

GDK 813.12 /.14 -- 016.2

KEMIJSKA ANALIZA POLISAHARIDOV LESA Z IONSKO IZMENJALNO KROMATOGRAFIJO

Vesna TIŠLER*

Izvleček

V prispevku je obdelana kemijska analiza večinoma standardiziranih določitev holoceluloze, celuloze in hemiceluloz. Primerjalno je opisano določevanje monosaharidov z ionsko izmenjalno kromatografijo s principom delovanja HPLC analizatorja sladkorjev.

Ključne besede: polisaharidi, kromatografija.

CHEMICAL ANALYSIS OF POLYSACCHARIDES OF WOOD BY ION-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY

Vesna TIŠLER*

Abstract

The paper concerns chemical analysis of holocellulose, cellulose and hemicellulose by standardized methods. The analysis is compared with the determination of monosaccharides by ion-exchange chromatography using HPLC sugar analyzer.

Key words: polysaccharides, chromatography.

* dr., dipl. inž. kemije, profesorica, Biotehniška fakulteta, oddelek za lesarstvo, 61000 Ljubljana, Rožna dolina, c. VIII/34.

KAZALO

1	UVOD	277
2	KLASIČNE LABORATORIJSKE DOLOČITVE	277
3	KROMATOGRAFIJA	278
3.1	Tankoplastna kromatografija	279
3.2	Plinska kromatografija.....	279
3.3	Tekočinska kromatografija	280
4	IONSKA IZMENJALNA KROMATOGRAFIJA	281
4.1	Analiza sladkorjev	281
5	SKLEP	284
6	SUMMARY	284
7	REFERENCE	285

1 UVOD

Les ne predstavlja homogene snovi, temveč ima celično zgradbo, ki je v vseh svojih podrobnostih najtesneje povezana s kemično sestavo in je v svojih lastnostih od nje v veliki meri odvisna.

Lesovi zmernega temperaturnega območja vsebujejo 97-99% polimerov z visoko molekulsko maso. Preostalo so nizko molekulske substance, ki jih delimo na ekstraktive in anorganske snovi. Pri tropskih lesovih je ta vrednost nižja in znaša približno 90% (FENGEL, WEGENER 1989).

65-75% lesa predstavljajo polisaharidi, ki jih delimo na celulozo in lesne polioze oz. hemiceluloze. Glavna komponenta lesov iglavcev in listavcev je celuloza, saj predstavlja skoraj polovico lesne mase. Na splošno je definirana kot linearni polimer, zgrajen izključno iz β -D-glukoze in predstavlja osnovno strukturno komponento celične stene. Lesne polioze ali hemiceluloze, ki so tudi v celični steni, vsebujejo predvsem pet nevtrálnih monosaharidov. To so heksoze glukoza, manoz, galaktoza in pentozi ksiloza in arabinoza. Nekatere polioze vsebujejo tudi uronske kisline (HON, SHIROUISHI 1991).

2 KLASIČNE LABORATORIJSKE DOLOČITVE

Kadar v laboratoriju ugotavljamo delež ogljikovih hidratov v lesu, se ponavadi odločimo za določanje holoceluloze. Holocelulozo sta že leta 1933 definirala Ritter in Kurth kot produkt, dobljen iz lesa po odstranitvi lignina. Pri tem nastopa težava, saj idealne delignifikacije tj. popolne odstranitve lignina iz lesa ne moremo doseči, ne da bi pri tem poškodovali polisaharide. Vzrok je v prepletenosti med posameznimi polimeri in kemijskimi vezmi, ki jih povezujejo. Izguba polisaharidov mora biti minimalna, oksidativna in hidrolitska razgradnja celuloze čim nižja. Poznano je več načinov delignifikacije, prevladujeta pa dva postopka. Po prvem uporabljamo za delignifikacijo klor ali brom, čemur sledi ekstrakcija preostanka z alkoholnimi raztopinami organskih baz. Najobičajnejši način je odstranjevanje lignina s kisló raztopino natrijevega klorita (EBRINGEROVA, HROMADKOVA 1986; SIEBER 1951). Postopek poteka pri temperaturi 70-80°C 3-5 ur, kar je odvisno od drevesne vrste. Delignifikacija iglavcev je dolgotrajnejša. Komponenta, ki pretvarja lignin v vodotopno obliko, je klorov dioksid. Le-ta se sprošča, ko raztopino natrijevega klorita nakisamo z očetno kislino. Holocelulozo kot oborino iz zmesi odfiltriramo. Metoda je standardizirana in je natančno opisana v standardu TAPPI 13 m - 54.

Pri ugotavljanju količine celuloze v lesu se v laboratoriju ponavadi odločamo za enega od treh načinov njenega izoliranja:

- iz holoceluloze z odstranitvijo polioz in preostalega lignina
- direktna izolacija celuloze iz lesa, ki vključuje postopke čiščenja

- določanje celuloze s popolno hidrolizo lesa.

Če se ukvarjamo s t.i. sumarno analizo, kjer posamezne komponente lesa izločamo in določamo njihov odstotni delež, je najprimernejša hidroliza polioz v holocelulozi z razredčeno žveplovo (VI) kislino. Pri tem se nam celuloza pojavi kot bela oborina, ki jo lahko kvantitativno določimo.

Pogosto pridobivamo celulozo tako, da holocelulozo v dušikovi atmosferi stopenjsko ekstrahiramo s 5% in 24% raztopino kalijevega ali natrijevega hidroksida. Metodo je že leta 1946 opisal Wise. Kasneje so ugotovili, da je analizo celuloze v lesu mogoče opraviti tudi z uporabo litijevega hidroksida.

Z analiznega stališča se lesne polioze razlikujejo od celuloze po svoji večji topnosti v alkalijah. Nekatero polioze, kot npr. arabinogalaktani macesnov so topni že kar v vodi. Kljub temu jih ne moremo pridobivati neposredno z alkalno ekstrakcijo iz lesa, ker se pri tem ne izločijo le lesne polioze, pač pa še številne ekstraktivne snovi, kot so tanini, pektini, monosaharidi in podobno. Zato pri analizi lesa največkrat polioze ekstrahiramo iz holoceluloze in iz njih izločimo sledove lignina. Izjema so arabinogalaktani in ksilani listavcev, ki jih je mogoče z zadovoljivimi izkoristki ekstrahirati iz lesa brez predhodne delignifikacije. Tako iz lesa topola (*Populus tremuloides*) ekstrahiramo skoraj ves ksilan, iz lesa bukve (*Fagus sylvatica*) pa le polovico. Pri pridobivanju lesnih polioz iz lesa iglavcev je predhodna delignifikacija nujna. Večkrat nas zanima le količina in vrsta polioz v vzorcu, ne da bi jih želeli izolirati. V tem primeru je najhitrejša in najbolj natančna popolna hidroliza polisaharidov in postopna določitev monosaharidov. Fengel in Wegener sta razvila postopek hidrolize s tetrafluorooctno kislino (FENGEL, LUDWIG 1987); številni drugi viri navajajo tudi hidrolizo z žveplovo (VI) kislino (PULS 1991). Mogoča je tudi razgradnja ogljikohidratnega dela lesa z encimi do enostavnih sladkorjev (SARANP, HLL 1989).

Ne glede na vrsto razkroja ogljikovih hidratov lesa je treba pridobljeno zmes monosaharidov in eventuelno disaharidov s primerno kemijsko metodo analizirati. Temu namenu najbolj služijo kromatografske metode, ki so se tako razvile, da so zaradi svoje učinkovitosti in univerzalnosti prerasle številne znane klasične analize.

3 KROMATOGRAFIJA

Kromatografija predstavlja skupno ime za fizikalno-kemijske metode razdvajanja komponent iz zmesi oziroma raztopin. Temelji na specifičnih sposobnostih adsorpcije posameznih komponent, ki jih hočemo odstraniti iz zmesi (TIŠLER 1991, PERKAVAC, PERPAR 1969).

V grobem jo delimo na tankoplastno, plinsko in tekočinsko kromatografijo. Princip vseh je porazdelitev posameznih komponent zmesi med stacionarno in mobilno fazo (MILOVANOVIČ 1985, GROB 1985).

3.1 Tankoplastna kromatografija

Pri tankoplastni kromatografiji je stacionarna faza kromatografska plošča, po kateri s pomočjo topila, ki je mobilna faza, sestavine zmesi različno dolgo potujejo in se med seboj ločijo. Tako je mogoče analizirati zmes različnih sladkorjev.

Prva tovrstna analitika se je razvila pred približno 30 leti, ko je izšel standard TAPPI T 250 pm-75, v katerem je opisana identifikacija in kvantifikacija sladkorjev po hidrolizi lesa s papirno kromatografijo. Analize so bile dolgotrajne, saj so s pripravami vred potrebovali kar nekaj dni. Uspešne analize so bile predvsem tiste, pri katerih v vzorcih niso bile več kot štiri vrste monosaharidov; poleg tega je bilo ločitve nekaterih sladkorjev kot npr. manoze in fruktoze ter glukoze in galaktoze včasih nemogoče doseči.

Kasneje so se razvile druge metode, kot npr. tankoplastna določitev sladkorjev po Klusu in Ripphahnu, objavljena leta 1982. Avtorja sta detekcijo monosaharidov na kromatografski plošči izvedla tako, da sta posamezne monosaharide in situ derivatizirala v fluorescenčne spojine, ki sta jih nato fluorimetrično ali fotometrično analizirala (KLAUS, RIPPHAHN, 1982).

Razvoj analitike določanja monosaharidov s tankoplastno kromatografijo še vedno poteka v smeri iskanja novih mobilnih faz tj. mešanic topil kot tudi stacionarnih faz tj. plošč, prekritih z različnimi naravnimi in umetnimi materiali (KOIZUMI, UTAMURA, OKADA 1985, DONER, BILLER 1984, VEGA, VALLADERES, SAELZER).

3.2 Plinska kromatografija

Plinska kromatografija je analizna metoda, pri kateri zmes hlapnih substanc vstopa v kromatografsko kolono, ki je napolnjena z adsorbentom ali nosilcem stacionarne faze. Skozi kolono vodimo nosilni plin, ki se ne veže na adsorbent, pač pa prenaša posamezne sestavine zmesi vzdolž kolone. Komponente zmesi se v koloni ločijo in ločeno iz nje izstopajo, kar zaznamo z ustreznim detektorjem (PERKAVAC, PERPAR 1969).

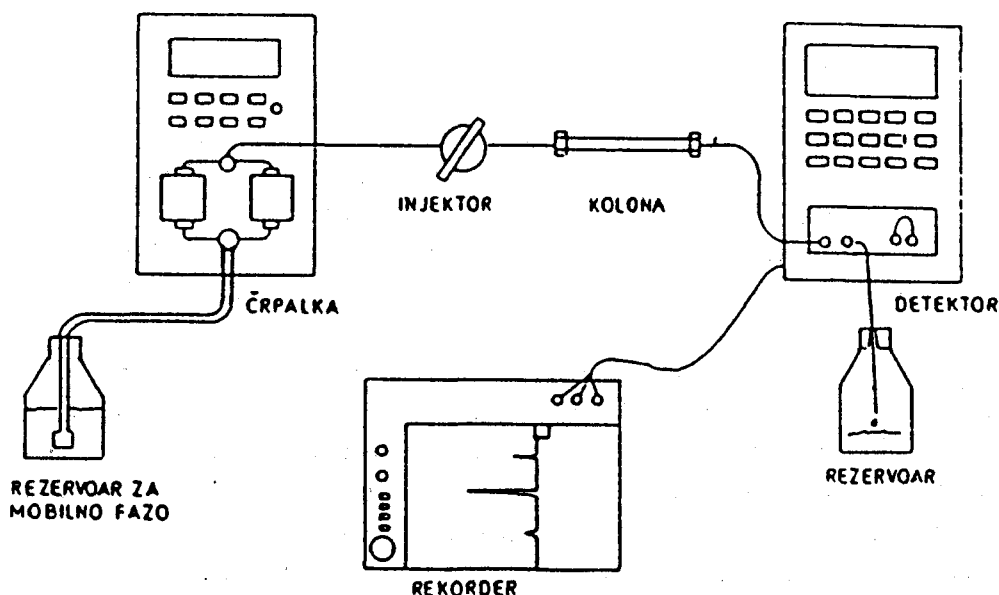
Analizo ogljikovih hidratov lesa s plinsko kromatografijo določa standard TAPPI T 249 pm-75 (DONALD, GARBY 1983). Nujna je predhodna hidroliza lesa do monosaharidov in njihova pretvorba v obliko, primerno za plinsko kromatografsko analizo. Vrsta derivatizacije monosaharidov je pomembna stopnja v analizi. Po prepričanju nekaterih avtorjev je najuspešnejše siliranje monosaharidov, katerega laboratorijska izvedba pa je zaradi uporabe strupenih kemikalij relativno zahtevna.

V najnovejšem času prihaja do veljave analitika GC-MS tj. plinska kromatografija v povezavi z masno spektroskopijo, ki je natančna in hitra, vendar zelo draga.

3.3 Tekočinska kromatografija

V nasprotju s plinsko kromatografijo, kjer je mobilna faza plin, je pri tekočinski kromatografiji mobilna faza tekočina. Njen začetek sega v štirideseta leta, a šele v zadnjih desetletjih se je z razvojem ustreznih detektorjev, kolon, novih materialov izpopolnila. Danes poznamo več vrst tekočinskih kromatografij kot so tekočinsko-trdna kromatografija, tekočinsko-tekočinska kromatografija, ionsko-izmenjalna kromatografija, gelska kromatografija, afinitetna kromatografija in ekstrakcijska kromatografija (MILOVANOVIČ 1985).

Ločljivost posameznih substanc v vzorcu je izredno izpopolnjena, zato že v kontrolnih laboratorijih v različnih proizvodnjah kakor tudi v raziskovalnih organizacijah večinoma uporabljamo t.i. HPLC aparate. Izraz tekočinska kromatografija obsega različne izvedbe tekočinske kromatografije, pri čemer je pomembna visoka ločljivost aparata. HPLC - High Performance Liquid Chromatography namreč pomeni tekočinsko kromatografijo z visoko ločljivostjo. HPLC je razvila najrazličnejše stacionarne faze, ki narekujejo ustrezne mobilne faze in različne detektorje. Na razpolago imamo vse gradacije adsorpcijske stacionarne faze, kot je npr. silikagel s premerom delcev od $3\ \mu\text{m}$ dalje, reverzne faze vseh velikosti delcev z vezanimi različnimi skupinami, ionske izmenjevalce, posebne permeabilne stacionarne faze in vedno bolj uporabljene kiralne stacionarne faze. Kljub izvedbam aparatov, ki zahtevajo vrhunsko tehniko, je princip delovanja tekočinskega kromatografa enostaven in ga shematsko prikazuje slika 1.



Slika 1 Shema najenostavnejšega HPLC sistema (GORNIK 1991) Najpomembnejši del inštrumenta je separacijska kolona preko katere črpalka enakomerno potiska tekočo mobilno fazo. Detektor, ki je lahko UV-VIS, fluorescenčni, kulometrični, detektor na lomni količnik, detektor na električno prevodnost itd. zazna posamezne komponente, ki jih rekorder zabeleži.

4 IONSKA IZMENJALNA KROMATOGRAFIJA

Ionska izmenjalna kromatografija je tekočinska kromatografija, ki temelji na ločevanju substanc na ustrezno pripravljenem ionskem izmenjevalcu. Veliko se uporablja za določanje kationov in anionov pa tudi organskih snovi kot so nukleinske kisline in amino kisline. Ionska izmenjalna kromatografija velja za zelo uspešno določevanje kompleksnih zmesi ogljikovih hidratov in poteka na močno bazičnih izmenjevalnih smolah (HENSCHEN, HUPE, LOTTSPREICH, VOELTER 1985).

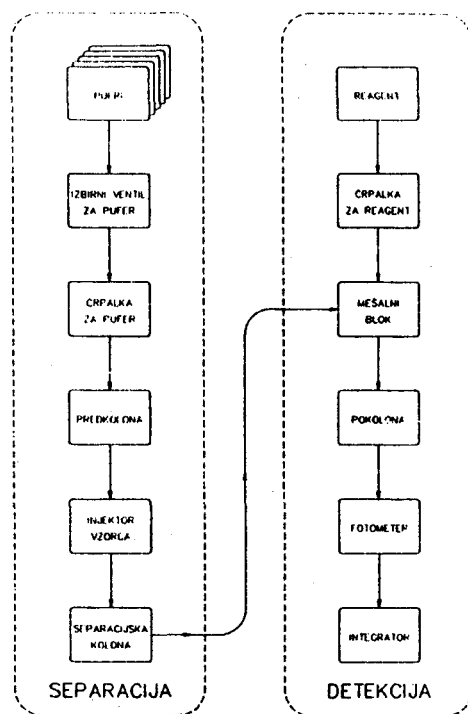
Mnogo ogljikovih hidratov se razlikuje le po legi ene hidroksilne skupine, kar otežuje njihovo analizo. Princip ločitve posameznih monosaharidov z ionsko izmenjalno kromatografijo temelji na dejstvu, da monosaharidi in polialkoholi tvorijo negativne boratne komplekse. Stabilnost le-teh je odvisna od prostorske orientacije sosednjih hidroksilnih skupin. Monosaharidi so šibki elektroliti in ionski izmenjevalci na njih le delno učinkujejo. Nasprotno velja za boratne komplekse, ki jih lahko ob prehodu skozi kolono na osnovi različne adsorpcije na nosilcu uspešno ločimo (SINNER, SIMATUPANG, DIETRICH 1975).

Prva poročila o določanju ogljikovih hidratov z avtomatsko tekočinsko kromatografijo segajo v leto 1974. Že takrat so ugotovili, da z uporabo anionske izmenjalne smole lahko ločimo posamezne monosaharide v hidrolizatu lesa in jih na osnovi boratnih kompleksov, ki jih tvorijo, kvalitativno in kvantitativno določimo. Ta tehnika se je z leti zelo izpopolnila, tako da obstajajo aparati, prirejeni za rutinske analize ogljikovih hidratov. Poenostavljeno jih imenujemo kar analizatorje sladkorjev.

4.1 Analizator sladkorjev

Delovanje analizatorja sladkorjev lahko razdelimo na dva dela, kar je shematsko prikazano na sliki 2.

Prvi del predstavlja nastanek in ločitev borovih kompleksov sladkorjev na separacijski koloni. Kot vidimo iz skice, je pred injektorjem vzorca predkolona, ki zadrži eventuelne nečistoče. Puferske raztopine, katerih osnovna sestavina je H_3BO_3 pod ustreznim tlakom dušika potujejo skozi sistem. Detekcija, ki predstavlja drugi del, poteka na osnovi pokolonske derivatizacije. V ta namen najpogosteje uporabljamo derivatizacijo z bakrovim bicinkoninatom. Monosaharidi reducirajo bakrove (II) ione v alkalnem mediju do bakrovih (I) ionov, ki reagirajo z bakrovim bicinkoninatom, pri čemer se tvori intenzivno obarvan modro-vijoličen kompleks. Intenziteto obarvanja zazna vgrajen spektrofotometer pri valovni dolžini 570 ali 420 nm.



Slika 2. Shematski prikaz delovanja analizatorja sladkorjev



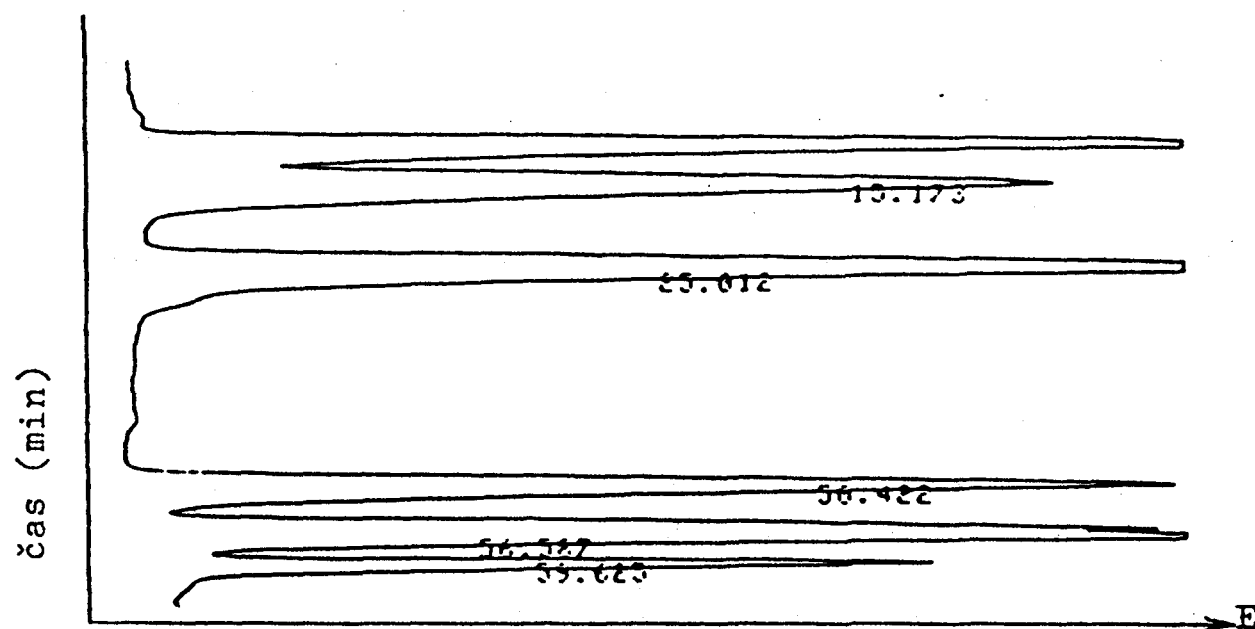
Slika 3. Analizator sladkorjev Biotronik HPLC 5001 v Laboratoriju za kemijo lesa na Biotehniški fakulteti, Oddelek za lesarstvo v Ljubljani (foto GORNIK)

Kadar analiziramo ogljikove hidrate v vzorcu s HPLC analizatorjem sladkorjev moramo predhodno izdelati program delovanja aparata. Ponavadi je sestavljen iz osmih korakov, ki si smiselno sledijo in so prikazani v preglednici 1.

Preglednica 1 Program poteka analize sladkorjev

Korak	1	2	3	4	5	6	7	8
Čas (min.)	5	14	14	7	31	10	15	0
Odvzem vzorca		X						
Reagent	X	X	X	X	X			
Pufer A	X	X					X	
Pufer B			X					
Pufer C				X				
Pufer D					X			
Regeneracija						X		
Temperatura kolone,								
T1 = 60°C	X	X		X			X	
T2 = 70°C			X		X			
T3 = 80°C						X		

Rezultate analize zapisuje na analizator sladkorjev priključen integrator, ki med analizo izriše kromatogram in po zaključku le-te izračuna površine odklonov in koncentracije posameznih komponent po predhodno danih parametrih. Primer kromatografske analize sladkorjev kaže slika 4.



Slika 4 Kromatogram zmesi monosaharidov in njihove koncentracije

Retenzijski čas	Površina	Koncentracija	Substanca
15,173	3639650	17,5053	maltoza
25,012	5605981	26,9625	ramnoza
50,422	3832475	18,4327	galaktoza
56,587	5060696	24,3399	ksiloza
59,625	2652958	12,7597	glukoza
Skupaj	20791754	100,	

5 SKLEP

Pri kemijski analizi polisaharidov v lesu se lahko poslužujemo klasične laboratorijske tehnike, ki nam omogoča predvsem ugotavljanje količin osnovnih sestavin celične stene kot so celuloza in hemiceluloze ali holoceluloza. Za podrobnejšo analizo so zelo uporabne kromatografske metode. V tem primeru moramo ogljikohidratni del lesa razkrojiti na njegove sestavne dele in jih postopoma analizirati.

Za analizo monosaharidov, disaharidov in nekaterih polialkoholov je primerna uporaba ionske izmenjalne kromatografije, s katero lahko zelo natančno določimo že minimalne količine. Tako so v drevesnem soku, dobljenem na različnih višinah zdravih in bolnih smrek, borov in bukev odkrili spremenjeno sestavo ogljikovih hidratov (FENGEL 1987).

Na splošno ima ionska izmenjalna kromatografija določene prednosti pred klasičnimi analizami, ki jih uporabljamo v lesni kemiji. Vodne raztopine lahko analiziramo brez predhodne obdelave. Količina nečistoč v vzorcu lahko doseže visoko stopnjo, a je analiza še vedno zadosti natančna. Za pripravo vzorca, ki ga injiciramo v kolono, se lahko poslužujemo običajnih kislinskih in encimskih hidroliz lesa brez dodatnih nadaljnjih operacij. Če uporabljamo za določanje sladkorjev plinsko kromatografijo, jih moramo pretvoriti v njihove hlapne derivate. Le-ti pa pri analizi dajejo več odklonov, kar se pri ionski izmenjalni kromatografiji ne dogaja (SINNER, SIMATUPANG, DIETRICH 1975). Za analizo ne potrebujemo mnogo časa. Nujna pa je nabava relativno dragega HPCL analizatorja sladkorjev in posebnih kemikalij. Analize lahko uspešno izvajajo le visoko izobraženi in specializirani kadri.

6 SUMMARY

CHEMICAL ANALYSIS OF POLYSACCHARIDES OF WOOD BY ION-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY

Chemical analysis of polysaccharides of wood may be performed with a classical laboratory method, which enables us above all to determine the content of basic components of the cell wall, such as cellulose and hemicellulose or holocellulose. A more detailed analysis can be achieved by a chromatographic method. Carbohydrates of wood have to be separated into their constituent parts, which are then analyzed step by step.

Ion-exchange chromatography is most suitable for an analysis of monosaccharides, disaccharides and some polyalcohols, as it achieves a most accurate determination of minimum amounts. This method was successfully used to determine the changed composition of carbohydrates in sap obtained from healthy as well as damaged spruce, pine and beech wood of different altitudes.

In general, ion-exchange chromatography has some advantages over classical methods used for wood analysis. Aqueous solutions can be analyzed without prior processing. Although the sample may contain a high amount of impurities, results obtained are still accurate enough. For the preparation of a sample to be injected into columns, standard acid and enzyme hydrolyses of wood can be used without an additional procedure. The application of gas chromatography for the determination of sugars involves their conversion into volatile derivatives, which makes determination inaccurate. This is not the case if ion-exchange chromatography is used. The method is not time consuming yet it requires the purchase of a relatively expensive HPLC sugar analyzer and special chemicals as well as highly skilled and specialized staff.

7 REFERENCE

- BROWNING, B. L., 1967. *Methods of wood chemistry*. Interscience Publishers. New York, London, Sydney.
- DONER, L. W., BILLER, L. M., 1984. High-Performance thin-layer chromatographic separation of sugars: preparation and application of aminopropylbonded-phase silica plates impregnated with monosodium phosphate. *Journal of Chromatography* 287, s. 391-398.
- DONALD, K. L., GARBY, A. C., 1983. Gas chromatography for carbohydrates. *Tappi Journal*.
- EBRINGEROVA, A., HROMADKOVA, Z., 1986. Zur Isolierung von Hemicellulosen des D-Xylantyps aus Laubholzern. *Holz als Roh-und Werkstoff*, 44, s. 223-227.
- FENGEL, D., 1987. Chemisch-analytische Untersuchungen am Holz erkrankter Bume. *Holz als Roh-und Werkstoff* 45, s. 501-507.
- FENGEL, D., LUDWIG, M., 1987. Zur chemischen Zusammensetzung der Wasserextrakte aus Tannenholz (*Abies alba* Mill.). *Holz als Roh-und Werkstoff* 47, s. 223-226.
- FENGEL, D., WEGENER, G., 1989. *Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions*, Walter de Gruyter. Berlin, New York.
- GORNIK, D., 1991. *Ultrafiltracija kostanjevega tanina*. Magistrsko delo. Ljubljana.
- GROB, R. L., 1985. *Modern practice of gas chromatography*. John Wiley and Sons.
- HENSCHEN, A., HUPE, K. P., LOTTSPEICH, F., VOELTER, W., 1985. High performance chromatography in biochemistry. VCH Weinheim, s. 395-412.
- HON, D., SHIROUSHI, N., 1991. *Wood and cellulosic chemistry*. Marcel Dekker, Inc. New York, Basel.

- KLAUS, R., RIPPHAHN, J., 1982. Quantitative Dischichtchromatographische Analyse von Zuckern, Zuckersuren und Polialkoholen. *Journal of Chromatography* 244, s. 99-124.
- KOIZUMI, K., UTAMURA, T., OKADA, Y., 1985. Analyses of homogeneous D-glucopoligosaccharides and -polisaccharides (Degree of polymerization up to about high-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography). *Journal of Chromatography* 321, s. 145-157.
- MILOVANOVIĆ, G., 1985. Hromatografske metode odvajanja. Univerza v Beogradu. Beograd.
- PERKAVAC, J., PERPAR, M., 1969. Kromatografija. Univerza v Ljubljani. Ljubljana.
- PULS, J., 1991. Characterization of hemicelluloses from organosolv pulping. Hamburg.
- SARANP, P., HLL, W., 1989. Soluble carbohydrates of *Pinus sylvestris* L. sapwood and heartwood. *Trees* 3, s. 138-143.
- SIEBER, R., 1951. Die Chemisch-Technischen Untersuchungs Methoden der Zellstoff und Papier Industrie. Springer Verlag. Berlin, Gttingen, Heidelberg.
- SINNER, M., SIMATUPANG, M. H., DIETRICH, H. H., 1975. Automated quantitative analysis of wood carbohydrates by borate complex ion exchange chromatography. *Wood Science and Technology*, s. 307-322.
- TIŠLER, V., 1991. Kemijska analiza lesa. Biotehniška fakulteta. Ljubljana.
- VEGA, M., VALLADERES, J., SAELZER, R., Improved separation and quantitative analysis of sucrose, glucose, fructose and xylose in natural products by High performance thin-layer chromatography (HPTLC). Universidad de Concepcion. Chile.
- 1991. Biotronik Carbohydrate Analyzer LC 5001. Navodila za uporabo.