

УДК 634.0.813.11:542.943:543:063

Я. Г. МИЛЕШКЕВИЧ, В. М. РЕЗНИКОВ, И. В. СЕНЬКО

Белорусский технологический институт им. С. М. Кирова

МИКРОМЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОДУКТОВ НИТРОБЕНЗОЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИГНИНА ЛИСТВЕННОЙ ДРЕВЕСИНЫ

Поступило 20. IV 1969

Подробно изложен микрометод количественного определения ванилина, сиреневого альдегида, *n*-оксибензальдегида и соответствующих кислот с помощью бумажной хроматографии. Предложенный новый метод определения кислот без предварительной очистки и фракционирования окислительной смеси позволяет получать воспроизводимые результаты. Для хроматографического разделения альдегидов использован известный способ Стоуна и Бленделла, при использовании которого рядом авторов не удалось получить ожидаемых результатов. Приводится подробная техника эксперимента, позволяющая получить надежные результаты при использовании как отечественной, так и зарубежной бумаги. При окислении лигнина Бьёркмана из тополя (*Populus robusta*) найдено: ванилина 12,7%, сиреневого альдегида 24,9%, следы *n*-оксибензальдегида, ванилиновой, сиреневой и *n*-оксибензойной кислот соответственно 2,1; 3,0 и 3,6%. Относительная ошибка определения продуктов окисления не превышает $\pm 2-2,5\%$.

Табл. 1, библи. 10 назв.

В предыдущем сообщении [1] нами был изложен микрометод количественного определения ванилина и ванилиновой кислоты в продуктах щелочного нитробензольного окисления лигнина древесины хвойных пород, исключая стадию выделения и очистки фракций, содержащих альдегиды и кислоты. В настоящей работе эти исследования распространены на более сложные смеси, образующиеся при нитробензольном окислении лигнина лиственной древесины.

Для хроматографического разделения альдегидов использован известный способ Стоуна и Бленделла [2], позволяющий с помощью хроматографии на бумаге выделить непосредственно из окислительной смеси ванилин, сиреневый альдегид и *n*-оксибензальдегид. Рядом авторов [1-6] не удалось получить ожидаемых результатов при работе по этому методу, причем предложенные его модификации [3, 4], хотя и улучшают условия хроматографирования, приводят к весьма существенным потерям альдегидов. Ниже нами приводится подробная техника эксперимента, позволяющая получить надежные результаты при использовании как отечественной, так и зарубежной бумаги.

В основе метода, в части, касающейся анализа кислот, лежит двухступенчатая бумажная хроматография, при которой выделение из смеси искомым веществ достигается их предварительным перемещением в системе бутанол—уксусная кислота—вода ко второму старту. Последующее разделение кислот осуществляется с помощью нисходящей хроматографии в системе бутанол—вода. Альдегиды при этом движутся вблизи фронта растворителя, примыкая к продуктам восстановления нитробензола. Для более совершенного разделения применяется бумага, пропитанная фосфатным буфером [7, 8].

Очень важную роль в разделении как альдегидов в системе лигроин—дибутиловый эфир—вода, так и кислот в насыщенном водой бутаноле играет способ насыщения камеры. Последнее достигается путем помещения в камеру полос бумаги, смоченных нижним слоем, остающимся после приготовления растворителя.

Количественное определение альдегидов и кислот в элюате производится на спектрофотометре СФ-4А в нейтральной среде. Построение калибровочных графиков осуществляется по методике, исключающей ошибки при хроматографии и экстракции веществ из бумаги. С этой целью растворы, служащие для построения калибровочных графиков, приготавливаются в условиях, аналогичных тем, при которых проводилось количественное определение продуктов окисления. Кроме того, в целях получения воспроизводимых результатов необходимо строго стандартизировать условия разделения, высушивания хроматограмм и экстракции. Это в первую очередь относится к альдегидам, обычные потери которых при хроматографировании составляют 4—5%; при длительном или интенсивном высушивании хроматограмм они могут достигать 10—25%. Потери кислот обычно не превышают 3—4%.

При соблюдении изложенных условий относительная ошибка определения, установленная на основании ряда проведенных окислений лигнина Бьёркмана, составила:

для ванилина $\pm 1,5$ —2,0%, для сиреневого альдегида $\pm 1,0$ —1,5%, для ванилиновой и сиреневой кислот $\pm 2,0$ —2,5%, для *n*-оксибензойной кислоты $\pm 1,0$ —2,0%.

В табл. 1 приведены значения R_f и результаты анализа продуктов окисления лигнина Бьёркмана из тополя (*Populus robusta*).

Как видно из табл. 1, значение R_f альдегидов в случае применения отечественных сортов бумаги чрезвычайно низко, поэтому нами использовалась методика нисходящей хроматографии с перетеканием. Указанные значения R_f кислот могут незначительно колебаться в зависимости от рН буфера, степени удаления первого растворителя, температуры окружающего воздуха и других факторов.

ТЕХНИКА ВЫПОЛНЕНИЯ АНАЛИЗА

Нитробензольное окисление. Для нитробензольного окисления может быть использован переоборудованный сушильный шкаф-термостат, в задней стенке которого вмонтирован встряхиватель, обеспечивающий крепление и покачивание автоклава внутри шкафа (например, виброкон типа «Labor»).

В автоклав емкостью 5 мл помещается 35—40 мг лигнина, 0,15 мл нитробензола [9] и 2 мл 2 н. NaOH. В нагретом шкафу быстро закрепляется автоклав и в течение 4—5 мин устанавливается требуемая температура. Смесь нагревается при непрерывном перемешивании в течение 2 ч при 180°. Этот режим, рекомендованный Леопольдом [7, 9], был нами проверен [1] и может быть признан оптимальным. Кроме того, Каванах и Пеннер [10] также показали, что при окислении размолотой основной

Таблица 1

Выход продуктов щелочного нитробензольного окисления лигнина тополя и значения их R_f

Продукты окисления	R_f	Выход, %
Ванилин	0,19	12,7
Сиреневый альдегид	0,05	24,9
<i>n</i> -Оксибензальдегид	0,12	Следы
Ванилиновая кислота	0,50	2,1
Сиреневая кислота	0,39	3,0
<i>n</i> -Оксибензойная кислота	0,66	3,6

древесины максимальный выход альдегидов был получен, когда нагревание осуществлялось в течение 2,5 ч при 170 и 180°.

После быстрого охлаждения содержимое автоклава центрифугируется и сразу же используется для количественного определения.

Хроматографическое разделение альдегидов. *Бумага.* Хорошие результаты по разделению альдегидов получены в случае применения хроматографической бумаги Ленинградской бумажной фабрики № 2 им. Володарского марки С. Применение более плотных зарубежных бумаг несколько облегчает процессы подкисления и разделения, однако при удалении растворителя из бумаги имеют место значительные потери альдегидов.

Для проведения количественных определений используются полоски бумаги размером 12×50 см.

Растворитель. Насыщение камеры. Растворитель — петролейный эфир (100—120°)—дибутиловый эфир—вода (6:1:1) — после встряхивания настаивается в продолжение не менее 24 ч.

Две полоски бумаги 6×50 см, смоченные нижним слоем растворителя, прижимаются к противоположным сторонам внутренней поверхности хроматографической камеры, на дно которой помещен небольшой кристаллизатор с растворителем. Удовлетворительное насыщение достигается через 8—12 ч.

Подкисление. На полоску хроматографической бумаги за 1—2 приема наносится 3 пятна по 5—7 мкл щелочной окислительной смеси. Не допуская подсушивания пятен, бумагу проносят несколько раз в парах кипящей уксусной кислоты до полного осветления пятен. Подкисление можно считать удачным, если после этой операции пятна будут влажными и однородными. При этом обеспечивается полный перевод фенолятов анализируемых альдегидов в подвижную форму фенолальдегидов.

Техника разделения. После операции подкисления бумага подсушивается на воздухе в течение 2 мин, помещается в камеру и закрепляется в лодочке с помощью стеклянной палочки треугольного сечения. После выдерживания хроматограмм в атмосфере камеры в продолжение 30 мин через отверстие в крышке заливается растворитель. Спустя 14—16 ч хроматограммы извлекаются из камеры и сушатся на воздухе около 1 ч.

Положение пятен альдегидов устанавливается по их малоинтенсивной темно-голубой флюоресценции в ультрафиолетовом свете. Контрольная полоска проявляется 2,4-динитрофенилгидразином. Идентификация альдегидов производится по положению «свидетелей».

Хроматографическое разделение кислот. *Бумага.* Для разделения кислот с успехом может быть применена бумага марки М. Лист форматом 14—60 см пропитывается фосфатным буфером рН 7,5—7,8 и высушивается на воздухе. На расстоянии 9 см проводится линия первого старта, на которой наносится рядом 3 пятна с интервалом в 4 см.

Растворители. Насыщение камеры. Первый растворитель — *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5); верхний слой наливается в кристаллизатор и помещается на дно камеры. Размер полос бумаги для насыщения камеры 5×50 см.

Второй растворитель — *n*-бутанол—вода (1:1) — предварительно настанваается в продолжение не менее 1 сут. Насыщение камеры достигается аналогично тому, как при анализе альдегидов. Размер полос для насыщения 12×50 см.

Техника разделения. На полоску хроматографической бумаги наносятся пятна по 20—25 мкл свежееокисленного щелочного раствора. Бумага подсушивается, помещается в камеру с первым растворителем и

выдерживается над ним в течение 2—4 ч, а затем приводится в контакт с растворителем.

После 12—13 ч восходящего хроматографирования полоски подсушиваются на воздухе в течение 30 мин и повторно хроматографируются в продолжение около 6 ч до совмещения линии фронта растворителя с отчерченной ранее меткой. Извлеченные из камеры хроматограммы высушиваются на воздухе (1—2 ч), а затем в токе теплого воздуха (30—40 мин).

Пятно, содержащее смесь альдегидов и кислот, сосредоточивается на втором старте. Оно находится у самого фронта растворителя ($R_f=0,96$) и хорошо заметно по желтой примеси азосоединений.

Хроматограммы помещаются в камеру со вторым растворителем, закрепляются в лодочках и выдерживаются в атмосфере камеры в течение 2,5—4 ч, после чего через отверстие в крышке заливается бутанол, насыщенный водой. Время нисходящего хроматографирования 22—24 ч. Растворитель из бумаги тщательно удаляется высушиванием в токе теплого воздуха.

Положение пятен кислот устанавливается по их темно-голубой флуоресценции в ультрафиолетовом свете, а также путем проявления контрольной полоски диазотированной сульфаниловой кислотой или бис-диазотированным бензидином (для сиреневой кислоты).

Появление на хроматограммах пятна с $R_f=0,6—0,7$ (голубое, светящееся в УФ-свете) можно исключить с помощью трех специальных фигурных вырезов перед линией второго старта (R_f пятна в первом растворителе около 0,8).

Количественное определение продуктов окисления. Все количественные определения проводятся на бумаге, промытой спиртом, методом нисходящей хроматографии.

Построение калибровочного графика. Приготавливается точный спиртовой раствор анализируемого вещества концентрации около 0,8 мг/мл. С помощью микропипеток на листы хроматографической бумаги наносятся различные объемы исходного раствора (от 10 до 50 мкл). Далее проводится хроматографирование с соблюдением ранее выбранных стандартных условий. Время же хроматографирования при этом может быть значительно сокращено.

Пятна альдегидов и кислот, обнаруженные при просмотривании хроматограмм в ультрафиолетовом свете, вырезаются. Вырезанные полосы бумаги размером 3,5×3,5 см измельчаются и помещаются в пробирки с притертыми пробками. Из чистого участка хроматограммы вырезается полоска такого же размера, элюат которой выполняет роль «холостой» пробы. Экстракция производится 5 мл спирта в течение 2—3 ч при непрерывном встряхивании.

Оптическая плотность элюатов определяется при длинах волн, соответствующих максимуму поглощения для каждого из анализируемых веществ: для ванилина 280 мкм, для сиреневого альдегида 308 мкм, для ванилиновой кислоты 252 мкм, для сиреневой кислоты 254 мкм и для п-оксибензойной кислоты 254 мкм. Замеры производятся по отношению к «холостой» пробе. Полученные данные изображаются графически в координатах: концентрация вещества (мкг/мл) — оптическая плотность.

Определение содержания продуктов окисления в лигнине. Обнаруженные на хроматограммах пятна альдегидов и кислот вырезаются, экстрагируются и фотометрируются. Процентное содержание компонента (P) рассчитывается по формуле

$$P = \frac{1075c}{kAV},$$

- где c — концентрация элюата ($мг/мл$), найденная на основании калибровочного графика по оптической плотности, измеренной при толщине слоя 1 см;
 a — навеска лигнина, взятая для окисления, мг;
 V — объем окислительной смеси, нанесенной на хроматограмму, мл;
 k — поправка на содержание углеводов в выделенном лигнине;
1075 — коэффициент пересчета на весь объем окислительной смеси.

ВЫВОДЫ

1. Показана возможность количественного анализа непосредственно в реакционной смеси ванилиновой, сиреневой и *п*-оксибензойной кислот, образующихся при щелочном нитробензольном окислении лигнина тополя.
2. Приведены условия, при которых можно получать воспроизводимые результаты по хроматографическому разделению альдегидов, пользуясь ранее предложенным методом [2].

ЛИТЕРАТУРА

1. Сенько И. В., Резников В. М. — ЖПХ, 40, 1967, 1879.
2. Stone I. E., Blundell M. I. — Anal. Chem., 23, 1951, 771.
3. Pepper I. M., Siddiqueullah M. — Canad. J. Chem., 39, 1961, 390.
4. Кодина Л. А. — ДАН СССР, 129, 6, 1959.
5. Кондо Т., Танака Д. — J. Japan Forest Soc., 37, 1955, 8, 342.
6. Танака Д., Кондо Т. — J. Japan. Wood Res. Soc., 4, 1958, 34.
7. Leopold B. — Acta chem. Scand., 6, 1952, 38.
8. Gardon I. L., Leopold B. — Pulp. a. Paper Mag. Can., 59, 1958, 148.
9. Leopold B. — Acta chem. Scand., 4, 1950, 1523.
10. Kavannagh K. R., Pepper I. M. — Canad. J. Chem., 33, 1955, 24.