

УДК 676.11/547.942:54.05

И. И. КАРПУНИН¹, В. В. КУЗЬМИЧ¹, Н. Г. КОЗЛОВ²

О ПРИРОДЕ СВЯЗИ ЛИГНОУГЛЕВОДНОГО КОМПЛЕКСА ЕЛОВОЙ ДРЕВЕСИНЫ

¹Белорусский национальный технический университет,

²Институт физико-органической химии НАН Беларуси

(Поступила в редакцию 27.12.2011)

Ранее [1] было установлено наличие простой, сложной, эфирной и углерод-углеродной связей между лигнином и углеводами древесной части льна. Анализ литературных источников [1–8] свидетельствует о наличии в растениях различной природы химических связей между полисахаридами и лигнином. Причем многие экспериментальные данные, которые привлекаются для доказательства наличия и природы связи лигнин–углевод, при дальнейшем изучении не приводят к однозначным результатам. В отношении же природы этих связей следует заметить, что данный вопрос пока невыснен, так как ранее не было выделено индивидуальных соединений лигнина с углеводами, что позволило бы убедительно доказать существование той или иной связи и ее местонахождение. Полученные результаты в работе [1] доказали наличие химических связей между лигнином и углеводами растительного сырья (древесной части льна).

Цель исследований – установление типов связей между лигноуглеводным комплексом еловой древесины (лигнином и углеводами). В настоящей работе приводятся результаты исследований по выделению и идентификации индивидуальных соединений лигнина с углеводами из лигноуглеводного комплекса еловой древесины, которые позволили доказать наличие некоторых химических связей между ними и установить их природу.

Выделение соединений из лигноуглеводного комплекса еловой древесины, связанных с лигнином и углеводной частью. Опилки еловой древесины (Минского лесничества) после ее экстракции спиртобензольной смесью (1:1) в течение 3 сут измельчали до пылевидного состояния на шаровой мельнице. После этого ее в течение 30 сут подвергали размолу в вибрационной шаровой мельнице в среде диоксана и толуола (1:1) в атмосфере азота. Остаток (размолотую древесину в среде диоксана и толуола) разделяли на 4 части (по 3 г каждая) и помещали в батарейные автоклавы. В первый автоклав заливали 10%-ный водный раствор аммиака при жидкостном модуле 1:12; во второй под давлением подавали CO₂ из расчета 2–3% к навеске (жидкостной модуль 1:8); в третий заливали 45%-ную уксусную кислоту (при жидкостном модуле 1:8); в четвертый – диоксан, содержащий 0,2% растворенной соляной кислоты (жидкостной модуль 1:10).

Закрытые автоклавы помещали в глицериновую баню и выдерживали 6 ч при 80 °С. После охлаждения (при комнатной температуре) автоклавы открывали, предварительно спустив давление, а содержимое переносили в колбы и последовательно экстрагировали в следующей последовательности: эфиром, этилацетатом, изоамилацетатом и в заключение ацетоном. После удаления экстрагентов оставались остатки еловой древесины, которые не исследовались. Условно названные растворы: эфирный (фракции A₁, A₂, A₃, A₄), этилацетатный (B₁, B₂, B₃, B₄), изоамилацетатный (C₁, C₂, C₃, C₄) и ацетоновый (D₁, D₂, D₃, D₄) (согласно номера батарейного автоклава и используемого экстрагента) отгоняли под вакуумом до 10 мл и подвергали хроматографическому разделению содержащихся в них веществ (фракции исследовали последовательно согласно их условного названия).

Для этого указанные фракции наносили на верхнюю часть сорбента колонки (3×100 см), заполненной полиамидом (полиамидный сорбент готовили по методу В. И. Литвиненко с сотр.). В результате при исследовании каждой фракции собирали 15 фракций элюата (по 30 мл каждая). Даль-

нейшее элюирование (после элюирования водой) проводили последовательно 5, 10, 25 и 50%-ным водным раствором метанола и собирали фракции 18–24; 25–30; 31–36; 37–45. Фракции 46–50 вымывали чистым метанолом. Из собранных фракций выбирали содержащие в своем составе соединения, связанные химической связью с углеводами. В результате (при исследовании фракции A₁) из фракции 22 на сефадексе марки LH-20 выделили соединение I; (при исследовании фракции B₂) из фракции 32 на сефадексе марки G-100 – соединение II; (при исследовании фракции C₃) из фракций 34, 35 на сефадексе марки G-75 – соединение III; (при исследовании фракции D₄) из фракции 40 на сефадексе марки LH-20 – соединение IV; (при исследовании фракции D₃) из фракции 43 на сефадексе марки G-75 – соединение V. Разделение веществ, содержащихся в указанных фракциях, было сопряжено с большой трудностью и проводили на сефадексе марок LH-50; G-100 и G-75 гельфильтрацией на колонке 3×80 см. Использование сефадексов указанных марок было необходимо для достижения наилучшего разделения выделяемых веществ.

Для бумажной хроматографии использовали бумагу ватман 3, которую пропитывали при необходимости (до нанесения веществ) 0, 1 Н фосфатным буфером, а также тетраборатом натрия (в зависимости от заданного рН 7,5; 8,2; 9) разрезали на полоски 10×50 см, а затем высушивали при 85–90 °С. С целью хроматографии на бумаге по 15 капель 10%-ного спиртового раствора вещества наносили на хроматографическую бумагу (смесь продуктов и свидетелей). В качестве растворителей использовали одну часть (по объему) бензола и две части лигроина (Т. кип. = 85–110 °С); а также смеси: метанол – изопропиловый эфир–вода (1:1:1); метанол–бензол–вода (7:7:10); вода–лигроин–хлороформ (Т. кип. = 85–110 °С) – метанол (5:7:2:1).

Хроматографирование проводили при комнатной температуре нисходящим способом до разделения входящих в смесь продуктов (результаты сравнивали с литературными данными). В результате было установлено, что некоторые из веществ, содержащиеся во фракциях, разделяются не полностью. Например, при исследовании фракций A₄, B₃, C₂ на бумажных хроматограммах четкого разделения пятен веществ не наблюдалось (3 соединения).

В качестве проявителей использовали реактив Миллона, диазотированную сульфаниловую кислоту, бензидин в уксусной кислоте, флюороглюцин в HCl, раствор Дениса. Перед проявлением хроматограмму просматривали в УФ-свете и на бумаге отмечали положение и окраску пятен содержащихся веществ. При использовании некоторых проявителей медленно образуется окрашивающий фон. Из-за этого пятна веществ на хроматографической бумаге постепенно становятся неразличимыми, поэтому перед проявлением по мере необходимости из непроявленной хроматограммы вырезали участки, соответствующие отдельным веществам.

Результаты бумажной хроматографии показывают, что при пропитывании хроматографической бумаги фосфатным буфером при рН 7,5 (растворитель: одна часть (по объему) бензола и две части лигроина (Т. кип. 85–110 °С) соединение I (при разделении фракции 22) имеет R_f 0,48. При пропитывании хроматографической бумаги при рН 8,2 (растворитель: метанол–изопропиловый эфир–вода (1:1:1) соединение II (при разделении фракции 32) имеет R_f 0,32, а при пропитывании хроматографической бумаги при рН 9,0 (растворитель: вода–лигроин–хлороформ (Т. кип. = 85–110 °С) – метанол (5:7:2:1) соединение III имеет R_f 0,16. Соединения IV и V имеют R_f 0,23 и 0,36 соответственно при разделении фракций 40 и 43 (растворитель: вода–лигроин–хлороформ (Т. кип. = 85–110 °С) – метанол (5:7:2:1) после пропитки хроматографической бумаги фосфатным буфером при рН 7,5 и ее сушки.

Т а б л и ц а 1. Результаты колоночной и бумажной хроматографий по выделению соединений из фракций

Соединение	Выделено из фракций, % (по выходу из колонки)			
	A	B	C	D
I	5,1	2,0	2,5	2,0
II	4,0	3,0	?	?
III	1,2	1,1	1,7	3,0
IV	–	3,5	?	2,0
V	3,3	?	3,0	?
3 соединения разделились неполностью	–	–	–	–

П р и м е ч а н и е «?» – неясно из-за плохого разделения; «прочерк» – отсутствие соединения.

В результате методом колоночной хроматографии (с помощью бумажной) из фракций были выделены соединения лигнина с углеводами еловой древесины, условно обозначенные I–V. Соединения I–III идентифицированы. Полученные результаты по выделению соединений I–V из указанных фракций представлены в табл. 1.

Идентификация выделенных соединений. Идентификацию проводили с помощью элементного анализа, определения $T_{пл}$ закристаллизованных соединений, ЯМР¹³C-, ИК-, УФ спектроскопии и масс-спектрометрии. ЯМР ¹³C спектры выделенных соединений снимали на спектрометре «Bruker Avance 400» с использованием дейтерированного растворителя, ИК спектры записывали на приборе «Specord IR-75», а масс-спектры – на приборе «Вариан МАТ-311». Для идентификации выделенных соединений применяли также кислотный гидролиз. С целью установления строения полисахаридов, связанных с лигнином, их метилировали [9]. Результаты испытаний представлены в табл. 2 и 3.

Т а б л и ц а 2. Температуры плавления, данные элементного анализа, содержание метоксильных групп и результаты масс-спектрометрии выделенных из еловой древесины соединений лигнина с углеводами

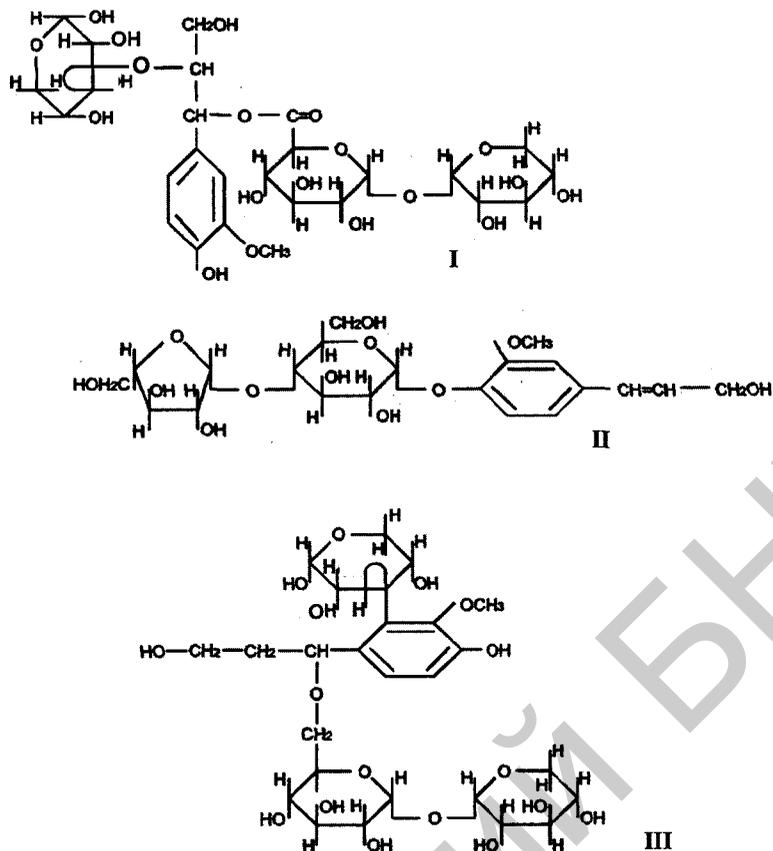
Соединение	$T_{пл}, ^\circ\text{C}$	Найдено			Брутто-формула	Вычислено			Метоксильные группы		Пики (масс-спектрометрия)	
		С	Н	О		С	Н	О	найдено	вычислено	молекулярные	ионные
I	Не кристаллизуется	47,90	5,70	46,40	$\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_{19}$	47,71	5,81	46,48	4,70	4,74	654	60; 73; 85; 89; 132; 149; 212; 297
II	185–186	54,25	6,15	39,60	$\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$	54,05	6,31	39,64	6,85	6,98	444	57; 60; 119; 132; 149; 179; 253
III	178–190	49,87	6,50	43,63	$\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_{17}$	50,00	6,41	43,59	4,81	4,97	624	60; 85; 132; 149; 245; 329; 343

Т а б л и ц а 3. Сигналы в спектрах ЯМР ¹³C неацетилированных соединений лигнина с углеводами

Отнесение атомов углерода к структурным фрагментам (данного диапазона)	Химический сдвиг ¹³ C м. д. для соединений (отнесение сигналов)		
	I	II	III
Ароматический гваяцильного типа	148,4	149,0	149,2
Простой эфирной связи между α -углеродным атомом боковой цепи гваяцилпропановой структуры и C_6 -глюкозы	–	–	77,5
4-О-1 связи между ксилозой и арабинозой	–	126,3	–
Простой эфирной связи между β -углеродным атомом боковой цепи гваяцилпропановой структуры и C_6 -глюкозы	–	–	–
Простой эфирной связи между β -углеродным атомом боковой цепи гваяцилпропановой структуры и C_2 -глюкозы	83,0	–	–
Сложной эфирной связи между α -углеродным атомом боковой цепи гваяцилпропановой структуры и C_6 -глюкозы	188,4	–	–
1-О-4 связи между глюкозой (C_1) и ксилозой (C_4)	71,2	–	71,8
Углерод-углеродной связи между C_3 -углеродным атомом гваяцилпропановой структуры и C_6 -глюкозы	–	–	–
Метоксильной группы гваяцилпропановой структуры	57,5	56,4	56,8
Гликозидной связи между C_4 -углеродным атомом гваяцилпропановой структуры и C_1 -ксилозы	–	134,8	–
Ароматические ксилозы при C_4 -углеродном атоме гваяцилпропановой структуры	154,0	–	144,4
Углерод-углеродной связи между C_3 -углеродным атомом гваяцилпропановой структуры и C_2 -ксилозы	–	–	107,2

П р и м е ч а н и е. «Прочерк» – отсутствие сигналов к структурным фрагментам данного элемента.

Из табл. 1 следует, что из фракций А, В, С и D выделено 5 соединений, причем разделяется от 7 до 15% соединений, находящихся в указанных фракциях, а остальные не разделяются. Это можно объяснить тем, что в условиях расщепления лигнина, связанного с углеводами химической связью, в раствор переходят продукты с разной молекулярной массой. Очевидно, что величина молекулярной массы некоторых отщепившихся соединений лигнина с углеводами влияет на их разделение. Из пяти выделенных соединений три идентифицировано (рисунок).



Схемы выделенных идентифицированных соединений

Из результатов элементного анализа (табл. 2) следует, что расчетные значения по содержанию С, Н, О и метоксильных групп близки по значению с экспериментальными. Анализ масс-спектров (табл. 2) показывает, что распад углеводов-пираноз выделенных соединений (или фураноз) начинается с разрыва связей C_1-C_2 , C_1-O_r и C_1-O_k , что подтверждается литературными источниками [11–14]. Для фураноз характерен в основном разрыв связи C_4-C_5 , который также происходит в гексапиранозах, но значительно меньше.

По наличию пиков ионов с молекулярными массами анализировали строение ионов, а затем соединений I–III в целом. Для соединения I характерно наличие в масс-спектре иона $C_3H_5O_3^+$ с массой 89, что указывает на присутствие в нем простой эфирной связи между β -положением боковой цепи фенолпропана и C_3 -ксилозы. На присутствие сложной эфирной связи в соединении I между α -углеродным атомом боковой цепи мономера лигнина и C_6 -глюкозы также указывает существование иона $C_3H_5O_3^+$ с массой 89.

В масс-спектре соединения II присутствуют пики ионов $C_{10}H_{11}O_3^+$ с массой 179 и $C_9H_{17}O_8^+$ с массой 253, которые указывают на наличие гликозидной связи между мономерами лигнина по C_4 -атому фенолпропановой структуры и C_1 -атому глюкозы.

На наличие в соединении III простой эфирной связи между α -углеродным атомом боковой цепи фенолпропановой структуры лигнина указывает пик иона $C_{11}H_{14}O_4^+$ с массой 210. В масс-спектре пики ионов $C_5H_9O_4^+$ с массой 133 и $C_{11}H_{14}O_4^+$ с массой 210 показывают, что в соединении III существуют С–С-связи между соединениями лигнина с углеводами.

Для анализа спектров ЯМР ^{13}C выделенных соединений (I–III) лигнина с углеводами из еловой древесины использовали результаты, изложенные в литературных источниках [4, 10, 15–19]. В спектре ЯМР ^{13}C выделенных соединений (I–III) наблюдаются интенсивные сигналы в диапазоне 148,4–147,2 м. д., которые характерны для ароматических соединений гваяцильного типа. Имеются сигналы, характерные для ароматических атомов углерода, связанных с атомом кислорода (164,5–138,5 м. д.). Наличие в спектрах соединения III сигнала 76,4 м. д. свидетельствует

о присутствии в нем простой эфирной связи между α -углеродным атомом боковой цепи гваяцилпропана и C_6 -глюкозы.

В спектре соединения **I** имеется сигнал 83,2 м. д., который указывает на наличие простой эфирной связи между β -углеродным атомом боковой цепи гваяцилпропана и C_3 -ксилозы, а также имеется сигнал 188,6 м. д., свидетельствующий о присутствии сложной эфирной связи между α -углеродным атомом боковой цепи гваяцилпропановой структуры и C_6 -глюкозы.

Анализ спектров ЯМР ^{13}C соединений **I** и **III** показывает, что в них имеются интенсивные сигналы в диапазоне 71–72 м. д. (71,4; 72,2 м. д.), указывающие на наличие 1-O-4 связи между глюкозой (C_1) и ксилозой (C_4). В спектре ЯМР ^{13}C соединения **II** имеется уширенный сигнал, указывающий на присутствие гликозидной связи между C_4 -углеродным атомом гваяцилпропановой структуры и C_1 -глюкозы—136,5 м. д., а также сигнал, свидетельствующий о наличии связи между 4-O-1 между глюкозой и арабинозой – 128,4 м. д. (C_4 -ксилозы и C_1 -арабинозы).

Сигнал 108,7 м. д. в спектре ЯМР ^{13}C соединения **III** указывает на наличие углерод-углеродной связи между C_5 -гваяцилпропановой структуры и C_6 -глюкозы, а также 71,2 м. д., свидетельствующий о присутствии 1-O-4 связи между глюкозой и ксилозой (между C_1 - и C_4 -углеродными атомами).

Анализ УФ спектров соединений **I–III**, полученных с добавками ионизирующих и комплексообразующих реагентов, позволил нам подтвердить место присоединения углеводов к фенолпропановой структуре. УФ спектры соединений **I–III** имеют максимум поглощения при 280–285 мкм и слабое при 328–330 мкм. Под действием уксуснокислого натрия в УФ спектре наблюдается смещение максимума поглощения в длинноволновую часть спектра на 20 мкм, что характерно для соединений **I** и **III**, которые содержат свободную OH-группу. В отношении соединения **II** следует заметить, что под действием $AlCl_3$ максимум поглощения в УФ спектре соединения **II** не смещается, что указывает на гликозидирование фенольного гидроксила фенолпропановой структуры.

В ИК спектре соединения **I** существует интенсивная полоса поглощения при 1670 см^{-1} , характерная для сложной эфирной группировки. Отсутствие полосы в ИК спектрах соединений **II** и **III** при 1020 см^{-1} (характерной для ν CO-группы CH_2OH глюкозы) также указывает, что остаток в глюкозе связан с первичным гидроксилом при C_6 -глюкозы.

Результаты кислотного гидролиза выделенных соединений, согласно работе [9], показали, что при их кипячении в течение 8 ч в 2%-ной HCl в гидролизатах обнаружены глюкоза, ксилоза (соединение **I**); глюкоза, арабиноза (соединение **II**); глюкоза, ксилоза (соединение **III**). Это свидетельствует о том, что исследуемые соединения в своем составе содержат углеводы.

Проведенные нами исследования по метилированию и частичному гидролизу неразделившихся соединений лигнина с углеводами согласно методике, изложенной в [9], показывают, что (согласно относительному содержанию метилпроизводных в гидролизатах) в их состав входят глюкоксилан и глюкоманнан. Причем глюкоманнан в своей основе имеет линейные цепи 1→4 связанных D-пиранозных и D-глюкопиранозных остатков. При этом глюкоманнаны имеют слабо разветвленную цепь: на каждую макромолекулу со средней степенью полимеризации 56 приходится 2–3 ответвления в отличие от глюкоксиланов (10–12 ответвлений). Незначительное различие между среднечисловой и среднemasсовой степенью полимеризации свидетельствует о том, что полисахарид имеет короткие боковые цепи. Основным же полисахаридом гемицеллюлоз, связанных с лигнином, является глюкоксилан, содержащий ксилозу.

Литература

1. Карпунин И. И., Козлов Н. Г., Горский Г. М. // Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук. 2004. № 2. С 135–140.
2. Никитин В. М. Лигнин. М.: Гослесбумиздат, 1961.
3. Никитин Н. И. Химия древесины и целлюлозы. М; Л., 1962.
4. Лигнины/ Под ред. К. В. Сарканена К. Х. Людвиг: Пер. с англ. М., 1975.
5. Грушников О. П., Елкин В. В. Достижения и проблемы химии лигнина. М., 1973.
6. Браунс Ф. Э., Браунс Д. А. Химия лигнина. М., 1964.
7. Bjorkman A. // Svensk Papperst. 1957. Vol. 60. P. 329–335.
8. Бейнарт И. И., Ведерников Н. А., Громов В. С. и др. Клеточная стенка древесины и ее изменения при химическом воздействии. Рига, 1972.
9. Шарков В. И., Куйбина Н. И. Химия гемицеллюлоз. М., 1972.

10. *Калабин Г. А., Каницкая Л. В., Кушнарев Д. Ф.* Количественная спектроскопия ЯМР природного органического сырья и продуктов его переработки. М.: Химия, 2000.
11. *Кочетков Н. К., Бочков А. Ф., Дмитриев Б. А.* и др. Химия углеводов. М., 1967.
12. *Jongh D. C.* // *J. Org. Chem.* 1965. Vol. 30. P. 453–456.
13. *Jongh D. C.* // *J. Org. Chem.* 1965. Vol. 30. P. 1963–1967.
14. *Jongh D. C.* // *J. Org. Chem.* 1964. Vol. 86. P. 3149–3154.
15. *Drumond M., Aoyama M., Chen C. L.* // *J. Wood Chem and Technol.* 1989. Vol. 9. N 4. P. 421–441.
16. *Pan D. R., Tai D. S., Chen C. L., Robert D.* // *Holzforschung.* 1990. Bd. 44. N 1. S. 7–16.
17. *Kilpelainen I.* // *Ann. Acad. Sci. Fenn., Ser. A, II. Chemica.* 1994. Vol. 255. P. 1–32.
18. *Chen C. L. Robert D.* // *Methods in Enzymology / Wood W. A., Kellog S. T.-San Diego.* 1988. Vol. 161 (B). Ch. 15. P. 137–174.
19. *Kringstad K. P., Morck R.* // *Holzforschung.* 1983. Bd. 37. N 5. S. 237–244.

I. I. KARPUNIN, V. V. KUZ'MICH, N. G. KOZLOV

ON THE NATURE OF BINDING IN LIGNOCARBOHYDRATE COMPLEX OF FIR WOOD

Summary

The results of studies on isolation and identification of individual lignine-carbohydrate compounds from fir wood ligno-carbohydrate complex are presented. The nature of some chemical bonds between the components and proof of their existence is discussed.