

Федеральное агентство по образованию

**Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Санкт-Петербургский государственный технологический
университет растительных полимеров»**

Буров А.В., Алиев Р.Г., Павлова Е.А., Терентьева Э.П., Удовенко Н.К.

**ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ЛИГНИНА
И ЦЕЛЛЮЛОЗЫ
МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ
ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

Учебно-методическое пособие

**Санкт - Петербург
2009**

ББК 35.77.я7

Буров А. В., Алиев Р. Г., Павлова Е. А., Терентьева Э. П., Удовенко Н.К. Изучение свойств лигнина и целлюлозы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. : учебно-метод. пособие / ГОУВПО СПбГТУ РП. - СПб., 2009. – 24 с.

Рассматриваются основные теоретические вопросы жидкостной хроматографии. Дается классификация хроматографических методов анализа. Показана эффективность методов жидкостной хроматографии при определении молекулярных масс и молекулярно-массовых характеристик высокомолекулярных соединений на примере лигнина и целлюлозы, приводятся методики анализа, устранение полиэлектролитных эффектов при работе.

Предназначено для студентов специальностей 240100, 240401, 240406, и 240501 всех форм обучения.

Рецензент: декан химико-технологического факультета Санкт-Петербургского государственного технологического университета растительных полимеров, канд. хим. наук., профессор А. А. Комиссаренков

Подготовлено и рекомендовано к печати кафедрой комплексной химической переработки древесины Санкт-Петербургского государственного технологического университета растительных полимеров (протокол № 3 от 15.04.09 г.).

Утверждено к изданию методической комиссией химико-технологического факультета СПбГТУ РП (протокол № 5 от 29.04.09 г.).

© ГОУ ВПО Санкт-Петербургский
государственный технологический
университет растительных
полимеров, 2009

ПРЕДИСЛОВИЕ

В последнее время большое внимание уделяется проблеме рационального использования природных ресурсов. Эта задача тесно связана с вопросами утилизации промышленных отходов химической переработки древесины.

Одним из таких многотоннажных отходов гидролизной и целлюлозно-бумажной промышленности является лигнин. Поиски путей превращения технических лигнинов в продукты, используемые в хозяйстве, необходимы не только с точки зрения экономики, но и экологии.

Лигнинные отходы могут быть источником получения биологически активных соединений, органических удобрений пролонгированного действия, поверхностно-активных веществ и т.д. Для выбора оптимальных направлений использования лигнина, технически осуществимых, не вызывающих дополнительного загрязнения окружающей среды, экологически рентабельных, необходимо тщательное исследование физико-химических свойств различных препаратов лигнина.

Одним из наиболее прогрессивных и совершенных методов изучения свойств лигнина является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), позволяющий исследовать молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение лигнина, форму его молекул и поведение в растворе, процессы конденсации и деструкции его при выделении из древесного сырья.

Молекулярная масса целлюлозы является одной из важнейших ее характеристик и в значительной степени определяет как области практического использования, так и физико-химические свойства получаемых из нее волокон и пленок.

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии нашел широкое применение в последнее десятилетие при изучении свойств синтетических и природных полимеров, благодаря ряду преимуществ перед другими аналитическими методами. Причин быстрого развития ВЭЖХ несколько:

- 1) большой диапазон молекулярных масс веществ, с которыми можно работать – от нескольких десятков единиц до миллионов, что существенно шире, чем в газовой хроматографии;
- 2) мягкость условий проведения анализа (почти все разделения можно проводить при температурах, близких к комнатной, при отсутствии контакта с воздухом) делает его особенно пригодным, а зачастую единственным методом при исследовании лабильных соединений, в частности, биологически активных веществ, какими являются препараты лигнина;
- 3) эффективность разделения, которую уже сейчас дает ВЭЖХ (до 150000 теоретических тарелок на 1 м), существенно превосходит

- 4) скорость анализа в ВЭЖХ высокая, обычно разделение сложной смеси занимает несколько минут;
- 5) метод ВЭЖХ дает возможность выделить из сложной смеси в мягких условиях чистые вещества, которые можно далее исследовать другими физико-химическими методами.

1. МОЛЕКУЛЯРНАЯ МАССА И ПОЛИДИСПЕРСНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ ЛИГНИНА И ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

При исследовании структуры и реакционной способности лигнинов знание их молекулярной массы и молекулярно-массового распределения является обязательным, так как позволяет глубже проникнуть в сущность химических превращений и строение этих природных полимеров.

Распределение лигнина неоднородно в клеточной стенке растительной ткани. Установлено, что по мере делигнификации древесины молекулярная масса выделяемых препаратов увеличивается.

Согласно современным представлениям, первые следы лигнификации наблюдаются в первичной стенке в углах клеток, затем процесс накопления и отложения лигнина распространяется на вещество срединной пластинки и по всей первичной стенке, далее в углы клеток срединной пластинки и, наконец, во вторичную стенку (последовательно слои S_1 , S_2 , S_3). Исходя из этого, логично предположить, что молекулярная масса лигнина будет наибольшей в тех частях клеточной стенки, где концентрация предшественников лигнина наиболее высока и где, следовательно, увеличивается степень конденсационной полимеризации. Такими частями клеточной стенки являются первичная стенка и вещество срединной пластинки. При варке древесины варочный раствор после проникновения в люмены клеток начинает диффундировать вместе с растворяющимся лигнином через клеточные стенки так, что сначала выделяется низкомолекулярный лигнин из вторичной стенки (последовательно слои S_1 , S_2 , S_3), срединная пластинка и, особенно, район углов клеток срединной пластинки являются последними участками, реагирующими с проникающими агентами. Низкомолекулярный лигнин, выделяемый на ранних стадиях делигнификации древесины различными способами, локализован во вторичной стенке, а высокомолекулярный – в веществе срединной пластинки.

Согласно данным Горинга, указанные морфологические различия в скорости делигнификации не связаны с диффузией активного реагента в клеточную стенку или с диффузией макромолекул лигнина из стенок клеток, а обусловлены, по-видимому, различной устойчивостью лигнинов во вторичной клеточной стенке и в срединной пластинке к действию варочных растворов.

Целлюлоза – линейный гомополимер с одинаковыми звеньями и связями.

Однако в процессе варки и отбелки молекулярная масса целлюлозы уменьшается. Поэтому целлюлоза характеризуется степенью полимеризации (молекулярной массой) и полидисперсностью, т.е. состоит из молекул различной длины.

Методы определения молекулярных масс

1.1.1. Осмометрический метод

Это наиболее распространенный и достаточно надежный способ определения среднечисленной молекулярной массы полимеров. Однако для многих препаратов лигнина он в полной мере не применим, так как самые «плотные» мембраны позволяют измерить молекулярную массу не ниже 3000. Поэтому этим методом можно определить молекулярную массу только высокомолекулярных фракций лигнина.

1.1.2. Метод рассеяния света

Этот метод, позволяющий измерить среднемассовые молекулярные массы (M) полимера, также не может охватить весь диапазона молекулярных масс препаратов лигнина, так как пригоден лишь для определения M больших, чем 10000-20000, хотя в некоторых случаях удается уменьшить нижний предел определяемых молекулярных масс до 5000. Следует учитывать, что метод светорассеяния может привести к сильно завышенным результатам по молекулярной массе при наличии в растворе даже ничтожных количеств загрязнений типа коллоидных частиц.

1.1.3. Вискозиметрический метод

Широко применяется для определения молекулярных масс синтетических полимеров, но не применим в случае лигнинов. Это обусловлено тем, что благодаря компактной форме макромолекул лигнина в растворе наблюдается слабая зависимость характеристической вязкости $[\eta]$ от молекулярной массы.

Значение показателя степени «а» в уравнении Марка-Куна-Хаувинка для большинства препаратов лигнина находится в пределах 0,1 – 0,33, что не позволяет с достаточной точностью вычислить молекулярную массу по данным одной вязкости.

$$[\eta] = K \cdot M^a$$

Показатель степени «а» в уравнении Марка-Куна-Хаувинка позволяет оценить формы молекул препаратов лигнина. Некоторые исследователи считают, что лигнин представляет собой беспорядочно скрученную в клубок спираль, частично проницаемую для растворителя, или компактный негидратирующийся эллипсоид. Также выдвинута гипотеза о том, что макромолекулы растворимых лигнинов, вероятно, представляют собой глобулярные частицы типа компактного микрогеля с поперечными связями, не протекаемого растворителем, но способного к ограниченному набуханию. Сетчатая структура лигнина усиливается водородными связями, образующимися между соответствующими группами.

Модель микрогеля хорошо объясняет полиэлектролитические расширения лигносульфонатов и щелочных лигнинов при растворении их в воде или при уменьшении концентрации электролитов, в то время как моделью компактного эллипсоида, протекаемого растворителем, объяснить это невозможно.

Если сравнить значения молекулярных масс, которые определены различными способами для одних и тех же препаратов лигнина, то они значительно различаются. Это обусловлено несколькими причинами.

Во-первых, поскольку значение молекулярной массы полимеров является величиной, во многом зависящей от способа ее измерения, то для препаратов, обладающих высокой полидисперсностью, различные методы в силу своих особенностей дают средние значения, которые могут значительно различаться в зависимости от того, по какому признаку произведено усреднение.

Во-вторых, определение молекулярных масс лигнинов в растворах осложняется неидеальностью их поведения в различных растворителях. Это вызвано наличием в лигнине функциональных групп, способных к меж- и внутримолекулярному взаимодействию и диссоциации.

В-третьих, невозможно выделить лигнин из растительного сырья всегда одинакового строения. Лигнин, как при химическом, так и при механическом выделении претерпевает как деструкционные, так и полимеризационно-поликонденсационные изменения.

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии

Хроматография – это метод разделения компонентов смеси, основанный на различии в равновесном распределении их между двумя несмешивающимися фазами, одна из которых неподвижна, а другая подвижна. Компоненты образца движутся по колонке, когда они находятся в подвижной фазе, и остаются на месте, когда находятся в неподвижной фазе. Чем больше сродство компонента к неподвижной фазе и чем меньше – к подвижной, тем медленнее он движется по колонке и тем дольше в ней удерживается. За счет различия в родстве компонентов смеси к

неподвижной и подвижной фазам достигается основная цель хроматографии – разделение за приемлемый промежуток времени смеси на отдельные полосы (пики) компонентов по мере их продвижения по колонке с подвижной фазой.

Согласно теории Мартина и Синджа, для описания процесса разделения веществ по слою сорбента в хроматографической колонке последняя мысленно разбивается на ряд последовательных элементов участков – «тарелок». Поэтому теория Мартина и Синджа получила название **теории тарелок**.

В основе ее лежат предположения, что хроматографируемое вещество проходит каждую тарелку прерывными порциями, переносимыми потоком жидкой фазы, и что на каждой тарелке между неподвижной фазой – сорбентом и подвижной фазой жидкостью успевает установиться равновесие. Каждая новая порция жидкости, подаваемая на первую тарелку, приводит к новому распределению вещества между подвижной и неподвижной фазами, причем часть вещества переносится на следующую тарелку. На этой тарелке также устанавливается равновесие и происходит перераспределение вещества между фазами и перенос его на последующие тарелки, вследствие этого с каждой новой порцией жидкой фазы концентрация вещества на первой тарелке падает, а на последующих возрастает.

В результате такого перемещения и перераспределения хроматографируемое вещество оказывается на нескольких тарелках, причем на средних его концентрация максимальна по сравнению с соседними тарелками. Таким образом, вещество «размывается» по нескольким тарелкам, причем, чем большее количество тарелок занято веществом, тем сильнее размывание.

Следовательно, число тарелок, занимаемых данным компонентом, служит мерой эффективности колонки. Эффективность колонки измеряется числом теоретических тарелок. Эффективность колонки тем выше, чем уже пик получается при том же времени удерживания (рис.1).

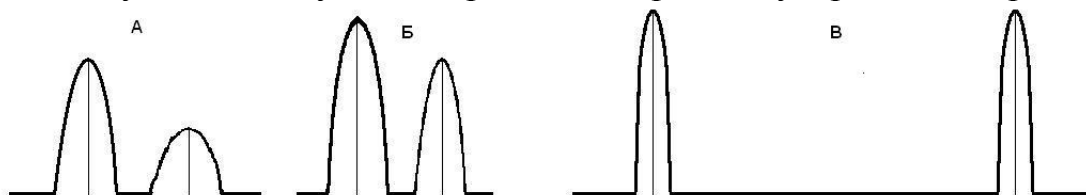


Рис. 1. Вид хроматограммы в зависимости от эффективности и селективности:

а – обычная селективность, пониженная эффективность (меньше теоретических тарелок);

б – обычная селективность и эффективность;

в – обычная эффективность, повышенная селективность

Чем выше эффективность, тем больше число теоретических тарелок (ЧТТ), тем меньше расширение пика первоначально узкой полосы по мере прохождения ее через колонку, тем уже пик на выходе из колонки.

ЧТТ характеризует число ступеней установления равновесия между подвижной и неподвижной фазами. ЧТТ легко определить по хроматограмме (рис. 2):

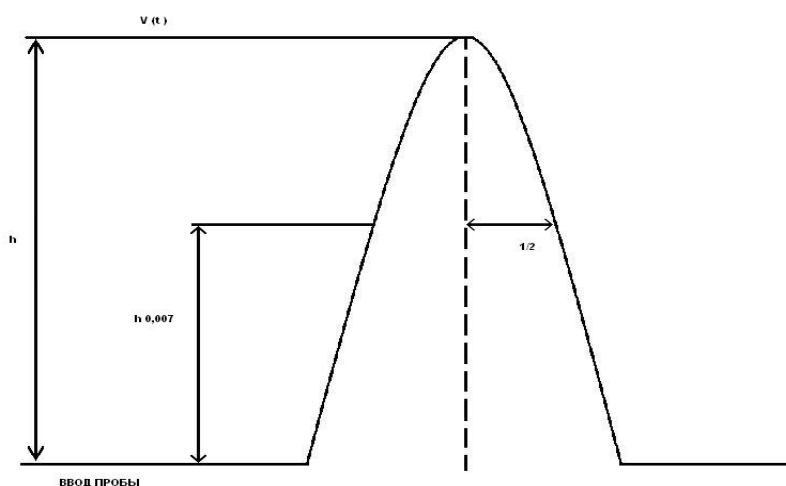


Рис.2. Параметры хроматографического пика и расчет числа теоретических тарелок:

V_R - удерживаемый объем, т.е. объем элюента, который следует пропустить через слой сорбента в колонке от момента ввода пробы до момента регистрации на выходе колонки максимальной концентрации вызываемого вещества;

t_R - время удерживания, соответствующее удерживаемому объему, V_R (t_R и V_R связаны следующим соотношением: $t_R = V_R / \dot{v}_0$, где \dot{v}_0 – скорость передачи элюента, м/с;

$h_{0,607}$ – высота пика, на которой определяется дисперсия σ .

Селективность колонки играет большую роль в достижении хроматографического разделения. Селективность колонки определяется отношением приведенных времен двух пиков по следующему уравнению:

$$\alpha = (t_{R2} - t_0) / (t_{R1} - t_0),$$

где t_0 - время удерживания несорбируемого компонента;

t_{R1}, t_{R2} - время удерживания компонентов 1 и 2.

Селективность колонки зависит от трех очень важных факторов: выбора химической природы сорбента, выбора состава растворителя и его модификаторов и учета химической структуры и свойств разделяемых компонентов. Иногда заметное влияние на селективность оказывает изменение температуры колонки, меняющее коэффициенты распределения веществ между подвижной и неподвижной фазами.

По механизму разделения ВЭЖХ подразделяется на адсорбционную, распределительную, ионообменную и эксклюзионную хроматографию. Так как изменение молекулярной массы и молекулярно-массового распределения лигнинов и лигнуглеводных комплексов осуществляют в основном по механизму эксклюзионной хроматографии, то остановимся наиболее подробно на этом методе.

1.3. Эксклюзионная хроматография лигнинов и целлюлозы

Эксклюзионная хроматография представляет собой вариант жидкостной хроматографии, в котором разделение происходит за счет распределения молекул между растворителем, находящимся внутри пор сорбента, и растворителем, протекающим между его частицами.

В отличие от остальных вариантов ВЭЖХ (адсорбционной, распределительной и т. д.), где разделение идет за счет различного взаимодействия компонентов с поверхностью сорбента, роль твердого наполнителя в эксклюзионной хроматографии заключается только в формировании пор определенного размера, а неподвижной фазой является растворитель, заполняющий эти поры. Поэтому применение термина «сорбент» к данным наполнителям условно.

Принципиальной особенностью метода является возможность разделения молекул по их размеру в растворе в диапазоне практически любых молекулярных масс от 10^2 до 10^8 , что делает его незаменимым для исследования синтетических и природных полимеров.

По традиции процесс, проводимый в органических растворителях, называют гель – проникающей, а в водных системах гель – фильтрационной хроматографией. Для обоих вариантов можно использовать термин «эксклюзионная хроматография», что означает исключение по размерам.

Объем эксклюзионной колонки равен:

$$V_c = V_0 + V_i + V_a, \quad (1)$$

где V_0 - мертвый объем – объем растворителя между частицами сорбента (объем подвижной фазы);

V_i - объем пор, занятый растворителем (объем неподвижной фазы);

V_a – объем матрицы сорбента без учета пор.

Полный объем растворителя в колонке V (его часто называют полным объемом колонки, так как он не принимает участия в хроматографическом процессе) представляет собой сумму объемов подвижной и неподвижной фаз:

$$V_t = V_0 + V_i, \quad (2)$$

Удержание молекул в эксклюзионной колонке определяется вероятностью их диффузии в поры и зависит от соотношения размеров молекул полимера и пор. Коэффициент распределения представляет собой отношение концентраций вещества в подвижной и неподвижной фазах:

$$K_d = C_i / C_0, \quad (3)$$

Так как подвижная и неподвижная фазы имеют одинаковый состав, то K_d вещества, для которого обе фазы одинаково доступны, равен единице. Эта ситуация реализуется для молекул с самыми малыми размерами (в том числе и молекул растворителя), которые проникают во все поры и поэтому движутся через колонку наиболее медленно. Их удерживаемый объем равен полному объему растворителя V_t .

Все молекулы, размер которых больше размера пор сорбента, не могут попасть в них (полная эксклюзия – вытеснение) и проходят по каналам между частицами. Они элюируются из колонки с одним и тем же удерживаемым объемом, равным объему подвижной фазы V_0 . Коэффициент распределения для этих молекул равен нулю.

Молекулы промежуточного размера, способные проникнуть только в какую-то часть пор, удерживаются в колонке в соответствии с их размером.

Коэффициент распределения этих молекул изменяется в пределах от нуля до единицы и характеризует долю объема пор, доступных для молекул данного размера. Их удерживаемый объем определяется суммой V_0 и доступной части объема пор:

$$V_d = V_0 + K_d \cdot V_i, \quad (4)$$

Связь между удерживаемым объемом и молекулярной массой (или размером молекул) образца описывается калибровочной кривой (рис.3).

Каждый сорбент характеризуется своей калибровочной кривой, по которой легко определить область разделяемых на нем молекулярных масс. Точка **A** соответствует пределу эксклюзии, или мертвому объему колонки V_0 . Все молекулы, масса (и размеры соответственно) которых больше, чем в точке **A**, будут элюироваться одним пиком с удерживаемым объемом V_0 .

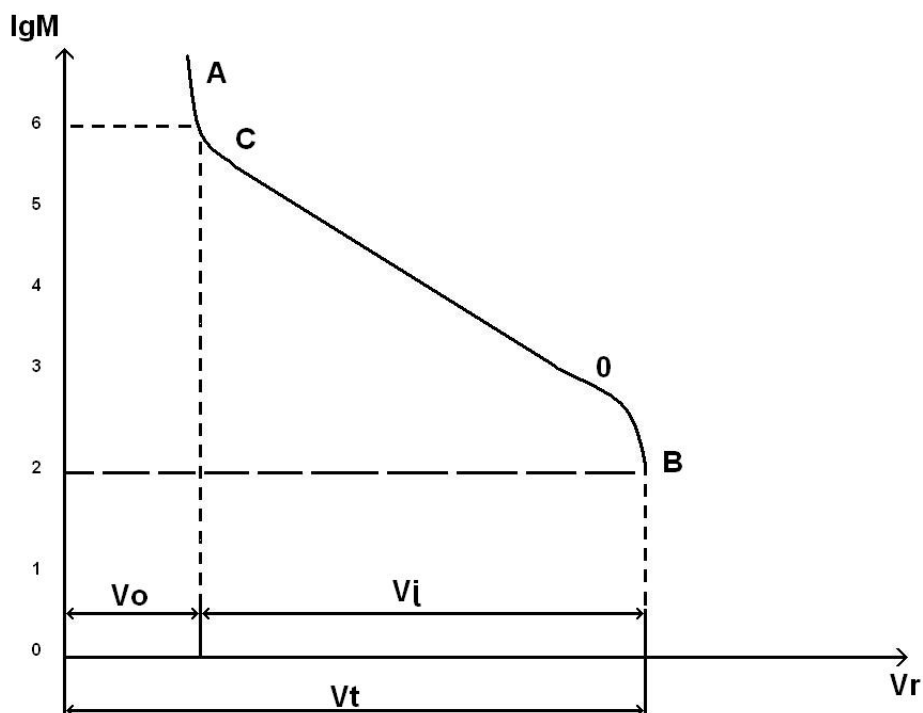


Рис.3. Калибровочная кривая

Точка **В** отражает предел проникания, и все молекулы, масса которых меньше, чем в точке **В**, также будут выходить из колонки одним пиком с удерживаемым объемом V_t . Между точками **А** и **В** располагается диапазон селективного разделения. Соответствующий ему объем $V_i = V_t - V_0$ часто называют рабочим объемом колонки. Отрезок **СО** представляет собой линейный участок калибровочной кривой, построенной в координатах

$V_R - \lg M$. Этот участок описывается уравнением

$$V_R = C_1 - C_2 \lg M, \quad (5)$$

где C_1 - отрезок отсекаемый на оси ординат продолжением отрезка **СД**;

C_2 - тангенс угла наклона этого отрезка к оси ординат.

Величину C_2 называют разделительной емкостью колонки, ее выражают количеством миллилитров растворителя, приходящимся на один порядок изменения молекулярной массы.

Для электронейтральных полимеров V_R функционально связан соотношением размеров макромолекул и пор сорбента и однозначно зависит от молекулярной массы макромолекулы. Для полиэлектролитов, к которым относятся препараты лигнинов, в случае использования при

хроматографии полярных элюентов, способствующих диссоциации, V_R зависит не только от молекулярной массы макромолекул. На элюционное поведение макроиона решающее влияние оказывают полиэлектролитные эффекты: ионная эксклюзия, полиэлектролитное набухание, ионная инклюзия.

Явление ионной эксклюзии обусловлено взаимным отталкиванием одноименно заряженных макроионов и стенок пор сорбента. При проявлении ионной эксклюзии хроматограммы имеют вытянутый передний фронт и круто срезанный задний. Ионная эксклюзия приводит к тому, что форма хроматограмм и V_R зависят от концентрации образца во вводимой пробе. При уменьшении концентрации V_R уменьшается.

Полиэлектролитное набухание приводит к значительно большему увеличению размера макромолекул, чем увеличение, вызываемое взаимодействием полимер – растворитель, что объясняется взаимным отталкиванием одноименных зарядов ионогенных групп.

Суть явления ионной инклюзии состоит в стремлении одноименно заряженных макроионов равномерно распределяться между элюентом в межпоровом пространстве и порах. Межионное электростатическое отталкивание приводит к тому, что в поры сорбента будут проникать предпочтительно макроионы меньших размеров, а вызывающие их инклюзию крупные макроионы будут оставаться в основном в подвижной фазе. Таким образом, ионная инклюзия уменьшает $1/2$ крупных макроионов и увеличивает V_R макроионов небольших размеров по сравнению с электронейтральными макромолекулами тех же гидродинамических радиусов.

При проведении хроматографии на элюционное поведение полиэлектролита действуют, как правило, все указанные факторы, но в зависимости от типа применяемого сорбента и условий проведения эксперимента, тот или иной эффект может преобладать.

1.3.1. Методика анализа

Хроматографический анализ лигнина проводится на геле Сферон Р-1000, зернением менее 25 мкм. Колонка 8x600 мм, изготовленная из нержавеющей стали. Элюентом служит полярный растворитель – диметилформамид марки «х.ч.» с добавкой 0,03М фосфорной кислоты и 0,03М бромида лития для подавления полиэлектролитного эффекта. Детектирование производится с помощью спектрофотометрического детектора (СПФД – 5) при длинах волн 280 и 350 нм и рефрактометра. Параметры хроматографического анализа: скорость подачи элюента – 0,5 см³/мин, температура колонки 60 °С, давление на входе колонки – 10 атм., объем пробы 200 мкл, концентрация образца в пробе 0,1%, скорость самописца 0,6 см³/мин. Эффективность хроматографической системы 5000

теоретических тарелок. Калибровку хроматографической системы производим с помощью лигнина Бьеркмана или активного лигнина.

Гели сферон. Эти макропористые сорбенты с высокой плотностью сшивки относятся к полужестким гелям. Получают их сополимеризацией оксиэтилметакрилатом. Они набухают как в воде, так и во многих органических растворителях, в частности в диметилформамиде. Степень набухания гелей в различных растворителях почти одинакова и не меняется в широком интервале значений рН и ионной силы, что позволяет рассматривать гели как универсальные сорбенты для эксклюзионной хроматографии в органических растворителях и водных средах.

Гели сферон обладают высокой удельной поверхностью ($50 - 200 \text{ м}^2 / \text{г}$), механической прочностью (допустимое давление выше $10 \text{ МПа} = 100 \text{ атм.}$) и термостойкостью до $200 \text{ }^\circ\text{C}$. Выпускается пять типов гелей разной пористости с пределом эксклюзии по декстрану от $6 \cdot 10^4$ до 10^8 . Нижний предел проницаемости гелей всех типов одинаков и составляет 10^3 . Высокая химическая стойкость позволяет использовать сфероны в диапазоне рН от 1 до 12.

1.3.2. Заполнение хроматографической колонки суспензионным методом

Сферон Р-1000 многократно промывается в дистиллированной воде, пока его раствор из мутного не становится прозрачным. Потом сушится в эксикаторе при температуре $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Для заполнения колонки необходимо 60 см^3 сферона залить 200 см^3 дистиллированной воды и приготовить суспензию, тщательно перемешивая смесь. После чего смесь оставить набухать в течение суток. Для полного удаления пузырьков воздуха надо набухшую суспензию поместить в колбу Бунзена, подключить вакуумный насос и деарировать в течение 15 мин при постоянном перемешивании смеси на магнитной мешалке. Затем слить с поверхности водного раствора суспензии слой примеси. Из набухшего геля надо приготовить 22,5%-й водный раствор по объему.

Заполнение хроматографической колонки производится на установке (см. рис.4).

Процесс суспензионной обработки проводим следующим образом: включаем вакуумный насос, через воронку наливаем в стеклянную предколонку 25 см^3 дистиллированной воды, через 10 мин - 25 см^3 хорошо перемешанной суспензии сферона и под низким давлением $0,02 - 0,01 \text{ МПа}$ продавливаем суспензию через колонку. Суспензия фильтруется на фильтре колонки, формируя упорядоченный слой сорбента. После продавливания первой порции сорбента в предколонку добавляют еще

25 см³ суспензии и т.д. Процесс заканчивается после того, как в стеклянной предколонке остается суспензии на 1/3 ее объема. Затем предколонку снимем и продолжим заполнять колонку густой суспензией в течение 2 ч до полной упаковки.

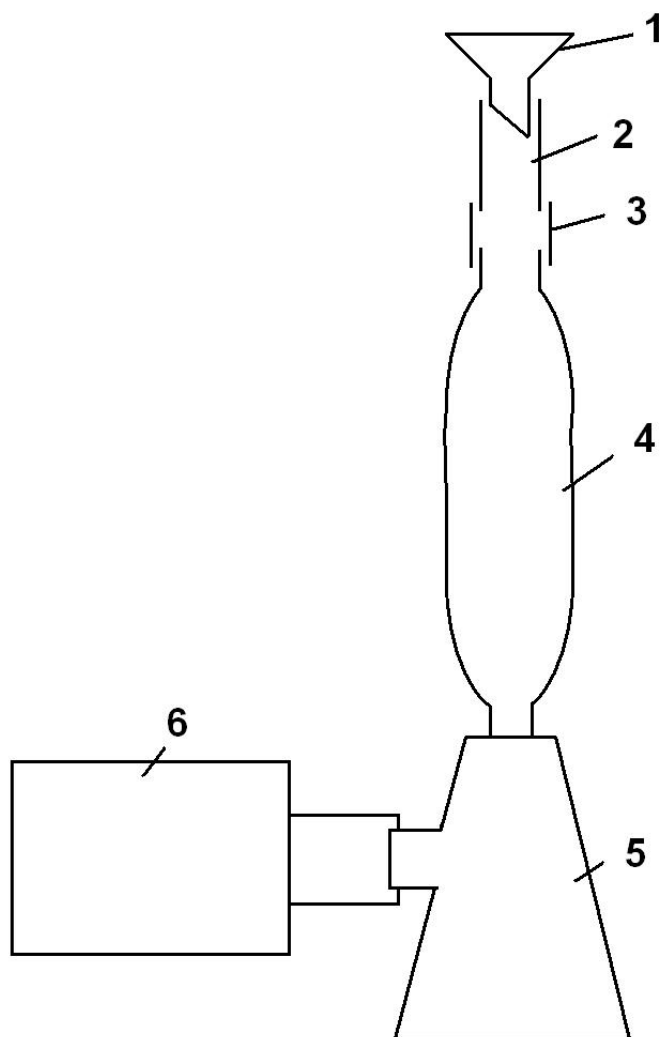


Рис. 4. Установка для заполнения хроматографической колонки:
1- воронка; 2 – стеклянная предколонка; 3 – резиновый переходник; 4 – хроматографическая колонка; 5 – колба Бунзена; 6 – вакуумный насос.

2. АНАЛИЗ ЛИГНИНА И ЦЕЛЛЮЛОЗЫ МЕТОДОМ ЭКСКЛЮЗИОННОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Принципиальная блок – схема многодетекторного хроматографа приведена на рис. 5.

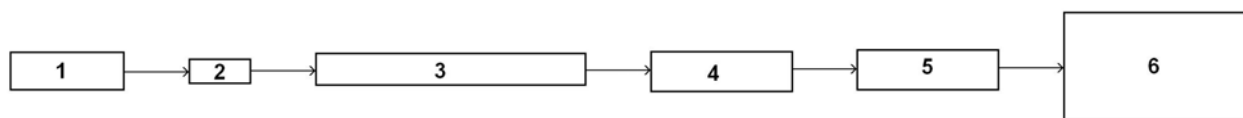


Рис. 5. Блок – схема многодетекторного хроматографа:
 1- насос высокого давления; 2 – кран – дозатор; 3 – хроматографическая колонка; 4 - ультрафиолетовый детектор ; 5 - рефрактометр;
 6 – самописец

2.1. Хроматограф жидкостной аналитический «Цвет – 4000»

Хроматограф жидкостной аналитический «Цвет – 4000» предназначен для качественного и количественного анализа смесей органических и неорганических веществ. Хроматограф обеспечивает дозирование смеси в прибор; разделение ее, обработка информации и выдача результатов ведутся с помощью персонального компьютера. Возможно дублирование функций управления вручную и аналоговая запись сигналов с детекторов.

В зависимости от типа разделительных колонок возможна реализация следующих методов хроматографического разделения:

- адсорбционная хроматография в нормально-фазовом или обращенно-фазовом вариантах – для разделения органических соединений, не растворяющихся в воде (1-й вариант) или растворяющихся в воде (2-й вариант);
- ион – парная хроматография - для разделения ионных соединений;
- ионная хроматография – для разделения неорганических ионов и органических кислот;
- гель – проникающая хроматография – для разделения веществ по их молекулярной массе.

Хроматограф может быть укомплектован различными детекторами (одним или несколькими) в зависимости от поставленной задачи:

- электрохимическим детектором для анализа смесей, содержащих окисляющие или восстанавливающие вещества (фенолы, цианиды, йодиды, нитрозоамины, катехоламины, сульфиды, нитриты. ПАВ и т.д.);
- кондуктометрическим детектором для анализа смесей, содержащих ионы (простые анионы типа фторидов, хлоридов, нитритов, сульфатов и т.д.; катионы щелочных и щелочноземельных металлов, амины, органические кислоты и т.д.);
- спектрофотометрическим детектором для анализа смесей, содержащих поглощающие в области 200-700 нм излучение молекулы (витамины, ароматика, стероиды, ПАУ, гормоны, консерванты, лекарства, соли переходных металлов, масла, фураны и т.д.).

2.2. Блок аналитический БА-124

Блок аналитический БА-124 (далее – блок) предназначен для размещения дозирующих устройств и колонок для жидкостной хроматографии. Колонки могут быть заполнены любым подходящим сорбентом. Колонки помещены в термостат с температурным диапазоном 313 – 373 К (40 – 100 °С).

Дозирование пробы в колонку может быть осуществлено микрошприцем при использовании устройства ввода пробы, петлевым краном-дозатором с электроприводом или с ручным приводом при использовании перистальтического насоса или медицинского шприца.

Блок может обеспечить двухканальную работу жидкостного хроматографа при наличии двух насосов для элюента и двух детекторов, в том числе в режиме концентрирования пробы.

Блок может работать в комплекте хроматографа «Цвет – 4000», а также с различными насосами и детекторами для жидкостной хроматографии.

Управление работой блока осуществляется вручную или от ПК.

Для подачи элюента в жидкостном хроматографе используется насос типа БПЖ-80. Диапазон расходов насоса – от 0,01 до 5,00 см³/мин. Насос имеет две сменные головки с диаметром плунжеров 3,13 и 5,00 мм. При плунжерах диаметром 3,13 мм диапазон расходов насоса 0,01 – 2,00 см³/мин, при плунжерах диаметром 5 мм – 0,1 – 5,00 см³/мин. Максимальное давление, создаваемое насосом на входе аналитической колонки, – не менее 20 МПа.

Стабильность расхода – 1%, погрешность задания расхода – 2%. Насос может работать в режиме постоянного расхода или постоянного давления. Задание расхода или давления, а также ограничения по верхнему и нижнему значениям давления производится от ПК, при этом предусмотрена возможность ручного задания этих параметров. Условиями надежной работы насоса является фильтрование (через металлокерамический или стеклянный фильтры) и дегазация (вакуумированием, нагреванием, гелием) растворителей.

2.3. Спектрофотометрический детектор СПФД-5

Принцип действия основан на поглощении излучения анализируемыми компонентами. Рабочая область длин волн 200-700 нм. На детекторе возможно определение витаминов, антибиотиков, гормонов, наркотических веществ, ароматических соединений, красителей, консервантов, пестицидов, солей тяжелых металлов и т.д.

Конструктивно детектор СПФД-5 состоит из двух блоков: спектрофотометра СФ-05 и блока питания осветителя БПО-103. В

спектрофотометре находится оптико-механический субблок с осветителем, дифракционной решеткой, кюветой и фотоприемниками и электронный блок с платами питания и логарифмическим усилителем. Осветителем является дейтериевая лампа.

Детектор предназначен для работы в комплекте с хроматографом «Цвет – 4000», а также с любым жидкостным хроматографом, имеющим блок подачи жидкости с расходом элюента от 0,1 до 2,0 см³/мин.

В основу действия детектора положено получение электрического сигнала, пропорционального величине поглощения раствором излучения в диапазоне длин волн 200 – 700 нм.

Согласно закону Ламберта – Бера

$$I_p = I_0 * e^{-D},$$

где I_p - световой поток, прошедший через рабочую кювету;

I_0 - световой поток, падающей на рабочую кювету;

D - оптическая плотность раствора.

При отсутствии поглощения $I_p = I_c$

где I_c - световой поток, прошедший через сравнительную кювету

Так как при работе с детектором элюент не должен поглощать излучение, то $I_c = I_0$

Отсюда:

$$I_p = I_0 * e^{-D} \text{ или } \ln I_c / I_p = D \text{ или } D = \ln I_c - \ln I_p.$$

Так как фототок фотодиода прямо пропорционален падающему на него световому потоку, то, находя разность логарифмов фототоков (или напряжений U_c и U_p) сравнительной и рабочей кювет, получим оптическую плотность анализируемого раствора D .

В свою очередь, оптическая плотность раствора прямо пропорциональна концентрации раствора

$$D = C * L * E,$$

где C – концентрация;

L - длина кюветы ячейки;

E – молекулярный коэффициент поглощения анализируемого вещества.

Следовательно, сигнал на выходе платы логарифмического усилителя пропорционален концентрации анализируемого вещества. Наиболее распространено выражение закона Ламберта – Бера через десятичные логарифмы

$$I_p = I_c * 10^{-D}.$$

Тогда $D = \lg I_c - \lg I_p$.

В блоке спектрофотометра СФ-05 размещены осветитель, оптические элементы, жидкостные линии и логарифмический усилитель.

В качестве осветителя использована лампа ДНМ-15, обеспечивающая световой поток в диапазоне длин волн от 200 до 700 нм.

Световой поток от источника света поступает в монохроматор, который состоит из сферического зеркала и дифракционной решетки. От сферического зеркала излучение параллельным пучком попадает на дифракционную решетку. В результате на ячейку попадает монохроматическое излучение.

Оптический баланс предназначен для выравнивания сигналов рабочего и сравнительного каналов.

Ячейка детектора представляет собой монолитный корпус из нержавеющей стали, в котором выполнены два цилиндрических отполированных канала диаметром 1,0 мм, длиной 10 мм.

Элюент – диметилформамид из насоса высокого давления пропускается непрерывно в течение всего опыта через всю систему: кран – дозатор, колонку, детекторы. Кран-дозатор 2 служит для ввода в хроматографическую колонку 3 жидкой анализируемой смеси. Разделение смеси на индивидуальные компоненты происходит в хроматографической колонке. Непосредственно на выходе жидкости из колонки устанавливаются детекторы: ультрафиолетовый (в качестве ультрафиолетового детектора используется прибор СПФД - 5) и рефрактометрический. Самописец 6 автоматически регистрирует результаты анализа (см. рис.5).

Ультрафиолетовые спектры лигнина снимают при длине волны 280 нм и 350 нм. Это объясняется тем, что в ионизированной форме ряд фенольных соединений имеют максимум поглощения при 280 нм, тогда как у их окисленных в процессе варки аналогов (производные хинона, стильбена и т.д.) максимум поглощения наблюдается при 350 нм. Исходя из этого, с известным приближением в ряде случаев, по изменению спектральных характеристик можно судить об окислении структурных элементов лигнина. Однако, поскольку в лигнине присутствуют фенольные фрагменты различные по строению, следует рассматривать не интенсивность индивидуальных полос, а интегральную интенсивность в определенном районе УФ – спектра (280 нм и 350 нм).

В качестве критерия, отражающего степень окисления лигнина, предлагается использовать коэффициент K , равный отношению высот или площадей пиков, приходящихся в УФ-спектре лигнина на области 350 нм и 280 нм.

$$K_{ок} = S_{350}/S_{280} \quad \text{или} \quad K_{ок} = h_{350}/h_{280}. \quad (6)$$

Рефрактометрический детектор показывает изменение молекулярной массы и молекулярно-массовое распределение в лигнине в процессе гидролиза или делигнификации. Изменения, происходящие при рефрактометрическом детектировании, можно описать следующим уравнением:

$$h_{R1} = K_{пр} * \Delta n * M_i,$$

где $K_{пр}$ - приборное уширение;

Δn – константа, зависящая от молекулярной массы;

M_i - молекулярная масса.

Для спектрофотометрического детектирования действительны следующие уравнения:

$$h_{280} = K_{пр} * E_{280} * M_i \quad (7)$$

$$h_{350} = K_{пр} * E_{350} * M_i \quad (8)$$

где E_{280} и E_{350} - коэффициенты экстинкции для ароматических соединений и сопряженных структурных единиц лигнина соответственно.

2.4. Расчет средней молекулярной массы и степени полимеризации

Среднюю молекулярную массу и степень полимеризации рассчитывают по уравнения Шульца – Блашке (9) и Марка – Хаувинка (10):

$$[\eta] = \eta / C * (1 + K * \eta), \quad (9)$$

$$[\eta] = K * M_{wa}, \quad (10)$$

где $[\eta]$ – характеристическая вязкость;

η - удельная вязкость;

C – концентрация раствора.

K – константа уравнения Шульца – Блаше, равная 0,29 для растворов целлюлозе.

K, α – константы уравнения Марка – Хаувинка, равные соответственно 3,85 и 0,76.

$$СП = M / 162, \quad (11)$$

где M – средняя молекулярная масса исследуемого образца;

162 – молекулярная масса одного элементарного звена целлюлозы.

2.5. Получение метилолцеллюлозы

2.5.1. Приготовление диметилформаида (ДМФА)

Исходный ДМФА – $(\text{CH}_3)_2\text{CHO}$, температура кипения $153\text{ }^\circ\text{C}$.

ДМФА смешивается с водой (в любых соотношениях) и с большинством органических растворителей, кроме того, он растворяет многие соли. ДМФА содержит примеси: аммиак, амины, формальдегид и воду. Исходный ДМФА подвергают очистке следующим образом: к 250 см^3 ДМФА вводят 30 см^3 бензола и 12 см^3 воды, после чего при атмосферном давлении из смеси отгоняют фракцию объемом 150 см^3 , затем производят вакуумную перегонку оставшегося раствора с помощью водоструйного насоса при температуре $65\text{ -}70\text{ }^\circ\text{C}$. Первую фракцию в объеме 50 см^3 отбрасывают, после чего собирают основной продукт с минимальным содержанием примесей, в том числе и воды.

Следует помнить, что ДМФА на свету разлагается на диметиламин и формальдегид, поэтому его следует защищать от света.

2.5.2. Сушка параформа и целлюлозы

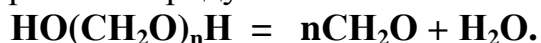
2.5.2.1. Параформ

Параформ представляет собой смесь линейных полимерных молекул формальдегида, на концах которых расположены гидроксигруппы:



где n – от 10 до 100.

В виде белого порошка (осадка) выделяется из водных растворов формальдегида при охлаждении. Поэтому товарный продукт содержит до 10% воды. Однако в химически связанном состоянии находится не более 4-6% воды. Параформ при нагревании легко возгоняется, превращаясь в мономерный формальдегид и воду, причем последняя концентрируется в первых порциях испаренного продукта:



В продуктах разложения присутствуют также небольшие количества образующихся при этом муравьиной и уксусной кислот, метанола, оксидов углерода. При хранении параформ медленно разлагается из-за присутствия следов муравьиной кислоты.

Химический метод сушки основан на применении пятиоксида фосфора, которую добавляют к полимеру, подвергнутому пиролизу. При этом температура разложения не должна превышать $90\text{ }^\circ\text{C}$ во избежание разложения формальдегида и поэтому процесс проводят под вакуумом. Окончание осушки контролируют визуально по изменению сыпучести параформа.

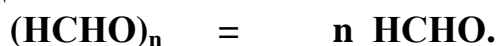
Целлюлоза

Исследуемые образцы целлюлозы перед растворением подвергались

сушке в течение нескольких часов в вакууме над пятиокисью фосфора при комнатной температуре.

2.5.3. Получение метилолцеллюлозы

В сосуд с двойным дном помещают 0,1 г целлюлозы и ДМФА. Смесь целлюлозы с ДМФА термостатируется при температуре 85 °С. В колбы помещают по 5 грамм параформа и добавляют силиконовое масло для равномерного пробулькивания, далее нагревают на глицериновой бане при температуре 130 °С. Параформ при этом начинает интенсивно возгоняться, образуя формальдегид:



Затем колбы присоединяют к установке. Газовый поток пробулькивается, при этом вначале образуется мутный коллоидный раствор, который постепенно превращается в прозрачный. После получения прозрачного раствора пропускание формальдегида прекращается, и реакционный сосуд помещают в глицериновую баню на 2-3 мин для удаления возможного избытка формальдегида. Затем раствор охлаждают до комнатной температуры.

2.6. Получение триацетата метилцеллюлозы

В охлажденный раствор метилцеллюлозы добавляется ацетилирующая смесь уксусный ангидрид – пиридин (катализатор) в соотношении: 0,1 г растворенной целлюлозы, 10 см³ уксусного ангидрида, 15 см³ пиридина.

Ацетилирование происходит в течение 18 ч при комнатной температуре, после этого смесь осаждают в ледяную воду.

2.7. Получение триацетата целлюлозы

Перед ацетилированием целлюлозу подвергают активации. Для этого 5 г воздушно-сухой целлюлозы разрыхляют и помещают в колбу с притертой пробкой. Пипеткой отбирают 5 см³ ледяной уксусной кислоты и постепенно вносят их в колбу. После этого на 1 ч помещают в термостат с температурой 50 – 80 °С. Ацетилирующую смесь готовят следующего состава:

15 см³ - уксусный ангидрид,
30 см³ - уксусная кислота,
0,5 г – серная кислота (d=1,84).

Приготовленную смесь медленно вносят в колбу с активированной целлюлозой, непрерывно перемешивая содержимое колбы стеклянной палочкой, а затем колбу помещают в водяной термостат с температурой 30°С. Реакционную массу постоянно тщательно перемешивают, не допуская образования комков. Через некоторое время в колбе образуется тесто, постепенно переходящее в прозрачный вязкий сироп.

Ацелирование ведут до «чистоты поля». Из полученного сиропа ацелиллоза высаживается в ледяную воду в виде триацетата.

3.ОПРЕДЕЛЕНИЕ ММР И СРЕДНИХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАСС ПОЛИМЕРОВ МЕТОДОМ ЭКСКЛЮЗИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

При эксклюзионной хроматографии первичная информация о молекулярно-массовом распределении (ММР) получается в виде хроматограммы, представляющей собой зависимость регистрируемого самопишущим потенциометром сигнала детектора от параметров удержания $F(V_R)$, $F(t_R)$ или $F(l_R)$. Если способ детектирования не зависит от свойств хроматографируемых макромолекул, то высота сигнала прямо пропорциональна их концентрациям на выходе из колонки $C(V_R)$ и $C(t_R)$.

Реальная хроматограмма лигнина и лигнина, как полидисперсного полимера, представляет собой суперпозицию большого числа перекрывающихся пиков отдельных полимергомологов (рис. 6). Поэтому ордината $F(V)$ не характеризует концентрацию одного единственного полимергомолога, а является суммой ординат концентрационных вкладов большого числа макромолекул, выходящих из хроматографической колонки с данным V .

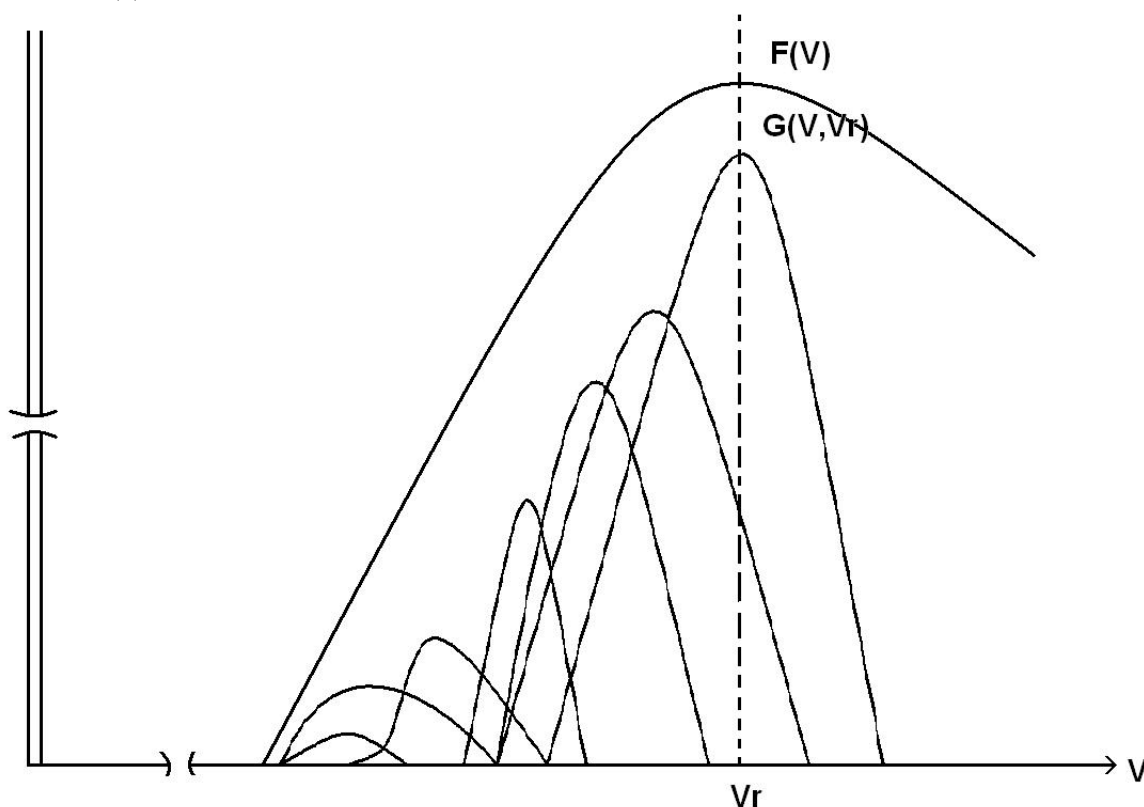


Рис. 6. Хроматограмма полидисперсного полимера $F(V)$ как суперпозиция пиков отдельных полимергомолов $G(V_1 V_R)$

Удобство метода эксклюзионной хроматографии для определения ММР заключается в том, что фракционирующий параметр метода – удерживаемый объем V – является однозначной функцией M , поэтому для эксклюзионной хроматографии справедливо

$$q(V)dV = q(M)dM, \text{ т.е.}$$

$$q(M) = q(V)dV/dM, \quad (12)$$

Характер зависимости dV/dM определяет закон преобразования, задается калибровочной зависимостью V_R от M , которую для данной колонки и условий эксперимента наиболее корректным образом можно получить с использованием охарактеризованных от M_w и M_n узкодисперсных полимерных стандартов. Элементарная калибровочная процедура заключается в последовательной хроматографии стандартов и измерений V_R пиков. Полученные V_R для каждого стандарта наносят на график $V = f(\lg M)$ и соединяют плавной линией, которая называется калибровочной кривой, $V = f(\lg M)$ (см. рис.3). Аналитически калибровочная зависимость $V = f(\lg M)$ любой формы записывается полиномом:

$$V = \sum C_k (\lg M)^{k-1} \quad (13)$$

где C_k – полиномиальные коэффициенты.

В своей средней части СД (см. рис.3) кривая (12) может быть описана линейным уравнением (5).

Таким образом, для определения из хроматографического эксперимента точного выражения ММР лигнина необходимо построить калибровочную зависимость (5) по узким фракциям лигнина и с ее помощью получить ММР любого анализируемого образца.

Библиографический список

Нефедов П.П., Лавренков П.Н. Транспортные методы в аналитической химии полимеров.- Л.: Химия, 1979.

Никитин В.М. Теоретические основы делигнификации. - М.: Лесная промышленность, 1981.

Сарканен К.В., Людвиг К.Х. Лигнины.- М.: Лесная промышленность, 1975.

Стыскин Е.Л., Ициксон Л.Б., Брауде Е.В. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. - М.: Химия, 1986.

Хеншен А., Хупе К.П., Лотшпайх Ф., Вельтер В. Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии.- М.: Мир, 1988.

Содержание

Предисловие	3
1. Молекулярная масса и полидисперсность препаратов лигнина и целлюлозы.....	4
1.1. Методы определения молекулярных масс.....	5
1.2. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии.....	6
1.3. Эксклюзионная хроматография лигнинов и целлюлозы.....	9
2. Анализ лигнина и целлюлозы методом эксклюзионной жидкостной хроматографии.....	14
2.1. Хроматограф жидкостной аналитический «Цвет – 4000».....	15
2.2. Блок аналитический БА -124.....	16
2.3. Спектрофотометрический детектор СПФД-5.....	-
2.4. Расчет средней молекулярной массы и степени полимеризации.....	19
2.5. Получение метилолцеллюлозы.....	20
2.6. Получение триацетата метилцеллюлозы.....	21
2.7. Получение триацетата целлюлозы.....	-
3. Определение ММР и средних молекулярных масс полимеров методом эксклюзионной хроматографии.....	22
Библиографический список.....	23

Редактор и корректор Н.П. Новикова

Техн. редактор Л.Я. Титова

Темплан 2009 г, поз. 61

Подп. к печати 3.06.09 Формат 60x84/16. Бумага тип. № 1.

Печать офсетная. 1,5 уч.-изд. л., 1,5 усл.-печ. л. Тираж 100 экз.

Изд. № 61. Цена «С». Заказ

Ризограф ГОУ ВПО Санкт-Петербургского государственного
технологического университета растительных полимеров, 198095, СПб.,
ул. Ивана Черных, 4.

