

УДК 541(64+183):543.544

ВЛИЯНИЕ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНОЙ ПРИРОДЫ ЛИГНИНОВ И ЛИГНОУГЛЕВОДНЫХ КОМПЛЕКСОВ НА ИХ ЭЛЮЦИОННОЕ ПОВЕДЕНИЕ ПРИ ЭКСКЛЮЗИОННОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА ПОРИСТЫХ КРЕМНЕЗЕМАХ В N,N-ДИМЕТИЛФОРМАМИДЕ

*Нефедов П. П., Русаков А. Е., Иванов М. А.,
Шербакова Л. Д., Лазарева М. А., Захаров В. И.*

Исследовано элюционное поведение лигнинов и лигноуглеводных комплексов в N,N-диметилформамиде и показано, что эти препараты в условиях эксклюзионной жидкостной хроматографии проявляют полиэлектролитные свойства. Хроматограммы лигнинов и лигноуглеводных комплексов, получаемые в чистом ДМФ, определяются не молекулярно-массовым распределением, как это предполагалось ранее, а распределением по степени замещения функциональных групп, способных к диссоциации в используемом элюенте. Установлено, что основным эффектом, определяющим элюционное поведение лигнинов и лигноуглеводных комплексов в ДМФ, является ионная эксклюзия. Подобраны условия, при реализации которых можно получить хроматограммы препаратов в ДМФ, однозначно определяемые распределением по размерам макромолекул. Обсуждены возможности метода для молекулярно-массового анализа лигнина и лигноуглеводных комплексов и показано, что наиболее целесообразно эксклюзионную жидкостную хроматографию использовать как качественный метод оценки распределения лигнина и лигноуглеводных комплексов по размерам макромолекул и изменения этого распределения при тех или иных превращениях препаратов.

При молекулярно-массовом анализе лигнинов и лигноуглеводных комплексов, проводимых с помощью гель-проникающей или эксклюзионной жидкостной хроматографии (ЭЖХ), необходимо одновременно учитывать полиэлектролитную природу, разветвленность и композиционную неоднородность этих природных полимеров и строить анализ с последующей интерпретацией хроматограмм таким образом, чтобы исключить влияние этих свойств на результирующее ММР.

Исследование электрофоретической подвижности лигнинов и лигноуглеводных комплексов свидетельствует о том, что эти соединения являются полиэлектролитами [1, 2]. Однако до сих пор интерпретация хроматограмм растворимых в полярных растворителях лигнинов и лигноуглеводных комплексов проводится в предположении, что эти полимеры являются электронейтральными [3, 4]. Исключение составляют водорастворимые лигносульфонаты, для которых впервые влияние полиэлектролитных свойств на элюционное поведение при ЭЖХ было доказано Мак-Карти [5] и в дальнейшем подробно изучено Стенлундом [6, 7].

Ранее нами [8–10] были изучены и сформулированы основные закономерности, которым подчиняется ЭЖХ растворимых в ДМФ полиэлектролитов, а также указаны способы подавления полиэлектролитных эффектов [11]. Данная работа посвящена дальнейшему выяснению роли полиэлектролитных эффектов при ЭЖХ лигнинов и лигноуглеводных комплексов, нахождению условий, при которых возможен их молекулярно-массовый анализ, а также использованию особенностей ЭЖХ полиэлектролитов для анализа их композиционной неоднородности.

Исследовали наиболее характерные по способам выделения лигнины и лигноуглеводные комплексы. Лигнины представляли собой выделенные из древесины или лигносульфоновую кислоту (растворимая в ДМФ часть составляла 40–50 вес. %), сульфатный лигнин и лигнин Пейпера, а также лигнин Бьеркмана, выделенный из древесины тополя. Кроме того, исследовали лигноуглеводный комплекс Бьеркмана,

выделенный из древесины тополя (растворимая в ДМФ часть составляла 70–80 вес. %), лигноуглеводный комплекс, выделенный из древесины березы экстракцией ледяной уксусной кислоты, насыщенной хлористым водородом [12], его ацетилированный и дезацетилированные аналоги, а также лигноуглеводный комплекс, выделенный по этому же методу [12] из древесины березы, предварительно обработанной при 120° в боратном буфере (рН 7,0) с гидромодулем 1:50.

Эксклюзионную жидкостную хроматографию осуществляли на системе из трех колонок, изготовленных из нержавеющей стали размерами 4×600 мм каждая. Колонки были заполнены кремнеземными сорбентами различной пористости: макропористыми стеклами (получены из института химии силикатов АН СССР, Ленинград) со средними диаметрами пор 1600 и 250 Å и силикагелем L (Народное предприятие

$\lg M_w$

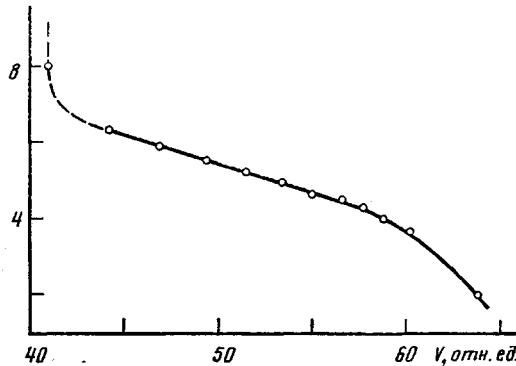


Рис. 1

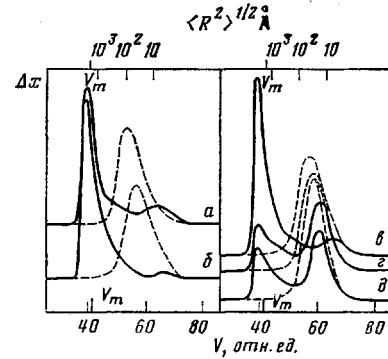


Рис. 2

Рис. 1. Молекулярно-массовая калибровочная зависимость удерживаемых объемов полимеромологов линейного ПС. Элюент – ДМФ

Рис. 2. Экспериментальные хроматограммы лигноуглеводного комплекса и лигнинов, полученные при использовании в качестве элюента чистого ДМФ (сплошные линии) и ДМФ с добавлением 0,02 моль/л LiBr, 0,02 моль/л H_3PO_4 и 1 об. % ТГФ (штриховые линии): *a* – лигноуглеводный комплекс Бьеркмана, выделенный из древесины тополя; *b* – лигносульфоновая кислота, выделенная из древесины ели; *c* – сульфатный лигнин, выделенный из древесины ели; *d* – лигнин Пейшера, выделенный из древесины ели; *e* – лигнин Бьеркмана, выделенный из древесины тополя (Δx – отклонение пера самописца; $\lambda=280$ нм)

«Лахема», Брно, ЧССР) со средним диаметром пор порядка 80 Å. Для приготовления колонок использовали фракции сорбентов $32 < d_p < 40$ мкм. Эксперименты проводили на жидкостном хроматографе высокого давления «Вариан» модель 8500 (США). Скорость элюции составляла 60 мл/ч, объем пробы 10 мкл, концентрация образца в пробе не более 0,2 г/дл. Температуру колонок поддерживали на уровне $30 \pm 0.1^\circ$ с помощью водяного терmostата U-10 (ГДР). Элюат анализировали с помощью проточного дифференциального ультрафиолетового спектрофотометра на длине волн $\lambda=280$ нм и дифференциального проточного рефрактометра.

Приготовленная на основе пористых кремнеземов хроматографическая система колонок имела молекулярно-массовый диапазон разделения более широкий, чем применяемые до сих пор системы на базе гелей «Сефадекс G» (фирмы «Фармация», Швеция) [3, 4]. Калибровку системы колонок проводили с помощью узкодисперсных образцов линейных ПС фирмы «Вотерс Ассошиэйтед, Инк» (США) с $M_w/M_n \leq 1,06$ и образца ПС с $M_w=10^8$. Приведенная на рис. 1 калибровочная зависимость V от $\lg M_w$ характеризуется широким линейным диапазоном разделения 10^4 – $5 \cdot 10^6$ а.е.м. и высоким значением предела проницаемости ($\sim 10^7$ а.е.м.). Наряду с высокими геометрическими показателями пористые кремнеземы обладают еще одним важным преимуществом перед набухающими органическими гелями (в том числе и гелями «Сефадекс G») – универсальностью в выборе растворителя, при этом размеры пор кремнеземов не зависят от окружающей среды. Поверхность пористых кремнеземов содержит силанольные гидроксили, диссоциация которых в полярных средах может приводить к образованию вблизи поверхности и стенок пор двойного электрического слоя.

Проведенные нами исследования показали, что хроматограммы лигнинов и лигноуглеводных комплексов, полученные при использовании в качестве элюента чистого ДМФ (рис. 2), имеют бимодальную форму, характерную для двухкомпонентных систем, причем первые пики, обычно приписываемые высокомолекулярным фракциям лигнинов и лигноуглеводных комплексов [3, 4], выходят из колонки с удерживаемым объемом мень-

шим, чем свободный объем V_m , определенный с использованием узкодисперсного полистирольного стандарта с $M_w=10^8$ а.е.м. Аналогичные бимодальные хроматограммы, как видно из рис. 3, были получены и для другого лигноуглеводного комплекса и продуктов его ацетилирования и дезацетилирования. Соотношение площадей пиков зависит от степени замещения в молекулах лигноуглеводного комплекса способных к диссоциации функциональных групп. Исходный лигноуглеводный комплекс занимает промежуточное положение.

Полученные результаты находят простое объяснение, если учесть, что лигнины и лигноуглеводные комплексы являются полиэлектролитами. Как

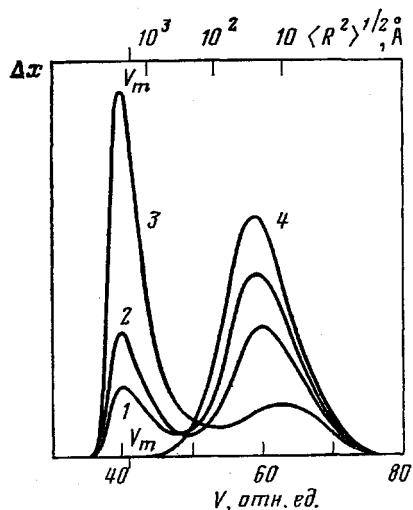


Рис. 3

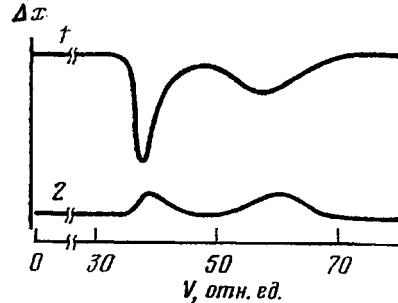


Рис. 4

Рис. 3. Совмещенные экспериментальные хроматограммы лигноуглеводного комплекса, выделенного из древесины березы, полученные при хроматографии в чистом ДМФ после ацетилирования (1), доацетилирования (2) и после дезацетилирования (3), а также хроматограмма этих же соединений (4), полученная в условиях подавления полиэлектролитных эффектов (ДМФ с добавлением 0,02 моль/л LiBr, 0,02 моль/л H_3PO_4 и 1 об. % ТГФ) (Δx – отклонение пера самописца; $\lambda = 280$ нм)

Рис. 4. Экспериментальные хроматограммы лигноуглеводного комплекса, выделенного по методике работы [17] из древесины березы, предварительно обработанной при pH 7,0 и 120°, полученные на двуперьевом самописце, регистрирующим показания последовательно подсоединенными к выходу из системы колонок спектрофотометрического (1) и рефрактометрического (2) детекторов

известно, элюционное поведение полиэлектролитов при ЭЖХ определяется суммой эффектов, таких как ионная эксклюзия [7], полиэлектролитное набухание [12], ионная инклузия (эффект Доннана) [13]. В нашем случае (рис. 2), по-видимому, определяющим эффектом является ионная эксклюзия – электростатическое отталкивание макромолекул от одноименно заряженной поверхности сорбента – макропористого стекла. Ионная эксклюзия приводит к тому, что относительно небольшие по размеру молекулы лигнина выходят из колонки за пределом исключения даже макропористого стекла со средним диаметром пор 1600 Å, и поэтому хроматограммы не отражают истинного ММР. Полиэлектролитное набухание может только дополнять эффект ионной эксклюзии, но не является определяющим. На отсутствие в первом хроматографическом пике ассоциатов развернутых макромолекулярных цепей [12] указывала идентичность хроматограмм лигноуглеводных комплексов, полученных при различных температурах колонок, в диапазоне 30–90°.

Для получения хроматограмм, действительно отражающих ММР, т. е. для того чтобы ЭЖХ была «чувствительна» только к размерам макромолекул, потребовалось подавить все полиэлектролитные эффекты внутри- и межмолекулярных взаимодействий, порождающих ионную эксклюзию и влияющих на конформацию и межфазное распределение макроионов в

колонке. Этого мы добились добавлением в элюент комплексного низкомолекулярного электролита, в состав которого входила растворимая в ДМФ неорганическая соль LiBr и неорганическая кислота H_3PO_4 [11]. Кроме того, в элюент добавляли 1 об.% ТГФ, который является адсорбционноактивным компонентом, для подавления адсорбции полимера на матрице сорбента [14]. Как видно из рис. 2 и 3, добавление низкомолекулярных электролитов в элюент привело к резкому изменению элюционного поведения как лигнинов, так и лигноуглеводных комплексов – бимодальные хроматограммы приобрели унимодальную форму с максимумом, соответствующим удерживаемому объему V полистиролов с $M_w \approx 10^4$ а.е.м. Концентрация низкомолекулярных электролитов 0,02 моль/л LiBr и 0,02 моль/л H_3PO_4 в ДМФ была выбрана оптимальной, так как дальнейшее повышение концентрации вилить до 0,1 моль/л LiBr и 0,1 моль/л H_3PO_4 уже не привело к сколько-нибудь заметным изменениям в форме и положении хроматограмм.

В отсутствие полиэлектролитных эффектов получаемые хроматограммы представляют собой распределения по размерам полимерных молекул, которые можно точно вычислить [12], используя полученную по полистирольным стандартам универсальную калибровочную зависимость Бенуа [15]. На рис. 2 и 3 ось удерживаемых объемов прокалибрована в средне-квадратичных радиусах полистиролов в ДМФ. Как видно из рис. 2, невозмущенные полиэлектролитным набуханием размеры макроцепей лигнинов и лигноуглеводных комплексов лежат в пределах от тысячи до нескольких ангстрем, что свидетельствует о значительной полидисперсности изученных образцов.

Полиэлектролитный эффект позволяет использовать ЭЖХ для фракционирования макроионов по их степеням диссоциации. Этот вывод прямо следует из результатов хроматографии (рис. 3). Блокировка ионогенных групп исходного лигноуглеводного комплекса посредством ацетилирования приводит к уменьшению первого пика, соответствующего полиэлектролитной части образца. Наоборот, доля первого «полиэлектролитного» пика в хроматограмме дезацетилированного лигноуглеводного комплекса намного выше, чем у исходного. Характерно, что ацетилирование блокирует не все ионогенные группы макроионов лигноуглеводного комплекса. По сути дела, хроматограммы лигнинов и лигноуглеводных комплексов, полученные в чистом ДМФ, отражают не ММР, а распределения макромолекул по функциональным ионогенным (не обязательно однотипным) группам.

Только в условиях подавления полиэлектролитных эффектов (рис. 3, хроматограмма 4) разделение происходит уже по размерам макромолекул, составляющих лигноуглеводный комплекс, и полученная хроматограмма наиболее надежно соответствует его ММР. Характерно, что хроматограммы всех трех образцов совпадают в пределах погрешности эксперимента.

Наличие функциональной гетерогенности неизбежно приводит к гетерогенности по составу (композиционной неоднородности). Обычно для анализа сополимеров используется двухдетекторная ЭЖХ [16]. На рис. 4 приведены хроматограммы лигноуглеводного комплекса, полученные в чистом ДМФ с использованием двух детекторов (УФ-спектрофотометра и рефрактометра), установленных последовательно на выходе из колонки. Видно, что соотношение пиков на рефрактометрической кривой, более реально отражающей распределение суммарной концентрации веществ в элюате, иное, чем на спектрометрической кривой, полученной на длине волны 280 нм. Из сопоставления хроматограмм можно сделать вывод о большей концентрации ароматических соединений в макромолекулах с повышенной способностью к диссоциации.

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что лигноуглеводные комплексы и лигнин представляют собой сложные макромолекулярные композиции, неоднородные, по крайней мере, по молекулярной массе, функциональности и составу.

Поэтому, если для обычных линейных синтетических полимеров, представляющих собой простую смесь полимергомологов, стандартная задача молекулярно-массового хроматографического анализа состоит в том, что-

бы, зная калибровочную кривую, превратить хроматограмму исследуемого образца в однозначно соответствующее ему ММР, для сложных полимерных систем калибровочная процедура и последующее определение ММР могут быть осуществлены только на основе допущений о монотонности изменяющихся с молекулярной массой структурных и композиционных характеристик [15]. Такие допущения, по-видимому, не всегда возможны для лигнинов и лигноуглеводных комплексов, образцы которых наряду с молекулярно-массовой неоднородностью, как уже упоминалось, обладают также полидисперсностью по структуре, составу и функциональности. Последние характеристики зависят и от способа выделения и от вида древесины, из которой выделяют лигнин и лигноуглеводный комплекс. По этой причине, как, например, было показано в работе [18], для одних и тех же типов лигнинов, но выделенных различным способом, нельзя получить единой, как для обычных полимеромологов, молекулярно-массовой зависимости удерживаемых объемов.

Нам представляется, что с учетом вышесказанного использование аналитической эксклюзационной жидкостной хроматографии для исследования полидисперсности лигнинов и лигноуглеводных комплексов даже при условии подавления полиэлектролитного эффекта, когда хроматограммы правильно отражают полимолекулярность, целесообразно во избежание ошибок, вызванных различными допущениями, ограничить стадией получения распределение по размерам макроцепей, т. е. той информацией, которую непосредственно дает ЭЖХ в виде хроматограммы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lindgren B. O. *Acta chem. scand.*, 1958, v. 12, № 10, S. 447.
2. Hermans J. J. *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 1957, v. 8, № 5, p. 179.
3. Шорыгина Н. Н., Эфендиева Н. Р. *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 1973, № 6, с. 1393.
4. Холькин Ю. И. В кн.: *Хроматография в химии древесины*. 2-е изд. перераб. М.: Лесная промышленность, 1976, с. 220.
5. Gupta P. R., McCarthy J. L. *Paperi ja puu*, 1970, B. 52, № 10, S. 121.
6. Stenlynd B. *Advances Chromatogr.*, 1976, v. 14, № 14, p. 167.
7. Stenlynd B. *Paperi ja puu*, 1970, B. 52, № 55, S. 197.
8. Нефедов П. П., Лазарева М. А., Беленький Б. Г., Котон М. М. *Докл. АН СССР*, 1975, т. 220, № 1, с. 389.
9. Nefedov P. P., Lazareva M. A., Belenky B. G., Frenkel S. Ya., Koton M. M. *J. Chromatogr.*, 1979, v. 15, № 1, p. 170.
10. Иванов М. А., Нефедов П. П., Русаков А. Е., Щербакова Л. Д., Лазарева М. А., Захаров В. И. *Химия древесины*, 1970, № 6, с. 108.
11. Нефедов П. П., Лазарева М. А., Кудрявцев В. В., Склизкова В. П., Беленький Б. Г. А. с. 495604 (СССР). — Опубл. в Б. И., 1975, № 46.
12. Давыдов В. Д., Лодыгин В. А., Ульяшева П. А. В кн.: *Химия и использование лигнина*. Рига: Зиннатне, 1974, с. 63.
13. Цветков В. Н., Эскин В. Е., Френкель С. Я. В кн.: *Структура макромолекул в растворе*. М.: Наука, 1964, с. 65.
14. Armstrong R. W., Strauss U. P. *Encycl. Polymer Sci. and Technol.*, 1969, v. 10, p. 781.
15. Беленький Б. Г., Виленчик Л. З. В кн.: *Хроматография полимеров*. Л.: Химия, 1978, с. 84.
16. Нефедов П. П., Лавренко П. Н. В кн.: *Транспортные методы в аналитической химии полимеров*. Л.: Химия, 1979, с. 78.
17. Runyon J. B., Barnes D. F., Rudd J. F., Tung L. H. *J. Polymer Sci.*, 1969, v. 13, № 10, p. 2359.
18. Froment P., Robert A. *Cellulose Chem. Technol.*, 1977, v. 11, № 12, p. 691.

Институт высокомолекулярных
соединений
АН СССР

Всесоюзный научно-исследовательский
институт целлюлозно-бумажной
промышленности

Поступила в редакцию
27.IV.1981

INFLUENCE OF POLYELECTROLYTE NATURE OF LIGNINS
AND LIGNOCARBOHYDRATE COMPLEXES ON THEIR ELUTION
BEHAVIOUR DURING EXCLUSION LIQUID CHROMATOGRAPHY
ON POROUS SILICA IN N,N-DIMETHYL FORMAMIDE

*Nefedov P. P., Rusakov A. Ye., Ivanov M. A.,
Shcherbakov L. D., Lazareva M. A., Zakharov V. I.*

Summary

The elution behaviour of lignins and lignocarbohydrate complexes (LCC) in DMFA has been studied and their polyelectrolyte nature in conditions of exclusion liquid chromatography has been proved. The chromatograms of lignins and LCC obtained in pure DMFA depend not on the MMD, as it was supposed earlier, but on the distribution according the degree of substitution of functional groups being capable to dissociate in the eluent. The main effect affecting the elution behaviour of lignins and LCC in DMFA is shown to be the ionic exclusion. The applicability of the method for the molecular mass analysis is discussed and its qualitative character is shown.