

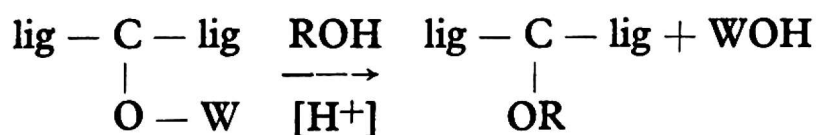
## METODY IZOLOWANIA I BADANIA KOMPLEKSÓW LIGNINOWO-WĘGLOWODANOWYCH

*Božena Košíková*

Instytut Chemii Słowackiej Akademii Nauk w Bratysławie

W naszym laboratorium od 1961 r. zajmujemy się systematycznie problemem wyodrębniania i badania własności kompleksów ligninowo-węglowodanowych (L—W). Wiele prac stanowi wkład do oznaczania ligniny, wyjaśniania jej charakteru *in situ* oraz reakcji przebiegających podczas jej wyodrębniania.

Badanie warunków acydolizy drewna świerkowego, topolowego i bukowego w metanolu pod kątem wpływu rodzaju i stężenia katalizatora, temperatury reakcji i czasu [9] potwierdziło przewidywany przez Schuerchoma mechanizm wiązania kompleksów ligninowo-węglowodanowych:



lig — makrocząsteczka ligniny,

W — węglowodany,

R — alkil.

Z obliczeń kinetycznych reakcji wynika, że metanoliza uwalnia sacharydy z cząstek ligniny prawdopodobnie mniej skondensowanej (w przypadku świerku 1/3, w przypadku topoli i buka 2/3 ligniny Klasona) wg mechanizmu reakcji pseudomonomolekularnej. Stałe szybkości (tab. 1) wskazują, że stosunek szybkości ekstrakcji ligniny z poszczególnych rodzajów drewna — świerk : topola : buk wyraża się proporcją 4 : 3 : 2, co związane jest z różnicami strukturalnymi ligniny i ich różną zdolnością do kondensacji. Z tych wyników można wyprowadzić ogólne wnioski także odnośnie przebiegu innych procesów chemicznego przerobu drewna, łącznie z delignifikacją.

Tabela 1

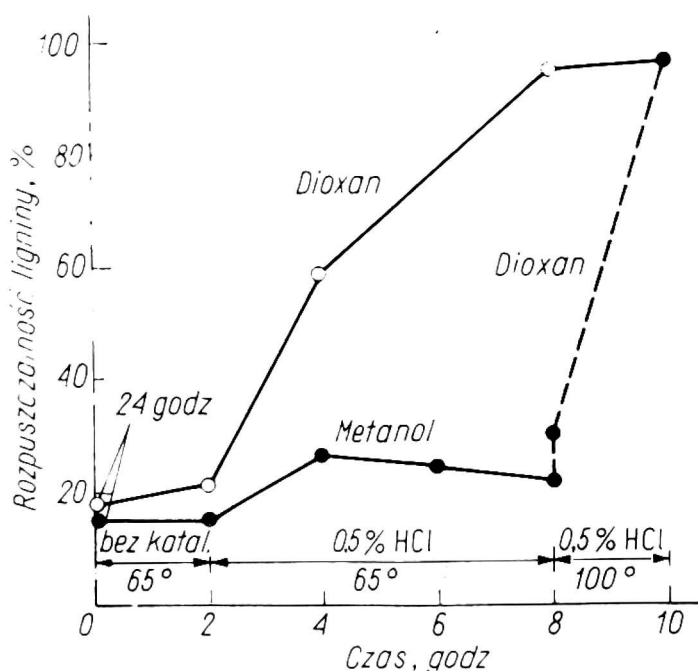
Stałe szybkości reakcji i energie aktywacji uwalniania ligniny i cukrów w czasie acydolizy drewna

Rodzaj drewna	Lignina		Cukry	
	stała szybkości $\text{min}^{-1}$	energia aktywacji cal	Stała szybkości $\text{min}^{-1}$	energia aktywacji cal
Świerk	$23 \cdot 10^{-4}$	11 000	$1,4 \cdot 10^{-4}$	10 400
Topola	$47 \cdot 10^{-4}$	12 800	$10 \cdot 10^{-4}$	12 800
Buk	$36 \cdot 10^{-4}$	11 400	$14 \cdot 10^{-4}$	11 300

Określenie mas cząsteczkowych izolowanych metanololignin, w różnych przedziałach czasu acydolizy drewna świerkowego, metodą osmometrii wykazało, że ciężar cząsteczkowy izolowanej ligniny zwiększa się w granicach 840-4500, prawdopodobnie w następstwie nieodwracalnych reakcji kondensacji ligniny za pośrednictwem grup funkcyjnych uwalnianych przez acydolizę.

Badając odporność ligniny na acydolizę w środowisku metanolu wykonano podobne doświadczenia z użyciem dioxanu [7]. Szybkość hydrolyzy ligniny była w tym przypadku dużo wyższa ( $k = 54 \cdot 10^{-4} \text{min}^{-1}$ ). W serii doświadczeń badano wpływ funkcji kwasowości Hammeta, parametru rozpuszczalności i kondensacji ligniny na efektywność dioxanu i metanolu, przy czym stwierdzono, że acydoliza w dioxanie jest około dwukrotnie efektywniejsza niż w metanolu. Najważniejszym czynnikiem okazała się ograniczona rozpuszczalność skondensowanej ligniny w metanolu (rys. 1).

Bilans materiałowy ligniny w przebiegu acydolizy drewna świerkowego (tab. 2) oraz oznaczenia zawartości grup metoksyłowych w ligninie i analiza chromatograficzna izolowanej ligniny wykazują, że lignina wyizolowana na drodze acydolizy w metanolu, a także w dioxanie, reprezen-



Rys. 1. Przebieg acydolizy drewna w środowisku metanolu i dioxanu

Tabela 2

Bilans materiałowy ligniny w procesie acydolizy drewna świerkowego w dioksanie

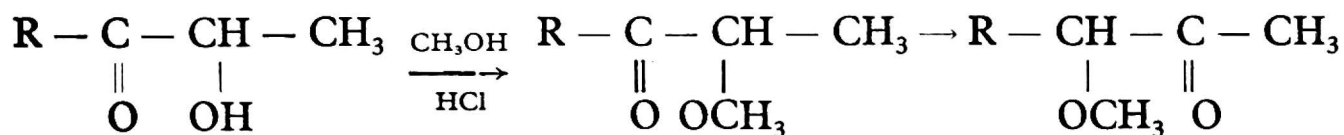
Czas acydolizy	-OCH <sub>3</sub> w pozostałości trocin po acydolizie, w % pierw- wotnej od- ważki	Lignina Klasona w pozosta- łości drewna po acydoli- zie %	Całkowita wyekstra- howana lignina  w % pierwotnej odważki	Cukry w wy- ekstrahowa- nej ligninie	Czysta wy- ekstrahowa- na lignina	Stosunek ligniny do cukrów
5 min	5,19	26,88	5,62	3,60	2,02	0,56
30 min	4,27	21,02	11,42	3,54	7,88	2,22
1 godz	3,58	18,66	14,80	4,56	10,24	2,24
2 „	2,86	14,63	20,63	6,36	14,27	2,24
4 „	2,26	10,79	26,51	8,40	18,11	2,15
8 „	1,36	7,66	30,70	9,46	21,24	2,24
16 „	0,98	4,57	33,75	9,42	24,33	2,58
24 „	0,78	3,54	34,40	9,04	25,36	2,80

tuje sobą kompleksy, w których stosunek ligniny do sacharydów zmienia się w zależności od czasu acydolizy. Doświadczenie to jest obecnie uogólnione w tym sensie, że wszystkie preparaty ligninowe (BNL, MWL, lignina enzymatyczna) zawierają pewne składniki sacharydowe, których nie można oddzielić przez frakcjonowanie; są to zatem kompleksy ligninowo-sacharydowe o wysokim stosunku ligniny do węglowodanów.

Do oceny acydolizy zastosowano oprócz metod klasycznych spektrofotometrię w ultrafiolecie, np. do oznaczania fenolowych nie sprzężonych grup wodorotlenowych. Zastosowanie spektrofotometrii w podczerwieni umożliwiło ilościowe oznaczenie ligniny w materiale drzewnym w czasie metanolizy, jak również w ekstraktach, przez pomiar pasma absorpcji  $1515\text{ cm}^{-1}$  (metodą linii podstawowej) odpowiadającego aromatycznym drganiom szkieletu w widmach w podczerwieni tych produktów [1] oraz śledzenie kondensacji fenylopropanowych jednostek ligniny szczątkowej w drewnie podczas powstawania układu flawonowego lub kumaronowego.

Techniką spektrometrii w podczerwieni potwierdzono obecność w ligninie grup karbonylowych, jak również ich przegrupowanie w czasie acydolizy w środowisku metanolu, ewentualnie dioxanu [2]. Na podstawie tych wyników, uzupełnianych specyficznymi reakcjami karbonyli i doświadczeniami z substancjami modelowymi, można powiedzieć, że podczas gdy w protoligninie i ligninach izolowanych w warunkach umiarkowanych (BNL, MWL) przeważa powstawanie grup karbonylowych w położeniu  $\alpha$  w stosunku do pierścienia benzenowego, to w czasie acydolizy następuje przegrupowanie karbonyli z położenia  $\alpha$  w położenie  $\beta$ , które jest poło-

żeniem „normalnym” w związkach z 1,2-hydroksykarbonylową strukturą:



Ze względu na złożoność badania wiązań ligniny z sacharydami w tak niejednorodnym układzie, jakim jest drewno i na fakt, że ligniny wyizolowane na drodze acydolizy zawierają określoną ilość cukrów, postanowiono zająć się problematyką izolowania frakcji kompleksów ligninowo-sacharydowych z materiałów roślinnych takim sposobem, ażeby zachowane zostały pierwotne wiązania obydwóch składników, dzięki czemu byłby uzyskiwany odpowiedni materiał wyjściowy do badania charakteru wiązań ligninowo-sacharydowych. Opracowana przez nas metoda izolacji kompleksów ligninowo-sacharydowych oparta jest na alkilacji drewna, dzięki czemu osiąga się jego częściową rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych [3]. Przez chromatograficzny rozdział rozpuszczalnych frakcji alkilowanego drewna uzyskano jednorodne frakcje, zawierające ligninę i cukry, które badano pod względem charakteru wiązania ligniny z cukrami. Zaletą podanego sposobu jest zastosowanie umiarkowanych warunków izolacji, w których nie dochodzi do zmian uwzględnionych typów wiązań (eterowe, glikozydowe, acetalowe), co potwierdzono na substancjach modelowych.

Przez powtórny metylację drewna świerkowego dwuazometanem można uzyskać tylko część ligniny (5%) w formie kompleksu ligninowo-węglowodanowego. Badania stabilności w ten sposób wyizolowanego zespołu, wobec zasad i kwasów, techniką spektrofotometrii UV i IR wskazują na obecność wiązań typu aryloglikozydowego pomiędzy ligniną a sacharydami [4].

Ilość ekstraktu kompleksów L-W udało się zwiększyć wprowadzając kombinację molekularnego mielenia z alkilacją [6]. Mechaniczna degradacja drewna świerkowego, z 0,1-0,5 mm na 20-50  $\mu\text{m}$ , w sposób istotny przyspieszyła jego metylację i zwiększyła rozpuszczalność metylowanego produktu. Z drewna świerkowego zmielonego wstępnie w młynie wibracyjnym, a następnie metylowanego dwuazometanem i siarczanem metylu uzyskano w przybliżeniu 20% ligniny w postaci kompleksów L-W. Wyizolowane kompleksy poddane hydrolizie zasadowej i kwaśnej, analizie chromatograficznej i spektrofotometrycznej w ultrafiolecie i podczerwieni, wykazały własności podobne do własności zespołów wyizolowanych z nie mielonego drewna. Pewne różnice w stosunku ligniny do cukrów wskazują, że mielenie wibracyjne obniża zawartość polisacharydów w kompleksach.

Metodę izolacji kompleksów ligninowo-węglowodanowych, opartą na alkilacji drewna, zmodyfikowano ostatnio w ten sposób, że materiał drze-

wny poddaje się acetylowaniu; otrzymuje się wówczas frakcje acetylowanego drewna rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych. W zmodyfikowanym sposobie nie dochodzi do rozszczepienia zakładanych typów wiązań, co sprawdzono na modelach, a frakcje uzyskuje się w większej ilości.

Interpretacja widm NMR substancji modelowych reprezentujących ligninę, sacharydy i kompleksy L-W umożliwiła ocenę kompleksowych widm dyfuzji kompleksów ligninowo-sacharydowych izolowanych z alkilowanego drewna bukowego i uzyskanie danych o ich strukturze [5]. Obecność ligniny w wyizolowanym kompleksie widoczna jest z sygnałów związanych z pierścieniem aromatycznym i aromatycznymi grupami metoksyłowymi, podczas gdy bardzo intensywne sygnały alifatycznych grup metoksyłowych charakteryzują głównie sacharydy. Widma NMR wskazują na syryngilową strukturę izolowanego zespołu oraz na stosunek ligniny do sacharydów równy 2:1, co zgadza się z wartością uzyskaną podczas ilościowej analizy ligniny w kompleksach metodą spektrofotometrii w podczerwieni.

Następną zaletą zmodyfikowanej metody izolowania kompleksów L-W jest fakt, że acetylowane pochodne dają więcej informacji o charakterze grup hydroksyłowych w widmie NMR, niż pochodne metylowe. Strukturę dwóch frakcji ligninowo-sacharydowych wyizolowanych z acetylo-

Tabela 3

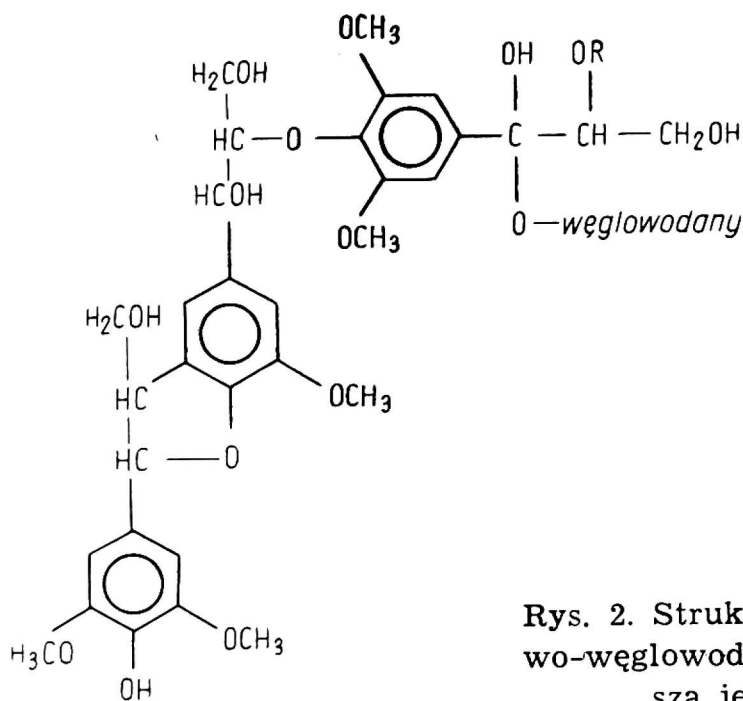
Obszary chemicznych przesunięć protonów w acetylowanych ligninach i frakcjach ligninowo-węglowodanowych

Obszar	Typ protonów	$\delta$	Względny stosunek liczby protonów do protonów aromatycznych			
			lignina Braunsa	metanolo-lignina	frakcja 1	frakcja 2
1	aromatyczne	8,00-6,60	1,00	1,00	1,00	1,00
2	C=C winylowe	6,60-5,86	0,20	—	0,46	0,27
3	H-CH <sub>3</sub>	5,86-5,35	0,17	0,06	0,31	0,33
4	H w łańcuchu bocznym H—1 -H—6*	5,35-3,95	1,13	1,36	2,80	2,80
5	-OCH <sub>3</sub> aromatyczne	3,95-3,60	0,41	0,64	0,57	0,46
6	H w łańcuchu bocznym CH <sub>2</sub> *	3,60-3,40	0,27	0,47	0,31	0,60
7	-OCH <sub>3</sub> alifatyczne	3,40-3,00	—	0,28	0,12	0,18
8	-OAc aromatyczne	2,48-2,15	0,21	0,18	0,27	0,29
9	-OAc alifatyczne	2,15-1,75	0,47	0,38	1,43	1,38
Aromatyczne OH			0,62	0,82	0,84	0,75
Alifatyczne OH			0,47	0,66	1,55	1,56
Aromatyczne OH : alifatyczne OH			1:0,76	1:0,80	1:1,85	1:1,96

\*Protony w cukrach.

wanego drewna bukowego zbadano metodą spektroskopii NMR stosując acetylowaną ligninę i modelowe związki dwóch typów wiązań: acetalowego i glikozydowego [8]. W tabeli 3 zestawiono wartości  $\delta$  sygnałów protonów ligniny acetylowanej (BNL i metanololigniny) i niskocząsteczkowych frakcji ligninowo-sacharydowych, co pozwala jednoznacznie identyfikować sygnały aromatycznych acetoksylowych grup przy  $\delta = 2,26$  i alifatycznych acetoksylowych grup zlokalizowanych w strefie  $\delta = 2$ . Podobnie można odróżnić w widmie protony związane w aromatycznych i alifatycznych grupach metoksylowych. Sygnały protonów łańcucha bocznego ( $\delta = 4-5$ ) w określonym stopniu nakładają się z sygnałami protonów pierścienia piranowego sacharydów.

Ocena ilościowa tych widm umożliwiła określenie całkowitej liczby protonów w pierścieniu aromatycznym i protonów alifatycznych łańcucha bocznego oraz pierścienia piranowego. Ponadto z zawartości protonów metoksylowych i acetoksylowych można obliczyć względny stosunek aromatycznych fenolowych grup hydroksylowych i wszystkich alifatycznych grup hydroksylowych przypadający na jeden proton pierścienia aromatycznego.



Rys. 2. Struktura kompleksów ligninowo-węglowodanowych: R = H lub dalsza jednostka ligninowa

Z ilościowej analizy całkowitej liczby protonów w pierścieniu aromatycznym oraz ze względnego stosunku aromatycznych fenolowych grup hydroksylowych i wszystkich alifatycznych grup hydroksylowych w obydwóch typach produktów, jak i z analizy chromatograficznej wynika, że na trimer zaproponowanej jednostki strukturalnej ligniny (rys. 2) w izolowanych frakcjach kompleksów L-W przypadają trzy jednostki ksylozy. Wynik oznaczenia ciężaru cząsteczkowego izolowanych frakcji — 1560 — jest zgodny ze strukturalną charakterystyką uzyskaną metodą NMR.

Z przedstawionego przeglądu wyników w zakresie chemii drewna,

uzyskanych głównie przez zastosowanie nowoczesnych metod fizykochemicznych, można wnioskować, że lignina lub określona część ligniny związana jest z hemicelulozami wiązaniem chemicznym. Trudność badania charakteru wiązania jest oczywista, jeżeli uwzględni się różnorodność możliwych wiązań kowalencyjnych wytwarzanych w następstwie przyłączenia polisacharydowych grup hydroksylowych do chinometylowej jednostki makrocząsteczki ligniny oraz niską zawartość tych wiązań wynoszącą w przybliżeniu 1-2% wszystkich wiązań pomiędzy monomerami makrocząsteczki ligniny względnie polisacharydów.

Stosowany obecnie sposób badania chemicznej trwałości wiązań ligninowo-węglowodanowych w stosunku do zasad i kwasów nie daje jednoznacznej możliwości specyficznego oznaczenia typu wiązania. Wiadomo bowiem, że trwałość danego typu wiązania zmienia się w zależności od wielu czynników.

Wyjaśnienie charakteru wiązań ligninowo-węglowodanowych w odpowiednio wybranych substancjach modelowych i izolowanych kompleksach jest obecnie przedmiotem systematycznych badań.

#### LITERATURA

1. Polčín J., Košíková B., Suchý J., Vašátková M.: Chemické zvesti 14, 562, 1962.
2. Polčín J., Košíková B., Šipoš P., Dandárová-Vašátková M., Suchý J.: Chemické zvesti 17, 891, 1963.
3. Košíková B., Polčín J., Dandárová-Vašátková M.: Holzforschung 23, 37, 1969.
4. Košíková B., Polčín J., Dandárová-Vašátková M.: Joniak D.: Holzforschung 23, 43, 1969.
5. Košíková B., Polčín J., Joniak D.: Holzforschung 27, 60, 1973.
6. Košíková B., Drevársky vyskum 18, 83, 1973.
7. Košíková B., Polčín J.: Wood Sci. Techn. 7, 308, 1973.
8. Košíková B., Polčín J., Joniak D.: Cellulose Chem. Techn. 7, 605, 1973.
9. Košíková B., Polčín J.: Holzforschung 26, 125, 1974.

*Б. Кошикова*

#### МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИГНОУГЛЕВОДНЫХ КОМПЛЕКСОВ

#### Резюме

В Институте химии САН с 1961 года систематически занимаются вопросом выделения и определения свойств лигноуглеводных комплексов (ЛУК). Сначала применяли ацидолиз, затем разработали метод основанный на алкилировании древесины с последующим извлечением и разделением растворимых фракций. Удалось увеличить количество извлеченных ЛУК путем комбинирования молекулярного размола с реакцией метилирования.

Лучшие результаты в области выделения ЛУК получили при использовании

ацетилированной древесины. Свойства выделенных ЛУК исследовали с применением: электронной спектроскопии и инфракрасной области, ядерного парамагнитного резонанса и хроматографического анализа. Это создало возможность определить содержание в комплексах ароматического и углеводного компонентов и исследовать их структуру. Перечисленные методы, химические реакции выделенных комплексов, а также аналогичные исследования модельных веществ позволяют определить характер связи лигнина и углеводов.

*B. Košikova*

## METHODS OF ISOLATION AND INVESTIGATION LIGNO-CARBOHYDRATE COMPLEXES

### Summary

At the Institute of Chemistry SAV, systematic investigations have been carried out since 1961 on the problem of isolation ligno-carbohydrate complexes and determination of their properties. These complexes were isolated from wood in different ways. First acidolysis was used, then method of wood alkylation followed by extraction and separation of soluble fractions was developed. It was possible to increase the number of extracted ligno-carbohydrate complexes by combination of molecular grinding with methylation reaction.

Best results in the isolation of ligno-carbohydrate complexes were obtained with acetylated wood. Properties of separated ligno-carbohydrate complexes were tested using following techniques: electron spectrometry, IR spectrometry, NMR spectroscopy, and chromatography. This enabled the determination of the share in these complexes of aromatic and carbohydrate components and gaining information about their structure. These methods and chemical reactions of isolated complexes together with analogical research on model substances are making it possible to determine the character of bondings between lignin and carbohydrates.