углистых хондритах больше, чем в земных; 2) карбонаты аномально обогащены изотопом  $^{13}\text{C}$  (в земных условиях карбонаты подобного изотопного состава не встречаются); 3) аминокислоты также обогащены изотопом  $^{13}\text{C}$ , что отличает их от земных аминокислот и доказывает их безусловно внеземное происхождение; 4) корреляция с величинами  $\beta$ -факторов неотчетлива (в отличие от приведенных на том же графике земных биогенных форм), однако нельзя сказать, что она полностью отсутствует, как это было показано выше для абиогенных форм углерода.

Недавно американские исследователи провели чрезвычайно интересные и тонкие исследования изотопного состава аминокислот в углистых метеоритах. Эти данные опубликованы лишь частично [19]. В табл. 10.5 приводятся данные по изотопному составу индивидуальных аминокислот

Таблица 10.5

Изотопный состав углерода аминокислот, выделенных из углистого хондрита Мерчисон (данные Ш. Чанга)

Фракция*	$\delta^{13}\text{C}$ , ‰			Фракция*	$\delta^{13}\text{C}$ , ‰		
	измеренное значение	фон	корректированное значение		измеренное значение	фон	корректированное значение
"Валин"	+21,2	-15,5	+22,6	"Глицин"	+35,6	-26,6	+43,7
"Аланин"	+27,3	-15,7	+30,4	"Глутаминовая кислота"	+27,2	-24,6	+38,4

\* Фракции представляют элюаты широких хроматографических полос, центры которых соответствуют  $R_f$  указанных аминокислот.

из метеорита Мерчисон, которые были мне любезно предоставлены доктором Ш. Чангом.

Сопоставление измеренных значений  $\delta^{13}\text{C}$  с  $\beta^{13}\text{C}$ -факторами соответствующих соединений выявляет поразительную связь между этими параметрами — связь того же типа, которая характеризует биологические соединения (рис. 10.4).

Отмеченную выше аномальную обогащенность карбонатов тяжелым изотопом, столь разительно отличающую их от земных карбонатов, в принципе нетрудно объяснить, если принять во внимание, что доминирующей формой углерода в углистых хондритах является восстановленный углерод, а в условиях земной коры окисленная ( $\text{CO}_2$  и карбонатная) форма. Поэтому различие в изотопном составе между окисленной и восстановленной формами при одной и той же средней величине изотопного состава общего углерода ( $\delta^{13}\text{C} = -7\%$ ) в углистых хондритах скажется в сдвиге значений  $\delta^{13}\text{C}$ , характеризующих карбонаты, в положительную сторону от среднего, а в земных условиях — в сдвиге в отрицательную сторону от среднего, значений  $\delta^{13}\text{C}$ , характеризующих восстановленную форму углерода, например метан. Заметим, что это рассуждение предполагает термодинамическую природу изотопного эффекта. В случае кинетических изотопных эффектов распределение изотопов зависит не от химической формы соединений, а от механизма процесса. При этом продукты окисления могут быть изотопически легче исходной восстановленной формы.

В том же духе можно объяснить аномальную обогащенность тяжелым изотопом ( $\delta^{13}\text{C}$  от +22 до +45‰) аминокислот в углистых хондритах. Казалось бы, аминокислоты, синтезированные abiogeno, должны быть вследствие кинетического эффекта обогащены легким изотопом, как это наблюдалось в экспериментах, описанных выше. Однако если принять во внимание величины  $\beta$ -факторов аминокислот ( $\beta^{13}\text{C} = 1,175$ ), то окажется, что их изотопный состав по отношению к изотопному составу

других форм углерода, в частности карбонатов, находится приблизительно в том же соотношении, в каком находятся характеризующие их значения  $\beta$ -факторов, по отношению к  $\beta$ -факторам других форм. Но это опять-таки предполагает термодинамический характер изотопных эффектов, сопровождавших синтез аминокислот.

В то же время отмеченная выше глубокая дифференциация различных форм углерода по изотопному составу при термодинамическом характере изотопных эффектов допустима лишь при весьма низких температурах, не превышающих первые десятки градусов Цельсия.

Во всяком случае в углистых хондритах мы встречаемся с весьма специфичным распределением изотопов, которому не чужды тенденции к термодинамически упорядоченному распределению изотопов, т.е. тенденции, характеризующие биологический углерод. Возможно, проявление изотопных эффектов термодинамической природы связано с какими-то весьма эффективными формами низкотемпературного гетерогенного катализа. Дальнейшие исследования изотопного состава индивидуальных соединений углистых хондритов, в особенности исследование внутримолекулярного распределения изотопов, по-видимому, могло бы иметь решающее значение для выяснения механизма образования органических соединений в углистых хондритах.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Банникова Л.А., Галимов Э.М. О характере первичного вещества, сформировавшего верхние оболочки Земли. – В кн.: Тез. докл. VII Всесоюз. Симпоз. по стабил. изотопам в геохимии. М.: ГЕОХИ АН СССР, 1978.
2. Боресков Г.К. Развитие представлений о природе гетерогенного катализа. – Кинетика и катализ, 1977, 8, вып. 5.
3. Виноградов А.П., Галимов Э.М., Кодина Л.А., Генералова В.Н. Внутримолекулярное распределение изотопов углерода как критерий биологического или небиологического происхождения органических соединений. – Геохимия, 1976, № 7.
4. Виноградов А.П., Кропотова О.И., Вдовыкин Г.П., Гриненко В.А. Изотопный состав различных фаз углерода высокоуглистых хондритов. – Геохимия, 1967, № 3.
5. Галимов Э.М. Геохимия стабильных изотопов углерода. М.: Недра, 1968.
6. Галимов Э.М. Изотопы углерода в нефтегазовой геологии. М.: Наука, 1973.
7. Галимов Э.М. Изотопы углерода в живом и неживом. В кн.: – Наука ичество: Междунар. ежегодник. М.: Знание, 1977.
8. Галимов Э.М., Кодина Л.А., Генералова В.Н. и др. Исследование распределения изотопов углерода в биогенных соединениях. – В кн.: Тр. VIII Междунар. конгр. по орган. геохимии. Наук. М., 1977.
9. Галимов Э.М., Мигдисов А.А., Ронов А.Б. Вариации изотопного состава карбонатного и органического углерода осадочных пород в истории Земли. – Геохимия, 1975, № 3.
10. Галимов Э.М., Петерсилье И.А. Изотопный состав углерода метана, изолированного в порах и полостях некоторых изверженных минералов. – Докл. АН СССР, 1967, 176, № 4.
11. Галимов Э.М., Петерсилье И.А. Изотопный состав углерода битумоидов изверженных и метаморфических пород. – Докл. АН СССР, 1968, 182, № 1.
12. Галимов Э.М. Две линии эволюции углерода Земли. – Геохимия, 1967, № 5.

13. Галимов Э.М., Поягин В.И., Прохоров В.С. Экспериментальное изучение фракционирования изотопов углерода в системе  $\text{CH}_4$ – $\text{C}_2\text{H}_6$ – $\text{C}_3\text{H}_8$ – $\text{C}_4\text{H}_{10}$  при различных температурах. – Геохимия, 1972, № 8.
14. Мейсон Б. Метеориты. М.: Мир, 1965.
15. Опарин А.И. Материя, жизнь, интеллект. М.: Наука, 1977.
16. Anders E., Owen T. Mars and Earth: origin and abundance of volatiles. – Science, 1977, 198, p. 453.
17. Belsky T., Kaplan I.R. Light hydrocarbon gases  $^{13}\text{C}$  and origin of organic matter in carbonaceous chondrites. – Geochim. et cosmochim. acta, 1970, 34, p. 257–278.
18. Boato G. The isotopic compositions of hydrogen and carbon in the carbonaceous chondrites. – Geochim. et cosmochim. acta, 1954, 6, p. 201.
19. Chang S., Mack R., Lennon K. Carbon chemistry of separated phases of Murchison and Allende meteorites. – In: Lunar and planetary science IX, Conf. Sponsored NASA, 1978, Mar. 13–17, pt I, p. 157.
20. Clayton R.N. Carbon isotope abundance in meteorite carbonates. – Science, 1963, 140, p. 192.
21. Cohn M., Urey H.C. Oxygen exchange reactions of organic compounds and water. – J. Amer. Chem. Soc., 1938, 60, N 3, p. 679–687.
22. Folsome C.E., Lawless J.G., Romiez M., Ponnamperuma C. Heterocyclic compounds recovered from carbonaceous chondrites. – Geochim. et cosmochim. acta, 1973, 37, p. 455–465.
23. Friedman I., O'Neil J.R. Data of geochemistry. Chapter KK. Compilation of stable isotope fractionation factors of geochemical interest: Geol. Surv. Prof. Pap. 440 KK. Wash.: US Govern. Print. Off., 1977.
24. Gelpi E., Oro J. Organic compounds in meteorites. – IV. Gas chromatographic-mass spectrometric studies on the isoprenoids and other isomeric alkanes in carbonaceous chondrites. – Geochim. et cosmochim. acta, 1970, 34, N 9, p. 995.
25. Hayes I.M. Organic constituents in meteorites: A review. – Geochim. et cosmochim. acta, 1970, 31, N 12, p. 1395.
26. Krouse H.R., Modzeleski V.E.  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  abundance in components of carbonaceous meteorites and terrestrial samples. – Geochim. et cosmochim. acta, 1970, 34, N 4, p. 459.
27. Lancet M.S., Anders E. Carbon isotopes fractionation in the Fischer-Tropsch synthesis and in meteorites. – Science, 1970, 170, N 3961.
28. Lawless J.G., Kvenvolden K.A., Peterson E., Ponnamperuma C. Amino acids indigenous to the Murray meteorite. – Science, 1971, 173, N 3997, p. 626.
29. Lawless J.G., Zeitman B., Pereira W.E. et al. Dicarboxylic acids in the Murchison meteorite. – Nature, 1974, 251, N 5470, p. 40–42.
30. McCrea M.J. On the isotopic chemistry of carbonates and a paleotemperature scale. – J. Chem. Phys., 1950, 18, N 6, p. 849–857.
31. Meinschein W.G., Rinaldi G.G., Hayes J.M., Schoeller D.A. Intramolecular isotopic order in biologically produced acetic acid. – Biomed Mass-Spectr., 1974, 1(3), p. 172.
32. Ringwood A.E. Origin of the Moon: The precipitation hypothesis. – Earth and Planet. Sci. Lett., 1970, 8, N 2.
33. Sackett W.M., Chang H.M. Experimental confirmation of the lack of carbon isotope exchange between methane and carbon dioxide at high temperature. – Geochim. et cosmochim. acta, 1979, 43, p. 273–276.
34. Turekian K.K., Clark S.P. Inhomogeneous accumulation of the Earth from the primitive solar nebula. – Earth and Planet. Sci. Lett., 1969, 6, N 5, p. 346–348.
35. Yankwich P.E., Promislow A.L. Carbon isotope constitution of some acetic acids. – J. Amer. Chem. Soc., 1953, 75, N 9, p. 4881.

## *Глава XI*

# **ПРОЯВЛЕНИЕ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИ УПОРЯДОЧЕННОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ИЗОТОПОВ, СВОЙСТВЕННОГО БИОЛОГИЧЕСКИМ ОБЪЕКТАМ, В ГЕОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭТОГО ЯВЛЕНИЯ**

Если в биологическом аспекте наиболее интересные возможности использования явления термодинамически упорядоченного распределения изотопов в биомолекулах связаны с решением вопроса о причинах и механизме этого эффекта, то для большинства геохимических применений важен сам факт упорядоченного распределения изотопов в биологическом материале. Этот факт означает, что биогенные соединения несут своеобразную изотопную метку — характерное распределение изотопов углерода. Это распределение сохраняется и тогда, когда организм отмирает и биогенные молекулы, попавшие в среду осадка, изменяясь в ходе геологического времени, постепенно теряют черты своего первоначального химического облика. Так, углеводородные молекулы нефти уже совсем не похожи на те биомолекулы, которые явились их предшественниками. Поэтому геохимики затрудняются определить, и это одна из основных проблем органической геохимии, как произошло данное органическое соединение, встреченное в горных породах, из каких предшествующих соединений, каков был путь его химической эволюции. Но будучи снабжено упомянутой меткой оно становится принципиально идентифицируемым.

Следует отметить следующее важное обстоятельство. Как уже неоднократно подчеркивалось выше, распределение изотопов может отклоняться от термодинамически упорядоченного в отдельных биомолекулах и в отдельных биологических системах в связи с особенностями их функционирования или особенностями жизнедеятельности конкретного организма. Однако при геохимическом рассмотрении органического вещества мы имеем дело с продуктом преобразования множества особей. Индивидуальные различия погашаются, а общая тенденция приобретает закономерный характер. Поэтому плодотворным оказывается применение установленных принципов биологического фракционирования изотопов к исследованию наиболее общих закономерностей поведения органического вещества в природных условиях.

## **ХИМИЧЕСКОЕ СОДЕРЖАНИЕ ПРОЦЕССА ПРЕВРАЩЕНИЯ ЖИВОГО ВЕЩЕСТВА В ИСКОПАЕМЫЕ ФОРМЫ**

С отмиранием организма прекращается действие механизма, поддерживавшего термодинамически упорядоченное распределение изотопов в биомолекулах. Унаследованное от биологических систем распределение изотопов метастабильно сохраняется в ненарушенных структурах захороненных органических соединений. Там же, где происходит разрыв и образование новых связей, может иметь место фракционирование изотопов, обус-

ловленное уже преимущественно кинетическими изотопными эффектами, т.е. большей лабильностью  $^{12}\text{C}$ — $^{12}\text{C}$  связей в сравнении с  $^{12}\text{C}$ — $^{13}\text{C}$  связями. Чем большей химической перестройке подвергались исходные биомолекулы, тем слабее становится связь между изотопным составом и  $\beta$ -фактором соединения.

В осадочных горных породах органическое вещество присутствует главным образом в виде так называемого керогена, сложного нерегулярного полимера, не растворимого в воде, органических растворителях, в кислотах и щелочах. Небольшая часть органического вещества (от долей процента до нескольких процентов) состоит из экстрагируемого из породы органическими растворителями так называемого битумоида. В морских осадках и в почвах присутствуют гуминовые вещества, которые обычно определяются как темно-коричневый полимерный материал, который может быть экстрагирован из почв и осадков разбавленными щелочными растворами. Щелочной экстракт принято делить на две фракции: гуминовые кислоты, растворимые в щелочах, но нерастворимые в кислотах, и фульвокислоты, растворимые в основаниях, и в кислотах.

Уже давно было установлено, что органическое вещество в горных породах, т.е. кероген, содержит меньше изотопа  $^{13}\text{C}$ , чем живые организмы. Например, кероген в морских осадочных фациях имеет  $\delta^{13}\text{C}$  от  $-23$  до  $-26\text{\textperthousand}$ , в то время как биологический углерод в соответствующих биоценозах имеет  $\delta^{13}\text{C}$  от  $-18$  до  $-22\text{\textperthousand}$ .

Полагали, что это явление связано с тем, что в процессе микробиологического разложения отмерших организмов белки и углеводы, представляющие относительно обденные изотопом  $^{12}\text{C}$  фракции, элиминируются, т.е. разлагаются до простых компонентов  $\text{CH}_4$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  и т.д. В то же время липиды и подобные им более устойчивые к микробиологической атаке компоненты, представляющие одновременно более изотопически легкие фракции, сохраняются и обусловливают наблюдаемую обденность керогена изотопом  $^{13}\text{C}$  относительно исходного биологического материала в целом.

Опираясь на закономерности распределения изотопов в биологических системах, удается обосновать принципиально иное представление о химическом содержании процесса раннего (диагенетического) преобразования биологического материала в ископаемые формы.

В свете изложенного в предшествующих главах ясно, что не весь углерод белков и углеводов обденен легким изотопом. Белки и углеводы обденены в целом легким изотопом потому, что содержат значительное количество функциональных групп, в которых углерод связан с гетероатомами, и, как следствие этого, в соответствии с правилом термодинамически упорядоченного распределения изотопов обогащен изотопом  $^{13}\text{C}$ .

Раньше считалось, что удаление функциональных групп не может привести к обогащению остаточного органического вещества легким изотопом, поскольку этот процесс сопровождается кинетическим изотопным эффектом. В результате низкомолекулярный фрагмент обогащается легким изотопом, а остаточное вещество, напротив, тяжелым. Действительно, это подтверждалось результатами экспериментов по декарбоксилированию

органических кислот [11]. Однако при этом не учитывалась внутримолекулярная изотопическая неоднородность биологических соединений.

В действительности имеет место конкуренция двух тенденций: одной, связанной со спецификой внутримолекулярного распределения изотопов, и другой, обусловленной кинетическим изотопным эффектом. Причем в общем случае первая тенденция оказывается более сильной (хотя, по-видимому, не во всех конкретных случаях), так что результирующий эффект состоит в выделении  $\text{CO}_2$ , обогащенной изотопом  $^{13}\text{C}$ , и соответственно в обогащении изотопом  $^{13}\text{C}$  остаточного органического вещества.

С этой точки зрения вовсе не обязательно связывать обогащенность керогена легким изотопом с процессом элиминирования белков и углеводов. Можно допустить, что имеет место процесс их полимеризации, сопровождаемый удалением функциональных групп.

Такой процесс действительно существует. Это — меланоидинообразование. Меланоидиновая реакция состоит во взаимодействии соединений, содержащих альдегидные и аминные группы, т.е. углеводов и белков, и ведет к образованию коричнево-бурых полимерных веществ, по своим свойствам близких к гуминовым кислотам морских осадков. На геохимическое значение меланоидиновой реакции было впервые указано С.М. Манской и Т.В. Дроздовой [10].

Совместно с Т.В. Дроздовой мы провели экспериментальное изучение фракционирования изотопов в процессе меланоидинообразования. Глюкозамин с небольшим количеством гидролизата белка подвергался нагреванию на кипящей водяной бане в течение 12, 18 и 30 ч. Меланоидиновый характер этой реакции был показан ранее [10]. В результате нагревания образовался коричневый раствор с темным осадком. Краткие сведения об условиях проведения эксперимента и полученные данные приведены в табл. 11.1. Результаты показывают следующее: 1) образовавшиеся полимерные вещества обогащены легким изотопом по сравнению с углеродом исходного биологического соединения; 2) существует определенная закономерность в соотношениях изотопных составов продуктов реакции, представляющих последовательные стадии полимеризации. Продукты реакции, растворимые в щелочах и кислотах, т.е. аналогичные природным фульвокислотам, лишь немного обогащены изотопом  $^{12}\text{C}$  относительно исходного вещества. Содержание легкого изотопа становится выше в более полимеризованных продуктах реакции, растворимых только в щелочах, т.е. соответствующих природным гуминовым кислотам, причем обогащенность последних изотопом  $^{12}\text{C}$  увеличивается по мере течения эксперимента, а первых — уменьшается. В еще большей степени обогащен легким изотопом нерастворимый в щелочах и кислотах продукт меланоидиновой реакции, который можно рассматривать как аналог природного керогена.

Сопоставляя эти результаты с распределением изотопов в природных веществах, мы можем констатировать их полное сходство. В самом деле исследование изотопного состава углерода гуминовых веществ показывает, что общим правилом является обогащенность изотопом  $^{12}\text{C}$  гуминовых кислот по сравнению с фульвокислотами. В свою очередь углерод

Таблица 11.1

## Изотопный состав продуктов меланоидиновой реакции\*

Время нагревания	Продукт реакции					
	коричневый раствор		черный осадок			
	осадок отсутствует, высокомолекулярные вещества удалены дигидроизом	растворим в 1N NaOH, осажден в 3N HCl	нерасторимые меланоидины			
	”фульвокислоты”	”гуминовые кислоты”	”кероген”			
	$\delta^{13}\text{C}$ , ‰	выход, %	$\delta^{13}\text{C}$ , ‰	выход, %	$\delta^{13}\text{C}$ , ‰	выход, %
12 ч	-27,00	11,4	-24,47	0,6	-	Сл.
18 ч	-26,68	10,7	-29,19	2,0	-0	0,33
30 ч	-26,32	3,6	-	Сл.	-36,42	6,1

\* Глюкозамин 1 г, гидролизат белка 0,018 г в эксперименте 1 и 0,12 в экспериментах 2 и 3,  $\text{H}_2\text{O}$  – 15 мл, pH 8,0; изотопный состав исходных веществ: глюкозамин – 26,14‰ и гидролизат белка – 19,24‰.

керогена обогащен изотопом  $^{12}\text{C}$  по сравнению с гуминовыми кислотами [30, 31, 32].

Исследование физико-химических свойств фульвокислот, гуминовых кислот и керогена показывает, что они образуют последовательный генетический ряд. Фульвокислоты имеют меньший молекулярный вес, чем гуминовые кислоты. Они содержат больше нативных функциональных групп. В их химическом составе больше гетероатомов по сравнению с гуминовыми кислотами. В свою очередь гуминовые кислоты представляются менее измененными по сравнению с керогеном. В осадках обычно существует взаимодополняемость содержания гуминовых кислот и керогена. С увеличением степени диагенетических изменений уменьшается количество фульвокислот за счет увеличения количества гуминовых кислот, содержание которых в свою очередь уменьшается по мере возрастания содержания керогена [16, 30, 31].

По мере перехода от фульвокислот к гуминовым кислотам и возрастания молекулярного веса гуминовых кислот происходит, как показывают спектральные исследования, уменьшение содержания функциональных групп [37, 47].

Совпадение характера распределения изотопов углерода в полимерных соединениях, полученных в эксперименте, с распределением изотопов в соответствующих природных полимерах, позволяет рассматривать меланоидинообразование как достаточно адекватную модель процесса диагенетического превращения органического вещества. Наблюдаемое обеднение фульвокислот изотопом  $^{12}\text{C}$  по мере обогащения им гуминовых кислот служит указанием на то, что фульвокислоты действительно являются промежуточными соединениями между исходными белково-углеводными компонентами и гуминовыми кислотами.

Обогащение изотопом  $^{12}\text{C}$  полимерных соединений связано с отщепле-

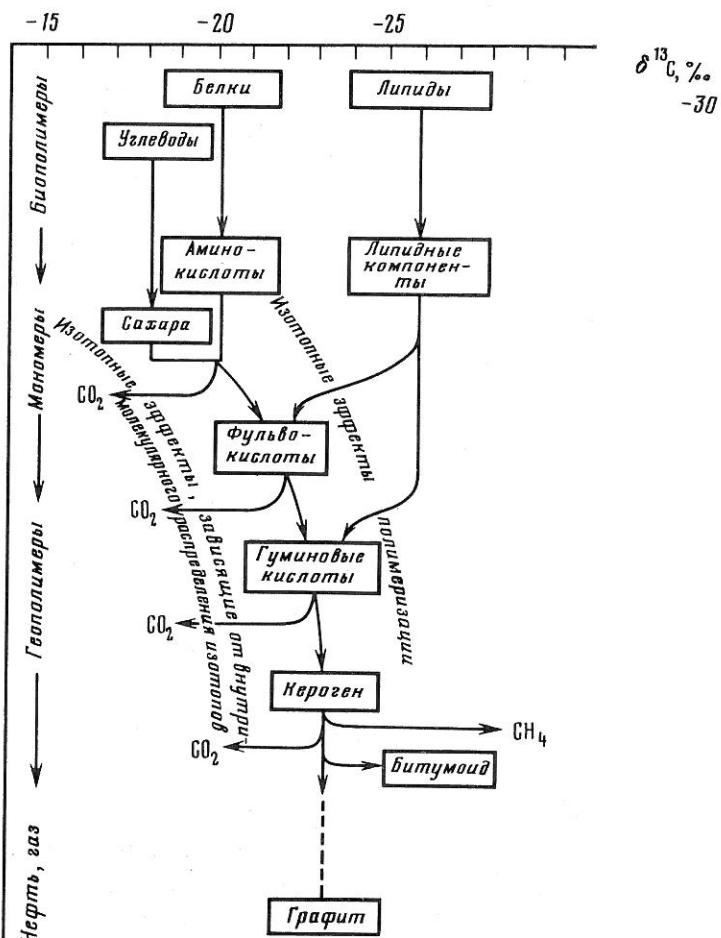


Рис. 11.1. Схема, характеризующая изменение изотопного состава углерода, в процессе превращения биополимеров в ископаемые формы органического вещества

нием обогащенных изотопом  $^{13}\text{C}$  функциональных групп (карбоксильной, формильной, кето- и т.п.). Другой возможной причиной фракционирования изотопов в ходе диагенеза являются собственно реакции полимеризации.

Исследование изотопных эффектов в реакциях полимеризации показало, что полимер может обогащаться на несколько промилле по отношению к углероду мономера при нормальных температурах и выходе полимера, составляющем 20–25% [1, 2].

Итак, химическое содержание диагенетического преобразования органического вещества (фактически оно реализуется в результате деятельности микроорганизмов) представляется следующим образом [24] (рис. 11.1).

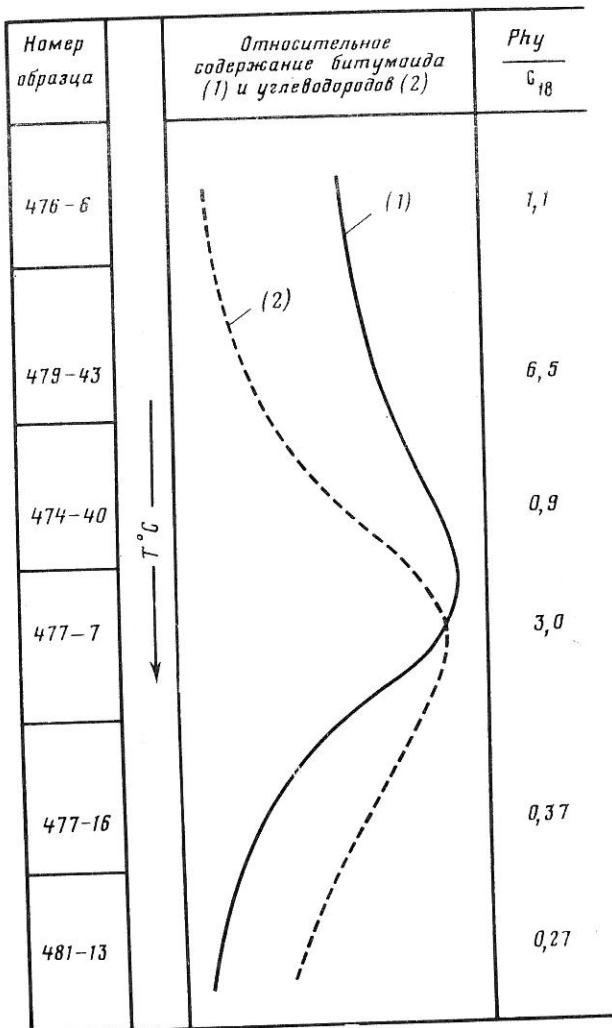
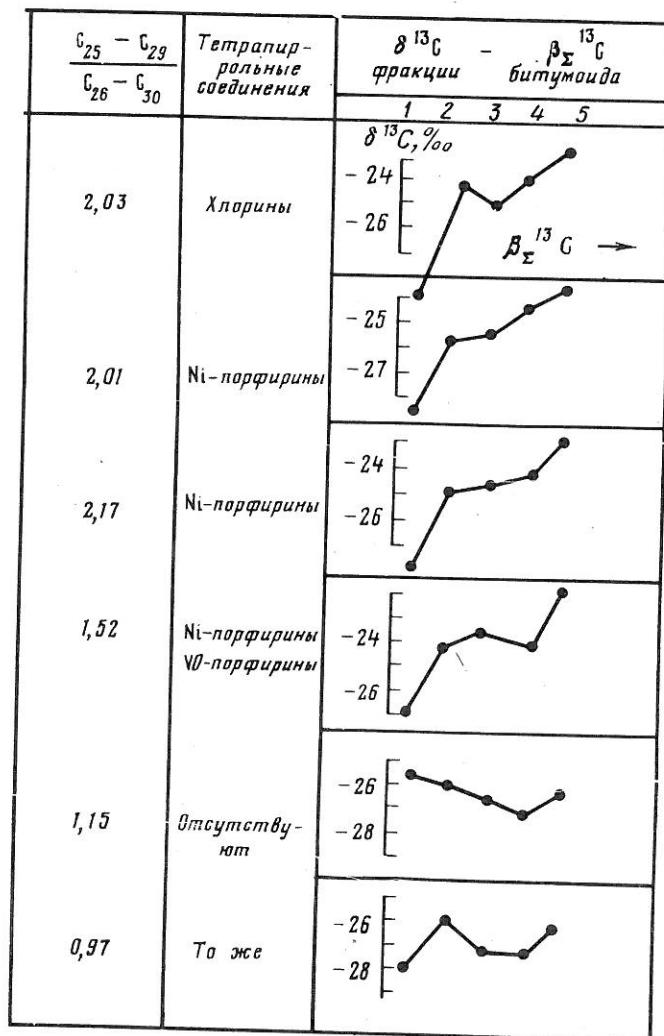


Рис. 11.2. Изменение характера зависимости  $\delta^{13}\text{C} - \beta_{\Sigma}^{13}\text{C}$  и других характеристик органического вещества по мере увеличения степени его термального метаморфизма (осадочные отложения Калифорнийского залива).

Фракции битумоида: углеводороды (1), гексанбензольные смолы (2), бензольные смолы (3), спирто-бензольные смолы (4), асфальтены (5)

Первоначально происходит распад биополимеров на более простые фрагменты и мономеры, а затем последовательная реполимеризация этих фрагментов в полимеры другого типа, более устойчивые в геологической обстановке. Процесс этот сопровождается отщеплением активных функциональных групп.

Потеря изотопически тяжелого углерода, связанного с карбоксильными и другими функциональными группами, а также изотопный эффект



полимеризации обусловливают наблюдаемое смещение изотопного состава геополимеров в сторону обогащения изотопом  $^{12}\text{C}$ .

Преобразование биомолекул начинается еще в водной толще до осаждения. Здесь возникают первые полимерные новообразования и происходит первоначальное обогащение углерода легким изотопом относительно углерода планктона. По своему характеру растворенное в воде органическое вещество близко к фульвокислотам [33]. В осадке продолжается процесс полимеризации, в результате которого нарастает содержание гуминовых кислот за счет фульвокислот и керогена — за счет гуминовых кислот. В конечном счете все органическое вещество переходит в стабильную форму керогена.

Гуминовые кислоты склонны к образованию комплексов с лиофобными соединениями, такими, как алканы, жирные кислоты, пигменты и другие липидные компоненты [36, 44], которые образуют основу будущей битумоидной фракции органического вещества.

Завершение образования керогена (полное исчезновение гуминовых кислот) знаменует окончание стадии диагенеза органического вещества и начало новой катагенетической фазы его превращения. На этой стадии происходит преобразование самого керогена под влиянием факторов литогенеза: возрастающих температуры и давления, процессов раскристаллизации минеральной части осадка. Этот процесс идет, с одной стороны, по пути дальнейшей циклизации и конденсации структуры керогена, ведущей в конечном счете к образованию графита, с другой – он сопровождается отщеплением некоторых подвижных дериватов, в числе которых газы, жидкые углеводороды, тетрапиррольные и другие устойчивые структуры. Липидоподобная фракция, которая экстрагируется из керогена органическими растворителями, называется битумоидом. Содержание битумоида, как правило, растет по мере катагенетического преобразования керогена, а в составе самого битумоида возрастает содержание малополярных фракций, прежде всего углеводородов. При определенных условиях и на определенной стадии преобразования органического вещества этот процесс достигает максимального развития. Эта стадия получила название главной фазы нефтеобразования.

Выявление главной фазы нефтеобразования, установление в геологическом разрезе отложений, прошедших эту стадию, представляет практическую важную задачу.

Из закономерностей термодинамически упорядоченного распределения изотопов следует, что битумоид должен быть обогащен изотопом  $^{12}\text{C}$  относительно керогена. Сам битумоид может быть разделен на фракции разной полярности. Наиболее полярной фракцией являются асфальтены, наименее полярной – углеводороды. В той мере в какой битумоид наследует структуры биологических предшественников, полярные фракции должны быть обогащены изотопом  $^{13}\text{C}$  относительно малополярных, поскольку в полярной фракции органическое вещество содержит больше гетероатомов и, следовательно, характеризуется более высокими значениями  $\beta^{13}\text{C}$ .

В нашей лаборатории было подробно изучено органическое вещество из уникальных образцов пород, полученных во время бурения глубоководных скважин в Калифорнийском заливе буровым судном "Гломар Челленджер" [25]. Калифорнийский залив – интересный в геологическом отношении объект. Здесь соседствуют участки с нормальным и очень высоким тепловыми потоками. Поэтому можно изучить практически одно и то же органическое вещество в очень широком диапазоне температурных условий.

На рис. 11.2 показано изменение изученных характеристик органического вещества в образцах по мере увеличения степени испытанного ими термального воздействия. Мы видим прежде всего, что кривые, характеризующие относительное содержание битумоида и концентрацию в нем углеводородов, имеют характерный максимум (обр. 477–7). Образцы, под-

вергавшиеся более жесткому тепловому воздействию, находятся уже на непродуктивной (с точки зрения нефтеобразования) стадии превращения органического вещества. На этой стадии, как видно из рис. 11.2, исчезают тетрапиррольные соединения. Резко уменьшается содержание изопреноидных углеводородов. Отношение изопреноида фитана к нормальному алкану  $C_{18}$  становится существенно меньше единицы. В биологическом материале, как известно, преобладают жирные кислоты с четным числом атомов углерода, а в ископаемом органическом веществе соответственно — нечетные алканы. В термально преобразованных образцах содержание четных и нечетных алканов выравнивается. Таким образом, на стадии превращения органического вещества, наступающей после прохождения главной фазы нефтеобразования, органическое вещество в значительной степени утрачивает признаки своего биологического происхождения.

Изотопный состав фракций битумоида в образцах, подвергшихся относительно слабому термальному воздействию, обнаруживает четкую зависимость от степени полярности — практическая зависимость типа  $\delta^{13}\text{C} - \beta_{\Sigma}^{13}\text{C}$ . В обр. 477–16 и 481–13 подобная зависимость отсутствует. Иначе говоря, вместе с другими признаками биологического происхождения органическое вещество, подвергшееся термальному метаморфизму, утрачивает и присущую биологическим объектам термодинамическую упорядоченность изотопного распределения. Последнее, правда, еще может сохраняться на внутримолекулярном уровне.

Таким образом, результаты изотопных исследований, в основе интерпретации которых лежит использование установленных закономерностей биологического поведения изотопов, позволяют раскрыть сущность постбиологической истории органического вещества.

## ПРОБЛЕМА ПРОИСХОЖДЕНИЯ НЕФТИ

Проблема происхождения нефти по традиции включает вопрос о том, является ли нефть результатом преобразования органических остатков или же углеводороды нефти синтезированы в эндогенных условиях (неорганическая гипотеза происхождения нефти). Если нефть органического происхождения, то вопрос заключается в том, образовались ли различные классы углеводородов (парафиновые, нафтеновые, ароматические) из общего исходного материала или они имели в качестве предшественников различные биохимические компоненты (унаследованный характер углеводородных структур). С точки зрения понимания условий нефтеобразования важно знать, каково соотношение в разных нефтях унаследованных и новообразованных структур.

С этой целью можно использовать подход, вытекающий из правила, сформулированного выше, а именно: если имеется соответствие между изотопным составом углеводородов нефти и величин  $\beta$ -факторов, характеризующих эти углеводороды, то это свидетельствует о биологическом происхождении и одновременно об унаследованности данных углеводородных структур от соответствующих структурных форм биомолекул. Если такого соответствия нет, то данные углеводородные структуры

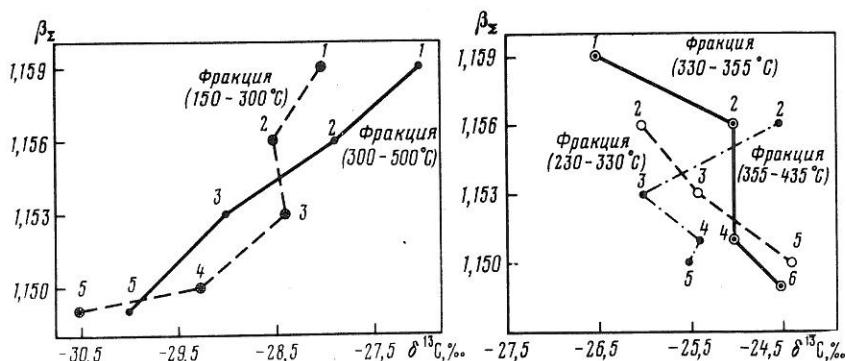


Рис. 11.3. Связь  $\delta^{13}\text{C}$ – $\beta^{13}\text{C}$  в углеводородах природной нефти (Краснокамское месторождение Пермской области)

Углеводороды: 1 – полиароматические; 2 – биароматические; 3 – моноароматические; 4 – нафтеновые; 5 – *n*-парафиновые

Рис. 11.4. Графики, отражающие отсутствие связи типа  $\delta^{13}\text{C}$ – $\beta^{13}\text{C}$  в углеводородах, синтезированных путем термокатализа олеиновой кислоты

Углеводороды: 1 – полиароматические; 2 – биароматические; 3 – моноароматические; 4 – нафтеновые (бициклические); 5 – нафтеновые (моноциклические); 6 – *n*-парафиновые

следует рассматривать как новообразования, в том числе, возможно, как абиогенные.

Этот подход был положен в основу соответствующих экспериментов, предпринятых в нашей лаборатории [5]. Из образца природной нефти одного из месторождений Волго-Уральской нефтегазоносной области (Краснокамского) был выделен ряд фракций углеводородов, отличающихся по молекулярному весу (т.е. выкипающих в различном интервале температур). Из этих фракций извлекались нормальные парафиновые, изопарафиновые, нафтеновые и ароматические углеводороды разной степени цикличности. Изотопный состав их углерода измерялся на масс-спектрометре, затем измеренные величины  $\delta^{13}\text{C}$  сопоставлялись с вычисленными значениями  $\beta$ -факторов (рис. 11.3).

Для сравнения был изучен изотопный состав углерода углеводородных фракций, полученных синтетически, путем термокатализа при 200° С [5]. Источником для всех углеводородов в этом случае служило одно исходное соединение – олеиновая кислота (рис. 11.4).

Для углеводородов природной нефти в целом наблюдается корреляция между величинами  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\beta^{13}\text{C}$  того же типа, что и в биомолекулах. В синтетических углеводородах подобная связь отсутствует. Это указывает на биологическое происхождение углеводородов данной нефти. В дальнейшем зависимость вида  $\delta^{13}\text{C}$ – $\beta^{13}\text{C}$  была установлена для многих нефей [14].

Связь между величинами  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\beta^{13}\text{C}$  будет становиться слабее по мере преобразования вещества на пути от биологических форм к соответствующей углеводородной фракции. Из рис. 11.3 видно, что связь  $\delta^{13}\text{C}$ – $\beta^{13}\text{C}$  четче выражена для более высокомолекулярной фракции. Это показывает,

что процесс нефтеобразования направлен в сторону последовательного разукрупнения молекул. Иначе говоря, низкомолекулярные бензиновые фракции нефти в генетическом отношении отстоят дальше от исходных биомолекул, чем высокомолекулярные фракции.

Последнее подтверждается результатами изучения индивидуальных нормальных алканов в нефтях. Низкомолекулярные парафиновые углеводороды бензиновой фракции  $C_7-C_{10}$ , как правило, обеднены изотопом  $^{12}C$  по сравнению с более высокомолекулярными. Они являются продуктом фрагментации исходных высокомолекулярных алканов и, в свою очередь, источником газообразных углеводородов  $C_1-C_4$ . Этот последний процесс, сопровождающийся кинетическим изотопным эффектом, приводит к выходу обогащенных легким изотопом метана и его гомологов и соответствующему обеднению легким изотопом углеводородов бензиновой фракции. По этой же причине относительно обеднены изотопом  $^{12}C$  сильноизмененные так называемые газоконденсатные нефти.

В нефтях встречаются соединения, для которых можно указать вполне определенных биологических предшественников. Так, предполагается, что нормальные алканы происходят от жирных кислот, изопреноидные углеводороды являются продуктом восстановления фитола, порфирины образуются из порфиринового ядра хлорофилла. Однако сторонники неорганического происхождения нефти утверждают, что основные классы углеводородов нефти, включая нормальные алканы, образуются в результате абиогенного синтеза в мантии или нижних этажах земной коры. В то же время порфирины и изопреноиды (легко разрушающиеся при повышенных температурах) действительно являются биогенными, но они попадают в нефть из вмещающих пород, будучи экстрагированы поступающим из глубин потоком углеводородов. Иначе говоря, они генетически не связаны с основной массой нефти, в частности, с нормальными алканами. Таким образом, решение вопроса о наличии или отсутствии генетической связи между указанными соединениями в нефтях приобретает принципиальное значение.

В работе [5, с. 371] мы отметили, что проблема может быть решена, если провести сравнительный анализ изотопного состава изопреноидов и нормальных алканов в нефти. Дело в том, что  $\beta$ -факторы фитольной цепи хлорофилла и многоатомных жирных кислот близки и имеют относительно низкие значения. Поэтому изопреноиды должны быть близки по изотопному составу к нормальным алканам и, так же как последние, относительно обогащены легким изотопом углерода при условии, что они происходят из общего биологического источника.

Экспериментальное исследование [15] показало, что изотопный состав изопреноидов ( $ip-C_{16} - ip C_{18}$ ) действительно весьма близок к изотопному составу нормальных алканов ( $nC_{16} - nC_{21}$ ) той же нефти (табл. 11.2).

С другой стороны,  $\beta$ -фактор порфиринового ядра хлорофилла имеет более высокое значение, чем  $\beta$ -фактор фитола. В гл. V мы видели, что в согласии с этим и в соответствии с принципом термодинамически упорядоченного распределения изотопов углерод порфиринового ядра хлорофилла обеднен изотопом  $^{12}C$ . Следовательно, и в нефтях порфирины должны быть относительно обеднены изотопом  $^{12}C$ . Экспериментальное ис-

Таблица 11.2

Изотопный состав углеводородных фракций нефти (Кокуйское месторождение, фракция, выкипающая в диапазоне 282–350°C  $\delta^{13}\text{C}$  нефти в целом = –29,23‰)

Углеводородная фракция	$\delta^{13}\text{C}$ , ‰	Углеводородная фракция	$\delta^{13}\text{C}$ , ‰
Фракция 282–350°C	–29,48	Na	–29,90
в целом		<i>i</i> -Алканы (изопреноиды)	–30,30
Me + Na	–30,41	<i>i</i> -Алканы (неизопреноидные изоалканы)	–29,84
Аг	–28,21		
<i>n</i> -Алканы	–30,99		

Таблица 11.3

Изотопный состав углерода нефтяных порфиринов в некоторых нефтях Пермского Прикамья [15]

Месторождение	$\delta^{13}\text{C}$ , ‰		Месторождение	$\delta^{13}\text{C}$ , ‰	
	нефть	VO-порфирины		нефть	VO-порфирины
Кудинское	–28,9	–27,1	Дуринское	–29,4	–26,9
То же	–28,2	–27,4	Альняжское	–28,4	–28,0
"	–27,3	–26,5	"	–28,0	–25,2
"	–27,7	–25,7	Киенгопское	–27,7	–26,0
"	–28,0	–26,0	Андреевское	–28,1	–26,8

следование показало, что это действительно так (табл. 11.3). Более того, наблюдается прямая корреляция между изотопным составом разных нефтей и содержащихся в них порфиринов.

Таким образом, доказывается генетическая связь биологических маркеров, таковыми являются порфирины и изопреноиды, с углеводородами, составляющими основную массу нефти, а, следовательно, и органическое происхождение самой нефти.

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНЕЗИСА И ИСТОЧНИКА УГЛЕВОДОРОДОВ, ФОРМИРУЮЩИХ ДАННУЮ ГАЗОВУЮ ЗАЛЕЖЬ

Метан образуется на всех стадиях превращения органического вещества. На самой ранней ступени он является чаще всего продуктом микробиологического восстановления углекислоты:  $\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 = \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$  и ферментативного расщепления уксусной кислоты:  $\text{CH}_3\text{COOH} = \text{CH}_4 + \text{CO}_2$ . Метан микробиологического происхождения сильно обогащен легким изотопом ( $\delta^{13}\text{C}$  от –50 до –80‰). Он относится к числу наиболее изотопно-легких соединений в природе. Обогащенность метана легким изотопом объясняют обычно кинетическим изотопным эффектом. Однако, имея в виду широкую распространенность термодинамических изотопных эффектов в биохимических процессах, нельзя не обратить

внимание на то, что метан характеризуется весьма низким значением  $\beta$ -фактора. Значение  $\beta^{13}\text{C}$  метана при  $25^\circ\text{C}$  равно 1,114, в то время как  $\beta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2} = 1,190$ , т.е. термодинамический изотопный эффект составляет 65‰. Это приблизительно отвечает наблюдаемой разнице в изотопном составе  $\text{CH}_4$  и  $\text{CO}_2$  в природных условиях.

На более поздних стадиях, когда органическое вещество захороняется в осадках и постепенно оказывается на все больших глубинах, микробиологические процессы затухают и метан образуется за счет химической фрагментации органических соединений, входящих в состав ископаемого органического вещества – керогена.

Скорость преобразования органического вещества в недрах зависит от разных причин. Но в целом, чем глубже захоронено органическое вещество в толще осадочных пород, тем оно более преобразовано. Уже давно было установлено, что углерод метана в осадочных отложениях изотопически значительно легче углерода органического вещества. С глубиной эта разница уменьшается, т.е. чем глубже находится залежь, тем, как правило, изотопически более тяжелый метан она содержит [4].

Эту зависимость объясняли кинетическим изотопным эффектом. Последний уменьшается с увеличением температуры, а температура в недрах нарастает с глубиной. Поэтому с увеличением глубины уменьшается обусловленная кинетическим эффектом разница в изотопном составе метана и исходного органического вещества. Такое объяснение было дано автором [3] и одновременно американским исследователем В. Саккеттом [40]. Но потом выяснилось, что в тех случаях, когда метан присутствует в ассоциации с очень глубоко преобразованным органическим веществом (антрацитовым углем) или на большой глубине, изотопный состав его почти не отличается от углерода органического вещества или даже может быть изотопически тяжелее его [46, 48]. Кинетическим изотопным эффектом этого объяснить нельзя, так как он всегда приводит к обогащению продукта легким изотопом.

Попытка объяснить это изотопно-обменными эффектами, в частности, между  $\text{CO}_2$  и  $\text{CH}_4$  [12] встречает серьезное возражение, так как скорости подобного обмена даже при высоких температурах ( $\sim 500^\circ\text{C}$ ) настолько малы [41], что при сравнительно низких температурах осадочного чехла эти эффекты не проявляются даже в течение геологически продолжительного времени.

Открытие внутримолекулярной неоднородности распределения изотопов в биосистемах создало новую основу для объяснения этих фактов. Если принять во внимание различие  $\beta_i$ -факторов разных структурных групп ( $\beta_{\text{CH}_3} \approx 1,130$ ,  $\beta_{\text{CH}_2} \approx 1,150$ ,  $\beta_{\text{CH}} = 1,168$ ), то переход газогенерирующей роли от  $\text{CH}_3$ -групп на ранней стадии к изотопически более тяжелым структурным группам на более поздних стадиях преобразования органического вещества в принципе объясняет наблюдаемую зависимость изотопного состава углерода метана от глубины его залегания.

Это приводит к важному в геохимическом отношении выводу о том, что изотопный состав метана отражает степень преобразованности органического вещества. Определенной степени преобразованности органического вещества отвечает способность его производить нефтяные углеводо-

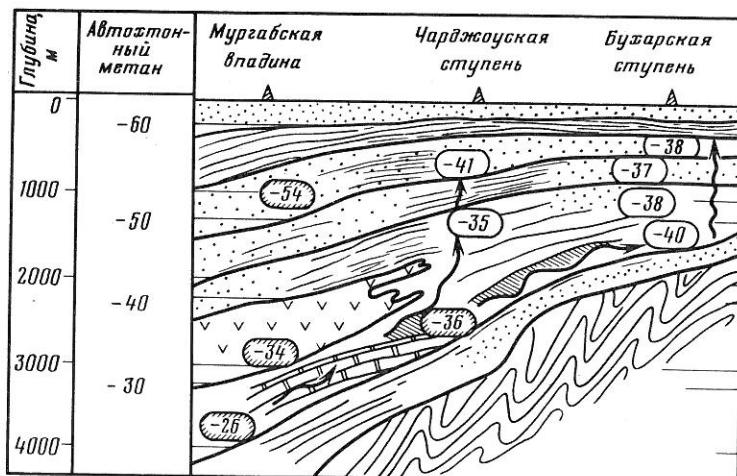


Рис. 11.5. Использование изотопного критерия для определения природы метана и направления миграции газа при формировании газовых залежей в пределах крупного газоносного бассейна (Амударьинская синеклиза, Средняя Азия)

роды. Поэтому изотопный состав метана приобретает значение диагностического признака процесса нефтеобразования.

Понимание причин, определяющих изотопный состав метана, позволило сформулировать способ установления углеводородного источника, питающего данную газовую залежь в процессе ее формирования. Для геологов-нефтяников, занимающихся исследованием условий формирования залежей, всегда очень важно определить, образовались ли углеводороды в непосредственной близости от района скопления залежей или они мигрировали издалека. Это – сложный вопрос, требующий обычно глубокого анализа всей геологической обстановки. Тем не менее далеко не всегда удается на него ответить, хотя от этого зависит дальнейшее направление геолого-поисковых работ на данной территории, оценка перспективных запасов и пр.

Сказанное выше относительно зависимости изотопного состава метана от степени преобразования органического вещества позволяет выработать критерий для такой оценки. Сущность его поясним на примере крупной газоносной провинции в Средней Азии, где он был практически нами применен [8].

На рис. 11.5, представляющем схематический разрез толщи осадочных пород этой территории, в овалах указан измеренный на масс-спектрометре изотопный состав метана из газовых залежей, находящихся в отложениях разного геологического возраста. Слева, рядом со шкалой глубин, указана шкала величин  $\delta^{13}\text{C}$  метана, изотопный состав которого теоретически отвечает степени преобразования органического вещества, возможной на соответствующих глубинах.

Если реальный изотопный состав метана газовых залежей находится в диапазоне значений  $\delta^{13}\text{C}$ , отвечающих степени преобразования органического вещества на этой глубине, то можно допустить, что метан образо-

вался в пространственной близости от места его скопления (автохтонный метан – заштрихованные овалы). Если же изотопный состав метана не соответствует степени преобразования органического вещества в соответствующих отложениях, то следует сделать вывод, что он мигрировал со стороны (аллохтонный метан – незаштрихованные овалы).

В данном случае очевидно, что газовые залежи Бухарской и Чарджоуской ступени, в том числе одно из богатейших месторождений в Советском Союзе – Газли на Бухарской ступени, образовались за счет притока газа из более погруженных отложений Амударьинской синеклизы, а именно, Мургабской впадины. Отсюда следовали соответствующие рекомендации в отношении направления геологоразведочных работ на этой территории.

### СВЯЗЬ ИЗОТОПНОГО СОСТАВА БИОГЕННОГО УГЛЕРОДА С ТЕМПЕРАТУРОЙ СРЕДЫ

Поскольку биологические изотопные эффекты имеют термодинамическую природу, а термодинамические изотопные эффекты зависят от температуры, биогенному углероду должна быть присуща температурная зависимость изотопного состава.

Действительно, зависимость изотопного состава организмов от температуры среды их обитания неоднократно отмечалась.

По-видимому, впервые на это обратили внимание В. Саккетт и его соавторы [42], обнаружив, что планктон, собранный в холодных водах высокосиротных акваторий Южной Атлантики, изотопически легче ( $\delta^{13}\text{C} = -27,9$ ) планктона, обитающего в теплых тропических водах ( $\delta^{13}\text{C} = -21,7$ ).

В нашей лаборатории проводились исследования изотопного состава липидной фракции планктона из Индийского океана [9]. Сопоставляли величины  $\delta^{13}\text{C}$  липидов планктона с температурой океанической воды, зарегистрированной в районе отбора. Полученная зависимость изображена на рис. 11.6. Связь изотопного состава углерода биомассы и температуры среды отмечалась для организмов, выращенных в лабораторных условиях [19].

С уменьшением температуры возрастает обогащенность организмов легким изотопом, т.е. увеличивается разница между изотопным составом органического углерода и исходной углекислоты. Это отвечает знаку температурной зависимости термодинамических изотопных эффектов (см. главу III).

Теоретическая зависимость термодинамических изотопных эффектов органических соединений от температуры составляет 0,2–0,4% на 1°. Приблизительно такую же температурную зависимость обнаруживают природные образцы.

Очевидно, что в тех случаях, когда по тем или иным причинам нарушается термодинамически упорядоченное распределение изотопов, должна утрачиваться и температурная зависимость. Этого, в частности, следует ожидать при развитии организма в экстремальных условиях, нестационарных режимах биосинтеза и т.п.

Существует еще одна возможность температурного регулирования изотопного состава, вытекающая из формулы для энзиматического фракци-

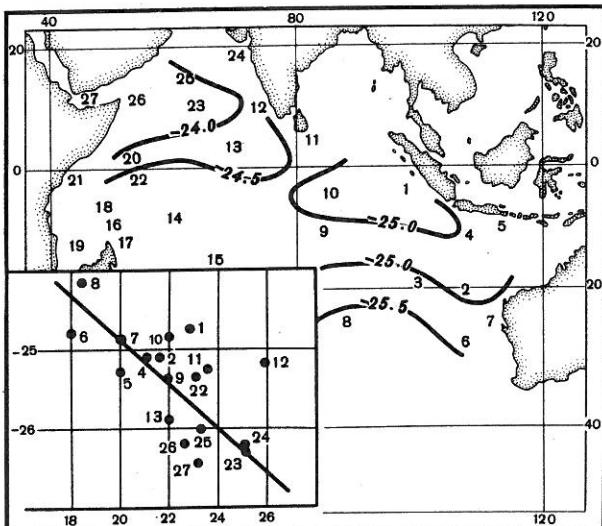


Рис. 11.6. Связь изотопного состава углерода липидов планктона с температурой океанической воды (Индийский океан)

Числа на графиках отвечают номерам станций, на которых проводился отбор проб

нирования. Дело в том, что коэффициент  $\chi$  принципиально может изменяться с температурой независимо от  $\beta$ -факторов ввиду возможного изменения с температурой величин констант  $k_a$ ,  $k_b$ ,  $k_2$  и их соотношения. Этот специфический температурный эффект, очевидно, может по-разному сочетаться с температурной зависимостью  $\beta$ -факторов.

Поэтому, вероятно, во многих случаях исследователям не удавалось обнаружить температурную зависимость биологического углерода [45, 49]. При изучении изотопных эффектов в энзиматических реакциях *in vitro* в некоторых случаях зависимость от температуры проявлялась [51], в других – влияние температуры было несущественным [17], а иногда температурный изотопный эффект имел знак, противоположный ожидаемому [20].

Следует отметить, что существует вообще множество факторов, которые маскируют и усложняют температурную зависимость. От температуры зависит целый ряд физических и физиологических параметров, которые могут влиять, причем по-разному, на изотопный состав организма. Например, скорость потребления  $\text{CO}_2$  при фотосинтезе, концентрация углекислоты во внешней среде (воде), и скорость роста клеток зависят от температуры. В свою очередь они определяют, причем иногда сложным образом, изотопный состав организмов. В высших растениях дело усложняется тем, что температура тканей может быть отлична от температуры воздуха и различна в разных частях растения.

Поэтому для индивидуальных организмов значимая температурная зависимость изотопного состава углерода, по-видимому, редкость. Более вероятно ее статистическое проявление для целых биоценозов, где влияние многих отдельных факторов взаимно погашается и зависимость от

температуры может проявиться более отчетливо, как это имело место, например, при упомянутых исследованиях планктона в пределах океанических акваторий.

Кстати, для геохимических приложений имеет значение именно этот статистический аспект. В такой связи находят теоретическое обоснование наблюдавшиеся случаи корреляции изотопного состава органического углерода в осадках с предполагаемыми температурными условиями соответствующих геологических эпох. Палеотемпературная зависимость изотопного состава ископаемого углерода в осадке была впервые отмечена М. Роджерсом и С. Кунсом [38]. Позже М. Роджерс и другие [39], исследуя глубоководные осадки третичного и четвертичного возраста в Северной Атлантике, обратили внимание на связь вариаций  $\delta^{13}\text{C}$  органического углерода (керогена) с историей оледенений. Эпохам оледенений отвечал на 1–2% более легкий углерод. Точка зрения М. Роджерса и его соавторов относительно существования зависимости  $\delta^{13}\text{C}$  керогена от палеотемператур подверглась критике как спекулятивная или применимая к очень специфическим условиям [43]. Эта критика, в свете сказанного выше, представляется неоправданной. Зависимость  $\delta^{13}\text{C}$  керогена от палеотемператур является естественным отражением температурной зависимости биологического углерода, для которого это свойство в силу преимущественно термодинамической природы изотопных эффектов является фундаментальным. Другое дело, что влияние температурного фактора может быть замаскировано действием других факторов.

Мы говорим только о температурной зависимости углерода. Известно, что величины  $\delta^{18}\text{O}$  и  $\delta\text{D}$  растений также во многих случаях коррелируют с температурой. Однако в большинстве случаев это не представляет подлинно биологического явления, а обусловлено зависимостью изотопного состава водорода и кислорода от скорости испарения внутриклеточной воды и других температурно-зависимых, но не связанных с собственно механизмом биосинтеза, факторов.

### ИЗМЕНЕНИЕ ИЗОТОПНОГО СОСТАВА ОРГАНИЧЕСКОГО УГЛЕРОДА В ХОДЕ ГЕОЛОГИЧЕСКОГО ВРЕМЕНИ

Исходя из того, что известно в настоящее время о факторах, влияющих на изотопный состав биологического углерода, можно предположить следующие основные причины, которые могли бы обусловить изменение изотопного состава органического углерода в ходе геологического времени.

1. Изменение изотопного состава углерода общего углеродного резервуара на поверхности Земли: а) вследствие эволюции процесса дегазации мантии Земли и сопряженного с ним возможного изменения изотопного состава продуктов дегазации; б) в результате периодического изменения масштаба и скорости рециркуляции корового углерода, связанного с глобальными эпохами магматизма.

2. Изменение соотношения между органической формой и другими формами углерода (практически между органической и карбонатной)

в результате изменения физико-химической обстановки на Земле и объема биосфера.

3. Изменение характера и величины фракционирования изотопов между органическим углеродом и углеродом источника. Из материалов предшествующих глав следует, что последнее может быть вызвано: а) изменением механизма биосинтеза и, следовательно, преобладающего типа изотопных эффектов; б) изменением биохимического состава организмов; в) изменением обилия углекислоты; г) изменением химической формы исходного углерода; д) вариациями температуры земной поверхности и другими причинами.

4. Изменение соотношения между изотопным составом ископаемого органического углерода и изотопным составом его биологических предшественников вследствие изменения условий и химического содержания процесса фоссилизации органического вещества.

Имеющиеся в настоящее время данные по изотопному составу органического углерода в древних геологических отложениях относятся, как правило, к углероду органического вещества в целом, в лучшем случае — к углероду керогена и битумоида. Поэтому возможности применения для их анализа сформулированных выше изотопных критериев ограничены. Тем не менее можно указать некоторые закономерности, отражающие эволюцию биосферы в ходе геологического времени.

**Фанерозой.** Большинство данных относится к фанерозою, т.е. геологическому времени, охватывающему последние 600 млн. лет истории Земли. В ряде работ отмечалась тенденция к постепенному уменьшению обогащения органического углерода изотопом  $^{13}\text{C}$  от древних к молодым отложениям в течение фанерозоя [28, 50]. В действительности эта зависимость, по-видимому, носит немонотонный характер. Конкретный вид зависимости лучше рассмотреть на примере одного крупного геологического региона, как это было сделано нами с А.А. Мигдисовым и А.Б. Роновым для Русской платформы. В работе [7] для пород каждого геологического возраста осадочного разреза Русской платформы была изготовлена представительная пробы, составленная путем смешения нескольких сотен образцов из различных районов. Отдельно определялся изотопный состав битумоида и керогена, а также карбонатного углерода.

На рис. 11.7 показано изменение изотопного состава исследованных форм органического углерода, а на рис. 11.8 — изотопного состава карбонатов и некоторых параметров, характеризующих обстановку осадконакопления в течение фанерозоя на Русской платформе.

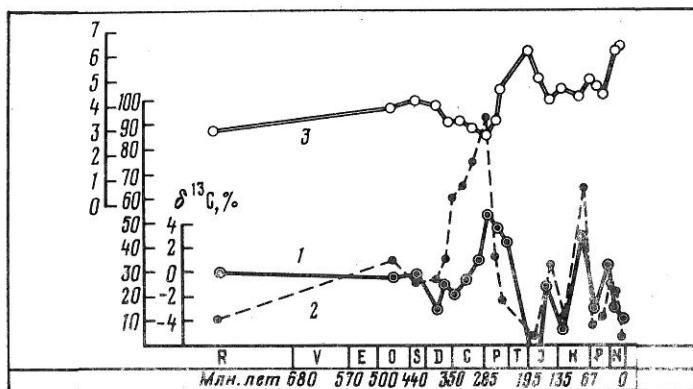
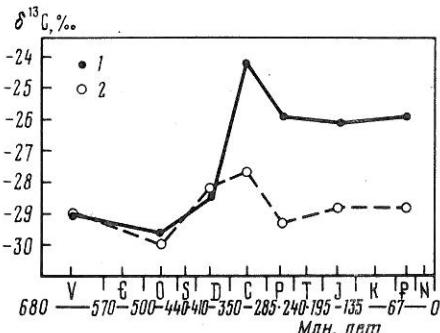
Сопоставление представленных кривых не показывает сколько-нибудь отчетливой зависимости изотопного состава органического углерода от характера преобладающих литолого-фациальных обстановок, скоростей седиментации, концентраций органического углерода и т.д.

Наиболее интересными являются две черты, обнаруживающиеся в распределении изотопного состава органического углерода в течение фанерозоя на Русской платформе: 1) резкое обеднение керогена и битумоида изотопом  $^{13}\text{C}$  в каменноугольное время; 2) появление в карбонате и сохра-

Рис. 11.7. Изменение изотопного состава органического углерода в осадочных отложениях Русской платформы фанерозоя

1 – кероген; 2 – битумоид [13]

Рис. 11.8. Изотопный состав углерода карбонатов (1), относительная распространенность карбонатов в процентах от общего объема осадков (2) и площадь распространения континентальных условий (3) и различные геологические периоды в течение фанерозоя на Русской платформе [13]



нение в дальнейшем отсутствовавшего до того времени различия в изотопном составе углерода керогена и битумоида.

Изотопный состав карбонатного углерода в отличие от органического находится, как видно из рис. 11.8, в тесной связи с другими геохимическими параметрами. Поэтому, очевидно, он может служить более чувствительным индикатором изменения изотопного состава углерода поверхностного фонда в целом (первые две группы указанных выше величин). Отсутствие четкой корреляции между изотопным составом карбонатного и органического углерода свидетельствует о том, что не эти причины обусловили наблюдавшиеся сдвиги в изотопном составе форм органического углерода.

Характерный сдвиг в карбоне, очевидно, так или иначе связан с появлением в это время наземной растительности и становлением кислородной атмосферы. Однако эти факты связаны не прямолинейно. Действительно, обеднение органического углерода изотопом  $^{12}\text{C}$  в послекаменноугольное время нельзя объяснить вкладом наземной растительности, так как ее углерод, напротив, обогащен легким изотопом относительно углерода морских организмов.

Установленные в этой работе закономерности биологического фракционирования изотопов позволяют думать, что упомянутый сдвиг скорее

всего обусловлен изменением характера процесса преобразования органического вещества в ископаемые формы. Выше говорилось, что взаимодействие между аминными группами белков и альдегидными группами углеводов, т.е. меланоидиновый процесс, позволяет стабилизироваться легко разрушающимся в геологической обстановке белкам и углеводородам в виде высокомолекулярных полимеров, сначала в виде фульвокислот, затем гуминовых кислот и, наконец, керогена. Возможно, что либо отличный от современного биохимический состав организмов в докарбоновое время, либо факт отсутствия кислородной атмосферы и связанная с этим иная диагенетическая обстановка в осадке препятствовали меланоидиновому процессу. Поэтому в диагенезе выживали преимущественно химические и микробиологически устойчивые липидные компоненты. Тогда в докаменноугольное время они должны были составлять основной источник керогена. Поскольку липиды обогащены легким изотопом, это объясняет относительную обогащенность докаменноугольного керогена легким изотопом. Объясняется также отсутствие в докаменноугольное время заметной разницы между углеродом керогена и битумоида, поскольку источником последнего служит та же липидная фракция.

**Докембрий.** Изучение изотопного состава органического углерода в докембрийских отложениях [7, 21, 27, 28, 34] показало, что он почти на протяжении всего доступного исследованию геологического времени обогащен легким изотопом практически до обычного "биологического уровня". Это наряду с высокой распространностью восстановленного углерода в докембрии [13] свидетельствует о раннем становлении биосфера.

Карбонатный углерод в докембрии характеризуется высокой амплитудой вариаций изотопного состава, причем всплески обогащенности углерода тяжелым изотопом отвечают эпохам мощного магматизма (рис. 11.9). В эти эпохи, очевидно, значительная часть ранее отложенного и захороненного в осадочной оболочке изотопически тяжелого карбонатного углерода возвращалась в поверхностный фонд системы атмосфера-гидросфера [7, 23].

Как и для фанерозоя, органический углерод не показывает тесной связи с изотопным составом карбонатного углерода в соответствующие геологические периоды. На рис. 11.10 собраны данные по изотопному составу углерода керогена из докембрийских отложений, полученные разными авторами. Распространенность изотопов в органическом углероде в докембрии характеризуется двумя особенностями.

Первая состоит в относительной обогащенности изотопом  $^{12}\text{C}$  керогена в раннем докембрии ( $\delta^{13}\text{C}$  от  $-28$  до  $-38\text{\textperthousand}$ , в то время как для фанерозоя характерны значения от  $-23$  до  $-30\text{\textperthousand}$ ). На эту особенность впервые обратил внимание Т. Хоеринг [28].

Вторая особенность состоит в аномальной обедненности изотопом  $^{12}\text{C}$  органического углерода в наиболее древних осадочных отложениях, Дж. Шопф с соавторами [34] обнаружили, что кероген из формации Триспрут (отложения группы Онвервахт Свазилендской серии, Южная Африка) возрастом 3,5 млрд. лет характеризуется величинами  $\delta^{13}\text{C}$  в среднем около  $-16\text{\textperthousand}$ . Этот изотопный сдвиг, по мнению упомянутых

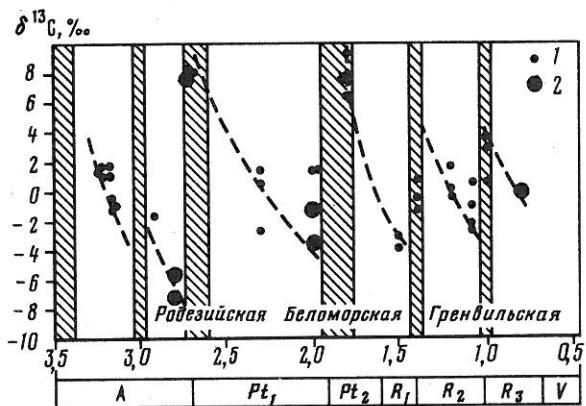


Рис. 11.9. Изотопный состав углерода докембрийских карбонатов и связь их с эпохами магматизма

1 – одиночные определения; 2 – смешанная проба, характеризующая множество образцов пород соответствующего геологического возраста [13]

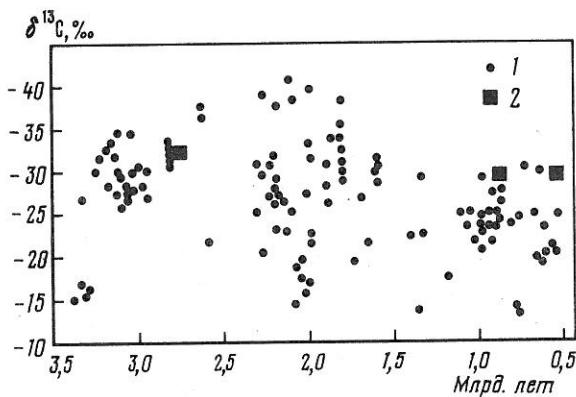


Рис. 11.10. Данные по изотопному составу органического углерода в докембреи

1 – одиночные определения; 2 – смешанная проба, характеризующая множество образцов пород соответствующего геологического возраста [23]

авторов, возможно, отмечает переход от abiогенного к biогенному углероду или то время, когда появился механизм biологического фракционирования изотопов, близкий к современному.

Относительно причин обогащенности изотопом  $^{12}\text{C}$  раннепротерозойского органического вещества высказывалось несколько предположений. С. Эпстайн [22] полагал, что это связано с малой распространностью biогенного углерода в то время и соответствующим смещением изотопного баланса. Э. Дегенс [18] предположил, что изотопно-легкий органический углерод в докембреи, возможно, отражает условия более низкого pH и более высокой концентрации молекулярной  $\text{CO}_2$  в докембрийском море. Дж. Пардю и другие [35], экспериментируя с культурой синезеленых

водорослей, показали, что при определенных условиях, в частности при уменьшении концентрации клеток в среде, изотопное фракционирование увеличивается. Они высказали предположение, что это могло бы объяснить изотопически легкий углерод докембрия.

М. Шилловский с соавторами [21, 29] считают, что вариации  $\delta^{13}\text{C}$  докембрийского органического углерода в общем не выходят за пределы диапазона, характерного для фанерозоя, и объясняются вариациями соотношения карбонатного и органического углерода в ходе геологического времени. Отметим, что в этом случае следовало бы ожидать синхронных изменений  $\delta^{13}\text{C}$  карбонатного и органического углерода.

Если отвлечься от деталей, основная тенденция состоит в изменении изотопного состава органического вещества на трех рубежах: геологического времени 3,5,2–1,8 и 0,4 млрд. лет. Последний отвечает появлению наземных растений и подъему концентрации  $O_2$  в атмосфере до современного уровня. В интервале 1,8–0,4 млрд. лет изотопный состав органического углерода сохраняется на уровне, характерном для докаменноугольного керогена. Предполагаемые причины его относительной обогащенности легким изотопом по сравнению с керогеном более молодого возраста были рассмотрены выше. Еще более высокая обогащенность изотопом  $^{12}\text{C}$  органического углерода в породах древнее 2 млрд. лет, возможно, объясняется отчасти причинами, на которые указывали цитируемые выше авторы, но, возможно, она связана с особенностью биохимического состава древнейших организмов. Рубеж 3,5 млрд. лет не является пока достаточно надежным. Данных об этом периоде истории Земли очень мало. Заметим только, что магматические породы, которые могли быть выплавками из несохранившихся древнейших осадочных отложений, почти всегда содержат изотопически легкий рассеянный углерод. Это может иметь свои объяснения, связанные со спецификой углерода мантии, но это не противоречит предположению о том, что биологическое фракционирование изотопов, а, следовательно, организмы появились на Земле гораздо раньше рубежа 3,5 млрд. лет.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Берман Е.Л., Сахаров А.М., Галимов Э.М. и др. Изучение структуры активного центра при полимеризации 1,3-диоксалана. — Докл. АН СССР, 1977, 234, № 4.
2. Берман Е.Л., Сахаров А.М., Галимов Э.М. и др. Кинетический изотопный эффект  $^{13}\text{C}$  в ионной полимеризации окиси этилена. — Докл. АН СССР, 1978, 239, № 5.
3. Галимов Э.М. Геохимия стабильных изотопов углерода. М.: Недра, 1968.
4. Галимов Э.М. Изотопный состав углерода газов земной коры. — Изв. АН СССР. сер. геол., 1968, № 5.
5. Галимов Э.М. Изотопы углерода в нефтегазовой геологии. М.: Наука, 1973.
6. Галимов Э.М., Кодина Л.А., Генералова В.Н. и др. Исследование распределения изотопов углерода в биогенных соединениях. — В кн.: Тр. VIII Междунар. конгр. по орган. геохимии, Наука, М., 1977.
7. Галимов Э.М., Мигдисов А.А., Ронов А.Б. Вариации изотопного состава карбонатного и органического углерода осадочных пород в истории Земли. — Геохимия, 1975, № 3.

8. Галимов Э.М., Теплинский Г.П., Табассаранский З.А. и др. – Условия формирования газовых залежей в пределах Восточной части Туранской плиты по данным изотопного состава углерода газов. – Геохимия, 1973, № 11.
9. Галимов Э.М., Ширинский В.Г., Бордовский О.К., Заикин В.Г. Изотопный состав углерода липидов планктона Индийского океана. – Геохимия, 1975, № 6.
10. Мансак С.М., Дроздова Т.В. Геохимия органического вещества. М.: Наука, 1964.
11. Меландер Л. Изотопные эффекты в скоростях реакций. М.: Мир, 1964.
12. Просолов Э.М., Лобков В.А. Об условиях образования и миграции метана (по изотопному составу углерода). – Геохимия, 1977, № 1.
13. Сидоренко Св.А., Сидоренко А.В. Органическое вещество в осадочно-метаморфических породах докембрия. М.: Наука, 1975.
14. Ширинский В.Г. Закономерности фракционирования изотопов углерода в природных липидах: Автореф. дис. ... канд. геол.-минерал. наук. М.: ГЕОХИ АН СССР, 1978.
15. Bogacheva M.P., Kodina L.A., Galimov E.M. Intramolecular carbon isotope distribution in chlorophyll and in geochemical derivatives. In: "Advances in Organic Geochemistry 1979", Proceed. 9th Intern. Meet. Org. Geoch., Newcastleupon-Tyne, Pergamon Press, 1980.
16. Brown F.S., Baedecker M.J., Nissenbaum A., Kaplan I.R. Early diagenesis in Saanich Inlet, a reducing fiord. 3. – Geochim. et cosmochim. acta, 1972, 36, p. 1185.
17. Christeller J.T., Lang W.A., Troughton J.H. Isotope discrimination by ribulose-1,5 diphosphate carboxylase. – Plant Physiol., 1976, 57, p. 580–582.
18. Degens E.T. Biogeochemistry of stable carbon isotopes. – In: Organic geochemistry/ Ed. G. Eglington, M.T.J. Murphy. B.: Springer-Verl., 1969.
19. Degens E.T., Guillard R.R.L., Sackett W.M., Hellebust J.A. Metabolic fractionation of carbon isotopes in marine plankton I. Temperature and respiration experiments. – Deep-Sea Res., 1968, 15, p. 1–9.
20. DeNiro M., Epstein S. Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis. – Science, 1977, 197, p. 261.
21. Eichmann R., Schidlowski M. Isotopic fractionation between coexisting organic carbon-carbonate pairs in Precambrian sediments. – Geochim. et cosmochim. acta, 1975, 39, p. 585.
22. Epstein S. Distribution of carbon isotopes and their biochemical and geochemical significance. – In: Proc. Symp. on CO<sub>2</sub>: Chemical, Biochemical and Physiological Aspects/Ed. Forster et al. Harerford (Pa), Aug. 1968(NASA SP-188). 1969, p. 5–14.
23. Galimov E.M. Variations of the carbon cycle at present and in the geological past. – In: Environmental biogeochemistry/Ed. J. Nriagu, 1976, 1, p. 3.
24. Galimov E.M. <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C in kerogen. In: "Kerogen", Edit. B. Durand, Editions Technip, 1980, p. 271–300.
25. Galimov E.V., Kodina L.A., Bogacheva M.P., Shirinsky V.G. Organic geochemistry study of samples from DSDP Sites 474, 477, 478, 479, 481 in Gulf of California, Leg 64. In: Initial Reports of Deep Sea Drilling Project. Wash.: U.S. Goverment Print. Office, 1980, v. 64.
26. Hayes I.M. Organic constituents in meteorites: A review. – Geochim. et cosmochim. acta, 1970, 31, N 12, p. 1395.
27. Hoefs J.M., Schidlowski M. Carbon isotope composition of carbonaceous matter from the Precambrian of the Witwatersrand system. – Science, 1967, 155, p. 1096.
28. Hoering T.C. – In: Researches in geochemistry./Ed. Abelson P./, Wiley, 1967, p. 2.
29. Junge C.E., Schidlowski M., Eichman R. Pietreck. Model calculations for the terrestrial carbon cycle: carbon isotope geochemistry and evolution of photosynthetic oxygen. – J. Geophys. Res., 1975, 80, p. 4542.
30. Nissenbaum A. The organic geochemistry of marine and terrestrial humic substances: Implications of carbon and hydrogen isotope studies. P.: Adv. Org. Geochem., Edit. Technip, 1974, p. 39–51.
31. Nissenbaum A., Baedecker M.J., Kaplan T.R. Studies on dissolved organic matter from interstitial water of a reducing marine fiord. Oxford: Adv. Org. Geochem., Pergamon Press, 1971, p. 427–440.

32. Nissenbaum A., Kaplan I.R. Chemical and isotopic evidence for the in situ origin of marine humic substances. — Limnol. and Oceanol., 1972, 17, N 4, p. 570–582.
33. Nissenbaum A., Presley B.J., Kaplan I.R. Early diagenesis in Saanich Inlet, a reducing fjord. 1. — Geochim. et cosmochim. acta, 1972, 36, p. 1007.
34. Ohler D.Z., Schopf J.M., Kvenvolden K.A. Carbon isotopic studies of organic matter in Precambrian rocks. 1971, 175, p. 1246.
35. Pardue J.W., Scalan R.S., van Baalen Ch., Parker P.L. — Maximum carbon isotope fractionation in photosynthesis by blue-green algae and green algae. — Geochim. et cosmochim. acta, 1976, 40, p. 309.
36. Philip R.P., Calvin M. Kerogen structures in recently deposited algal mats at Laguna Mormona, Baja California: A model system for the determination of kerogen structures in ancient sediments. — In: Environmental geochemistry/Ed. Nriagu. Ann Arbor Sci., 1976, vol. 1, p. 131.
37. Raschid M.A., King L.H. Major oxygen-containing functional groups present in humic acid fractions isolated from contrasting marine environmental. — Geochim. et cosmochim. acta, 1970, 34, p. 193–202.
38. Rogers M.A., Koons C.B. Organic carbon  $\delta^{13}\text{C}$  values from Quaternary marine sequences in the Gulf of Mexico: A reflection of paleotemperature changes. — Trans. Gulf Coast Assoc. Geol. Soc., 1969, 19, p. 529–534.
39. Rogers M.A., Hinte J.E. van, Sugden J.G. Organic carbon  $\delta^{13}\text{C}$  values from Cretaceous, Tertiary and Quaternary marine sequence in the North Atlantic. — In: Initial Reports of Deep Sea Drilling Project. Wash.: U.S. Government Print. Office, 1972, v. 12, p. 1115.
40. Sackett W.M. Carbon isotope composition of natural methane occurrences. — Bull. Amer. Assoc. Petrol. Geol., 1968, 52, N 5, p. 853.
41. Sackett W.M., Chang H.M. Experimental confirmation of the lack of carbon isotope exchange between methane and carbon oxides at high temperature. — Geochim. et cosmochim. acta, 1979, 43, p. 273–276.
42. Sackett W.M., Eckelman W.R., Bender M.L., Be A.W.H. Temperature dependence of carbon isotope composition in marine plankton and sediments. — Science, 1965, 148, p. 235–237.
43. Sackett W.M., Rankin J.G. — J. Geophys. Res., 1970, 75, p. 4557.
44. Schitzer M., Neyroud J.A. Alkanes and fatty acids in humic substances. — Fuel, 1975, 54, p. 17–19.
45. Smith B.N., Hearth H.M.W., Chase J.B. Effects of growth temperature on carbon isotope ratios in barley, pea and rape. — Plant. Cell. Physiol., 1973, 14, p. 177–182.
46. Stahl W. Zur Herkunft nordwestdeutscher Erdgase. — Erdöl und Kohle — Erdgas — Petrochem., 1968, 21, N 9.
47. Stevenson F.J., Goh K.M. Infrared spectra of humic acids and related substances. — Geochim. et cosmochim. acta, 1971, 35, N 5, p. 471.
48. Teichmüller R., Teichmüller M., Colombo U. et al. Das Kohlenstoff – Isotopen – Verhältnis in Methan von Grobengas und Flößgas und seine Abhängigkeit von den geologischen Verhältnissen. — Geologische Mitteilungen. — Ztschr. allg. region. und angew. Geol., 1970, N 9, S. 181–206.
49. Troughton J.H., Card K.A. Temperature effects on carbon isotope ratios of C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> and crassulacean – acid – metabolism (CAM) plants. — Planta, 1975, 123, p. 185–190.
50. Welte D.H., Hageman H.W., Hollerbach A. et al. World Petr. Congr. Tokyo, PD3, topic 5, 1975, May.
51. Whelan T.W., Sackett M., Benedict C.R. Enzymatic fractionation of carbon isotopes by phosphoenolpyruvate carboxylase from C<sub>4</sub>-plants. — Plant Physiol., 1973, 51, p. 1051–1054.

## Глава XII

### ТЕРМОДИНАМИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ЖИВОГО

Совместимо ли термодинамически упорядоченное распределение изотопов в биосистемах с представлением об их существенно неравновесном составе и строении?

Некоторые исследователи (см. [1]) высказывали сомнения в равновесной природе наблюдаемых изотопных эффектов, исходя из следующего соображения. Изотопное равновесие устанавливается позже химического. Поэтому термодинамические изотопные эффекты могут иметь место лишь в химически равновесных системах. Предположение же о химическом равновесии абсурдно применительно к живым системам.

Такое рассуждение, однако, содержит существенную неточность. Правило, в соответствии с которым изотопное равновесие наступает после химического равновесия, относится лишь к химической реакции, обеспечивающей изотопный обмен, а не к равновесию системы вообще. Возьмем, к примеру, систему, состоящую из ацетона и воды. При нормальных условиях эти вещества не реагируют между собой с образованием других, более устойчивых продуктов. Между тем, если одно из них будет дейтерированым, то через некоторое время установится равновесное распределение дейтерия в обоих соединениях. Реакцией, обеспечивающей изотопное равновесие в данном случае, является обмен между водородом воды и гидроксила энольной формы ацетона, сопряженный с кето-энольной тautомерией ацетона.

Лишь равновесие этой последней реакции, а не элементарное равновесие в системе ацетон–вода, является условием равновесия изотопного обмена. Применительно к биосистемам это означает, что равновесие процесса селекции изотопных форм в фермент-субстратном комплексе не требует элементного равновесия биомолекул.

Сказанное определяет ответ на вопрос, поставленный в начале главы. Но корень вопроса глубже. Проявление термодинамически упорядоченного распределения изотопов в биосистемах подчеркивает, как нам кажется, тот факт, что принятая трактовка биологических систем, исключительно как неравновесных, не исчерпывает проблемы термодинамического состояния живого. Здесь хотелось бы привести некоторые соображения в этой связи.

Существенным свойством биологических систем является то, что химические реакции в них управляются катализаторами – ферментами.

Катализатор лишь во вторую очередь влияет на скорость реакций – ускоряя одни реакции и замедляя другие. Прежде всего роль катализатора состоит в том, что, взаимодействуя с силовым полем атомов реагирующих молекул, он определяет путь перехода системы в одно из более устойчивых состояний. Присутствие катализатора изменяет рельеф потенциальной поверхности, характеризующей взаимодействия в системе. В этом смысле катализ является частным случаем проявления силовых полей в системе. Последние могут быть разнообразны по своей природе, начиная

от внешних полей и кончая взаимодействием между атомами самих соединений, образующих систему. Ориентирующее действие зародыша в процессе кристаллизации или роль матрицы при воспроизведении копий в процессе репликации также можно рассматривать как проявление катализа в широком смысле. Короче говоря, присутствие катализатора означает присутствие некоторого специфического (определенного свойствами катализатора) взаимодействия в системе. Любое взаимодействие, в сущности, представляет инструкцию о том, как должен осуществляться процесс перехода из одного энергетического состояния в другое.

Наличие взаимодействий предопределяет известную степень упорядочения системы. Представление о том, что полностью разупорядоченное хаотическое распределение частиц является наиболее вероятным, т.е. отвечает максимуму энтропии, справедливо лишь при отсутствии силовых полей. Физическое состояние системы определяется конкуренцией взаимодействий и теплового движения. Чем ниже температура, тем существеннее роль взаимодействий. При температуре абсолютного нуля энтропия равна нулю. Система полностью упорядочена в том смысле, что ее состояние определяется только наличием взаимодействий.

Упорядоченные, в том числе высокоупорядоченные системы, могут быть равновесными. Скажем, распределение металлических частиц в магнитном поле может образовать прихотливый узор в соответствии с направлениями силовых линий поля. Это распределение будет равновесным для данных условий; хотя и достаточно высоко упорядоченным. То же самое справедливо и для химических систем. Поэтому совсем не обязательно представлять дело так, что в состоянии равновесия элементы, составляющие живое вещество, должны образовывать простые соединения, вроде  $\text{CH}_4$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  и т.п. Сложные многоатомные соединения, присущие живому, в принципе могут представлять равновесные композиции при той структуре взаимодействий, которая обеспечивается набором действующих в биологических системах катализаторов.

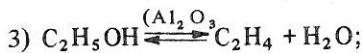
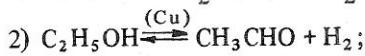
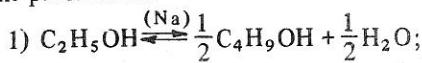
Необходимо подчеркнуть, что особенностью термодинамики является то, что она абстрагируется от понятия взаимодействий и рассматривает процесс так, как будто бы взаимодействий не существует, т.е. подсистемы, образующие данную систему, ведут себя независимо. Иногда полагают, что идеализированное представление о независимости частиц, образующих систему, обусловлено использованием соответствующего уравнения состояния (уравнения состояния идеального газа) и что ограничения, связанные с этим, могут быть устранены с переходом к более сложным уравнениям состояния реального вещества. Однако это не так. Предположение о независимости подсистем и следовательно, аддитивности энергий носит гораздо более фундаментальный характер. Оно, наряду с требованием максимума термодинамической вероятности, является отправным при получении выражения для статсумм, через которую представляются все термодинамические функции. Если частицы, имеющие энергии  $\epsilon_1$  и  $\epsilon_2$ , взаимодействуют, то их общая энергия уже не равна просто сумме  $\epsilon_1 + \epsilon_2$ . Она отличается от нее на некоторую величину  $\epsilon_{12}$ , которая в

общем случае зависит от координат и скоростей частиц. В курсах статистической механики подчеркивается, что "фактически получение ценных результатов возможно только в том случае, когда состояния и движения сложной материальной системы можно разложить на состояния и движения почти независимых систем" (с. 16 [5]).

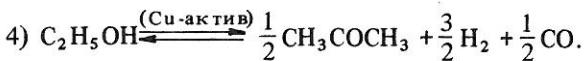
Если термодинамика, тем не менее, рассматривает реальные взаимодействующие системы, то это связано с допущениями, границы которых должны быть ясно осознаны. Энергию взаимодействия с консервативными полями можно представить как некоторую потенциальную функцию, зависящую только от координат, и приплюсовать ее к энергии каждой подсистемы. Тогда энергии  $\epsilon_i$  можно суммировать. В выражение для статсуммы войдет так называемый конфигурационный интеграл, содержащий соответствующую потенциальную функцию. В результате можно описать равновесное распределение частиц, например, в магнитном или гравитационном поле. Подбирая определенным образом вид потенциальной функции, можно описать в "консервативном" приближении состояние реальных газов и жидкостей. В химической реакции взаимодействия атомов между собой имеет характер взаимодействий с неконсервативным полем, т.е. полем, зависящим от времени. Однако если наблюдать атом достаточно долго, так чтобы он за это время многократно входил в различные взаимодействия, то энергии его взаимодействий можно усреднить. Тогда величина  $\epsilon_i$  будет содержать член, определяемый взаимодействием, но не зависящий от времени (усредненный по времени), т.е. величина  $\epsilon_i$  приобретает свойство аддитивности. Длительность времени, по прошествии которого  $\epsilon_i$  можно суммировать в консервативном приближении, зависит от характера взаимодействий. Это время представляет собой фактически время установления равновесия в системе взаимодействующих частиц.

В масштабе времени установления равновесия соответствующие химические соединения можно рассматривать как свободно взаимопревращающиеся, а атомы в направлении реакции можно рассматривать как независимые частицы. В частном случае перегруппировка атомов может совершаться в каком-либо определенном направлении более свободно, чем в других. Эта ситуация будет отвечать равновесию определенной химической реакции.

Катализатор в общем случае и представляет собой такой источник взаимодействий, который обеспечивает равновесное, но не вообще, а определенных реакций. Например, если исходным соединением является этиловый спирт, то используя разные катализаторы, можно получить следующие равновесия<sup>1</sup>.



<sup>1</sup>Практически указанные реакции проводятся при несколько различных температурах. Но в данном контексте это не имеет принципиального значения.



Если условие свободного взаимопревращения (независимости подсистем) выполнено, реакция может быть исследована методами равновесной термодинамики (определенны константы равновесия, соотношение компонентов), причем наличие или отсутствие катализатора в этом случае уже не оказывает влияния на результат.

Таким образом, чтобы практически воспользоваться термодинамическим методом, необходимо обособить в реальной системе такую ее часть или такую реакцию, в отношении которых было бы максимально оправдано указанное допущение о независимости подсистем. Рассматривать как целое системы, в отношении которых указанное условие не выполнено, также нецелесообразно, как нецелесообразно было бы рассматривать реакции между реактивами, заключенными в разные сосуды на лабораторном столе.

Именно таковыми представляются биологические системы, которые, будучи вполне обычными физико-химическими системами, отличаются тем, что взаимодействия в них столь существенны и столь специфичны, что эти системы практически невозможно "идеализировать" в удобном для применения термодинамического метода смысле.

"Тайна" высокой упорядоченности биологических систем и удивительной целесообразности функционирования живых организмов состоит не в какой-либо особенности их как физико-химических систем, а в выработанной эволюцией специфической структуре взаимодействий в системе. Чрезвычайно важно, что сама эта структура не является продуктом развития данной физико-химической системы. Инструкцию о том, какие ферменты должны возникнуть и какими реакциями они должны управлять, несет информационная система, включающая ДНК и транскрибирующие ферменты, которая передается организму в зиготе при рождении. Химическое же содержание развития организма в онтогенезе представляется процессом установления равновесия в заданном инструкцией "силовом поле".

В течение жизни организма в высокую степень упорядочения вовлекается масса вещества (из окружающей среды), находившаяся ранее на более низком уровне организации – энтропия системы уменьшается. Существует точка зрения, что это происходит за счет извлечения из окружающей среды низкоэнтропийной материи. Э. Шредингер писал: "... живой организм непрерывно увеличивает свою энтропию, или, иначе, производит положительную энтропию и, таким образом, приближается к опасному состоянию максимальной энтропии, представляющему собой смерть. Он может избежать этого состояния, т.е. оставаться живым только постоянно извлекая из окружающей его среды отрицательную энтропию... В самом деле, у высших животных им достаточно хорошо знаем вид упорядоченности, которым они питаются, а именно: крайне хорошо упорядоченное состояние материи в более или менее сложных органических соединениях служит им пищей. После использования животные возвращают эти вещества в очень деградированной форме, однако не впол-

не деградированной, так как их еще могут употреблять растения” [6, с. 121]. Ленинджер в своей “Биохимии” [2] развивает этот подход применительно не только к организму в целом, но и к отдельным биомолекулам. Он пишет: “Вывод, согласно которому нативная, биологически активная конформация полипептидной цепи является, по-видимому, наиболее устойчивой конформацией, может показаться парадоксальным и несовместимым с законами термодинамики, действующими в “неживых” системах. Системы с высокой степенью упорядоченности характеризуются по определению сравнительно низкой энтропией. Поэтому может показаться странным, что при  $pH = 7,0$  развернутая (свернутая в беспорядочный клубок) полипептидная цепь, не обладающая биологической активностью и характеризующаяся сравнительно высокой энтропией, может самопроизвольно образовать более упорядоченную структуру со специфической биологической активностью, т.е. систему с меньшей энтропией. Но это лишь кажущийся парадокс. Мы можем разрешить его, вспомнив, что согласно второму закону термодинамики, при равновесии сумма энтропий системы (полипептидная цепь) и окружающей среды (водный раствор) становится максимальной. Этот закон вполне допускает самопроизвольное уменьшение энтропии неизолированной системы, какой является полипептидная цепь, при условии, что энтропия окружающей среды, т.е. водного раствора, одновременно возрастает...” (с. 852).

Это – справедливо. Но неизолированность системы – лишь условие, а не причина. Остается открытym вопрос, в силу каких свойств биологических систем отрицательная энтропия устремляется именно в сторону организма.

Уменьшение энтропии в определенной части системы возможно в том случае, если это отвечает меньшему уровню ее свободной энергии. Примером может служить процесс кристаллизации. Энтропия кристаллической фазы ниже, чем энтропия исходной жидкости. Процесс кристаллизации сопровождается возрастанием упорядоченности и понижением энтропии. Этот процесс возможен, поскольку кристаллическому состоянию отвечает меньший уровень свободной энергии системы. Для того чтобы такой процесс мог осуществиться, система должна передать избыток внутренней энергии в окружающую среду (термостат), т.е. система должна быть незамкнутой (энтропия в изолированной системе уменьшаться не может). На наш взгляд, уменьшение энтропии при преобразовании неживого вещества в живое, так же как и в других природных процессах, со пряжено с минимизацией свободной энергии системы. Важно, однако заметить, что подобный процесс, связанный с уменьшением энтропии в незамкнутой системе, ведет к равновесию, ибо минимум свободной энергии отвечает состоянию равновесия. Когда же говорят о том, что организм “питается отрицательной энтропией”, имеют в виду, напротив, что таким способом система удаляется от равновесия.

Равновесие в течение жизни организма действительно не достигается, но это происходит по той причине, что управляющие синтезом биомолекул ферменты, в свою очередь, являются продуктом биосинтеза. Это порождает метаболизм.

Здесь нужно указать на то, что уникальным тестом термодинамического состояния биологических систем может служить соотношение изотопных составов биомолекул. Дело в том, прежде всего, что изотопный состав представляет собой **отношение** содержания изотопных форм. Соответственно термодинамическая величина, характеризующая изотопные свойства соединения, представляет отношение статсумм соответствующих изотопных форм ( $\beta$ -фактор). Далее, существенно важно, что силовое поле молекул не изменяется при изотопном замещении. Изотопные формы молекулы характеризуются одинаковым набором силовых постоянных. Соответственно силовое поле, в котором происходит превращение изотопных молекул в процессе катализа, неразличимо. Фракционирование изотопов происходит не потому, что различны силовые поля молекул, а потому, что различно поведение частиц (атомов) разной массы в одном и том же силовом поле. Это значит, что конфигурационные интегралы, характеризующие взаимодействия, в которых участвуют изотопные формы (по крайней мере в консервативном приближении), одинаковы и сокращаются в выражении для  $\beta$ -фактора. Поэтому в информационных молекулах не может быть заложено никакой инструкции относительно отбора тех или иных изотопных форм молекул. Изотопный состав биомолекул не может кодироваться. Нет изотопно-специфических ферментов.

Следовательно, та специфическая структура взаимодействий, которая инструктирует элементарное распределение в биологических системах и делает непременным в отношении них принцип независимости подсистем, не распространяется на изотопное распределение. Поэтому, если стремление к равновесию является существенной чертой биологического процесса, оно должно проявиться в тенденции к равновесному распределению изотопов. Наблюдаемое термодинамически упорядоченное распределение изотопов как раз отражает эту тенденцию.

Таким образом биологические системы не относятся к какому-то особому классу систем "избегающих равновесия" или находящихся в отличие от других природных систем на особой энтропийной диете ("питающихся негэнтропией"). Упорядочение биологических систем не является результатом собственно биологического процесса, а обусловлено взаимодействиями, инструкция о которых передается организму в зародыше. Биологический процесс идет в сторону уменьшения свободной энергии системы. Принципиально развитие организма в онтогенезе не отличается от других естественных процессов, например, процесса кристаллизации. Только "зародыш" в этом случае несравненно более сложен.

Упомянутая выше проблема энтропии имеет два аспекта. Один состоит в том, чтобы примирить со вторым законом термодинамики высокую упорядоченность организма как химической системы. Другой — в том, чтобы согласовать биологический эволюционный принцип с термодинамическим эволюционным принципом, т.е. согласовать появление в ходе эволюции все более высокоорганизованных форм жизни с утверждением термодинамики об общей направленности процессов в сторону разупорядочивания систем.

Если низкоэнтропийность организма, приобретаемая в онтогенезе, обусловлена внесенным извне элементом порядка (ДНК), то эволюция самой информационной молекулы от начала зарождения жизни через все более высокие ступени филогенетической организации, является истинно спонтанным процессом. Соответственно проблема энтропии имеет разный смысл в этих двух случаях.

"Общеизвестно, как трудно дать определение живого", — приведя эти слова Ф. Крика, М. Эйген поясняет: "потому что переход между живым и неживым не резкий". И далее: "обращаясь к этому этапу (моменту перехода от неживого к живому, Э.Г.) мы должны начать с систем, которые заведомо не являются "живыми" (например, минералы), а кончить такими, из которых по крайней мере в результате развития может получиться то, что мы определенно называем "живым": бактериальные клетки, растения, животные" (с. 26, [7]). М.Эйген, таким образом, говорит об интуитивной способности отличать живое от неживого, точно так же как Э.Шредингер, который писал: "Когда мы считаем материю живой? Тогда, когда она продолжает "делать что-либо", двигаться, участвовать в обмене веществ с окружающей средой и т.д., — все это в течение более длительного времени, чем по нашим ожиданиям, могла бы делать неодушевленная материя в подобных условиях" (с. 72, [6]).

Сущность жизни почти всегда пытаются определить через свойство живого. Но ясно, что если физико-химическое содержание биологического развития клетки или организма представляет вполне тривиальный процесс, наподобие кристаллизации, то определение жизни следует искать в понятиях другой категории.

Организм следует отнести к классу сущностей, построенных в соответствии с инструкцией. В этот класс войдут также устройства и механизмы, изготовленные человеком. Между ними нет принципиальной разницы. В обоих случаях имеет место упорядочение материи. В обоих случаях это упорядочение производится по плану, заданному извне. Организм — материальное образование, созданное из элементов внешней среды на основе инструкции, носителем которой является информационная молекула. Точно так же в техническом устройстве реализуется план человека, задумавшего его и управляющего его созданием. Информационная молекула организует пространство на атомном уровне. Человек организует материю на макроскопическом уровне. Обстоятельство, которое создает видимое отличие организмов от искусственных устройств и позволяет интуитивно их различать, состоит в том, что мы воспринимаем организм всегда в единстве с его молекулярным информационным механизмом, в то время как искусственные устройства пространственно отделены от человека, играющего по отношению к ним роль носителя инструкции.

Если сущность жизни невозможно адекватно определить через свойства организма, то, очевидно, ее главное содержание как-то связано с эволюцией самой инструкции. Это, следовательно, — тип эволюции материи. Но известен единственный закон эволюции материи, выражаемый вторым законом термодинамики. В соответствии с ним эволюция материи состоит в ее разупорядочении и увеличении энтропии. Существенно, одна-

ко, что второй закон термодинамики имеет статистическую природу. Он указывает направление процесса с большой вероятностью, но не детерминировано. Всегда остается некоторая вероятность совершения процесса против общего потока эволюции – отрицательная флуктуация энтропии. В отдельных частях системы или в отдельных подсистемах постоянно совершаются отрицательные флуктуации энтропии. Однако, будучи не связаны между собой, они подобны искрам – вспыхивают, чтобы тут же угаснуть. Но в принципе возможно накопление флуктуаций энтропии. Для этого необходимо, чтобы вероятность возникновения отрицательной флуктуации энтропии была выше в той подсистеме, которая испытала предшествующую отрицательную флуктуацию энтропии.

Механизм такого накопления известен, это – селекция. Общая идея отбора – как принципа биологической эволюции, принадлежит Ч. Дарвину. В книге А.И. Опарина 1924 г. [3] мы встречаем впервые идею естественного отбора на молекулярном уровне. Она была развита М. Эйгеном [7].

Очевидно, что эволюция инструкции должна осуществляться посредством организации элементов среды. Отбор включает производство копий и испытание устойчивости подсистемы в данных условиях. Совокупность физико-химических процессов, совершающихся при этом, т.е. процессов, сопровождающих развитие живых существ, находится, как уже подчеркивалось, в полном согласии со вторым законом термодинамики. Физический смысл отрицательной флуктуации энтропии сводится к такому самопроизвольному изменению инструктирующей молекулы, которое проявляется в селективных преимуществах ее производных. Последние могут иметь уровень молекул, клеток, организмов или сообществ. Вытеснение ими производных прежнего варианта информационной молекулы предопределяет возникновение новой отрицательной флуктуации энтропии в подсистеме, которая утвердила в результате предшествующей флуктуации.

Таким образом, жизнь, определяемая как тип эволюции материи, состоящей в накоплении отрицательных флуктуаций энтропии, находится в особом соотношении со вторым законом термодинамики. Она не противоречит, но и не тождествена ему. Жизнь можно рассматривать как тип эволюции материи, по своей сути комплементарной второму закону термодинамики. Жизнь является следствием его неабсолютного детерминизма (статистического характера), допускающего маловероятные отклонения от основного направления эволюции материи, которые однако могут накапливаться посредством отбора, обусловливая линию эволюции материи, противоположную основному направлению ее движения в сторону разупорядочения.

Понятие жизни отсюда должно занимать следующее место в иерархии фундаментальных понятий. Это – не способ существования, не форма организации, не свойство и не способность. Это – тип эволюции материи, т.е. понятие высшей степени общности. Как возможность, жизнь присуща всем пространствам и временам.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Галимов Э.М. О концепции термодинамического распределения изотопов в биологических системах и ошибках, связанных с ее пониманием. Геохимия, 1978, № 10.
2. Ленинджер А. Биохимия. М.: Мир, 1974.
3. Опарин А.И. Происхождение жизни. М.: Московский рабочий, 1924.
4. Опарин А.И. Жизнь, ее природа происхождения и развитие. М.: Наука, 1968.
5. Фаулер Р., Гугенгейм Э. Статистическая термодинамика. М.: Изд-во иностр. лит., 1949.
6. Шредингер Э. Что такое жизнь с точки зрения физика. М.: Атомиздат, 1973.
7. Эйген М. Самоорганизация материи и эволюция биологических макромолекул. М.: Мир, 1973.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие . . . . .	3
Введение . . . . .	6
<i>Глава I</i>	
Причины фракционирования изотопов . . . . .	11
Основные понятия . . . . .	11
Изотопный состав . . . . .	11
Изотопные эффекты . . . . .	12
Измеряемые величины . . . . .	12
Кинетический изотопный эффект . . . . .	14
Термодинамический изотопный эффект . . . . .	16
Ядерно-спиновый изотопный эффект . . . . .	20
Систематика изотопных эффектов . . . . .	21
Литература . . . . .	24
<i>Глава II</i>	
Изотопный состав углерода . . . . .	24
Фракционирование изотопов в системе организм – среда . . . . .	25
Геохимическая шкала . . . . .	26
Высшие и низшие растения . . . . .	27
Возраст растений . . . . .	27
Растения C <sub>3</sub> - и C <sub>4</sub> -типов . . . . .	28
Автотрофы и гетеротрофы . . . . .	29
Наземные и водные растения . . . . .	30
Пресноводные и морские растения . . . . .	32
Роль температуры . . . . .	32
Изотопный состав биохимических компонентов . . . . .	33
Липиды . . . . .	33
Белки . . . . .	34
Углеводы . . . . .	36
Лигнин . . . . .	37
Респирируемая углекислота . . . . .	38
Попытки объяснить биологическое фракционирование изотопов . . . . .	39
Литература . . . . .	43
<i>Глава III</i>	
Метод оценки термодинамических изотопных факторов многоатомных соединений . . . . .	46
Внутримолекулярные и межмолекулярные термодинамические изотопные эффекты. Соотношение между величинами $\beta_i$ и $\beta_{\Sigma}$ . . . . .	47
Спектральный метод расчета $\beta_i$ -факторов . . . . .	53
Принцип аддитивной оценки $\beta$ -фактора . . . . .	56

Изотопические числа связей углерода . . . . .	59
Изотопические числа связей $L_{C-H}$ и $L_{C-C}$ . . . . .	60
Изотопические числа $L_{C-O}$ и $L_{C=O}$ . . . . .	62
Изотопическое число связи $L_{C=C}$ и ароматические соединения . . . . .	63
Изотопическое число связи $L_{C\equiv C}$ . . . . .	65
Изотопические числа связей $L_{C-N}$ и $L_{C\equiv N}$ . . . . .	66
Изотопические числа связей $L_{C-F}$ , $L_{C-Cl}$ , $L_{C-Br}$ , $L_{C-J}$ . . . . .	66
Изотопическое число связи $L_{C=S}$ . . . . .	69
Изотопическое число связи $L_{C=N}$ . . . . .	69
Точность аддитивного метода . . . . .	70
Погрешность оценок изотопических чисел связей . . . . .	70
Статистический анализ расхождений между $\beta_i^{13}C$ -спектр и $\beta_i^{13}C$ Саддит . . . . .	71
Погрешность определения $\beta\Sigma$ -факторов . . . . .	78
Изотопические числа связей азота . . . . .	79
Изотопические числа связей кислорода . . . . .	81
Некоторые закономерности, характеризующие изотопические числа связей . . . . .	82
Другие аддитивные методы . . . . .	84
Температурная зависимость термодинамических изотопных факторов . . . . .	89
Литература . . . . .	90

#### Глава IV

Экспериментальные свидетельства термодинамически упорядоченного распределения изотопов в биологических системах . . . . .	92
Распределение изотопов между индивидуальными аминокислотами . . . . .	92
Внутримолекулярное распределение изотопов в аминокислотах . . . . .	97
Распределение изотопов углерода в компонентах липидной фракции . . . . .	100
Внутримолекулярное распределение изотопов в ацетате . . . . .	106
Внутримолекулярное распределение изотопов в ароматических мономерах лигнина . . . . .	110
Изотопный состав углерода фитола и порфиринового ядра хлорофилла . . . . .	113
Изотопный состав фрагментов молекулы гемина . . . . .	113
Внутримолекулярные изотопные эффекты в других биогенных соединениях . . . . .	116
Литература . . . . .	118

#### Глава V

Теоретическая модель биологического фракционирования изотопов . . . . .	119
Механизм возникновения термодинамического изотопного эффекта при ферментативном катализе . . . . .	119
Фракционирование изотопов в ферментной реакции . . . . .	125
Изотопный эффект переноса . . . . .	131
Замечание к методике кинетического анализа ферментативных реакций . . . . .	134
Фракционирование изотопов при изменяющихся объемах субстрата и продукта . . . . .	136
Модель фракционирования изотопов в метаболически связанный системе ферментных реакций . . . . .	138
Литература . . . . .	143

#### Глава VI

Объяснение закономерностей биологического распределения изотопов в рамках предложенной теории . . . . .	144
Корреляция $\delta^{13}C - \beta\Sigma^{13}C$ . . . . .	144

Внутримолекулярное термодинамически упорядоченное распределение изотопов . . . . .	147
Случаи отсутствия термодинамически упорядоченного распределения изотопов . . . . .	152
Литература . . . . .	155
<i>Глава VII</i>	
Интерпретация результатов некоторых биохимических экспериментов . . . . .	155
Ферментативное декарбоксилирование пирувата . . . . .	155
Микробиологическое окисление этанола до уксусной кислоты . . . . .	162
Литература . . . . .	166
<i>Глава VIII</i>	
Фракционирование изотопов в биологических циклах . . . . .	166
Цикл Кальвина . . . . .	166
C <sub>3</sub> -растения . . . . .	166
Энзиматическое карбоксилирование рибулозидифосфата <i>in vitro</i> . . . . .	167
Теоретический анализ фракционирования изотопов в цикле Кальвина . . . . .	170
Цикл Хетч-Слека . . . . .	174
Изотопный состав углерода C <sub>4</sub> -растений и суккулентов . . . . .	175
Фракционирование изотопов в процессе энзиматического карбоксилирования фосфоенолпирувата <i>in vitro</i> . . . . .	177
Причины различия изотопного состава углерода C <sub>3</sub> - и C <sub>4</sub> -растений . . . . .	179
Цикл Кребса . . . . .	181
Литература . . . . .	185
<i>Глава IX</i>	
Биологическое фракционирование изотопов кислорода <sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O биологического кислорода . . . . .	188
Природа изотопных эффектов кислорода в биологических системах . . . . .	191
Литература . . . . .	194
<i>Глава X</i>	
Новые изотопные критерии при решении проблем генезиса органических соединений в природе . . . . .	195
Экспериментальное исследование внутримолекулярного распределения изотопов в абиогенных аналогах некоторых биогенных соединений . . . . .	195
Термодинамические изотопные эффекты в небиологических системах . . . . .	198
Изотопные критерии для распознавания биогенных и абиогенных соединений . . . . .	200
Распределение изотопов в продуктах реакции Фишера-Тропша . . . . .	203
Распределение изотопов в продуктах синтеза в электрическом разряде . . . . .	204
Изотопный состав углеродистых компонентов углистых хондридов . . . . .	206
Литература . . . . .	209
<i>Глава XI</i>	
Проявление термодинамически упорядоченного распределения изотопов, свойственного биологическим объектам, в геологических условиях и практическое использование этого явления . . . . .	211
Химическое содержание процессов превращения живого вещества в исконаемые формы . . . . .	211
Проблема происхождения нефти . . . . .	219
Определение генезиса и источника углеводородов, формирующих данную газовую залежь . . . . .	222

Связь изотопного состава биогенного углерода с температурой среды . . . . .	225
Изменение изотопного состава органического углерода в ходе геологического времени. . . . .	227
Литература . . . . .	232
<i>Глава XII.</i>	
Термодинамическое состояние живого . . . . .	235
Литература . . . . .	243

**Эрик Михайлович Галимов**

**"ПРИРОДА БИОЛОГИЧЕСКОГО ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ ИЗОТОПОВ"**

*Утверждено к печати ордена Ленина Институтом геохимии и аналитической химии  
им. В.И. Вернадского АН СССР*

Редактор издательства *О.А. Харнас*. Художник *М.Р. Ибрагимов*

Художественный редактор *Т.И. Алексеева*. Технический редактор *А.Л. Шелудченко*  
Корректор *О.А. Разуменко*

ИБ № 21429

Подписано к печати 11.06.81. Т – 09036. Формат 60x90 1/16. Бумага офсетная № 1  
Печать офсетная. Усл.печ.л. 15,5. Уч.-изд.л. 17,2. Усл. кр.отт. 15,8. Тираж 850 экз. Тип. зак. 314.  
Цена 2р. 90к.

Издательство "Наука", 117864 ГСП-7, Москва В-485, Профсоюзная ул., д. 90  
Ордена Трудового Красного Знамени 1-я типография издательства "Наука",  
199034, Ленинград, В-34, 9-я линия, 12

**2 p. 90 k.**