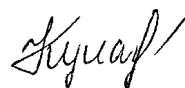


На правах рукописи

КУЛАГИНА Наталья Владимировна



**ФОРМИРОВАНИЕ ИЗОТОПНОГО СОСТАВА
ВОДОРОДСОДЕРЖАЩИХ ФРАГМЕНТОВ ЭТАНОЛА В
РЕАКЦИЯХ ХИМИЧЕСКОГО И БИОХИМИЧЕСКОГО СИНТЕЗА**

02.00.03. - органическая химия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Иркутск - 2004

Работа выполнена на кафедре аналитической химии химического факультета
Иркутского государственного университета

Научный руководитель: доктор химических наук
Сахабутдинов А. Г.

Научный консультант: доктор химических наук, профессор
Калабин Г. А.

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Медведева С.А.
кандидат химических наук, вед. науч.
сотр. Гаврилов Ю. Д.

Ведущая организация: Московский государственный
университет им. М. В. Ломоносова,
г. Москва

Защита состоится «15» декабря 2004 г. в 10 час. на заседании диссертационного совета Д 212.074.06 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата химических наук при Иркутском государственном университете по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 126, химический факультет ИГУ.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ИГУ.

Отзывы на автореферат высылать по адресу: 664003, г. Иркутск-3, ул. К. Маркса 1, учёному секретарю диссертационного совета Эдельштейн О.А.

Автореферат разослан «15» ноября 2004 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук, доцент



Эдельштейн О.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Природное распределение дейтерия в водородсодержащих фрагментах органических соединений существенно отличается от статистически ожидаемого и является достаточно характеристичным, чтобы судить о происхождении молекулы. Это нашло широкое применение в решении вопросов подлинности продукции в самых различных отраслях химии. Однако, сведения о механизме формирования изотопомерного состава органических молекул практически отсутствуют. Знание количественных закономерностей, управляющих процессом распределения природной метки позволит не только развить теоретические представления о химических реакциях, но и совершенствовать методы аутентификации и дифференциации биохимической продукции.

В настоящее время к решению данной проблемы существует два подхода. В работах с естественным обогащением образцов констатируется факт нестатистического распределения минорного изотопа в молекуле органического вещества. Однако, в этих условиях субстрат и реагент имеют соизмеримое по величине изотопное обогащение, что существенно затрудняет оценку их роли в формировании изотопного состава продукта реакции. С другой стороны, попытки изучить механизм этих реакций с использованием изотопномеченых продуктов дают результаты, применение которых к интерпретации природного распределения затруднено вследствие проявления изотопных эффектов.

Перечисленные выше обстоятельства позволили сформулировать цели и задачи настоящего исследования.

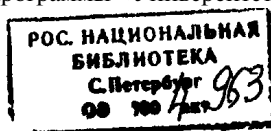
Целью диссертационной работы являлось:

- разработка количественной методики измерений природного содержания дейтерия в органических веществах, водных и водно-органических растворах методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса. Установление возможностей и ограничений методики в дифференциации органических молекул различного происхождения на примере этанола;

изучение методом меченых атомов (^2H , ^{13}C), механизма формирования природного водородного профиля молекулы этанола в модельных реакциях получения его синтетических и природных аналогов - сернокислотной гидратации этилена и ферментативного сбраживания глюкозы;

разработка подхода к интерпретации изотопного состава молекул, учитывающего различную степень обогащения образцов, и установление на его базе количественных соотношений между дейтеросодержанием субстратов, реагентов и продуктов реакции.

Диссертационная работа выполнена при финансовой поддержке НТП Министерства образования РФ «Научные исследования высшей школы по приоритетным направлениям науки и техники» на 2003-2004 г.г. (гранты № 203.05.07.040 и 204.01.02.014) и в рамках программы «Университеты России».



Научная новизна и практическая значимость.

Разработана методика количественного определения содержания дейтерия в молекулах органических веществ методом спектроскопии ЯМР ^2H . Применение методики позволяет проводить идентификацию этанолов различных технологий получения в компаундах широкого диапазона концентраций. Представлены количественные критерии дифференциации пищевых и синтетических этанолов, алгоритм идентификации вин с использованием компонентного и изотопного анализов.

Изучен механизм формирования водородного изотопного профиля этанола, полученного в реакции ферментативного сбраживания обычной и $[1-^{13}\text{C}]$ -меченой глюкозы в тяжелой воде. Установлен вклад структурных фрагментов глюкозы в изотопный состав продуктов биоконверсии - этанола и глицерина.

Впервые показано, что распределение дейтерия в молекуле этанола определяется изотопомерным составом воды, в которой проводилась ферментация углевода. Установлено, что НОН и НOD изотопомеры участвуют в формировании изотопного состава метильной и метиленовой групп спирта с определенным изотопным вкладом.

Предложены соотношения, позволяющие прогнозировать изотопный состав этанола, основываясь на знаниях о фрагментном распределении дейтерия в молекуле углевода и его содержанием в воде, как в экспериментах с изотопной меткой, так и на уровне природного обогащения среды. Это открывает путь решения обратной задачи - установление изотопных характеристик исходных веществ на основании изотопных данных для продуктов реакции.

Апробация работы. Отдельные разделы диссертации докладывались на II научно-практической конференции «Идентификация качества и безопасности алкогольной продукции» (Пушино, 2000); V Всероссийской научно-практической конференции «Метрологическое обеспечение сертификационных испытаний пищевой продукции» (Екатеринбург, 2001); I научно-практической конференции ГТЛ «Экспертно-исследовательская деятельность в таможенных целях» (Москва, 2001); Всероссийских научных чтениях (Улан-Удэ, 2002); VI Международном семинаре по магнитному резонансу (Ростов-на-Дону, 2002); EuroConference «Modern Analytical Methods for Food and Beverage Authentication» (Lednice, Czech Republic, 2002); научно-технической конференции «Технологии живых систем» (Москва, 2003); XVII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Казань, 2003).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 4 статьи, 11 тезисов докладов.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка литературы. Работа изложена на 125 страницах машинописного текста и содержит 28 таблиц, 14 рисунков, 4 схемы. Список литературы включает 124 наименования.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА I. Обзор литературы

Обзор литературы посвящен вопросам формирования природного изотопного состава органических молекул. Представлены особенности изотопных методов анализа при работе с природной изотопной меткой. Подробно рассмотрен механизм ферментативного сбраживания глюкозы с точки зрения процессов водородного обмена, формирующих изотопный состав молекулы этанола. На примере водно-этанольных композиций обсуждается информативность изотопных характеристик для их идентификации. Показано, что совокупность экспериментальных фактов не удастся объяснить с единой позиции.

ГЛАВА II. Количественные аспекты спектроскопии ЯМР ^2H в анализе изотопного состава органических веществ, водных и водно-органических растворов

2.1 Методика количественного определения содержания дейтерия

Разработана методика количественного определения содержания дейтерия в водородсодержащих структурных фрагментах молекул жидких или растворенных индивидуальных веществ и их смесей методом спектроскопии ЯМР ^2H в сильных магнитных полях (>6Т) без использования стабилизации резонансного условия (отношение частота/поле).

Проведена оценка метрологических характеристик методики: в условиях природного обогащения образцов изотопом ^2H (диапазон концентраций 40–200 ррт) относительная погрешность измерений содержания дейтерия не превышает 2 %. В условиях искусственного обогащения погрешность ниже.

Область применения методики - измерение природного фракционирования водорода в органических молекулах, изучение механизмов химических реакций, доказательство или опровержение аутентичности веществ по дифференциальному и интегральному содержанию в них изотопов водорода, мониторинг технологических процессов переработки природного сырья, определение сырьевого и географического происхождения индивидуальных веществ.

Методика аттестована Госстандартом РФ (№ 105-05-99), код МВИ ФР.1.31.1999.00073.

2.2 Содержание изотопа ^2H , как маркер сырьевой природы этанола

Разработанная методика применена для изотопного анализа этанолов различного генезиса (спектрометр ЯМР VXR 500S с рабочей частотой для ядер ^2H 76.7 МГц и термостатированным датчиком для ампул диаметром 10 мм).

Установлено, что в процессе перегонки виноматериалов происходит значительное изменение изотопного состава водорода этильного фрагмента отогнанного спирта. Диапазон вариаций дейтерия во фракциях достигает 12ррт для CH_3 и 6 ррт для CH_2 групп, что в несколько раз превышает

погрешность измерений, т.е. неполная дистилляция этанола может вносить основную ошибку в результаты анализа. Реализована возможность регистрации спектров ЯМР ^2H водно-спиртовых смесей (>30% об. этанола) без предварительной дистилляции этанола в отсутствие стабилизации резонансного условия частота / поле.

Проведен анализ представительной серии (более 200 образцов) пищевых, синтетических и гидролизных этанолов (ПЭ, СЭ и ГЭ) и установлен диапазон вариаций природного содержания дейтерия в метильной и метиленовой группах (рис. 1).

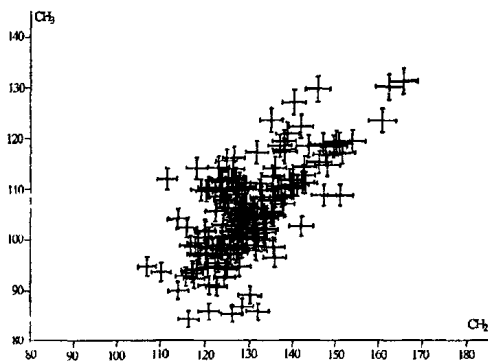


Рис. 1. Фрагментное распределение дейтерия в ПЭ, СЭ, ГЭ

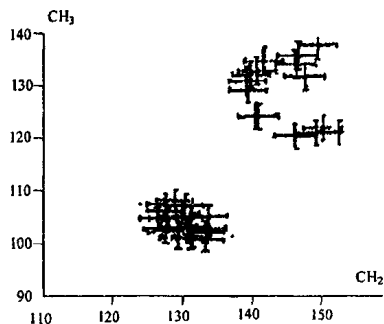


Рис. 2. Фрагментное распределение ^2H в ПЭ из зерна и СЭ

Исключение ПЭ из нетипичного для России сырья (кукуруза, сахарный тростник, ячмень) сформировало «нейтральную зону», разделяющую область ПЭ и СЭ (рис.2). Каждая охарактеризована предельными значениями содержаний ^2H :

СЭ: D/H CH_3 -группы >120 ppm; D/H CH_2 -группы > 140 ppm.
 ПЭ из зерна: D/H CH_3 -группы < 110 ppm; D/H CH_2 -группы < 135 ppm.

На модельных смесях ПЭ и СЭ, показано, что при концентрации компонентов в смеси не менее 20 % погрешность определения содержания этанолов различного сырьевого происхождения не превышает 4.5 %.

С учетом граничных значений областей зерновых ПЭ и СЭ возможно решение обратной задачи – установление сырьевого происхождения этанола по изотопным параметрам образца:

1. Этанол, изотопный состав которого соответствует «нейтральной зоне» (110÷120 ppm для CH_3 и 135÷140 ppm для CH_2 групп), является продуктом компаундирования ПЭ и СЭ. Зная фрагментное распределение ^2H для одного из компонентов, можно оценить соотношение ПЭ и СЭ в смеси.

2. Этанол с минимальными значениями (D/H) по обеим, или хотя бы по одной из координат (<130 ppm для CH_2 и/или <105 ppm для CH_3 группы)

практически всегда является ПЭ, с максимальными (>145 ррт для СН_2 и/или >125ррт для СНз группы) - СЭ.

3. Этанол с изотопными параметрами выделенных областей соответствует ПЭ (СЭ), но не исключает примесь СЭ (ПЭ) в количестве, определяемом изотопным составом последней.

Показано, что в силу особенностей изотопного состава ГЭ проблему его идентификации целесообразно решать как независимую, используя совокупность методов ЯМР ^1H , ^2H , ^{13}C , масс — спектрометрию изотопных отношений и ХМС.

На основе сочетания количественных методов спектроскопии ЯМР для компонентного и изотопного анализа разработан эффективный алгоритм идентификации водно-органических растворов (рис. 3), возможности которого проиллюстрированы на примере натуральных виноградных вин.

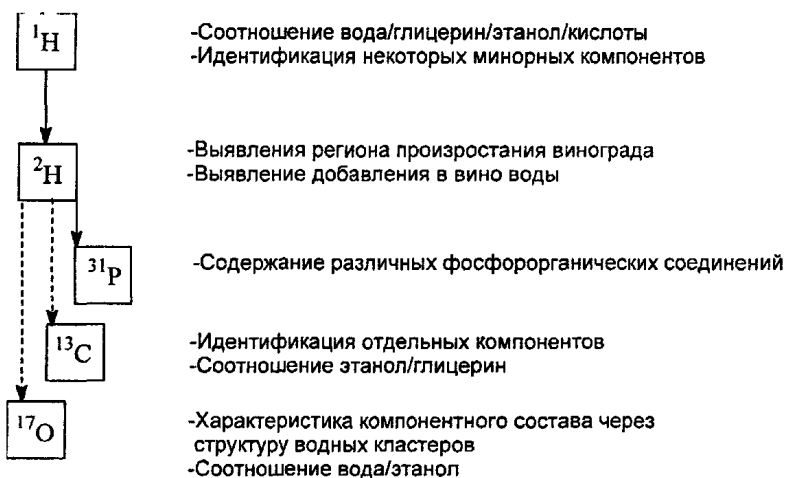


Рис. 3. Экспресс-алгоритм анализа подлинности вин

ГЛАВА III Формирование изотопного состава водородсодержащих фрагментов этанола в биохимических и химических реакциях

Для установления факторов, определяющих формирование природного изотопного профиля молекул этанола различного генезиса, методом меченых атомов (^2H , ^{13}C) изучены механизмы ферментативного сбраживания глюкозы и сернокислотной гидратации этилена, как модельных реакций получения этанола из растительного сырья и промышленного технического спирта, соответственно.

3.1 Реакция спиртового брожения глюкозы

Изучено влияние среды на формирование водородной периферии

молекулы этанола в процессе биоконверсии глюкозы. Методом количественной спектроскопии ЯМР ^2H и ^{13}C изучено фрагментное распределение дейтерия в спиртах, полученных ферментацией глюкозы в среде с различным содержанием D_2O .

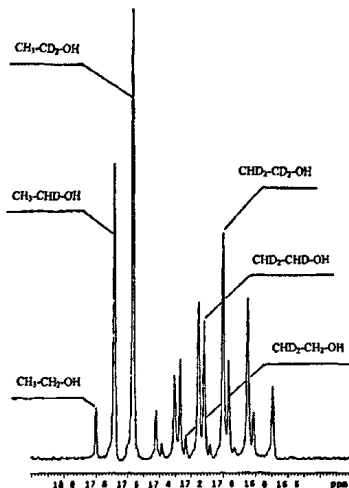


Рис.4 Подспектр d_0 и d_2 изотопомеров метильной группы спирта

Очевидно, при таком строении обмен между водой внутри комплекса и водной фазой вне его будет существенно ограничен. Таким образом, характер распределения дейтерия в молекуле этанола определяется, прежде всего, изотопомерной формой молекулы воды, вошедшей в такой комплекс.

Таблица 1. Изотопомерный состав этанола в зависимости от содержания дейтерия в воде

Изотопимер	Содержание дейтерия в воде, %					
	100	75	50	25	10	5
$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$	1.3	8.5	29.3	58.5	83.6	91.6
$\text{CH}_3\text{-CHD-OH}$	7.7	21.9	30.1	23.7	10.4	5.8
$\text{CH}_3\text{-CD}_2\text{-OH}$	11.5	12.8	7.7	2.4	0.4	-
$\text{CH}_2\text{D-CH}_2\text{-OH}$	2.6	8.2	11.6	9.3	4.9	2.6
$\text{CH}_2\text{D-CHD-OH}$	15.6	20.2	12.8	4.0	0.7	-
$\text{CH}_2\text{D-CD}_2\text{-OH}$	25.3	13.1	3.8	0.6	-	-
$\text{CHD}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$	2.0	3.1	1.9	0.7	-	-
$\text{CHD}_2\text{-CHD-OH}$	11.1	7.4	2.1	0.5	-	-
$\text{CHD}_2\text{-CD}_2\text{-OH}$	17.7	4.8	0.7	0.2	-	-
$\text{CD}_3\text{-CHD-OH}$	2.0	-	-	-	-	-

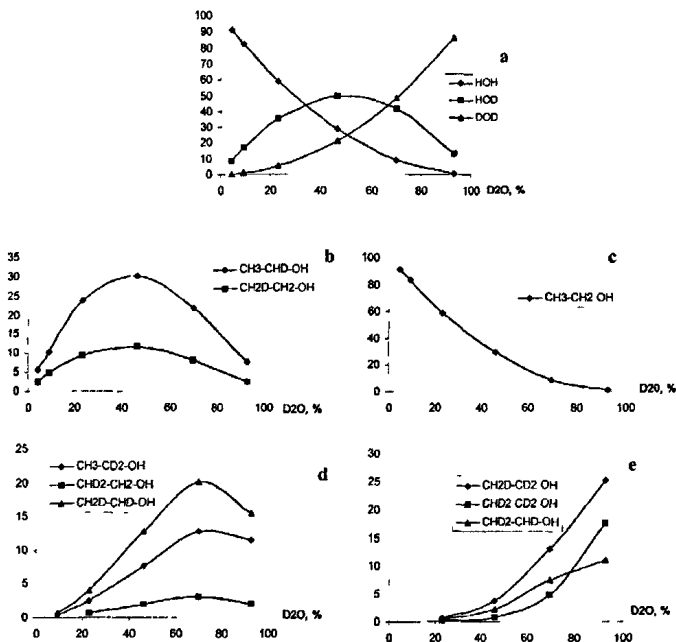
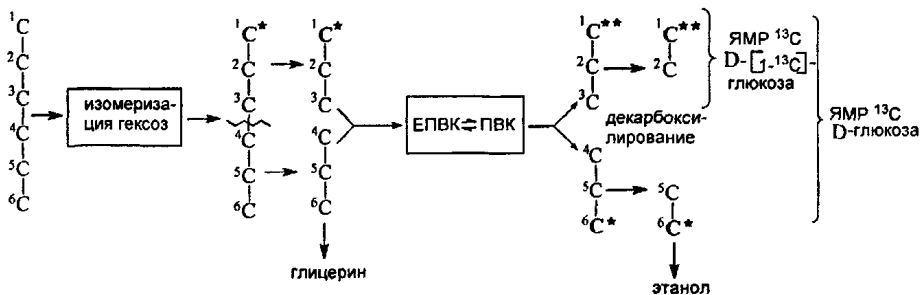


рис. 5 Процентное содержание изотопомерных форм воды (а) и этанола (b-e) в зависимости от содержания D₂O в среде.

Обнаружено, что относительное распределение дейтерия между CH₂ и группами этанола количественно связано не только с концентрационными изменениями D₂O, но достаточно очевидно синхронизируется с изменениями в изотопомерном составе воды.

Изучен вклад структурных фрагментов глюкозы в распределение дейтерия в этаноле. Ферментативное сбраживание D-[1-¹³C]- и обычной глюкозы в тяжелой воде позволило независимо оценить вклад C₁-C₃ и C₄-C₆ структурных фрагментов глюкозы в формирование водородной оболочки двух молекул спирта и глицерина, образующихся из одной молекулы углевода по схеме:



где * обозначен дейтерий, попадающий в продукты биоконверсии вследствие межмолекулярного водородного обмена со средой.

Согласно схеме, формирование изотопного состава метильных групп двух молекул спирта атомы глюкозы протекает в ходе двух стадий: кето-енольной перегруппировки фосфатных производных гексоз и синтеза пировиноградной кислоты (ПВК) из енол-пировиноградной кислоты (ЕПВК). Поскольку один из фрагментов глюкозы подвергается обоим превращениям, а второй (C₄-C₆) в обмен со средой вступает только на стадии синтеза ПВК, то в формировании метильной группы молекулы этанола фрагменты участвуют с различным изотопным вкладом. Эти различия закладываются на стадии кето-енольной перегруппировки гексоз, которая осуществляется как по внутри-, так и межмолекулярному механизму. Последний фактор определяет величину расхождения в обогащении метильных групп, образующихся из различных фрагментов глюкозы.

В табл. 2 представлено фрагментное распределение дейтерия (грамм-атомы) в молекулах этанола, образующихся из обычной и меченой глюкозы.

Таблица 2. Распределение дейтерия в молекулах спирта, формирующихся из различных фрагментов молекулы глюкозы (г.-а.)

Фрагмент		d ₁	d ₂	d ₃	d ₄	d ₅	дейтеро- содержание
ΣEt	C ₁ -C ₆	0.08	0.48	1.14	1.01	0.20	2.91
	C ₁ -C ₃	0.05	0.40	1.18	1.20	0.26	3.09
	C ₄ -C ₆	0.11	0.56	1.10	0.82	0.14	2.73
CH ₂	C ₁ -C ₆	0.33	1.18	-	-	-	1.51
	C ₁ -C ₃	0.35	1.17	-	-	-	1.52
	C ₄ -C ₆	0.31	1.19	-	-	-	1.50
CH ₃	C ₁ -C ₆	0.41	0.80	0.19	-	-	1.40
	C ₁ -C ₃	0.37	0.89	0.32	-	-	1.58
	C ₄ -C ₆	0.45	0.71	0.06	-	-	1.22

Содержание дейтерия в этаноле, полученном биоконверсией обычной глюкозы, отражает усредненный вклад всех изотопмеров d; двух молекул спирта, образующихся в ходе превращений как C₁-C₃, так и C₄-C₆ фрагментов глюкозы. Следовательно, суммарное содержание изотопа в обеих молекулах этанола составляет 2.91x2 = 5.82 г.-а. Эксперименты с меченой ¹³C глюкозой отражают изотопный состав этанола, полученного только из фрагмента. Таким образом, разность этих величин 5.82-3.09 = 2.73 г.-а. соответствует дейтеросодержанию спирта, образующегося из фрагмента C₄-C₆.

Этот же подход был использован для определения дейтеросодержания метильной и метиленовой групп спирта. Согласно представленным результатам на стадии кето-енольной перегруппировки между ЕПВК и ПВК дейтерирование метильной группы спирта, образующегося из C₄-C₆ фрагмента глюкозы, составляет 1.22 г.-а. Следовательно, такое же количество ²H на этой стадии

попадает в металлическую группу второй молекулы спирта. Тогда, в ходе кето-енольной перегруппировки между фосфатами глюкозы и фруктозы в металлическую группу этанола (C₁-C₃ фрагмент) из воды переходит 1.58-1.22=0.36 г.-а. дейтерия.

Показано, что изотопный состав спиртов, выделенных после ферментации различных углеводов - глюкозы и фруктозы в условиях одинакового обогащения среды, практически совпадает. Следовательно, фруктоза участвует в тех же обменных процессах, что и молекула глюкозы, накапливая при C\ атоме равное количество дейтерия. Принимая во внимание, что перегруппировка между ними протекает по двум механизмам - внутри- и межмолекулярному, очевидно, что равновесие между гексозами с привлечением механизма внутримолекулярного переноса протона устанавливается значительно быстрее, чем межмолекулярное перемещение, сопровождающееся обменом протона со средой.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при биоконверсии глюкозы из шести атомов водорода металлических групп двух молекул этанола по меньшей мере 2.80 г.-а. имеют водное происхождение.

Изотопмерный состав глицерина рассчитывался из спектра ЯМР ¹³C метиленовой группы молекулы, из которого также можно оценить изотопное окружение для соседней метиновой группы молекулы. Состав второго метиленового фрагмента глицерина не определен и обозначен как R. В табл. 3 представлены результаты ЯМР ¹³C спектрального анализа глицерина, полученного ферментацией обычной (а) и O-[1-¹³C]-глюкозы (б) в тяжелой воде.

Таблица 3. Изотопмерный состав глицерина, полученного ферментацией обычной и меченой глюкозы в тяжелой воде

глюкоза	Изотопмеры глицерина					
	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \\ \\ \text{CH} - \\ \\ \text{R} - \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \\ \\ \text{CD} - \\ \\ \text{R} - \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CHD} - \\ \\ \text{CH} - \\ \\ \text{R} - \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CHD} - \\ \\ \text{CD} - \\ \\ \text{R} - \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CD}_2 - \\ \\ \text{CH} - \\ \\ \text{R} - \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CD}_2 - \\ \\ \text{CD} - \\ \\ \text{R} - \end{array}$
а	19.2	45.7	9.5	20.4	2.2	3.0
б	12.8	29.7	10.8	17.3	11.0	18.5

При регистрации спектров меченого [1-¹³C]-глицерина установлен изотопмерный состав только C₁-C₂ углеродного фрагмента. Для обычного глицерина он представляет собой суперпозицию всех -CH₂-CH< фрагментов. (в табл. 3 представлен их усредненный изотопмерный состав). По результатам таблицы рассчитано фрагментное распределение дейтерия в молекуле глицерина:

D-[1-¹³C]-глюкоза: dch₂=0.40 г.-а.; dch=0.69г.-а.
D-глюкоза: dch₂=0.87 г.-а.; dch=0.66г.-а.

согласно которому дейтеросодержание при Q атоме глицерина составляет 0.40 г.-а. (эксперимент с меченой глюкозой). Эта величина соответствует количеству дейтерия, попадающему в молекулу фруктозы на стадии кетонольной перегруппировки фосфатов гексоз и хорошо согласуется с результатами, полученными для этанола.

Впервые проведена оценка глубины водородного обмена со средой водородсодержащих фрагментов при углеродных атомах глюкозы на стадии изомеризационного равновесия между триозами - диоксиацетоном и глицериновым альдегидом. В метиленовых группах глицерина при ферментации обычной глюкозы в тяжелой воде оказывается 0.87 г.-а. дейтерия, из них по $(2 \times 0.87 - 0.4) / 2 = 0.67$ г.-а. приходится на группы при углеродных атомах. Таким образом, по меньшей мере, 33 % атомов водорода в этих группах принадлежат водной среде.

Метиновая группа глицерина, изотопный состав которой формируется на стадии восстановления диоксиацетона под действием молекулы НАДН, содержит в среднем 0.68 г.-а. дейтерия. Последняя, не вступая в какие-либо обменные процессы со средой, участвует также в восстановлении ацетальдегида до этанола. Тогда, по аналогии с молекулой глицерина в метиленовую группу спирта поступает на этой стадии 0.68 г.-а. дейтерия. Поскольку суммарное содержание дейтерия в ней составляет 1.51 г.-а. (табл. 2.), остальные 0.83 г.-а. поступают на стадии декарбоксилирования ПВК.

Изучено влияние изотопмерных форм воды на распределение дейтерия в этаноле. В табл. 4 представлен изотопмерный состав этанола и воды, в которой проводилась ферментация. Установлено, что во всем диапазоне концентраций D_2O содержание необмененных и дейтерированных форм этанола полностью соответствуют таковому в воде. Для изотопмеров такая согласованность соблюдается только в изотопноразбавленной среде. В концентрированных растворах она нарушается вследствие мультиплетного обмена продуктов биоконверсии со средой с образованием полидейтерированных молекул спирта. Представленная взаимосвязь распределения изотопмеров этанола и воды согласуется с предположением об

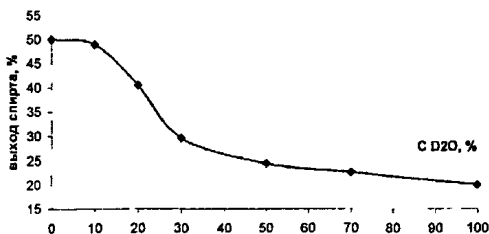


Рис. 6 Зависимость выхода спирта от концентрации тяжелой воды в среде

изолированности молекул воды внутри субстрат-ферментного комплекса от внешней фазы. Полученные результаты свидетельствуют также о том, что внедрение молекул воды в такой комплекс происходит без заметной изотопной дискриминации.

Установлено, что при низких степенях превращения глюкозы (5 суток после начала ферментации) выход этилового спирта уменьшается с увеличением содержания дейтерия в воде (рис.6).

Таблица 4

Изотопмерный состав воды и этанола при ферментации глюкозы в среде с различным содержанием D₂O

CD ₂ O, %	Вода, % ^a			Этанол, %										Σd ₁ ^b , %	
	d ₀	d ₁	d ₂	d ₀	d ₁			d ₂				Σd _{3,5}	H ₂ O	EtOH	
					CH ₃ -CHD	CH ₂ D-CH ₂	Σ	CH ₃ -CD ₂	CHD ₂ -CH ₂	CH ₂ D-CHD	Σ				
5	91.0	8.8	0.2	91.6	5.7	2.6	8.3	-	-	-	-	-	9.0	8.3	
10	82.3	16.9	0.9	83.6	10.4	4.9	15.3	0.4	-	0.7	1.1	-	17.8	16.3	
25	59.0	35.7	5.4	58.5	23.7	9.3	33.0	2.4	0.7	4.0	7.1	1.3	41.1	41.4	
50	28.7	49.7	21.5	29.3	30.1	11.6	41.7	7.7	1.9	12.8	22.4	6.6	71.2	70.7	
75	9.2	42.2	48.9	8.5	21.9	8.2	30.1	12.8	3.1	20.2	36.1	25.3	90.8	91.5	
100	0.5	13.2	86.3	1.3	7.7	2.6	10.3	11.5	2.0	15.6	29.1	59.3	99.5	98.7	

^a с учетом эффективной концентрации D₂O; ^b суммарное содержание дейтерированных молекул

Очевидно, это связано с проявлением изотопных эффектов на промежуточных стадиях превращения углевода внутри комплекса. В итоге, если суммарный изотопный состав образующегося спирта отражает состав водной среды, то распределение изотопа между метальной и метиленовой группами определяется величиной изотопных эффектов, сопровождающих их синтез на промежуточных стадиях биоконверсии.

Представленные результаты позволяют предположить, что количество дейтерия, переходящего в результате обменных процессов в молекулу этанола, будет определяться независимым вкладом каждой изотопмерной формы воды, вошедшей в фермент-субстратный комплекс:

$$D_i = k_1 \cdot d_1 / 100 + k_2 \cdot d_2 / 100 \quad (1)$$

где D_i – количество дейтерия в водородсодержащем фрагменте молекулы, грамм-атомы;

d_1, d_2 – содержание HOD и DOD изотопмеров воды, %, соответственно;

k_1, k_2 – коэффициенты, отражающие вклад молекул воды данного изотопмерного строения в дейтеросодержание этанола.

Определение коэффициента k проводилось на основании результатов, полученных в экспериментах по биоконверсии глюкозы в условиях природного обогащения водной среды, когда дейтерированные молекулы воды представлены исключительно изотопмером. Роль воды в процессе формирования водородной оболочки молекулы спирта в этом случае оценивалась по следующему алгоритму (табл. 5).

Таблица 5. Алгоритм расчета вклада изотопмеров воды в формирование водородной периферии молекулы спирта

d_{H_2O}	d_{CH_3}	d_{CH_2}	Δd_{H_2O}	Δd_{CH_3}	Δd_{CH_2}	$\Delta d_{CH_3} / \Delta d_{H_2O}$	$\Delta d_{CH_2} / \Delta d_{H_2O}$
300.0	331.2	250.6	-	-	-	-	-
779.8	455.1	609.6	479.8	123.9	359.0	0.26	0.75
1952.8	776.7	1495.8	1652.8	445.5	1245.2	0.27	0.75
3957.0	1302.0	2972.0	3657.0	970.8	2721.4	0.26	0.74

* d_i - количество дейтерия в водородсодержащем фрагменте i

В качестве «нулевой точки» был принят изотопный состав этанола, выделенного из среды с естественным обогащением (300 прпг). Постепенное обогащение воды дейтерием позволяет проследить ее вклад в формирование изотопного состава метальной и метиленовой групп этанола. Разностные значения дейтеросодержания (Δ) для «контрольного» и рассматриваемого этанола определяют количество дейтерия, сформированное за счет разности обогащения водной среды сравниваемых экспериментов. Нормируя полученные значения на величину D d_{H_2O} , установлено, что вклад среды, а именно изотопмера воды, в формирование водородной оболочки обоих фрагментов спирта постоянен и определяется коэффициентами 0.26 и 0.75 для метальной и метиленовой групп, соответственно.

Содержание дейтерия в метильной и метиленовой группах этанола, полученного ферментацией глюкозы в тяжелой воде, составляет 1.21 и 1.52г.-а., соответственно (рассчитано по результатам табл. 1). С учетом изотопного разбавления среды за счет обмена с атомами водорода гидроксильных групп глюкозы изотопмерный состав воды включает формы в количестве 13.2 и 86.3 %, соответственно (табл. 4). Тогда, уравнение 1 может быть представлено следующим образом:

$$\begin{aligned} \text{для } \text{CH}_3 \text{ группы} & \quad 1.21 = 0.26 \cdot 13.2/100 + k_2' \cdot 86.3/100 \\ \text{для } \text{CH}_2 \text{ группы} & \quad 1.52 = 0.75 \cdot 13.2/100 + k_2'' \cdot 86.3/100 \end{aligned}$$

Решение уравнений относительно коэффициентов позволяет установить их значения для метильной и метиленовой групп этанола - 1.36 и 1.65, соответственно. Следовательно, уравнение зависимости количества дейтерия, переходящего в молекулу этанола, от концентрации изотопа в среде принимает следующий вид:

$$\text{для } \text{CH}_3 \text{ группы} \quad D_{\text{CH}_3} = 0.26 \cdot d_1/100 + 1.36 \cdot d_2/100 \quad (2)$$

$$\text{для } \text{CH}_2 \text{ группы} \quad D_{\text{CH}_2} = 0.75 \cdot d_1/100 + 1.65 \cdot d_2/100 \quad (3)$$

Апробация уравнений на спиртах, полученных биоконверсией глюкозы в среде с различным содержанием D_2O , показывает что изотопный состав и метильной, и метиленовой групп этанола удовлетворительно воспроизводится на основании предложенных уравнений (табл. 6).

Таблица 6. Вклад изотопмеров воды в формирование метиленовой и метильной групп спирта

С D_2O , %	изотопмеры воды, %		D CH_2 , г.-а.		D CH_3 , г.-а.	
	d $_1$	d $_2$	у-ние (2)	ЯМР ^{13}C	у-ние (3)	ЯМР ^{13}C
5	8.8	0.21	0.07	0.06	0.03	0.03
10	16.9	0.86	0.14	0.12	0.06	0.06
25	35.6	5.4	0.36	0.35	0.17	0.17
50	49.7	21.5	0.73	0.69	0.42	0.38
75	42.2	48.6	1.12	1.11	0.77	0.72

Согласно представленным уравнениям при проведении ферментации в 100%-ной D_2O , количество дейтерия в водородсодержащих фрагментах спирта соответствует величине k_2 . В таком случае обогащение метиленовой группы этанола должно составлять 1.65 г.-а. Экспериментально установлено, что содержание дейтерия в метиленовой группе составляет 1.51 г.-а. Однако, вследствие обмена воды с атомами водорода гидроксильных групп глюкозы происходит изотопное разбавление среды до концентрации 93%. Следовательно, в пересчете на 100% D_2O количество дейтерия в метиленовой группе спирта составит 1.62 г.-а. Это означает, что величина представленных коэффициентов имеет механистическое обоснование.

При проведении ферментации в условиях природного обогащения субстрата и среды, необходимо учитывать вклад атомов водорода самой молекулы глюкозы в изотопный состав этанола. В связи с этим предпринята попытка оценить коэффициенты чувствительности водородсодержащих фрагментов спирта к изотопному составу исходного углевода.

В табл. 7 в соответствии с предложенным ранее алгоритмом расчета, проведена оценка вклада структурных фрагментов глюкозы в изотопный состав молекулы этанола.

Таблица 7. Распределение дейтерия в этаноле в зависимости от положения метки в молекуле глюкозы

глюкоза		этанол			k
Положение метки	Δгг, ррт *	СН ₃	ΔСН ₃	ΔСН ₃ /Δгг	
-	природное обогащение	331.2	-	-	-
С ₁	585	562.8	231.6	0.40	0.80
С ₂	341	420.6	89.4	0.26	0.52
С ₆	752	637.0	305.8	0.41	0.82

* количество дейтерия в С₁ фрагменте глюкозы за вычетом естественного обогащения

Чтобы исключить вклад естественного содержания дейтерия молекулы глюкозы в изотопный состав молекулы спирта, также в качестве «нулевой точки» был принят этанол, полученный ферментацией немеченой глюкозы. Селективное обогащение дейтерием отдельных положений исходной глюкозы позволяет оценить их вклад в формирование изотопного состава этанола. Разностные значения дейтеросодержания (Δ) для исходного и обогащенного таким образом этанола определяют количество дейтерия, формирующего метальную группу спирта за счет изотопного обогащения дейтерием С₁ фрагмента глюкозы. Нормируя полученные значения на величину изотопной метки углевода (Δгг), установлено, что вклад С₁, С₂ и С₆ фрагментов глюкозы в изотопный состав метальной группы характеризуется коэффициентами 0.40, 0.26 и 0.41, соответственно. Принимая во внимание, что метка передается лишь одной из двух образующихся молекул спирта (С₁-С₃ и С₄-С₆ фрагменты глюкозы), что приводит к ее разбавлению, представленные коэффициенты должны быть удвоены (табл. 7). Тогда с учетом вклада изотопного состава глюкозы и водной среды в формирование водородной оболочки метальной группы спирта величина дейтеросодержания последней может быть рассчитана на основании следующего уравнения:

$$D_{СН_3} = 0.80 \cdot D_{C_1} + 0.52 \cdot D_{C_2} + 0.82 \cdot D_{(C_6+C_6)} + 0.52 \cdot D_{H_2O} + b \quad (5)$$

Вклад молекул воды удваивается (0.26 x 2), поскольку представленное уравнение учитывает количество образующихся молекул спирта. Параметр,

дополнительно введенный в уравнение, связан с вкладом атомов дейтерия гидроксильных групп глюкозы в изотопный состав водной среды.

Апробация уравнения на результатах работы с известным фрагментным распределением дейтерия в молекуле глюкозы (табл. 8) свидетельствует о том, что изотопный состав метильной группы спирта удовлетворительно воспроизводится на основании предложенного уравнения.

Таблица 8. Расчет изотопного состава метильной группы этанола

Сахар	Глюкоза (D/H) _i , ppm				(D/H) _{CH₃} , ppm	
	C ₁	C ₂	C ₆	C _{6'}	экспери- мент	уравнение (5)
сахарная свекла	123.3	126.1	112.6	111.8	90-94	92.4
виноград	145.3	144.4	135.3	131.4	98-106	102.7
сахарный тростник 1	159.8	137.8	148.0	130.5	108-113	105.6
сахарный тростник 2	165.4	138.7	156.2	141.3	108.5	107.9
кукуруза	173.8	156.7	151.7	142.7	111.1	111.3
ананас	151.5	157.6	134.7	148.5	100-106	106.9

* содержание дейтерия в воде 150 ppm

3.2 Реакция сернокислотной гидратации этилена

Синтетические этанолаы характеризуются более высоким содержанием дейтерия по сравнению с этанолами растительного происхождения. Для них также свойственно фракционирование изотопов водорода, отличное от статистически ожидаемого: дейтеросодержание метильной группы этанола в 1.1 - 1.3 раза больше, чем метиленовой. Реакция сернокислотной гидратации этилена использована как модельная для изучения факторов, определяющих природное распределение дейтерия в синтетических спиртах.

В отличие от многостадийного процесса получения этанола ферментативным сбраживанием растительного сырья, при сернокислотной гидратации этилена изотопное строение молекулы спирта формируется в результате одной стадии — присоединения протона к двойной связи, при этом на уровне природного обогащения образцов вероятность одновременного взаимодействия дейтерированных молекул субстрата и реагента близка к нулю.

Для изучения возможности ориентирующего действия дейтерия этилена на направление присоединения протона кислоты проведена сернокислотная гидратация [1,1-²H₂] - этилена. Спектр ЯМР Н выделенного спирта свидетельствует о том, что присоединение протона протекает равновероятно по обоим углеродным атомам. Таким образом, в результате реакции дейтерий этилена оказывается полностью распределенным между метильной и метиленовой группами спирта и не оказывает влияние на соотношение их изотопомеров.

Для определения направления миграции дейтерия реагента изучено распределение изотопа в этиловом спирте в зависимости от его содержания в серной кислоте. Дейтерозамещение последней варьировалось от 5 до 100 %.

Результаты количественного ЯМР С анализа выделенных спиртов представлены в табл. 9.

Таблица 9. Влияние концентрации дейтерия кислоты на распределение изотопомеров в этаноле при сернокислотной гидратации этилена

Изотопимер	dD ₂ SO ₄ [*] , %				
	100	75	30	15	5
CH ₃ -CH ₂ -OH	6.5	33.3	74.6	89.3	98.0
CH ₂ D-CH ₂ -OH	85.9	63.6	25.4	10.7	2.0
CH ₃ -CHD-OH	4.0	1.2	-	-	-
C ₂ H ₃ D ₂ OH	3.6	1.9	-	-	-
d ₁ ^{CH₃} ·100/dD ₂ SO ₄	85.9	84.8	84.7	71.3	40.0

* содержание D₂SO₄ в кислоте

Показано, что в результате реакции дейтерий практически полностью оказывается в метильной группе этанола. В изотопно-разбавленной кислоте изотопимер CH₂D-CH₂-OH является единственным продуктом присоединения дейтерона к двойной связи этилена. В 75 и 100 %-ной D₂SO₄ в этаноле, кроме того, присутствуют изотопимеры CH₃-CHD-OH и C₂H₃D₂OH, однако, их суммарное содержание составляет всего 3.1 и 7.6 %, соответственно. Поскольку уже в 30 %-ной кислоте образование изомерных изотопомеров не обнаружено, то реакция обратной депротонизации не может оказывать существенного влияния на соотношение изотопомеров в условиях природного обогащения.

При проведении гидратации в изотопно-концентрированных кислотах (100, 75 и 30% D₂SO₄) степень перехода дейтерия кислоты в изотопимер спирта CH₂D-CH₂-OH практически неизменна и составляет «85%. По мере разбавления выход дейтерированных молекул уменьшается, и в 5 %-ной кислоте составляет всего 40% от дейтерозамещенности кислоты. Очевидно, экстраполирование в сторону большего изотопного разбавления может привести к дальнейшему уменьшению степени дейтерирования молекул спирта относительно концентрации дейтерия в кислоте. Следовательно, в синтетических спиртах, полученных в условиях природного обогащения образцов, нестатистическое распределение изотопа между метильной и метиленовой группами (CH₂D/CHD=1.1.3) связано, очевидно, с вышеуказанной динамикой.

Таким образом, в условиях природного обогащения изотопное строение молекулы синтетического этанола складывается из двух слагаемых - дейтерия субстрата (этилена) и реагента (кислоты). Полученные результаты показывают, что содержание молекул спирта с атомом дейтерия в метиленовой группе определяется только дейтеросодержанием этилена. В образовании молекул, дейтерированных по метильной группе, участвуют и этилен, и кислота, однако, вклад последней значительно меньше и не соответствует количеству дейтерия, содержащегося в ней. Следовательно, обогащение метиленовой группы может служить критерием для изотопной характеристики исходного соединения, тогда

как использование метильной группы для этих целей требует дополнительных исследований в каждом конкретном случае.

ВЫВОДЫ:

1. Разработана методика количественного определения содержания дейтерия во фрагментах молекул органических веществ методом спектроскопии ЯМР ^2H в сильных магнитных полях ($> 6\text{T}$) без стабилизации резонансного условия (отношение частота / поле).

2. Комплексное использование спектров ЯМР на ядрах ^1H , ^2H и ^{13}C с обработкой совокупности количественных параметров позволяет проводить надежные определения как абсолютного содержания изотопов водорода в каждом фрагменте молекулы, так и изотопомерных форм в молекулярной смеси. Эффективность разработанного подхода показана на примерах изучения механизмов органических реакции и идентификации сырьевой природы органических объектов.

3. Методом количественной спектроскопии ЯМР ^{13}C и ^2H изучен изотопомерный состав этанола в зависимости от содержания дейтерия в воде. Впервые показано, что при биоконверсии глюкозы в изотопнообогатенной среде распределение дейтерия в образующемся этаноле определяется изотопомерным составом воды, в которой проводилась ферментация.

4. Методом меченых атомов изучен механизм формирования изотопного профиля этанола и глицерина, полученных ферментативным сбраживанием обычной и [$1\text{-}^{13}\text{C}$]- меченой глюкозы в тяжелой воде. Установлен вклад структурных фрагментов глюкозы и роль промежуточных стадий биоконверсии.

5. Впервые предложены уравнения, позволяющие прогнозировать изотопный состав метильной и метиленовой групп спирта, основываясь на знаниях о дейтерозамещенности водной среды и водородсодержащих фрагментов глюкозы.

6. На примере сернокислотной гидратации этилена установлено, что для синтетического спирта различия в дейтеросодержании метильной и метиленовой групп определяется количеством изотопа, переходящего из реагента в субстрат.

7. Установлены количественные критерии дифференциации этанолов и водно-этанольных композиций различного сырьевого происхождения методом ЯМР ^2H . Предложен оригинальный алгоритм идентификации водно-органических растворов по их компонентному и изотопному составу из спектров ЯМР.

Публикации по теме диссертации:

1. Калабин Г.А., Кушнарв Д.Ф., Кулагина Н.В., Козлов Ю.П., Количественная спектроскопия ЯМР Н. Применение для идентификации алкогольной продукции. // Материалы II научно-практической

- конференции «Идентификация качества и безопасности алкогольной продукции». - Пушкино, 2000. - С.94.
2. Калабин Г.А., Дроздовская Е.В., Козлов Ю.П., Кулагина Н.В., Кушнарв Д.Ф., Рохин А.В. Спектроскопия ЯМР в сертификации пищевой продукции. // Материалы V всероссийской научно-практической конференции «Метрологическое обеспечение сертификационных испытаний пищевой продукции». - Екатеринбург, 2001. - С.26-29.
 3. Калабин Г.А., Кушнарв Д.Ф., Володина Е.Г., Кулагина Н.В., Козлов Ю.П. Спектроскопия ЯМР Н — новый метод количественного изотопного анализа водных и водно-органических объектов. // Материалы I научно-практической конференции ГТЛ «Экспертно-исследовательская деятельность в таможенных целях». - Москва, 2001. - С.26-29.
 4. Рохин А.В., Кушнарв Д.Ф., Кулагина Н.В., Трунов С.В., Сапожников Ю.М., Калабин Г.А. Определение содержания минорных изотопов методом спектроскопии ЯМР в молекулах спиртосодержащих жидкостей. // Материалы I научно-практической конференции ГТЛ ГТК РФ «Экспертно-исследовательская деятельность в таможенных целях». — Москва, 2001.-С.33-34.
 5. Рохин А.В., Кушнарв Д.Ф., Сапожников Ю.М., Кулагина Н.В., Калабин Г.А. Определение содержания минорных изотопов методом спектроскопии ЯМР в молекулах спиртосодержащих жидкостей. // Сб. трудов «Проблемы идентификации алкогольсодержащей продукции». Гост - стандарт РФ - Москва, 2001. - С.58-92.
 6. Калабин Г.А., Кушнарв Д.Ф., Кулагина Н.В., Рохин А.В., Рыков Р.С. Количественная спектроскопия ЯМР - новый метод идентификации сырьевой, региональной и технологической природы веществ и материалов по содержанию в них стабильных изотопов основных элементов. // Материалы всероссийских научных чтений. - Улан-Удэ, 2002.-С.133-134.
 7. Kalabin G.A., Belovezhets K.I., Kozlov Y.P., Rykov R.S., Kushnarev D.F., Rohin A.V., Kulagina N.V., Apostolova I.S. Some Aspects of Applying Quantitative NMR for Russian Customs Laboratory Issues. // Abstracts of EuroConference «Modern Analytical Methods for Food and Beverage Authentication». - Lednice, Czech Republic, 2002. - p.24.
 8. Калабин Г.А., Рыков Р.С., Дроздовская Е.В., Козлов Ю.П., Кушнарв Д.Ф., Кулагина Н.В., Рохин А.В. Количественная мультиядерная спектроскопия ЯМР в идентификации сырьевой, региональной и технологической природы технической и пищевой продукции. // Материалы VI Международного семинара по магнитному резонансу. - Ростов-на-Дону, 2002. - С.274-275.
 9. Калабин Г.А., Козлов Ю.П., Кулагина Н.В., Кушнарв Д.Ф. Установление регионального соответствия натуральных вин количественными методами ЯМР. // Материалы научно-технической конференции «Технологии живых систем». - Москва, 2003. - С.59-61.

- Ю.Калабин Г.А., Козлов Ю.П., Кушнарев Д.Ф., Кулагина Н.В., Рохин А.В., Пуляева В.Н., Дроздовская Е.В., Рыков Р.С. Идентификация и контроль качества продуктов биотехнологических процессов методами спектроскопии ядерного магнитного резонанса. // *Материалы научно-прикладной конференции «Химия и химические продукты»*. - Москва, 2003. - С.166-167.
- П.Кулагина Н.В., Сахабутдинов А.Г., Кушнарев Д.Ф., Рохин А.В., Пройдаков А.Г., Калабин Г.А. Механизм природного распределения дейтерия в синтетическом этиловом спирте. // *Материалы XVII Менделеевского съезда по общей и прикладной химии*. - Казань, 2003. - С.477.
- 12.Калабин Г.А., Кулагина Н.В., Рыков Р.С, Козлов Ю.П., Кушнарев Д.Ф., Рохин А.В. Идентификация сырьевой природы этанола методом спектроскопии ЯМР²H. // *Вестник РУДН. Сер. Экология и безопасность жизнедеятельности*. - 2003. - №7. - С.87-99.
- 13.Калабин Г.А., Козлов Ю.П., Рыков Р.С, Кулагина Н.В., Кушнарев Д.Ф., Рохин А.В. Новый алгоритм идентификации натуральных вин Грузии методом спектроскопии ЯМР. // *Вестник РУДН. Сер. Экология и безопасность жизнедеятельности*. - 2003. - №9. - С.77-82.
- Н.Сахабутдинов А.Г., Кулагина Н.В., Кушнарев Д.Ф., Пройдаков А.Г., Калабин Г.А. Механизм распределения дейтерия в этиловых спиртах. // *Журнал прикладной химии*. - 2003. - Т.76. - Вып.3. - С.520.
- 15.Кулагина Н.В., Сахабутдинов А.Г., Кушнарев Д.Ф., Рохин А.В., Пройдаков А.Г., Калабин Г.А. Об участии воды в формировании молекулы спирта при биоконверсии глюкозы. // *Вестник ИрГТУ*. - 2004. - X2.4-С.150.

№ 24062