

Определение содержания леволиновой кислоты бумажной хроматографией

В. М. Резников, Г. С. Василевская, И. И. Савина

Белорусский технологический институт им. С. М. Кирова

Древесные гидролизаты содержат довольно сложную смесь органических кислот. Они могут быть подразделены на две группы: летучие (муравьиная, уксусная) и нелетучие (леволиновая, возможно, янтарная и др. [1]). Содержание индивидуальных кислот знать необходимо, так как при биохимической переработке гидролизатов органические кислоты утилизируются дрожжами различно [2].

Между тем в гидролизной промышленности до сих пор при оценке доброкачественности гидролизатов определяется только общее содержание органических кислот в пересчете на уксусную или серную кислоту. Поэтому большой интерес представляет разработка методов анализа индивидуальных кислот при их совместном нахождении.

Химические методы определения содержания индивидуальных органических кислот в гидролизатах трудосмки и недостаточно точны [3]. В то же время современные методы хроматографического анализа позволяют относительно просто индивидуализировать состав весьма сложных смесей кислот.

В настоящей статье излагается разработанная авторами методика количественного определения леволиновой кислоты в древесных гидролизатах. Для модельных опытов использовалась леволиновая кислота, полученная по Маккензи [4] и очищенная двукратной перегонкой в вакууме. При повторной перегонке отбиралась фракция с $t_{кип} = 158^{\circ}\text{C}$ при 12 мм рт. ст. Очищенная таким образом леволиновая кислота при охлаждении превращалась в бесцветные игольчатые кристаллы с $t_{пл} = 33,5^{\circ}\text{C}$.

Хроматография осуществлялась на бумаге марок М и В Ленинградской бумажной фабрики № 2. В соответствии с литературными данными [5] были подобраны и экспериментально проверены три смеси растворителей: н. бутанол, этанол и 3 н. водный раствор аммиака (1 : 1 : 1); этанол, вода и аммиак (95 : 5 : 1); н. бутанол и 1,5 н. водный раствор аммиака (1 : 3).

Проявителем служил солянокислый раствор 2,4-динитрофенилгидразина и 0,05%-ный этанольный раствор бромтимолового синего. Первый дает оранжевое пятно на светло-желтом поле (идентифицирует карбонильные группы), второй — желтое пятно на синем поле (используется для открытия карбоксильных групп).

Количественное определение леволиновой кислоты в элюате проводилось титрованным раствором фенолфталеината натрия. Последний приготавливался следующим образом. 5 г фенолфталеина растворяли при кипячении в 100 мл 20%-ного раствора Na_2CO_3 и затем упаривали досуха на водяной бане. Фенолфталеинат многократно извлекался 90%-ным этанолом. Спиртовые вытяжки объединяли, спирт отгоняли, а сухой остаток повторно растворяли в этаноле. После отделения не растворимых в спирте веществ экстракт опять упаривали досуха. Порошок фенолфталеината сохраняли в герметичной посуде.

Для приготовления титрованного раствора 0,35 г фенолфталеината растворяли в 1 л дважды перегнанной дистиллированной воды, освобожденной от углекислого газа. Раствор отстаивался в течение суток, и если выпадал осадок, его отделяли. Перед употреблением устанавливали титр раствора по соляной кислоте. При хранении для стабилизации растворов фенолфталеината к ним полезно добавлять 2—3 капли 0,1 н. щелочи.

Качественное определение леволиновой кислоты в гидролизате. Опытами по хроматографированию чистой леволиновой кислоты было установлено, что для ее анализа следует применить инородный метод хроматографии, причем эффект от использования всех трех приведенных выше растворителей равен. При употреблении этих растворителей и бумаги марки М были найдены значения R_f леволиновой кислоты, которые за 24 ч хроматографирования оказались соответственно равными 0,77; 0,87; 0,12.

В качестве растворителя была выбрана смесь н. бутанола с 1,5 н. водным раствором аммиака, так как в этом случае

малое значение R_f леволиновой кислоты обеспечивает наилучшее отделение ее от летучих кислот, которые будут перемещаться вблизи фронта растворителя.

Для идентификации пятна леволиновой кислоты был поставлен следующий эксперимент. На листе бумаги марки М отчерчивались четыре полосы шириной 3,5 см каждая и проводилась общая стартовая линия. На первую и третью полосы наносилась леволиновая кислота, на вторую и четвертую — гидролизат.

После хроматографирования лист разрезался на две части таким образом, чтобы хроматограммы леволиновой кислоты и гидролизата были попарно разделены. Затем одна половина каждой пары проявлялась бромтимоловым синим, а вторая — раствором 2,4-динитрофенилгидразина в соляной кислоте. Таким образом, леволиновая кислота идентифицировалась по обеим функциональным группам, что может быть признано однозначным доказательством подлинности пятна леволиновой кислоты, найденной в гидролизате.

Поскольку при нанесении на бумагу гидролизата на хроматограмме появляются так называемые хвосты, было исследовано влияние рН гидролизата на внешний вид хроматограммы и R_f леволиновой кислоты. Установлено, что R_f леволиновой кислоты не зависит от рН гидролизата, однако наиболее четкие пятна (хроматограммы без хвостов) получаются при рН—6,0—7,0. Поэтому до нанесения на бумагу гидролизат нейтрализовали аммиаком до рН 6,0.

Количественное определение леволиновой кислоты после хроматографирования. По данным В. И. Шаркова [1], в древесных гидролизатах леволиновой кислоты содержится 0,2—0,3%. При бумажной хроматографии на стартовую линию удобно наносить максимум 0,2 мл анализируемого раствора. Таким образом, при хроматографическом анализе древесных гидролизатов необходимо определять леволиновую кислоту в количестве около 0,7—0,6 мг.

Такие небольшие навески вещества могут быть определены объемным микрометодом [6], по которому кислоты титруются из микробюретки 0,001 н. раствором фенолфталеината натрия. Использование фенолфталеината исключает индикаторную ошибку, которая при микроопределениях достигает значительной величины.

Для проверки границ чувствительности и точности метода проводилось титрование следующих навесок леволиновой кислоты: 0,5; 0,7; 1,0; 2,0; 3,0 мг. Относительная ошибка определений соответствовала уменьшилась от 70 до 3%*.

Минимальным количеством леволиновой кислоты, определяемым с достаточной точностью, следует считать 1,5—2,0 мг. Такие навески дают удовлетворительные результаты при титровании не только 0,001 н. фенолфталеинатом, но и 0,01 н. раствором его. Повышение концентрации титранта увеличивает его стабильность и облегчает визуальное определение точки эквивалентности, что в свою очередь улучшает воспроизводимость результатов. Поэтому в дальнейшем количество леволиновой кислоты определялось 0,01 н. раствором фенолфталеината.

Модельные опыты по количественному определению леволиновой кислоты после снятия ее с хроматограммы показали, что относительная ошибка определения колеблется от 30 до 45%. Это было обусловлено тем, что растворитель содержит аммиак и, следовательно, в элюате находится не свободная леволиновая кислота, а ее аммонийная соль, которая фенолфталеинатом разлагается не полностью.

Для разложения соли хроматограммы леволиновой кислоты перед элюированием опрыскивались 0,1 н. соляной кислотой, а затем высушивались в сушильном шкафу при 80°C в течение 30; 60; 90 и 120 мин.

* Большая относительная ошибка анализа для концентрации 0,5—0,7 мг леволиновой кислоты в 10 мл свидетельствует о том, что эти концентрации соответствуют границе чувствительности метода анализа.

Результаты определений леволиновой кислоты приведены в таблице.

Навеска леволиновой кислоты, мг	Найдено леволиновой кислоты (мг) после высушивания в течение				Относительная ошибка, %
	30 мин	60 мин	90 мин	120 мин	
2,0	2,51	2,1	2,12	2,12	6,0
3,0	3,92	3,22	3,19	3,16	5,3
3,0	3,98	3,25	2,93	2,93	2,3

Из представленных в таблице данных видно, что для полного удаления хлористого водорода хроматограмму достаточно выдерживать в сушильном шкафу при 80°C в течение 90 мин, при этом относительная ошибка анализа составляет 5—6%, что для данного метода вполне приемлемо.

Определение леволиновой кислоты в гидролизатах. Как отмечалось выше, древесные гидролизаты содержат 0,2—0,3% леволиновой кислоты и, следовательно, для ее определения необходимо гидролизат упарить в 10 раз. Однако при десятикратном упаривании общее содержание сухих веществ становится настолько высоким, что при хроматографировании леволиновая кислота не проявляется. Кроме того, красящие и коллоидные вещества интенсивно окрашивают все поле хроматограммы. Попытка осветления гидролизата активированным углем не увенчалась успехом, так как оказалось, что при этом на угле адсорбируется 40—50% кислот.

Опыты показали, что допустимое концентрирование гидролизата — двойное или тройное.

Поскольку при двукратном упаривании гидролизата количество анализируемой леволиновой кислоты может быть повышено только до 0,8—1,2 мг, в дальнейшем мы ставили два параллельных анализа, а леволиновая кислота с обеих хроматограмм элюировалась в один приемник. Это позволило титровать фенолфталеином 1,6—2,4 мг леволиновой кислоты, что следует считать допустимым.

Методика анализа. Древесный гидролизат нейтрализуется аммиаком до pH 6,0—7,0 и упаривается в два раза. Затем с помощью микропипетки на стартовую линию трех полос хроматограммы наносится три навески по 0,2 мл сконцентрированного гидролизата. Хроматограмма помещается в хроматографическую камеру на 24 ч. В качестве растворителя применяется смесь н. бутанола и 1,5 н. раствора аммиака (1 : 3).

По истечении 24 ч хроматограмма извлекается из камеры и подсушивается на воздухе. От высушенной хроматограммы отрезается одна полоса и опрыскивается раствором солянокислого 2,4-динитрофенилгидразина для определения положения пятна леволиновой кислоты. Оставшаяся часть хроматограммы опрыскивается 0,1 н. раствором HCl и высушивается при 80°C в течение 90 мин. При помощи проявленной хроматограммы находят положение пятен леволиновой кислоты на двух остальных и отрезают соответствующий участок хроматограммы длиной 5 см. Вырезанный отрезок хроматограммы перегибают пополам, и леволиновую кислоту элюируют дистиллированной водой. Одновременно по ходу хроматограммы отрезают равный по длине участок, смежный с тем,

на котором содержится леволиновая кислота. Эту часть хроматограммы также обрабатывают в стандартных условиях дистиллированной водой. Элюат второй части хроматограммы используется для холостого определения. Оба элюата титруют из микробюретки 0,01 н. раствором фенолфталеината.

Содержание леволиновой кислоты в гидролизате находят по формуле

$$X\% = \frac{(a - v) K \cdot 0,00116 \cdot 100}{nmv}$$

где a — объем в мл 0,01 н. раствора фенолфталеината, прошедшего на титрование леволиновой кислоты;

v — то же, в холостом опыте;

K — коэффициент нормальности фенолфталеината;

n — степень концентрирования гидролизата;

m — число параллельных хроматограмм;

0,00116 — титр 0,01 н. раствора леволиновой кислоты;

v — количество гидролизата, нанесенного на хроматограмму, мл.

Для приведенной выше методики формула приобретает вид

$$X\% = 0,145 \cdot K \cdot (a - v).$$

Для проверки методики был проанализирован заводской гидролизат Бобруйского гидролизного завода, который в среднем содержал 0,29% леволиновой кислоты. Ряд определений дал вполне хорошую воспроизводимость результатов.

Итоговая проверка методики была проведена с помощью модельного опыта, в котором анализировался гидролизат с добавкой заданного количества леволиновой кислоты. Всего на хроматограмму было нанесено 3,0 мг леволиновой кислоты. При проведении анализа найдено 3,1 мг. Таким образом, относительная ошибка определения составила 3,3%, что указывает на высокую точность анализа.

Нужно отметить, что гидролизаты Бобруйского гидролизного завода, перерабатывающего смесь лиственной и хвойной древесины, содержат много коллоидов и интенсивно окрашены. Это существенно затрудняет их анализ. При работе с более светлыми гидролизатами степень концентрирования, вероятно, может быть увеличена, и тогда отпадет необходимость в постановке анализов с двумя параллельными хроматограммами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шарков В. И. Гидролизное производство. Т. II. М.—Л., Гослесбумиздат, 1948, с. 19.
2. Крючкова А. П., Воробьева Г. И. «Гидролизная и лесохимическая промышленность», 1964, № 8.
3. Туманов И. Ф., Потапова Н. П. «Химическая переработка древесины», 1963, № 2, с. 3.
4. Синтезы органических препаратов. М., ИЛ, 1949, сб. 1, с. 240.
5. Хроматография на бумаге. Под ред. И. М. Хайса и К. Машека М., ИЛ. 1962, с. 230.
6. Магницкий К. П., Шугаров Ю. А., Малков В. К. Сб. Новые методы анализа растений и почв, М., Сельхозгиз, 1959.