

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XIV, 12

SECTIO E

1959

Z Katedry Żywnienia Zwierząt Wydziału Zootechnicznego WSR w Lublinie
Kierownik: z. prof. dr Franciszek Schmidt

Apolonia KORZEŃ

**Porównanie niektórych metod ilościowego oznaczania ligniny
w słomach czterech podstawowych gatunków zbóż**

**Сравнение некоторых методов количественного определения лигнина
в соломах четырёх основных видов злаков**

**Comparison of some Methods of Assessing Lignin Content in the Straw
of the Four Main Kinds of Corn**

Mimo że w ciągu ostatniego stulecia prowadzono wiele badań nad ligniną (E. Hägglund (4), K. Kürschner (8), J. König (7), B. Rasow i H. Gabriel (9), K. Freudenberg (3), F. E. Brauns i H. Hibbert (2), F. E. Harris (6), to jednak struktura tej substancji nie jest jeszcze dostatecznie określona.

Główną trudnością w chemii ligniny, a szczególnie w pracy nad określaniem jej budowy jest to, że izolacja prowadzona za pomocą odczynników chemicznych powoduje zmiany w jej strukturze. Między innymi, podczas hydrolizy, lignina ulega procesom autokondensacji, polimeryzacji, dehydracji i huminifikacji. Uzyskany produkt nie jest zatem identyczny z ligniną rodzimą i dlatego należy go raczej nazywać „preparatem ligniny”, albo też jeśli środek ekstrahujący reaguje z ligniną — „pochodną ligniny”. Jak dalece preparaty ligniny swym składem odbiegają od ligniny rodzimej, nie zostało dotąd rozstrzygnięte, ponieważ mają one formę bezpostaciową i dlatego nie dają się do nich zastosować zwykłe sprawdziany czystości, używane w badaniu związków organicznych. Głównym wskaźnikiem czystości preparatów ligniny może być zawartość grup metoksyłowych (F. E. Brauns (1)). Nie znaczy to jednak, że preparaty ligniny o najwyższej zawartości grup metoksyłowych są ligniną najbardziej czystą, gdyż zbyt ostre działanie czynników hydrolizujących może obniżyć albo podwyższyć ilość tych grup. Zawartość grup metoksyłowych zależy też w dużym stopniu od pochodzenia ligniny.

Stosowane metody przy izolacji ligniny można podzielić na trzy zasadniczo różne grupy:

1. Metody, w których używa się odczynników hydrolizujących polisacharydy na substancje rozpuszczalne w wodzie, wówczas lignina pozostaje w osadzie.

2. Metody, w których ekstrahuje się ligninę, przeprowadzając ją w rozpuszczalną pochodną ligniny, a celuloza i inne węglowodany stanowią pozostałość nierozpuszczalną.

3. Metody, w których cały materiał wyjściowy jest rozpuszczony, a ligninę oddziela się od rozpuszczonych węglowodanów za pomocą środków fizycznych.

Najczęściej stosowane są metody grupy pierwszej. Wyróżnić tu można dwa sposoby postępowania:

- a) izolacja ligniny przez usuwanie polisacharydów za pomocą silnych kwasów mineralnych,
- b) usuwanie polisacharydów za pomocą rozpuszczalnika dla celulozy, np. odczynnika Schweitzer'a.

W celu wyizolowania ligniny z substancji zdrewniałych, materiał wyjściowy należy uprzednio przygotować. Materiał roślinny doprowadza się do stanu powietrznie suchego, po czym rozdrabia się go. Dla zapewnienia powtarzalności wyników materiał wyjściowy poddaje się wstępnym ekstrakcjom — rozpuszczalnikami organicznymi, a następnie wodą lub 1% kwasem solnym. Przy ekstrakcji eterem, acetonem, alkoholem, benzenem lub mieszaniną tych rozpuszczalników — usuwa się tzw. tłuszcz surowy, zawierający takie substancje, jak woski, żywice, barwiki i inne składniki w nich rozpuszczalne. Należy zaznaczyć, że rozpuszczalniki te, z wyjątkiem eteru i benzenu, rozpuszczają również małe ilości ligniny. Materiał wyekstrahowany rozpuszczalnikami organicznymi ponownie ekstrahuje się wodą lub 1% kwasem solnym w celu usunięcia taniny, skrobi i innych substancji rozpuszczalnych w wodzie lub też łatwo hydrolizujących.

Oznaczanie ligniny w paszach, szczególnie w tzw. paszach objętościowych, jest w wielu przypadkach również niezbędne, jak oznaczanie zawartości włókna surowego.

Tematem niniejszej pracy jest porównanie i wybranie najpraktyczniejszych metod ilościowego oznaczania ligniny w słomach.

METODY OZNACZANIA

Ligninę oznaczano w słomach czterech podstawowych gatunków zbóż: żyta i pszenicy ozimej oraz jęczmienia i owsa. Próbkę słomy doprowadzono do stanu powietrznie suchego i obliczano współczynnik podsuszania.

Następnie rozdrabniano w młynku tak, aby zmielona pasza przechodziła całkowicie przez sito o oczkach 1 mm.

W próbkach oznaczano suchą masę celem odniesienia do niej zawartości ligniny. Przygotowane w ten sposób próbki poddawano ekstrakcjom wstępnym.

Ekstrakcja mieszaniną benzenowo-alkoholową

Do gilzy z odłuszczonej bibuły odważano około 10 g próbki i ekstrahowano ją w aparacie Soxhlet'a mieszaniną benzenowo-alkoholową w stosunku objętościowym 68:32 przez 9 do 10 godzin. Po ekstrakcji, gilzę suszono w temp. 105°C do stałej wagi. Z ubytku wagi obliczano procentową zawartość słomy po ekstrakcji. Wysuszone próbki pozostawiano na dobę w temperaturze pokojowej w celu doprowadzenia ich do stanu powietrznie suchego.

Ekstrakcja wodą

Do erlenmeyerki na 1000 ml odważono 5 g powietrznie suchej próbki wyekstrahowanej rozpuszczalnikami organicznymi. Próbkę zalewano wodą destylowaną w proporcji: 150 ml wody na 1 g próbki i gotowano przez 3 godziny pod chłodnicą zwrotną, a następnie pozostawiano do opadnięcia osadu. Zawartość erlenmeyerki sączono przez tarowany tygiel filtracyjny 1G3, zlewając najpierw wodę znad osadu. Osad w tyglu przemywano 1000 ml gorącej wody destylowanej. Tygiel z osadem suszono do stałej wagi w temp. 105°C i obliczano procentową zawartość słomy po ekstrakcji. Próbkę pozostawiano na jedną dobę w celu doprowadzenia do stanu powietrznie suchego. Średnie wyniki z dziesięciu powtórzeń zestawiono w tab. 1.

Tabela 1.

S ł o m a	Sucha masa w %	Po ekstrakcji benzenowo-alkohol. %	Po ekstrakcji wodą w %
żytnia	94,95	94,97	90,50
pszenna	94,76	96,20	89,96
jęczmienna	94,27	95,78	89,42
owsiana	94,47	92,68	85,85

Wyniki po ekstrakcji odnoszą się do suchej masy. Błąd oznaczeń nie przekracza 2%. Materiał przygotowany w ten sposób poddawano hydrolizie według metod grupy pierwszej.

I. Hydroliza 72% kwasem siarkowym

Do zlewki na 100 ml odważono 1 g wyekstrahowanej słomy i energicznie mieszając dodawano powoli 30 ml 72% kwasu siarkowego o temp. 12 do 15°C. Mieszano przez kilka minut, by nie powstawały grudki. Zlewkę odstawiano na 4 godziny na łaźnię wodną (o temp. 18 do 20°C), od czasu do czasu mieszając. Następnie mieszaninę wymywano do erlenmeyerki na 1500 ml, rozcieńczano do 1200 ml. wodą destylowaną (aby uzyskać 3% koncentrację kwasu) i gotowano przez 4 godziny pod chłodnicą zwrotną. Ligninę znajdującą się w osadzie odsączano do tarowanego tygla filtracyjnego 1G3, przemywano 1000 ml gorącej wody destylowanej w celu usunięcia kwasu siarkowego. Tygiel z osadem suszono w temp. 105°C do stałej wagi.

Ligninę surową spopieliano i zawartość ligniny czystej obliczano przy użyciu poniżej podanego wzoru:

$$\% \text{ ligniny czystej} = \frac{(\text{odwaga ligniny surowej} - \text{odwaga popiołu}) 100}{\text{nawaga}}$$

II. Hydroliza 38% kwasem solnym i stęż. kwasem siarkowym

Przygotowanie 38% HCl. Do kolby destylacyjnej (na 500 ml) z salmiakiem wkrapla się stęż. kwas siarkowy z wkraplacza umieszczonego w szyjce kolbki. Gazowy chlorowódor, wywiązujący się w kolbie, przechodzi rurką kondensacyjną do płuczki ze stęż. kwasem siarkowym, a następnie do kolby z 36% kwasem solnym. Kolbę — odbieralnik chłodzi się lodem.

Do erlenmeyerki z doszlifowanym korkiem odważano 1 g wyekstrahowanej próbki. Następnie mieszając dodawano 50 ml 38% kwasu solnego. Po kilku minutach, gdy próbka całkowicie została zwilżona, wkraplano powoli 5 ml stęż. kwasu siarkowego, w czasie wkraplania energicznie mieszając próbkę. W ciągu pierwszych kilku godzin wstrząsano mieszaninę kilka razy, po czym odstawiano na noc w pokojowej temperaturze. Następnego dnia rozcieńczono próbkę wodą destylowaną, przenoszono do erlenmeyerki na 750 ml, uzupełniano do 500 ml wodą destylowaną i gotowano przez kilka minut. Roztwór odstawiano do opadnięcia osadu, a następnie sączono przez tarowany tygiel filtracyjny 1G3 i przemywano gorącą wodą. Osad w tyglu suszono w 105°C do stałej wagi. Ligninę surową spopieliano w piecu i obliczano zawartość czystej ligniny, tak jak w metodzie z 72% kwasem siarkowym.

III. Hydroliza 78% kwasem siarkowym z dodatkiem dwumetyloaniliny

Do zlewki na 100 ml odważono 1 g wyekstrahowanej słomy, a po dodaniu 5 ml dwumetyloaniliny mieszano przez 3 do 4 minut (w celu spo-

wodowania spęczenia tkanek). Następnie dodawano powoli 25 ml 78% kwasu siarkowego i mieszano chłodząc strumieniem bieżącej wody. Po dwu godzinach próbkę rozcieńczano gorącą wodą destylowaną i przenoszono do erlenmeyerki, uzupełniając objętość do 200 ml. Po gotowaniu przez 3 minuty umieszczono ją na wrzącej łaźni wodnej na godzinę. Po opadnięciu osadu sączone przez tarowany tygiel filtracyjny 1G3 i przemylwano dużą ilością gorącej wody. Osad suszono w temp. 105°C do stałej wagi, po czym spopieliano. Procent ligniny czystej obliczano, tak jak w metodzie z 72% kwasem siarkowym.

Tab. 2. Średnia zawartość ligniny w słomach
Mean percentage of lignin content in different kinds of straw

Słoma	% ligniny w suchej masie			% suchej masy	% ligniny w powietrzniesuchej masie			współczynnik poduszania	% ligniny w materiale surowym		
	I	II	III		I	II	III		I	II	III
żyto	13,0	12,87	14,78	94,95	12,34	12,22	14,03	0,8856	10,83	10,82	12,43
pszenica	11,56	11,34	13,52	94,76	10,95	10,74	12,80	0,8797	9,63	9,45	11,27
jęczmień	11,11	11,05	13,01	94,27	10,47	10,42	12,26	0,8787	9,20	9,16	10,78
owies	13,68	13,65	15,30	96,47	13,20	13,17	14,76	0,8347	10,87	10,76	12,07

Tab. 2 zawiera średnią procentową zawartość ligniny w stosunku do suchej masy, powietrzniesuchej masy i materiału surowego. Zamieszczone tam dane są średnimi z 6 do 10 powtórzeń.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Jak wynika z wyżej przedstawionych liczb, metoda hydrolizy z 72% kwasem siarkowym oraz metoda z 38% kwasem solnym dają wyniki bardzo zbliżone do siebie, natomiast hydroliza z 78% kwasem siarkowym daje wyniki znacznie wyższe. Przypuszczać należy, że wyższe wartości uzyskane ostatnią metodą wynikają z tworzenia się substancji nierozpuszczalnych, z cukrów towarzyszących ligninie w paszy. Substancji rozpuszczalnych bowiem tworzy się tym więcej, im bardziej stężony jest kwas użyty do hydrolizy. Wyższe wartości mogą też wynikać z zatrzymania pewnej ilości kwasu siarkowego w preparacie.

Zdaniem wielu autorów metody hydrolizy za pomocą kwasu siarkowego nie są odpowiednie. Między innymi E. Ungar (10) podaje, że zawartość siarki w ligninie zależy od stężenia kwasu siarkowego użytego do hydrolizy. E. Halse (5) wskazuje natomiast, że lignina izolowana mieszaniną kwasów (solnego i siarkowego) zawiera mniejszy procent siarki niż w metodach z kwasem siarkowym.

Preparaty ligniny otrzymane poszczególnymi metodami różniły się barwą. Najjaśniejszą barwę (żółto-brunatną) miała lignina z 38% kwasem solnym, nieco ciemniejsza była lignina z 72% kwasem siarkowym, natomiast po hydrolizie 78% kwasem siarkowym uzyskano ligninę o najciemniejszym zabarwieniu (ciemno-brunatną).

Stwierdzony w tej pracy procent błędu względnego z oznaczeń ligniny poszczególnymi metodami przedstawia się następująco:

72% H_2SO_4 — 1,0%

38% HCl — 0,56%

78% H_2SO_4 — 1,1%

W metodzie z kwasem solnym błąd ten okazał się zatem najmniejszy. Przedstawione dane pozwalają twierdzić, że z przytoczonych wyżej metod najodpowiedniejsza jest metoda z 38% kwasem solnym. Można również przypuszczać, że metoda ta będzie odpowiednia do oznaczenia ligniny w produktach podobnych do słomy.

Należy zaznaczyć, że jednym z głównych warunków otrzymywania wyników powtarzalnych jest wstępne przygotowanie próbki, tj. odpowiednie jej rozdrobnienie i przeprowadzenie ekstrakcji wstępnych. Również konieczne jest, aby próbki były hydrolizowane w identycznych warunkach, ze szczególnym uwzględnieniem temperatury, czasu hydrolizy i przemywania osadów.

PIŚMIENNICTWO

1. Brauns F. E.: The Chemistry of Lignin. Academic Press Inc., Publishers — New York 1952.
2. Brauns F. E. and Hibbert H.: Canada Journal Research 13 b, 28, 1935.
3. Freudenberg K.: Tannin, Cellulose, Lignin. Berlin 1933.
4. Hägglund E.: Arkiv. Kemi, Mineral, Geol. 7 no 1, 1918.
5. Halse E.: Paper Trade J. 80, nr 16, 49, 1925.
6. Harris E. E., Ianni J. D. and H. Adkins: Journal of the American Chemical Society. 60, 1467. 1938.
7. König J.: Neues Verfahren zur Chemischen Untersuchung der Futter- und Nahrungsmittel. Berlin 1930.
8. Kürschner K.: Zur Chemie der Lignin-körper. Stuttgart 1925.
9. Rassow B. and Gabriel H.: Cellulosechem. 12, 227, 290, 318, 1931.
10. Ungar E.: Beiträge zur Kenntnis der verholzten Faser. Dissertation. Zürich 1914.

РЕЗЮМЕ

В работе автор провел сравнение некоторых методов определения лигнина в соломах.

Смолотый образец был подвержен вступительным экстракциям бензолоспиртовой смесью, а затем водой. Так приготовленный материал был подвергнут гидролизу:

- a) 72% серной кислотой,
- б) 38% соляной кислотой и концентрированной серной кислотой,
- в) 78% серной кислотой и диметиланилином.

В проведенных гидролизах соблюдались сохранение соответствующей температуры, времени продолжительности реакции и промывки осадков. Наиболее подходящим оказался метод с 38% соляной кислотой, так как он дает наименьший процент погрешности и возможность исполнения массовых определений.

SUMMARY

In this paper the author has compared some methods of assessing lignin content in straw.

A sample of ground straw was subjected to preliminary extractions, done first with a mixture of benzene and alcohol and then with water. Thus prepared the material was next treated with hydrolysis, for which were used:

- a) 72 per cent sulphuric acid,
- b) 38 per cent muriatic acid and concentrated sulphuric acid,
- c) 78 per cent sulphuric acid and bimethylaniline.

Care was taken to keep a proper temperature during each hydrolysis. Attention was paid to the exact time of reaction and to the rinsing of the sediment.

It was found that the most convenient method was that with 38 per cent muriatic acid, as it leaves the smallest margin of error and allows the mass assessment of lignin content.