

碳-单体同位素分析(C-CSIA)技术 用于葡萄糖液化机理研究

郭 康^{1,2}, 沈娟章¹, 蒋剑春¹, 徐俊明¹, 谭卫红¹

(1. 中国林业科学研究院林产化学工业研究所, 生物质化学利用国家工程实验室,
国家林业局林产化学工程重点开放性实验室, 江苏省生物质能源与材料重点实验室, 江苏 南京 210042;
2. 南京林业大学, 江苏省林业资源高效加工利用协同创新中心, 江苏 南京 210037)

摘要:建立了碳-单体同位素分析(C-CSIA)技术测定葡萄糖液化产物中特定目标化合物的碳稳定同位素比值分析方法, 分析得到的单体化合物 $\delta^{13}\text{C}$ 值误差小于0.3‰, 低于仪器测试允许的偏差(0.5‰)。当葡萄糖在不同温度下液化时, 对比了中间产物1,4;3,6-二脱水- α -D-吡喃葡萄糖(DGP)的碳稳定同位素变化及分馏特征。发现温度较低时, DGP发生显著的碳稳定同位素贫化效应, 温度越高, DGP分子的碳稳定同位素富集因子越大。此外, 在葡萄糖脱水生成DGP过程中仅发生C—O、C—H键的断裂及形成, 而在DGP生成乙酰丙酸乙酯过程中, 因脱羧、重排异构化反应等, 不仅发生了C—O、C—H键断裂及形成, 还有C—C键参与反应, 导致后者具有更显著的碳稳定同位素动力学效应。该方法适用于葡萄糖催化液化等复杂体系的反应路径研究, 可为液化机理研究提供信息。

关键词:单体同位素分析(CSIA); 葡萄糖液化; 液化机理; 同位素分馏; 动力学同位素效应

中图分类号: O657.63; O656.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-2997(2020)06-0604-10

doi: 10.7538/zpxb.2019.0122

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Research on Liquefaction Mechanism of Glucose by Carbon-Compound Specific Isotope Analysis

GUO Kang^{1,2}, SHEN Juan-zhang¹, JIANG Jian-chun¹, XU Jun-ming¹, TAN Wei-hong¹

(1. National Engineering Lab for Biomass Chemical Utilization,
Key and Open Lab of Forest Chemical Engineering, SAF, Key Lab
of Biomass Energy and Material, Institute of Chemical Industry of Forest Products,
Chinese Academy of Forestry, Nanjing 210042, China;
2. Co-innovation Center of Efficient Processing and Utilization of Forest Resources,
Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: In recent years, the compound specific isotope analysis (CSIA) technology can be directly used to determine the stable isotope ratio of the element to be measured

收稿日期: 2019-09-02; 修回日期: 2019-12-11

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(31530010)资助

作者简介: 郭 康(1995—), 男(汉族), 陕西西安人, 硕士研究生, 林产化学加工工程专业。E-mail: kang_guo@foxmail.com

通信作者: 谭卫红(1971—), 女(汉族), 江苏南京人, 副研究员, 从事单体同位素分析技术研究。

E-mail: tanweihong71@163.com

in a specific compound in the reaction system, and the analysis results are not affected by the reaction environment and have high accuracy. Therefore, this technology is not only applied to the transformation of environmental organic pollutants, but also gradually applied to the study of specific chemical reaction mechanism. In this paper, the carbon isotope ratio analysis method of specific target compounds in the liquefied products of glucose was established by C-CSIA, and the standard deviation of $\delta^{13}\text{C}$ test value of the specific compounds was less than 0.3‰. The $\delta^{13}\text{C}$ value and fractionation characteristics of intermediate products 1,4;3,6-dianhydro- α -D-glucopyranose (DGP) were compared with different liquefaction temperatures. At low temperature, the stable isotope ratio of the DGP has significant carbon isotope dilution effect, and the DGP gradually has carbon isotope enrichment effect when the temperature increases. At 140 °C, the $\delta^{13}\text{C}$ value of the DGP decreases from $(-15.89 \pm 0.08)\text{‰}$ to $(-17.79 \pm 0.09)\text{‰}$, and at this point, the carbon stable isotope ratio of DGP shows dilution effect during the liquefaction process, and the dilution value is -1.90‰ . When the liquefaction temperature is 160 °C, the $\delta^{13}\text{C}$ value of DGP increases from $(-15.66 \pm 0.17)\text{‰}$ to $(-11.95 \pm 0.09)\text{‰}$, while the $\delta^{13}\text{C}$ of DGP increases from $(-18.09 \pm 0.16)\text{‰}$ to $(-9.26 \pm 0.06)\text{‰}$ at 180 °C, the carbon stable isotope enrichment values are 3.71‰ and 8.83‰, respectively. Meanwhile, the enrichment factor at 140, 160 and 180 °C are $(-0.44 \pm 0.05)\text{‰}$ (R^2 is 0.953 2), $(0.17 \pm 0.01)\text{‰}$ (R^2 is 0.981 6), $(0.32 \pm 0.03)\text{‰}$ (R^2 is 0.959 2), respectively. And combining with the variation tendency of the DGP's yield, all of the above results show that, C—O, C—H bonds just participate in reacting in the process of glucose to generate DGP by dehydration. But during the generation of ethyl levulinate from DGP by decarboxylation and rearrangement isomerization reactions, there are not only breaking and forming C—O, C—H bonds, but also involving C—C, which leads to the latter having more significant carbon isotope kinetic effect. Therefore, it is speculated that the DGP directly generates levulinic acid through further decarboxylation and isomerization without undergoing 5-hydroxymethylfurfural. The results show that CSIA technology can effectively study reaction paths in complex systems such as glucose catalytic liquefaction and provide more information for liquefaction mechanism.

Key words: compound specific isotope analysis (CSIA); glucose liquefaction; liquefaction mechanism; isotope fractionation; kinetic isotope effect

溶剂液化作为一种高效转化生物质的手段,具有反应条件温和、化合物选择性较高等优点,已成功利用生物质原料制备了左旋葡萄糖酮、糠醛(FF)^[1]、5-羟甲基糠醛(5-HMF)^[2-3]、 γ -戊内酯^[4-5]、烷基糖苷、乙酰丙酸(LA)^[6]及其酯等多种小分子平台化合物^[7]。

目前,关于 H_2SO_4 等质子酸类催化剂催化纤维素液化的研究主要为 H_2SO_4 等催化行为^[8],而对催化液化机理的研究较少。Zhang 等^[9]采用同位素标记法对葡萄糖和果糖中的碳

原子进行标记,结合¹³C-NMR 分析 5-羟甲基糠醛及乙酰丙酸的生成机理,认为甲酸分子中的碳原子均来源于果糖及葡萄糖分子中的 1 号碳,而糠醛则无法由 5-羟甲基糠醛生成,只能经果糖得到^[10-14]。这说明,葡萄糖异构化为果糖后进一步生成 5-羟甲基糠醛过程中伴随的竞争反应,即有部分果糖发生开环、脱羧及脱水反应生成糠醛^[11,13]。然而对于液化过程中,葡萄糖二次脱水产物 1,4;3,6-二脱水- α -D-吡喃葡萄糖(DGP)的进一步降解报道较少,一般认为

DGP 作为中间产物会进一步反应生成 5-羟甲基糠醛^[14-16], 后者最终生成乙酰丙酸及其酯(醇作为溶剂时)。此外, 无论是 Lewis 酸或 Brønsted 酸催化液化葡萄糖, 纤维素制备 5-羟甲基糠醛时, 总会伴随乙酰丙酸的生成。一方面, 该反应条件下可能会促使部分 5-羟甲基糠醛转化生成乙酰丙酸; 另一方面, 在葡萄糖液化过程中, 可能还存在一条不经历 5-羟甲基糠醛直接生成乙酰丙酸的路径。在前期研究中发现, 葡萄糖经历二次脱水生成 DGP, 后者可能会发生异构化、脱羧等反应直接生成乙酰丙酸, 因此有必要对 DGP 做进一步研究。

单体同位素分析(CSIA)技术可直接测定反应体系目标化合物中待测元素的稳定同位素比值(如 C^{13}/C^{12} 、 O^{18}/O^{16} 、 H^2/H^1 、 N^{15}/N^{14} 、 S^{34}/S^{32} 等), 因其结果不受其他反应物、产物及元素的干扰而具有较高的准确性, 使该技术不仅广泛应用于环境有机污染物降解过程评价^[17-18]、辨识解析污染物来源^[19]、评价降解路径及转化机理^[20]、研究污染物实地生物降解程度等^[21], 还逐渐应用于特定化学反应机理的研究^[22-24]。

本研究拟将 CSIA 技术应用到 H_2SO_4 催化液化葡萄糖制备乙酰丙酸乙酯的研究中, 建立葡萄糖液化产物中单体化合物稳定同位素比值的分析方法, 研究中间产物 DGP 的碳稳定同位素分馏特征, 利用瑞利方程分析液化过程的碳稳定同位素富集因子, 进而研究 DGP 在反应过程中的同位素动力学效应, 判别 DGP 在反应过程中的断键种类及反应类型, 进一步明确葡萄糖液化机理。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

7890B-7200B 气相色谱-四极杆飞行时间质谱联用仪(GC/Q-TOF MS): 美国 Agilent 公司产品; 稳定同位素比值质谱仪、FLASH 2000 HT 元素分析仪、TRACE GC ULTRA 气相色谱仪: 美国 Thermo Fisher 公司产品; XS204 天平: 瑞士 Mettler Toledo 公司产品; RE-6000A 旋转蒸发器: 上海亚荣生化仪器厂产品; GCF-0.25 高压反应釜: 大连自控设备厂产品。

葡萄糖、浓硫酸、乙酸乙酯: 均为分析纯, 购

自南京化学试剂有限公司; 无水乙醇、丙酮: 均为色谱纯, 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 碳稳定同位素标准物质: 咖啡因(IAEA-600, $\delta^{13}C$: $(-27.771 \pm 0.043)\text{‰}$), 购自广州济科仪器科技有限公司; 咖啡因同位素标准溶液: 称取 20 mg 咖啡因标准物质, 用丙酮溶解并定容至 10 mL 容量瓶中, 此标准溶液浓度为 2 g/L, 保存于 0~4 °C。其中, 咖啡因用于 EA-IRMS 碳稳定同位素比值分析, 咖啡因同位素标准溶液用于 GC-C-IRMS 碳稳定同位素比值分析。GC-C-IRMS 和 EA-IRMS 所用气体为氦气(99.999%)、二氧化碳(99.999%)、氧气(99.995%), GC/Q-TOF MS 所用气体为氦气(99.999%)、氮气(99.999%); 购自南京麦克斯南分特种气体有限公司。

1.2 样品制备及预处理

称取 2.00 g 葡萄糖于反应釜中, 加入 30.00 g 无水乙醇液化溶剂和 0.10 g 浓硫酸催化剂, 不断搅拌^[25-26], 加热至设定温度时所用的时间即为反应时间。液化实验中, 以 3 °C/min 速率升至 140 °C, 此时的压力为 0.12 MPa, 反应完毕后, 立即通水使釜内温度冷却至室温, 将釜体打开倒出液化产物, 并称质量, 用慢速定量滤纸抽真空过滤, 得滤液和残渣。在 35 °C 下对所得滤液进行旋蒸以除去溶剂, 得到粘稠状浓缩样品后, 加入 4 g 无水乙醇稀释, 所得样品用于同位素分析, 技术路线示于图 1。

1.3 1,4;3,6-二脱水- α -D-吡喃葡萄糖定量

本实验以特征离子 m/z 69.033 5 提取得到 DGP 提取离子色谱图(EIC)进行定量, 在相同的测试方法下, 对每个样品至少连续分析 5 次, 取平均值。此外, 利用 GC/Q-TOF MS 对液化过程中 DGP 含量测定时, 反应釜制备所得葡萄糖液化产物不做其他处理, 直接取 0.2 mL 样品用于定量分析。

1.3.1 色谱条件 HP-5MS 色谱柱(30 m $\times$ 0.250 mm $\times$ 0.25 μ m); 进样量 0.2 μ L; 分流比 100 : 1; 载气为高纯氦气(99.999%), 流速 175.42 mL/min; 柱流速 1.7 mL/min; 进样口温度 300 °C; 程序升温: 50 °C 保持 2 min, 以 5 °C/min 升至 280 °C, 保持 5 min。

1.3.2 质谱条件 EI 离子源, 电子轰击能量

70 eV,离子源温度 230 ℃,传输线温度 280 ℃,质量扫描范围 m/z 20~300,采集延迟时间 3 min。

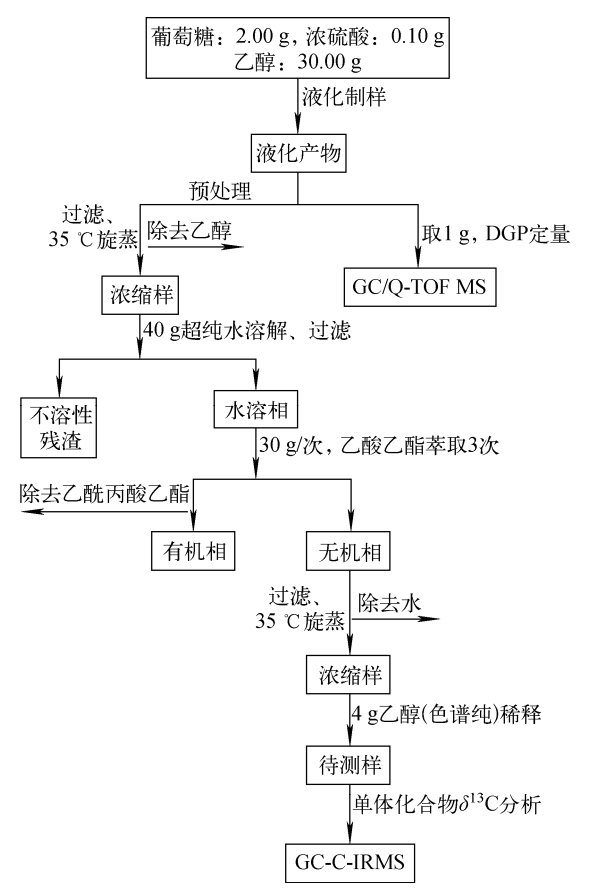


图1 葡萄糖液化产物定量及碳稳定同位素比值分析路线

Fig. 1 Roadmap for quantitative and carbon isotope ratio analysis of liquefaction products of glucose

1.4 GC-C-IRMS 分析液化产物中 1,4;3,6-二脱水- α -d-吡喃葡萄糖碳稳定同位素比值

葡萄糖液化产物按照图 1 进行预处理后,利用气相色谱-燃烧单元联机同位素比值质谱(GC-C-IRMS)测定样品中 DGP 的碳稳定同位素比值。测碳时,氧化反应管温度保持在 1 000 ℃,不分流模式进样,进样量 3 μ L,进样口温度 280 ℃,采用 HP-5MS 毛细管色谱柱(60 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m),升温程序及其他参数与 GC/Q-TOF MS 分析时一致。每个样品至少测定 5 次,考察仪器的稳定性及重复性。结果表明,所有样品 5 次测试的标准偏差均在测定允许的范围(δ¹³C:±0.5‰)。

1.5 碳稳定同位素富集因子的计算

1981 年 Mariotti 等^[27]用瑞利模型分析一个不可逆反应,当同位素富集与反应物浓度无关时,可以用同位素富集因子 ϵ 表征反应过程的同位素分馏程度, ϵ 可根据线性瑞利方程作图求出,示于式(1),其不确定度为 95% 置信区间的统计误差。

$$\ln \frac{\delta_t + 1}{\delta_0 + 1} = \epsilon \times \ln f \quad (1)$$

式中:δ_t、δ₀ 分别表示反应时间为 t 时 DGP 的同位素比值和 DGP 初始稳定同位素比值(C: ¹³C/¹²C); f 表示 t 时刻 DGP 的残留因子,即反应 t 时刻的浓度 C_t 和初始反应浓度 C_0 的比值; ϵ 为相应的同位素富集因子。

2 结果与讨论

2.1 GC-C-IRMS 测试方法学研究

因样品复杂,本研究验证了单体稳定同位素测定方法的可靠性。分别采用 GC-C-IRMS 和 EA-IRMS 两种方法测定碳稳定同位素标准物质,评价 GC-C-IRMS 分析稳定同位素标准物质时所用的气相色谱柱对稳定同位素标准物质测定值的影响,以确保样品测定结果的准确性。首先,采用 GC-C-IRMS 分析咖啡因同位素标准溶液 δ¹³C 时,在完成参比气体的 CO₂ON/OFF 测试后,至少连续测定 10 个咖啡因标准物质溶液样品,验证其标准偏差≤0.2‰后,方可利用该组标准品的测量值对参比气体进行标定。参比气体重新标定后,再连续测定至少 10 个咖啡因标准溶液样品,其标准偏差≤0.2‰,且与其咖啡因标定值(−27.771‰)之差保持在±0.3‰以内,方可做进一步的样品分析。

GC-C-IRMS 中的气相色谱可以对混合物样品分离,用于测定混合物中特定单体化合物的碳稳定同位素比值。为了评价本实验中气相色谱柱对样品的稳定同位素比值测试所造成的影响,利用 EA-IRMS 连续测定至少 10 次咖啡因标准物质,每次测定称取 0.150~0.200 mg 咖啡因标准物质。分别利用 GC-C-IRMS 和 EA-IRMS 分析咖啡因标准物质溶液和咖啡因标准物质的碳稳定同位素比值,结果列于表 1。其中,通过 GC-C-IRMS 分析咖啡因标样的 δ¹³C 平均值为 −27.712‰,标准偏

表 1 GC-C-IRMS 和 EA-IRMS 咖啡因标准品碳稳定同位素比值测定结果

Table 1 Determination results of the carbon isotope ratio of caffeine standard using GC-C-IRMS and EA-IRMS

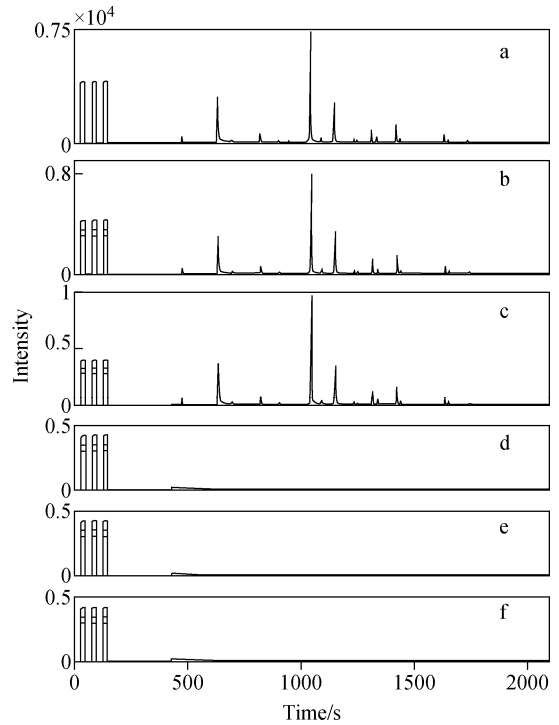
样品 Sample	GC-C-IRMS		EA-IRMS	
	咖啡因 Caffeine $\delta^{13}\text{C}/\text{‰}$	与标定值之差/ ‰ Difference from calibration value	咖啡因 Caffeine $\delta^{13}\text{C}/\text{‰}$	与标定值之差/ ‰ Difference from calibration value
1	27.838	0.067	-27.719	-0.052
2	-27.866	0.095	-27.782	0.011
3	-27.615	-0.156	-27.859	0.088
4	-27.563	-0.208	-27.711	-0.060
5	-27.786	0.015	-27.543	-0.228
6	-27.729	-0.042	-27.630	-0.141
7	-27.702	-0.069	-27.719	-0.052
8	-27.582	-0.189	-27.584	-0.187
9	-27.690	-0.081	-27.584	-0.187
10	-27.749	-0.022	-27.692	-0.079
平均值/ ‰	-27.712	-0.059	-27.682	-0.089
标准偏差/ ‰ ($n=10$)	0.1032	—	0.0979	—

差为 0.103 2‰,小于 0.3‰,符合该仪器测定样品碳稳定同位素比值标准偏差要求,表明 GC-C-IRMS 在分析咖啡因标样时,具有较好的准确性和稳定性,因此可进一步完成样品分析。此外,其标准偏差(0.103 2‰)与标准品真值(-27.771±0.043)‰存在较大误差,一方面,这是由于不同测试仪器所造成的系统误差;另一方面,咖啡因标准品真值本身具有的不确定度会与本实验仪器的系统误差造成进一步累积,导致测定所得的咖啡因标准品的不确定度偏大^[28]。

2.2 GC-C-IRMS 分析样品碳稳定同位素测定方法可行性验证

利用 GC-C-IRMS 分析样品中目标单体化合物稳定同位素比值时,不仅要求气相色谱柱对所分析的物质具有较好的分离效果,还要不会造成同位素的分馏。为了验证样品在色谱柱内的滞留情况,本实验采用分析一个样品后,再在相同的条件下直接用 GC-C-IRMS 分析 0.3 μL 无水乙醇作为空白对照组,观察空白样品的谱图中是否有化合物的色谱峰,以此确定前一个样品在色谱柱中是否滞留。选择液化产物分布较为复杂且目标化合物含量较高的 3 个样品,利用 GC-C-IRMS 分析其单体化合物 $\delta^{13}\text{C}$ 时,分别穿插着分析一次无水乙醇,得到 3 个样品及 3 个空白样品的 GC-C-IRMS 谱图,示于

图 2。对比发现,在 3 个空白样品的 GC-C-IRMS 谱图中均未发现明显色谱峰,表明该色

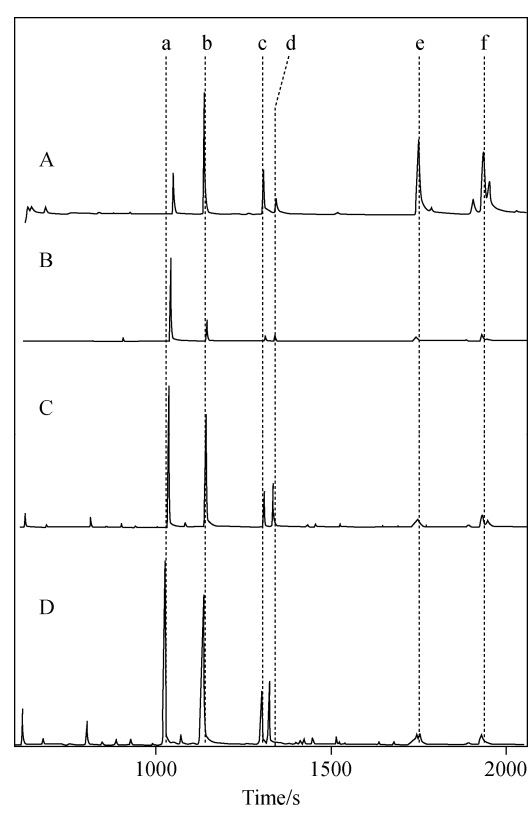


注:a,b,c 分别为葡萄糖在 140、160、180 ℃ 反应 3 h、2 h、10 min 所得液化产物的 GC-C-IRMS 谱图;
d,e,f 均为乙醇(色谱纯)的 GC-C-IRMS 谱图

图 2 GC-C-IRMS 分析样品时,HP-5 色谱柱适用性评价
Fig. 2 Evaluation of applicability of HP-5 column for sample analysis by GC-C-IRMS

谱柱对样品无明显的吸附作用。

通过 GC-C-IRMS 谱图与 GC/Q-TOF MS 的 TIC 谱图对比,确定了目标化合物在 GC-C-IRMS 中的保留时间,示于图 3。通过比较可知,a、b、c、d、e、f 分别为乙酰丙酸乙酯(1 028 s)、左旋葡萄糖酮(1 146 s)、1,4;3,6-二脱水- α -d-吡喃葡萄糖(1 313 s)、5-羟甲基糠醛(1 325 s)、1,6-脱水吡喃葡萄糖(1 725 s)和乙基葡萄糖苷(1 910 s)。



注:A 为样品的 GC/Q-TOF MS 色谱图;
B、C、D 为葡萄糖在 140 °C 反应 3 h 所得产物,
进样量依次为 1.0、0.5、0.2 μ L 的 GC-C-IRMS 谱图

图 3 通过 GC-C-IRMS 谱图与
GC/Q-TOF MS 的 TIC 谱图对比确定目标化合物

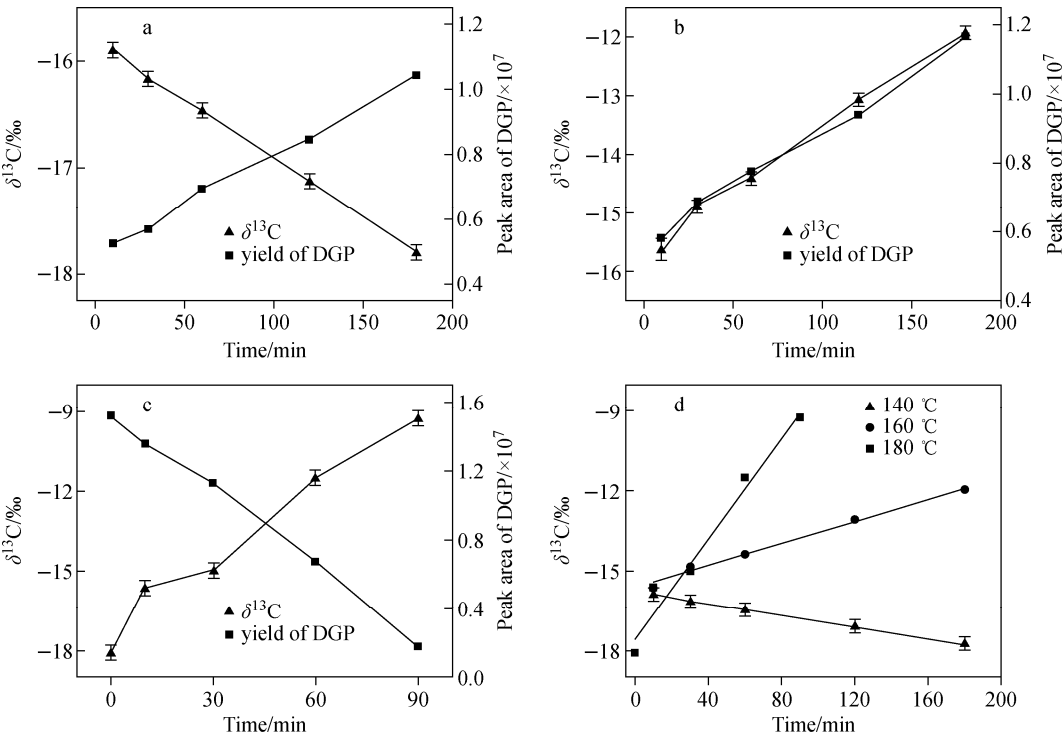
Fig. 3 Identification of the target compound's retention
time by comparing the GC-C-IRMS spectra
with the TIC spectra of GC/Q-TOF MS

2.3 葡萄糖液化中间产物 1,4;3,6-二脱水- α -d-吡喃葡萄糖的碳稳定同位素分析

采用 GC-C-IRMS 法测定葡萄糖在 140、160、180 °C 温度下分别液化反应不同时间的中间产物 DGP 分子的碳稳定同位素($\delta^{13}\text{C}$)。液化过程中,DGP 含量及其分子 $\delta^{13}\text{C}$ 值的变化曲

线示于图 4,可见,反应温度的不同不仅影响液化产物中的 DGP 含量,还影响 DGP 分子的 $\delta^{13}\text{C}$ 值。液化温度为 140 °C 时,随着反应时间的延长,液化产物中 DGP 含量逐渐升高,而 DGP 分子的 $\delta^{13}\text{C}$ 值逐渐降低,示于图 4a。这是由于在葡萄糖经 DGP 液化生成乙酰丙酸乙酯的过程中,反应 a 仅发生脱水反应,因此在较低温度下即可完成;在反应 b 过程中,由于要进行脱羧、重排异构化等反应,需要较高的反应活化能,因此需要较高的反应温度,从而最终导致 DGP 含量不断升高,示于图 5(1)。另一方面,在化学反应过程中,同位素(含轻同位素和重同位素的分子)之间存在能量差异,并且含轻同位素分子反应所需的活化能要低于含重同位素分子^[29],即动力学同位素效应。一般情况下,在任何一个单向、不可逆的化学反应过程中^[20,30],含轻同位素分子优先反应会导致反应物同位素比值逐渐增大,相应地,反应物的同位素比值逐渐减小。因此在较低温度时,随着中间产物 DGP 含量的提高,DGP 分子的碳稳定同位素比值逐渐降低。

当温度升高至 160 °C 时,液化产物中的 DGP 含量依旧逐渐升高,相应地,DGP 分子的 $\delta^{13}\text{C}$ 值也逐渐升高,示于图 4b。这可能是由于随着温度升高,反应 a 和 b 的速率常数均有所提高,但反应 b 的速率常数仍然小于反应 a,导致中间产物 DGP 含量逐渐增多,示于图 5(1)。反应温度的升高使反应 b 过程中所伴随的动力学同位素效应显现出来,并且与反应 a 相比,反应 b 的碳稳定同位素动力学效应更加显著。此外,在 DGP 的进一步降解过程中,在路径 c 中,DGP 生成 5-羟甲基糠醛的过程仅发生脱水、重排异构化等反应;在路径 d 中,DGP 直接生成乙酰丙酸,不仅发生脱水、重排异构化等反应,还会发生脱羧反应,直接导致 d 路径的碳稳定同位素动力学效应较 c 路径更加显著^[31],示于图 5(2)。因此,中间产物 DGP 中的轻同位素分子优先反应生成乙酰丙酸乙酯时,DGP 分子的 $\delta^{13}\text{C}$ 值逐渐增大。当液化温度升至 180 °C 时,在葡萄糖生成乙酰丙酸乙酯的过程中,由于反应 b 的速率常数和动力学同位素效应均明显大于反应 a,从而导致 DGP 含量逐渐降低的同时,其分子的 $\delta^{13}\text{C}$ 值也逐渐



注:a. 140 °C ; b. 160 °C ; c. 180 °C ; d. 温度对 DGP $\delta^{13}\text{C}$ 值的影响

图 4 不同液化反应温度下,葡萄糖液化产物中 DGP 的碳稳定同位素比值变化情况
Fig. 4 Variation tendency for carbon stable isotope ratio and the yield of DGP in the process of glucose liquefaction at different temperatures

减小,并且 $\delta^{13}\text{C}$ 值减小的程度明显大于较低温度(160 °C),示于图 4c。

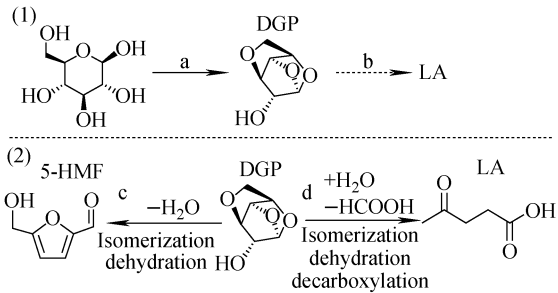


图 5 DGP 的 a 生成路径与 b 降解路径(1)和 DGP 液化生成乙酰丙酸可能经历的两种反应路径(2)
Fig. 5 Generation path a and degradation path b of DGP (1) and two different reaction pathways of DGP further liquefied into levulinic acid (2)

分别对不同温度下采集的 DGP 碳稳定同位素比值进行线性拟合,发现较低温度时,DGP 分子的碳稳定同位素会出现贫化,即 $\delta^{13}\text{C}$ 值降低;当温度较高时,DGP 分子的碳稳定同位素会出

现不同程度的富集,并且温度越高,富集程度越大,示于图 4d。在较低温度(140 °C)时,DGP 的 $\delta^{13}\text{C}$ 值从恒温反应 10 min 时的 $(-15.89 \pm 0.08)\text{‰}$ 降至恒温反应 180 min 时的 $(-17.79 \pm 0.09)\text{‰}$,此时,DGP 分子在液化过程中的碳稳定同位素富集值为 -1.90‰ ,即 DGP 出现碳稳定同位素贫化。当反应温度分别升高至 160 °C 和 180 °C 时, $\delta^{13}\text{C}$ 值均表现出不同程度的增大趋势。其中,当液化温度为 160 °C 时,DGP 的 $\delta^{13}\text{C}$ 值从恒温反应 10 min 时的 $(-15.66 \pm 0.17)\text{‰}$ 增加到反应 180 min 时的 $(-11.95 \pm 0.09)\text{‰}$;在 180 °C,DGP 的 $\delta^{13}\text{C}$ 值从恒温反应 0 min 时的 $(-18.09 \pm 0.16)\text{‰}$ 增加到反应 90 min 时的 $(-9.26 \pm 0.06)\text{‰}$,二者的碳稳定同位素富集值分别为 3.71‰和 8.83‰,随液化温度的升高而增大。

2.4 1,4;3,6-脱水- α -D-吡喃葡萄糖在反应过程中的碳稳定同位素分馏特征

为了比较 DGP 在不同液化温度下的碳稳定同位素富集程度,根据瑞利方程(Rayleigh

equation)^[32],即式(1),对 DGP 在液化反应过程中的转化程度和相应碳稳定同位素组成的线性回归拟合,相关系数 R^2 越接近 1,说明反应过程中的同位素分馏越符合瑞利分馏模型,拟合直线的斜率即为反应过程相应的碳稳定同位素富集因子 $\epsilon(\text{‰})$,其不确定度为 95% 置信区间的统计误差。考虑到 DGP 作为中间产物参与到液化过程中,在本实验中,转化率 f 的计算方式示于式(2):

$$f = C_t / C_{\max}$$

(2)

其中, C_t 指恒温液化 t 时间内 DGP 含量; $C_{\max}$ 指葡萄糖在该温度恒温液化时,中间产物 DGP 含量的最大值。利用瑞利方程计算碳稳定同位素富集因子时,强制瑞利曲线过原点对富集因子进行校正^[33]。

在 140、160、180 °C 下,分别绘制葡萄糖液化产物中单体化合物 DGP 碳稳定同位素的瑞利分馏曲线,示于图 6。不同液化温度的碳稳定同位素富集因子列于表 3。可以看出,图 6 中所有拟合直线的相关系数 R^2 均不小于 0.953 2,表明葡萄糖在酸催化液化过程中,其中间产物 DGP 的碳稳定同位素分馏遵循瑞利方程。此外,液化温度越高,液化过程中 DGP 分子的碳稳定同位素富集因子越大,180 °C 时的富集因子最大,为 $(0.32 \pm 0.03)\text{‰}$,而 140 °C 时的富集因子最小,为 $(-0.44 \pm 0.05)\text{‰}$ 。这是由于液化温度越高,中间产物 DGP 越有利于发生脱羧反应生成乙酰丙酸乙酯,从而 DGP 分子的碳稳定同位素富集因子越大;相反地,

当反应温度较低时,越有利于葡萄糖脱水转化生成 DGP,而使其碳稳定同位素发生贫化,即碳稳定同位素富集因子表现为负。这说明在复杂反应体系中,CSIA 技术依旧可以分析辨别单向不可逆反应,并且依据特定元素的同位素富集因子判别反应中发生的化学键断裂情况,辅助判别该单向多步骤反应中所发生的反应类型。

表 3 不同温度下,DGP 碳稳定同位素比值的瑞利分馏参数

Table 3 Rayleigh fractionation parameters of DGP carbon isotopeat different temperature

温度 Temperature/ °C	相关系数 Correlation coefficients(R^2)	分馏因子 Fractionation factor/ ‰
140	0.9532	-0.44 ± 0.05
160	0.9816	0.17 ± 0.01
180	0.9592	0.32 ± 0.03

3 结论

建立了 GC-C-IRMS 测定葡萄糖液化产物中特定目标化合物碳稳定同位素比值的分析方法,在该条件下,分析得到的单体化合物 $\delta^{13}\text{C}$ 值的标准偏差均小于 0.3‰ ,在仪器测试允许的误差范围内,符合该仪器分析测试要求。利用 CSIA 技术初步研究了葡萄糖在不同反应温度下催化液化制备乙酰丙酸乙酯过程,中间产物 DGP 具有明显不同的碳稳定同位素富集值,并且具有典型的分馏特征。在葡萄糖液化过程中,中间产物 DGP 发生显著的碳稳定同位素分馏,表明 DGP 在反应生成乙酰丙酸乙酯过程中较 DGP 生成过程具有更显著的碳动力学同位素效应,说明 DGP 在进一步降解过程中发生明显的 C—O、C—C、C—H 键断裂或形成,即 DGP 可能通过脱羧异构化等反应而不经历 5-羟甲基糠醛直接生成乙酰丙酸。单体碳稳定同位素分析技术可以为葡萄糖液化机理的研究提供更多的信息,提高反应机理研究的准确性和可靠性,稳定同位素比值分析可为复杂反应体系的机理研究提供思路。

参考文献:

[1] 张俊姣,廖航涛,强陆,张阳,董长青. 果糖低温

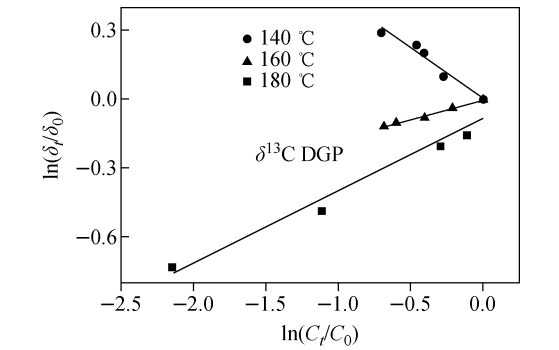


图 6 葡萄糖液化产物中 DGP 碳稳定同位素瑞利分馏特征

Fig. 6 Rayleigh fractionation characteristics of DGP carbon isotopein glucose liquefaction products

- 快速热解制备糠醛的机理研究[J]. 燃料化学学报, 2013, 41(11): 1 303-1 309.
- ZHANG Junjiao, LIAO Hangtao, QIANG Lu, ZHANG Yang, DONG Changqing. Mechanistic study on low-temperature fast pyrolysis of fructose to produce furfural[J]. Journal of Fuel Chemistry and Technology, 2013, 41(11): 1 303-1 309(in Chinese).
- [2] ZOU X, ZHU C, WANG Q, YANG G. Catalytic dehydration of hexose sugars to 5-hydroxymethylfurfural[J]. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 2019, 13(1): 153-173.
- [3] QIAO Y, THEYSSEN N, HOU Z. Acid-catalyzed dehydration of fructose to 5-(hydroxymethyl) furfural[J]. Recyclable Catalysis, 2015, 2(1): 1-22.
- [4] DENG L, LI J, LAI D M, FU Y, GUO Q X. Catalytic conversion of biomass-derived carbohydrates into gamma-valerolactone without using an external H₂ supply[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2009, 48(35): 6 529-6 532.
- [5] QI L, HORVÁTH I T. Catalytic conversion of fructose to γ -valerolactone in γ -valerolactone[J]. ACS Catalysis, 2012, 2(11): 2 247-2 249.
- [6] PILEIDIS F D, TITIRICI M M. Levulinic acid biorefineries: new challenges for efficient utilization of Biomass[J]. Chem Sus Chem, 2016, 9(6): 562-582.
- [7] MIKA L T, CSEFALVAY E, NEMETH A. Catalytic conversion of carbohydrates to initial platform chemicals: chemistry and sustainability [J]. Chem Rev, 2018, 118(2): 505-613.
- [8] HU B, LU Q, WU Y T, ZHANG Z X, CUI M S, LIU D J, DONG C Q, YANG Y P. Catalytic mechanism of sulfuric acid in cellulose pyrolysis: a combined experimental and computational investigation[J]. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 2018, 134: 183-194.
- [9] ZHANG J, WEITZ E. An in situ NMR study of the mechanism for the catalytic conversion of fructose to 5-hydroxymethylfurfural and then to levulinic acid using ¹³C labeled d-fructose[J]. ACS Catalysis, 2012, 2(6): 1 211-1 218.
- [10] SHI K, PEDERSEN C M, GUO Z, LI Y, ZHENG H, QIAO Y, HU T, WANG Y. NMR studies of the tautomer distributions of d-fructose in lower alcohols/DMSO-d₆[J]. Journal of Molecular Liquids, 2018, 271: 926-932.
- [11] WANG Y, YANG X, ZHENG H, LI X, ZHU Y, LI Y. Mechanistic insights on catalytic conversion fructose to furfural on beta zeolite via selective carbon-carbon bond cleavage[J]. Molecular Catalysis, 2019, 463: 130-139.
- [12] QIAO Y, PEDERSEN C M, HUANG D, GE W, WU M, CHEN C, JIA S, WANG Y, HOU X. NMR study of the hydrolysis and dehydration of inulin in water: comparison of the catalytic effect of lewis acid SnCl₄ and brønsted acid HCl [J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2016, 4(6): 3 327-3 333.
- [13] PEPI F, RICCI A, GARZOLI S, TROIANI A, SALVITTI C, DI RIENZO B, GIACOMELLO P. A mass spectrometric study of the acid-catalysed d-fructose dehydration in the gas phase[J]. Carbohydr Res, 2015, 413: 145-150.
- [14] AKIEN G R, QI L, HORVATH I T. Molecular mapping of the acid catalysed dehydration of fructose[J]. Chem Commun (Camb), 2012, 48 (47): 5 850-5 852.
- [15] SVENNINGSEN G S, KUMAR R, WYMAN C E, CHRISTOPHER P. Unifying mechanistic analysis of factors controlling selectivity in fructose dehydration to 5-hydroxymethylfurfural by homogeneous acid catalysts in aprotic solvents [J]. ACS Catalysis, 2018, 8(6): 5 591-5 600.
- [16] GUO K, GUAN Q, XU J, TAN W. Mechanism of preparation of platform compounds from lignocellulosic biomass liquefaction catalyzed by brønsted acid: a review[J]. Journal of Bioresources and Bioproducts, 2019, 4(4): 202-213.
- [17] WU L, CHLADKOVA B, LECHTENFELD O J, LIAN S, SCHINDELKA J, HERRMANN H, RICHNOW H H. Characterizing chemical transformation of organophosphorus compounds by ¹³C and ²H stable isotope analysis[J]. Sci Total Environ, 2018, 615: 20-28.
- [18] WANNER P, PARKER B L, CHAPMAN S W, LIMA G, GILMORE A, MACK E E, ARAVENA R. Identification of degradation pathways of chlorohydrocarbons in saturated low-permeability sediments using compound-specific isotope analysis[J]. Environmental Science & Technology, 2018, 52(13): 7 296-7 306.
- [19] ELSNER M, IMFELD G. Compound-specific

- isotope analysis (CSIA) of micropollutants in the environment-current developments and future challenges[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2016, 41: 60-72.
- [20] NIJENHUIS I, RICHNOW H H. Stable isotope fractionation concepts for characterizing biotransformation of organohalides[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2016, 41: 108-113.
- [21] KUNTZE K, KOZELL A, RICHNOW H H, HALICZ L, NIJENHUIS I, GELMAN F. Dual carbon-bromine stable isotope analysis allows distinguishing transformation pathways of ethylene dibromide[J]. *Environ Sci Technol*, 2016, 50 (18): 9 855-9 863.
- [22] VANDERSTEEN A A, HOWE G W, SHERWOOD LOLLAR B, KLUGER R. Carbon kinetic isotope effects and the mechanisms of acid-catalyzed decarboxylation of 2,4-dimethoxybenzoic acid and CO₂ incorporation into 1,3-dimethoxybenzene[J]. *J Am Chem Soc*, 2017, 139(42): 15 049-15 053.
- [23] PACHECO J J, LABINGER J A, SESSIONS A L, DAVIS M E. Route to renewable PET: reaction pathways and energetics of diels-alder and dehydrative aromatization reactions between ethylene and biomass-derived furans catalyzed by lewis acid molecular sieves[J]. *ACS Catalysis*, 2015, 5(10): 5 904-5 913.
- [24] PALAU J, SHOUAKAR-STASH O, HUNKELER D. Carbon and chlorine isotope analysis to identify abiotic degradation pathways of 1,1,1-trichloroethane[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(24): 14 400-14 408.
- [25] MA Y, TAN W, WANG K, WANG J, JIANG J, XU J. An insight into the selective conversion of bamboo biomass to ethyl glycosides[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2017, 5(7): 5 880-5 886.
- [26] FENG J, JIANG J, XU J, YANG Z. One-step method to produce methyl-D-glucoside from lignocellulosic biomass[J]. *RSC Advances*, 2015, 5(48): 38 783-38 791.
- [27] MARIOTTI A, GERMON J C, HUBERT P, KAISER P, LETOLLE R, TARDIEUX A, TARDIEUX P. Experimental determination of nitrogen kinetic isotope fractionation: some principles; illustration for the denitrification and nitrification processes[J]. *Plant and Soil*, 1981, 62 (3): 413-430.
- [28] COPLEN T B, BRAND W A, GEHRE M, GRÖNING M, MEIJER H A J, TOMAN B, VERKOUTEREN R M. New guidelines for $\delta^{13}\text{C}$ measurements[J]. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(7): 2 439-2 441.
- [29] SWIDEREK K, PANETH P. Binding isotope effects[J]. *Chem Rev*, 2013, 113(10): 7 851-7 879.
- [30] ELSNER M. Stable isotope fractionation to investigate natural transformation mechanisms of organic contaminants: principles, prospects and limitations[J]. *J Environ Monit*, 2010, 12(11): 2 005-2 031.
- [31] ELSNER M, ZWANK L, HUNKELER D, SCHWARZENBACH R P. A new concept linking observable stable isotope fractionation to transformation pathways of organic pollutants [J]. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39(18): 6 896-6 916.
- [32] BREUKELLEN B M V. Extending the rayleigh equation to allow competing isotope fractionating pathways to improve quantification of biodegradation[J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41: 4 004-4 010.
- [33] JULIEN M, GILBERT A, YAMADA K, ROBINS R J, HOHENER P, YOSHIDA N, REMAUD G S. Expanded uncertainty associated with determination of isotope enrichment factors: comparison of two point calculation and Rayleigh-plot [J]. *Talanta*, 2018, 176: 367-373.