

مطالعه ساختاری لیگنین‌های چوب آسیاب‌شده (MWL) و دیوکسان چوب سرو با استفاده از روش DFRC

طیبه پرتوی^{۱*} و سید احمد میرشکرایبی^۲

^۱ استادیار گروه شیمی دانشکده علوم دانشگاه پیام‌نور، تهران، ایران

^۲ استاد گروه شیمی دانشکده علوم دانشگاه پیام‌نور، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۰/۱۳، تاریخ تصویب: ۱۳۹۰/۸/۱)

چکیده

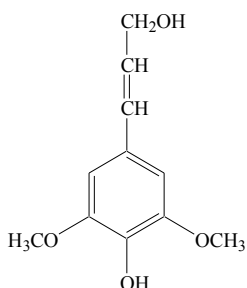
در این مطالعه از روش "مشتق‌سازی - گسست کاهشی" (DFRC) برای بررسی ساختار لیگنین چوب آسیاب‌شده (MWL) و لیگنین دیوکسان چوب سرو سیمین استفاده شد. با استفاده از این روش و نیز فنون طیف‌سنجی FT-¹³CNMR و GC-Mass و کروماتوگرافی تراوش ژلی (GPC) ساختارهای تشکیل‌دهنده این دو نوع لیگنین مورد بررسی قرار گرفته و نتایج با یکدیگر مقایسه شده است. نتایج نشان داد که مهمترین واحدهای ساختاری در دو لیگنین فوق‌الذکر از شکسته شدن پیوندها در موقعیت‌های β -O-4 حاصل می‌شوند. بر اساس این مشاهدات، مهمترین واحدهای ساختاری در لیگنین دیوکسان و لیگنین چوب آسیاب‌شده به ترتیب، ۴- هیدروکسی-۳- متوکسی-۱- فنیل پروپن و ۴- هیدروکسی-۳- متوکسی-۱- فنیل- پروپنال (ساختارهای گواپایاسیل) می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: سرو، لیگنین چوب آسیاب‌شده (MWL)، لیگنین دیوکسان، روش DFRC

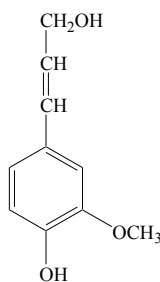
مقدمه

می‌شوند. درصد بسیار کمی از ساختار لیگنین از واحدهای غیر فنیل پروپانی تشکیل شده است. در این واحدها، زنجیر جانبی حذف یا کوتاه شده و یا توسط یک گروه کینونی جایگزین شده است (Lai *et al.*, 1971). عملاً تمامی انواع عناصر ساختاری قابل تشخیص در لیگنین از اکسایش p-هیدروکسی سینامیل الکل تشکیل می‌شوند (شکل ۱).

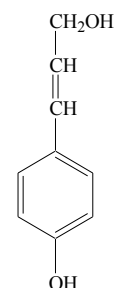
لیگنین زیست‌بسپاری طبیعی متشکل از واحدهای فنیل پروپان با یک اتم اکسیژن در موقعیت ۴ (به صورت OH یا O-C) و یک یا دو گروه متوکسیل در موقعیت‌های ۳ و ۵ حلقه آروماتیکی است. موقعیت‌های دیگر در حلقه‌های آروماتیکی لیگنین به ندرت توسط گروه‌های عاملی یا استخلافی اشغال



(ج)



(ب)

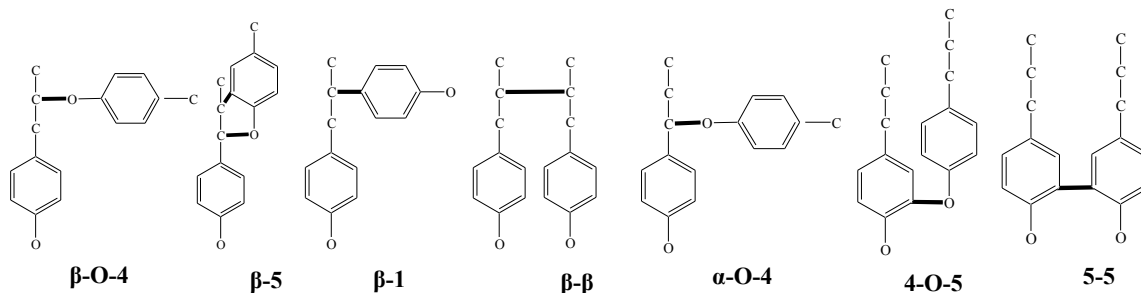


(الف)

شکل ۱- فنول‌های مشارکت‌کننده در تشکیل زیست‌پلیمر لیگنین: (الف) p-کوماریل الکل (ب) کانیفریل الکل (ج) سیناپیل الکل

مونومری یکسانی دارند؛ به عنوان مثال در هوموپلیمری مانند سلولز همه واحدهای تکرار شونده، β -D-گلوکوپیرانوز می‌باشد. اما لیگنین، هتروپلیمری شبکه‌ای و نامنظم است که از جفت شدن اکسایشی واحدهای مختلف ۴-هیدروکسی فنیل پروپان تشکیل شده است. مهمترین پیوندها و اتصالات بین واحدهای فنیل پروپان در شکل ۲ نشان داده شده است (Adler, 1977).

واحدهای ساختاری در لیگنین طبیعی بدون وجود نظم مشخصی به هم اتصال دارند. لیگنین طبیعی از نظر نوری فعال نیست و بسپاری است شبکه‌ای با پیوندهای عرضی. پس از سلولز، لیگنین فراوان‌ترین پلیمر طبیعی است که ساختار پیچیده‌ای دارد و هنوز به طور کامل شناسایی نشده است (Bagby *et al.*, 1973). دلیل این مسأله را می‌توان این نکته دانست که برخی پلیمرهای طبیعی نظیر سلولز و همی‌سلولزها، واحدهای مونومری و نیز پیوندهای بین



شکل ۲- مهمترین پیوندها و اتصالات بین واحدهای فنیل پروپان در لیگنین

پیوندهای فیزیکی و شیمیایی بین لیگنین و پلی‌ساکاریدهای دیواره سلول، عملاً جداسازی لیگنین به صورت تغییر نیافته و سالم را غیرممکن می‌سازد

مقدار لیگنین چوب سوزنی برگان معمولاً ۲۶ تا ۳۳ درصد وزن چوب را تشکیل می‌دهد و قسمت اعظم اجزای ساختمانی آن از واحدهای کانیفریل الکل (گواپایسیل) تشکیل شده است.

اسیدی است (عمدتاً آریل گلیسرول- β - آریل اترها). این نوع پیوندهای اتری در تیواسیدکافت هم شکسته می‌شوند، اما گسست پیوندها از طریق حلال کافت با کاتالیزور اسید لوئیس (BF_3)^۲ در تیواتانول صورت می‌گیرد. اکسایش با نیتروبنزن در موارد ویژه‌ای به عنوان جایگزینی برای اکسایش با پرمنگنات عمل می‌کند. هیدروژن کافت (هیدروژن دار کردن کاتالیزوری) و تیواستوکافت از روش‌های مهم دیگر تخریب هستند (Lapierre et al., 1985). متأسفانه این روش‌ها بسیار پیچیده و وقت‌گیر هستند و به مراحل آماده‌سازی، هزینه و زمان آنالیز زیادی نیازمندند. اخیراً روشی ابداع شده است که به نظر می‌رسد محدودیت‌های مذکور را ندارد. این روش با نام اختصاری DFRC^۳ بر پایه واکنش لیگنین با استیل برومید و تخریب α -آریل اترها و تشکیل مشتقات آلفا برومید استیل دار و گسست کاهشی اتصال‌های β -آریل اتری می‌باشد. ساختارهای کانفیویل الکل استیل دار شده بیشترین محصولات بدست آمده از واکنش‌های DFRC هستند که از گسست واحدهای β -O-4 بدست می‌آیند. در حقیقت این روش بر اساس آزادشدن سیناپیل الکل از گروه‌های متصل به ساختارهای β -O-4 است و این عمل بدون هیچ تغییری در ساختارها انجام می‌شود. در این پژوهش، از روش مشتق‌سازی - گسست کاهشی (DFRC) برای انجام مطالعات ساختاری روی دو نوع لیگنین چوب آسیاب‌شده (MWL) و لیگنین دیوکسان چوب سرو استفاده شده است (Lu & Ralph, 1997).

مواد و روش‌ها

۱. ماده اولیه: آرد چوب تهیه‌شده از سرو سیمین^۴ حدوداً پانزده ساله (برون چوب)
۲. حلال‌ها: دیوکسان، اتانول، دی کلرومتان، تتراهیدروفوران، آب
۳. استیل برومید
۴. اسید استیک
۵. پودر روی
۶. استیک انیدرید
۷. پیریدین
۸. آنتراسن
۹. اسید کلریدریک

(Adler & Hemestam, 1955; Sederoff et al., 1991). به همین دلیل، جداسازی و مطالعه ساختاری لیگنین بکر (تغییر نیافته) بسیار مشکل است. اولین تلاش برای جداسازی لیگنین بدون تغییر قابل توجه شیمیایی توسط یورکمن در سال ۱۹۵۴ انجام گرفت (Bjorkman, 1954) که در طی آن لیگنین از چوب به شدت آسیاب‌شده به کمک دیوکسان استخراج گردید. این لیگنین بنام لیگنین یورکمن یا لیگنین چوب آسیاب‌شده (MWL)^۱ و به عنوان لیگنین نسبتاً بکر معروف شده است.

در تهیه لیگنین MWL، بازده استخراج به میزان زیادی تحت تأثیر مدت زمان آسیاب‌کردن است (Ikeda et al., 2002; Fujimoto et al., 2005). از طرف دیگر، مطالعات نشان می‌دهد که در اثر آسیاب‌کردن، درجه بسپارش لیگنین کاهش یافته و گروه‌های هیدروکسیل فنولی آزاد بر اثر گسستن پیوندهای β -آریل اتر و گروه‌های α -کربونیل از طریق اکسیداسیون زنجیر جانبی ایجاد می‌شوند (Ikeda et al., 2002). در نتیجه، لیگنین حاصل ساختار لیگنین واقعی را ندارد. اما به هر حال این روش را برای به دست آوردن لیگنینی نسبتاً طبیعی و تغییرنیافته می‌توان پذیرفت و به کار برد (Gellerstedt & Northey, 1989; Holtman et al., 2004).

پژوهش‌های دیگری برای دستیابی به لیگنین تغییرنیافته و اصلاح فرآیند جداسازی لیگنین بدون تغییر ساختار آن نیز صورت گرفته است که یکی از آنها تهیه لیگنین سلولیتیک (CEL) است (Chang et al., 1975). این لیگنین از طریق تخریب گزینشی پلی‌ساکاریدهای چوب به‌وسیله آنزیم سلولاز تهیه می‌شود. روش دیگر استخراج لیگنین از آرد چوب، استفاده از مخلوط آب و دیوکسان حاوی اسیدکلریدریک است (Brauns & Brauns, 1960). لیگنین حاصل از این روش، لیگنین دیوکسان نامیده می‌شود. لیگنین دیوکسان تهیه‌شده با روش ملایم و اصلاح‌شده، ضمن سهل‌الوصول بودن، می‌تواند یک لیگنین نمایاننده و مناسب برای مطالعات و تحقیقات ساختاری در خصوص لیگنین نیز باشد.

روش‌های تخریبی متعددی برای شناسایی ساختار لیگنین از طریق بررسی ترکیبات سبک مولکول حاصل از تخریب وجود دارد. به‌وسیله آنالیز دقیق این ترکیبات می‌توان به تصویری از ساختار لیگنین دست پیدا کرد. این روش‌ها شامل اسیدکافت، تیواسیدکافت، اکسایش با پرمنگنات و ازون کافت هستند. اسیدکافت شامل تخریب لیگنین توسط آبکافت اترها با کاتالیزور

¹ Milled Wood Lignin

² Lewis Acid

³ Derivatization Followed by Reductive Cleavage

⁴ *Cupressus sempervirens*

لیگنین خام با خشک کردن در خشک‌کن انجمادی بدست آمد. لیگنین MWL خام در محلول استیک اسید ۹۰٪ حل گردید و سپس این محلول به ۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در حال به‌هم‌زدن اضافه شد تا رسوب حاصل شود. رسوب لیگنین به کمک سانتریفوژ جدا و با قرارگرفتن در خلأ و در مجاورت مواد رطوبت‌گیر خشک گردید.

لیگنین خشک‌شده در ۲۰۰ میلی‌لیتر ۱ و ۲ - دی‌کلرو اتان حل و محلول حاصل در اتر ریخته شد. بعد از رسوب لیگنین خالص، با تبخیر اتر لیگنین جمع‌آوری گردید. بازده تقریبی لیگنین به دست آمده ۲۶٪ شد.

- روش مشتق‌سازی - گسست کاهشی (DFRC)

این روش توسط Fachung و Ralph در سال ۱۹۹۶ ارائه شده است (Lu & Ralph, 1996). بر اساس این روش به ۱۰ میلی‌گرم لیگنین حل شده در ۵ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان، ۲/۵ میلی‌لیتر محلول استیل برومید (AcBr) اضافه و مخلوط در دمای اتاق در طول شب هم‌زده شد. (محلول AcBr از مخلوط کردن AcBr و استیک اسید به نسبت حجمی ۸:۹۲ بدست می‌آید که برای هفته‌ها پایدار است). سپس حلال با دستگاه تبخیر در فشار کم در دمای کمتر از ۵۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر و باقیمانده آن در ۲/۵ میلی‌لیتر مخلوط دی‌اکسان، اسید استیک و آب به نسبت حجمی ۱:۴:۵ حل شد. پس از اضافه کردن ۳۰ میلی‌گرم پودر روی، محلول به مدت ۳۰ دقیقه هم‌زده شد. سپس ۳ میلی‌گرم آنتراسن حل شده در متیلن کلرید به‌عنوان استاندارد داخلی به آن اضافه شد. مخلوط حاصل در قیف جداکننده ریخته شده و همراه با ۱۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان (CH₂Cl₂)، و ۱۰ میلی‌لیتر محلول اشباع کلرید آمونیم، NH₄Cl، بخوبی مخلوط و عمل استخراج انجام گردید. pH لایه آبی باید کمتر از ۳ باشد که می‌توان آنرا با ۳٪ HCl تنظیم کرد. بعد از جداسازی لایه آبی، مجدداً لایه آبی حاصل دوبار دیگر و هر بار با ۵ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان استخراج شد. لایه‌های آلی در یک ظرف جمع‌آوری و با سولفات منیزیم (MgSO₄) رطوبت آن گرفته شد. پس از صاف کردن، حلال اضافی در فشار کم تبخیر شد. ماده باقی‌مانده برای استیل‌دار کردن تکمیلی، به مخلوطی از پیریدین ۲/۲ ml + استیک انیدرید ۲/۲ ml + دی‌کلرومتان ۱/۵ ml اضافه شد و ۴۰ دقیقه به هم‌زده شد. پس از تبخیر در

قابل ذکر است که کلیه مواد شیمیایی با درجه خلوص آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. همچنین، در پودر کردن چوب و عصاره‌گیری، به ترتیب از استانداردهای T257 cm-85 و T280 pm-99 استفاده شده است.

- تهیه لیگنین دیوکسان

جداسازی لیگنین از آرد چوب به کمک مخلوط دیوکسان و آب حاوی اسید کلریدریک بر اساس روش Brauns انجام گرفته است (Bjorkman, 1954). آرد چوب با مش ۸۰-۴۰ عاری از مواد استخراجی به مقدار ۳۰ گرم (بر مبنای وزن خشک) و مخلوط آب و دیوکسان به نسبت حجمی ۱ به ۹ و HCl با غلظت ۰/۴ مول بر لیتر به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق هم‌زده شد. در مدت هم‌زدن، ظرف استخراج با فویل آلومینیوم پوشانیده می‌شود تا از واکنش‌های نوری جانبی اجتناب شود. پس از صاف کردن و شستن رسوب با ۱۰۰ میلی‌لیتر دیوکسان، حلال باقی مانده در محلول صاف‌شده حاوی لیگنین تبخیر شد. بعد از رسیدن حجم محلول به حدود ۵۰ میلی‌لیتر، آنرا در حال هم‌زدن به ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه می‌کنیم. پس از مدتی رسوب لیگنین ایجاد می‌شود. رسوب حاصل با استفاده از سانتریفوژ (سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه) به مدت ۲۵ دقیقه، از فاز مایع جدا و با آب مقطر شستشو داده شد. سپس لیگنین حاصله در محیط خلأ و در حضور مواد جاذب رطوبت خشک گردید. با استفاده از این روش، از هر ۱۰۰ گرم آرد چوب، حدود ۰/۷ گرم لیگنین دیوکسان بدست آمد.

- تهیه و خالص‌سازی لیگنین چوب آسیاب‌شده (MWL)

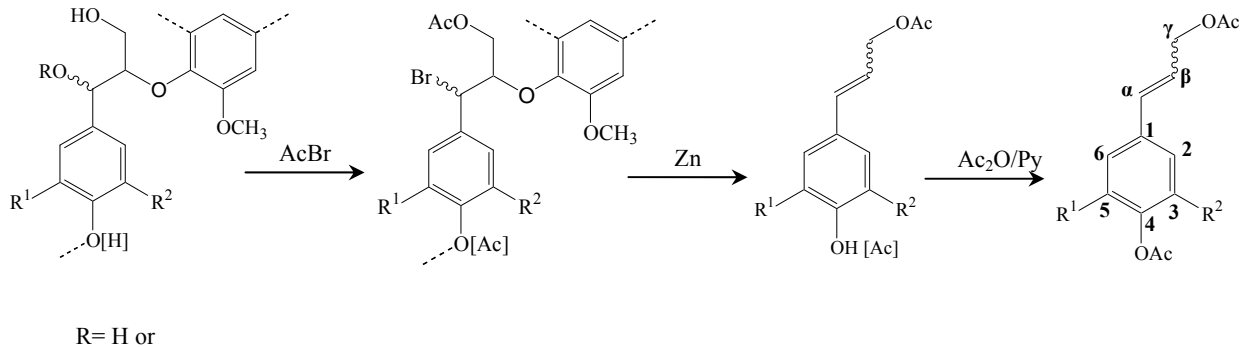
لیگنین چوب آسیاب‌شده (لیگنین یورکمن) با استفاده از روش Lawther و همکاران تهیه شد (Lawther et al., 1996). در این روش چوب سرو به وسیله آسیاب معمولی سائیده و از الک ۲۰ مش عبور داده شد. سپس با استفاده از دستگاه سوکسله و حلال استون طی دو شبانه روز استخراج انجام و مواد استخراجی خارج گردید. پس از صاف کردن، آرد چوب با آب شستشو داده شد و با قرار گرفتن در هوای آزاد، خشک گردید. آرد چوب خشک‌شده به وسیله آسیاب گلوله‌ای^۱ به مدت یک هفته در یک مخزن ۵ لیتری به‌همراه گلوله‌هایی از جنس آلومینا آسیاب شد. در مرحله بعد، چوب آسیاب‌شده توسط محلول دیوکسان و آب (۱۰ ml/g و ۹۶:۴) طی دو مرحله ۲×۲۴ ساعته استخراج شد. پس از صاف کردن محلول، بخشی از حلال تبخیر و در نتیجه، محلول تغلیظ شد. در پایان،

¹ Ball Mill

² Derivatization Followed by Reductive Cleavage

ماده باقیمانده برای انجام سایر مراحل تحقیق آماده است (شکل ۳).

فشار کم برای خارج کردن حلال و اجزاء فرار، چندبار و هر بار ۵ میلی‌لیتر اتانول به محلول اضافه و عمل تبخیر تکرار شد.



شکل ۳- مراحل انجام واکنش‌های DFRC

ترکیبات، ۰/۰۵ گرم از محصول واکنش در ۰/۵ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان حل و مقدار ۲ میکرولیتر از این نمونه به دستگاه کروماتوگرافی گازی مجهز به ستون سیلیکون تزریق گردید. این تزریق در دمای ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد انجام و کوره از ۱۰۰ تا ۲۸۰ با سرعت ۸ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه گرم شد. در ادامه، ترکیبات یونیزه شده به وسیله طیف‌سنج جرمی شناسایی شدند و الگوی گسست آنها با استفاده از مراجع NIST و Wiley تعیین شد. برای انجام آزمایش‌های GC-Mass از دستگاه VARIAN-QUADRUAPOLE 1200 استفاده شد.

- طیف‌سنجی $^{13}\text{C-NMR}$

از طیف‌سنجی $^{13}\text{C-NMR}$ برای مشخص کردن ساختار لیگنین‌ها و نیز ساختار ترکیبات حاصل از اجرای فرآیند DFRC استفاده شد (Capanema *et al.*, 2005). برای گرفتن این طیف‌ها از دستگاه BRUKER 400MHz استفاده شد. به این منظور، ۱۵ میلی‌گرم نمونه در ۰/۶ میلی‌لیتر کلروفرم دوتریم‌دار (CDCl_3) حل و طیف آن گرفته شد.

- کروماتوگرافی تراوش ژلی (GPC^1)

قبل از انجام کروماتوگرافی تراوش ژلی، ضروری است لیگنین‌ها استیل‌دار شوند. بدین منظور ۰/۳ گرم لیگنین با مخلوط انیدرید استیک و پیریدین به نسبت‌های حجمی برابر ($1/7 : 1/7$ میلی‌لیتر) مخلوط و به مدت یک شبانه روز در دمای اتاق هم زده شد. سپس انیدرید استیک و پیریدین اضافی با افزودن متانول، آب و یخ غیرفعال شد تا واکنش‌ها متوقف شوند. پس از تبخیر حلال در فشار حدود ۱۰ میلی‌بار تا حد خشک شدن، باقیمانده جامد در تولوئن حل و مجدداً تبخیر گردید. این کار چهار بار تکرار شد تا مواد و واکنش‌گرهای اضافی کاملاً حذف شوند تا آنجا که ماده باقی‌مانده بوی پیریدین، انیدرید استیک و تولوئن نداشته باشد. اکنون نمونه برای انجام آزمایش‌های GPC آماده است. حلال بکار رفته برای انجام کروماتوگرافی تتراهیدروفوران (THF) است. کروماتوگرام‌ها با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی تراوش ژلی Shimadzu، با ستون پلی استایرن A^0 ۱۰۰۰۰، آشکارساز ضریب شکست سنج (RID) و سرعت جریان مایع ۱ میلی‌لیتر در دقیقه تهیه شده‌اند.

- کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی (GC-Mass^2)

از تکنیک کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی برای تفکیک و شناسایی ترکیبات حاصل از اجرای واکنش‌های DFRC استفاده شد (Rio *et al.*, 2001). برای تعیین بازده این

³ ^{13}C - Nuclear Magnetic Resonance

¹ Gel Permeation Chromatography

² Gas Chromatography-Mass Spectrometry

نتایج

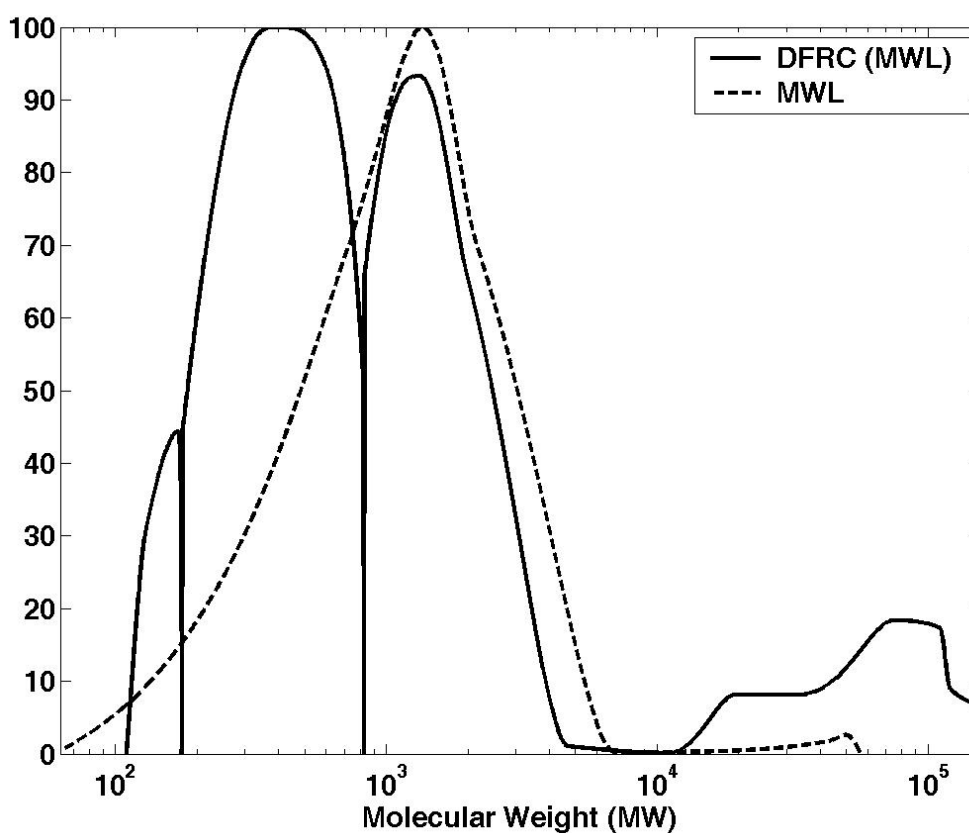
- توزیع وزن مولکولی در لیگنین‌ها

شکل ۴، توزیع وزن مولکولی لیگنین استیل‌دار شده MWL پیش و پس از DFRC را نشان می‌دهد. این کروماتوگرام‌ها نشان می‌دهد که بر اثر انجام واکنش‌های DFRC، لیگنین تخریب و به سه جزء با وزن‌های مولکولی نسبتاً کم تبدیل شده است.

مشخصات و درصدهای وزنی این سه جزء در جدول ۱

آمده است.

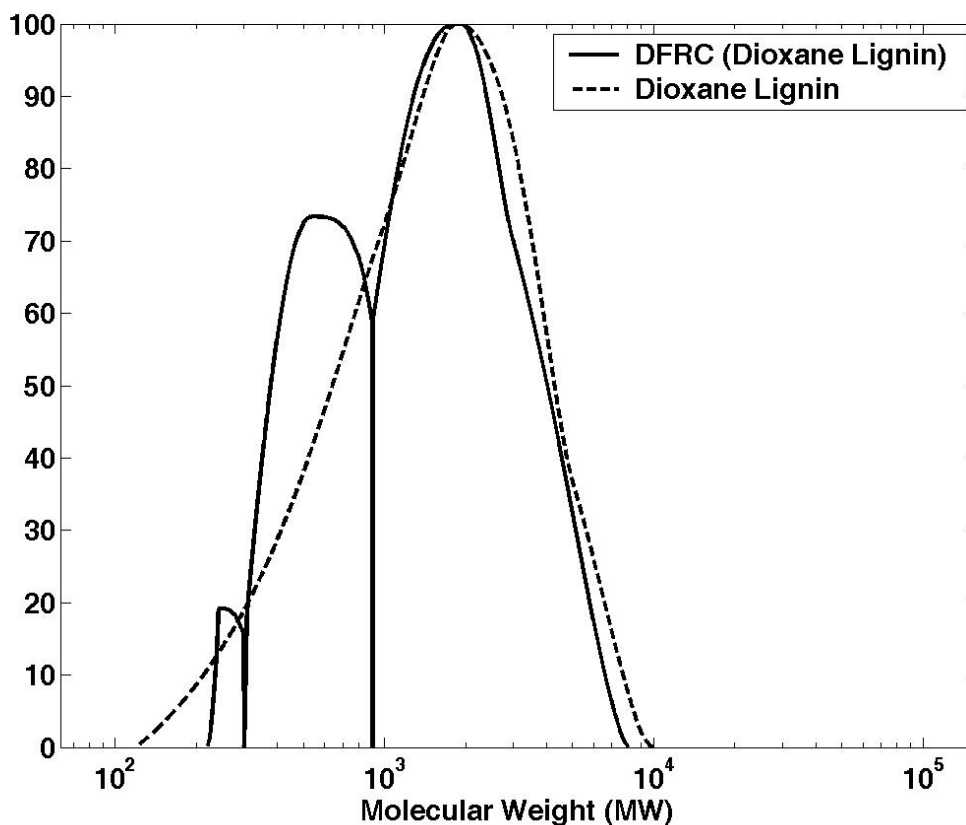
همچنین، نتایج کروماتوگرافی تراوش ژلی لیگنین استیل‌دار شده دیوکسان پیش و پس از واکنش‌های DFRC به ترتیب در شکل ۵ و جدول ۲ نشان داده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که لیگنین دیوکسان نیز در شرایط DFRC تخریب و به سه جزء با وزن‌های مولکولی کمتر تبدیل شده است.



شکل ۴- کروماتوگرام توزیع وزن مولکولی لیگنین MWL سرو پیش و پس از انجام فرآیند DFRC

جدول ۱- نتایج GPC لیگنین MWL سرو پس از فرآیند DFRC

سهم (درصد)	$D = \bar{M}_w / \bar{M}_n$	\bar{M}_n	\bar{M}_w	اجزاء
۱۱/۴۹	۱/۱۶۲	۱۱۳۷	۱۳۲۳	۱
۲۳/۵۴	۱/۰۸۷	۳۵۸	۳۸۹	۲
۲۰/۰۸	۱/۰۲۸	۱۶۶	۱۷۱	۳
۱۸/۱۹	۱/۸۶۷	۷۲۸	۱۳۶۰	لیگنین (شاهد - قبل از DFRC)



شکل ۵- کروماتوگرام توزیع وزن مولکولی لیگنین دیوکسان سرو پیش و پس از انجام فرآیند DFRC

جدول ۲- نتایج GPC لیگنین استیل‌دار شده دیوکسان سرو پس از فرآیند DFRC

سهم (درصد)	$D = \bar{M}_w / \bar{M}_n$	\bar{M}_n	\bar{M}_w	اجزاء
۹/۸۷	۱/۲۶۵	۱۵۱۴	۱۹۱۶	۱
۲۲/۸۱	۱/۰۵۶	۵۰۸	۵۳۷	۲
۲۲/۸	۱/۰۲۰	۲۳۹	۲۴۳	۳
۹/۶۹	۱/۹۴۰	۹۵۴	۱۸۵۱	لیگنین (شاهد - قبل از DFRC)

از لیگنین یورکمن است. مقایسهٔ وزن‌های مولکولی اجزاء حاصل از تخریب نشان می‌دهد که وزن مولکولی فرآورده‌های تخریبی در لیگنین دیوکسان از لیگنین یورکمن بیشتر است.

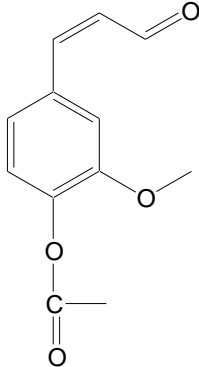
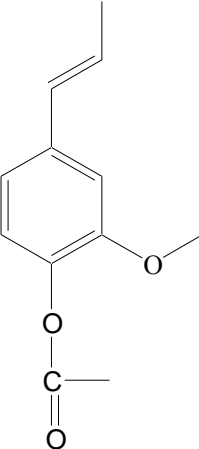
نتایج حاصل از کروماتوگرام‌های GPC، نشان می‌دهد که وزن مولکولی متوسط لیگنین دیوکسان بیشتر از لیگنین یورکمن است. همچنین، میانگین وزن مولکولی لیگنین دیوکسان کمتر

انجام شده است و تشکیل پیوند دوگانه بین کربن‌های α و β حاکی از ساختار متیل پروپن است. همچنین، در جزء حاصل از لیگنین MWL پس از اجرای فرآیند DFRC کربن γ به آلدهید و در لیگنین دیوکسان، کربن γ به CH_3 تبدیل و در واقع احیا شده است. اجزاء شناسایی شده از لیگنین‌های با ساختار گواپاسیل مشتق شده اند.

– نتایج حاصل از کروماتوگرافی گازی – طیف‌سنجی جرمی (GC-Mass)

لیگنین سوزنی برگان عموماً دارای ساختارهای گواپاسیل – سیرینجیل می‌باشد که از واحدهای کانیریل الکل و سیناپیل الکل با نسبت‌های متغیر مشتق شده‌اند. در این تحقیق با استفاده از تکنیک GC-Mass، دو جزء مهم حاصل از تخریب شناسایی شده‌اند که ساختار آنها در جدول ۳ نشان داده شده است. در ساختار این دو جزء نیز گسستن در موقعیت β -O-4

جدول ۳- اجزاء مهم مشاهده‌شده در لیگنین‌های MWL و دیوکسان سرو پس از DFRC

ساختار	ساختار	لیگنین MWL	سهم (درصد)	لیگنین دیوکسان	سهم (درصد)
	A	+	۲/۰۶	-	-
	B	-	-	+	۰/۷

(ب) لیگنین دیوکسان استیل‌دار شده سرو

از طیف $^{13}\text{C-NMR}$ لیگنین دیوکسان استیل‌دار شده سرو پیش و پس از DFRC (شکل‌های ۷-الف و ۷-ب)، نتایج مندرج در جدول ۵ حاصل گردیده است.

– نتایج حاصل از طیف‌سنجی $^{13}\text{C-NMR}$

الف) لیگنین MWL استیل‌دار شده سرو

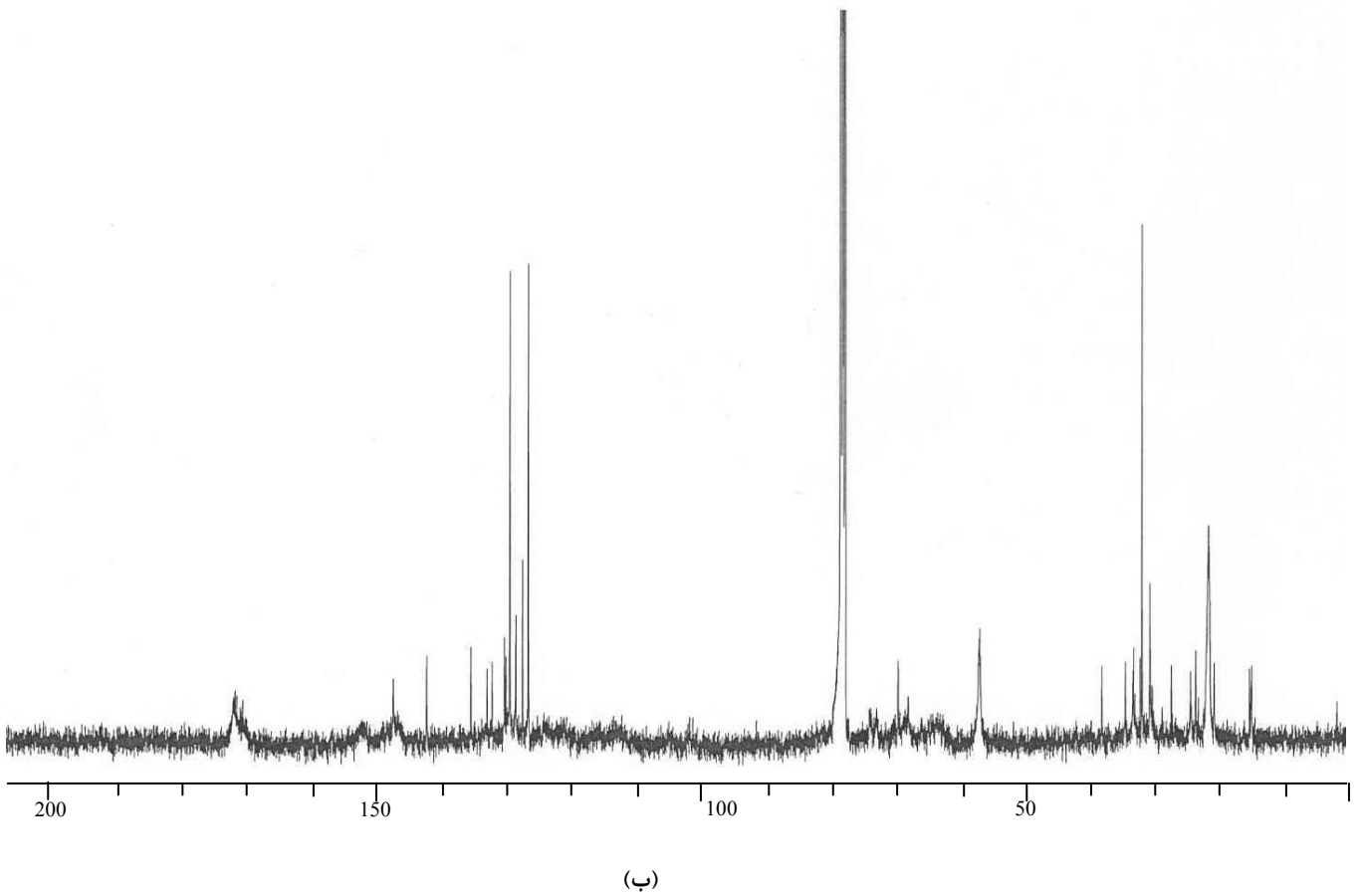
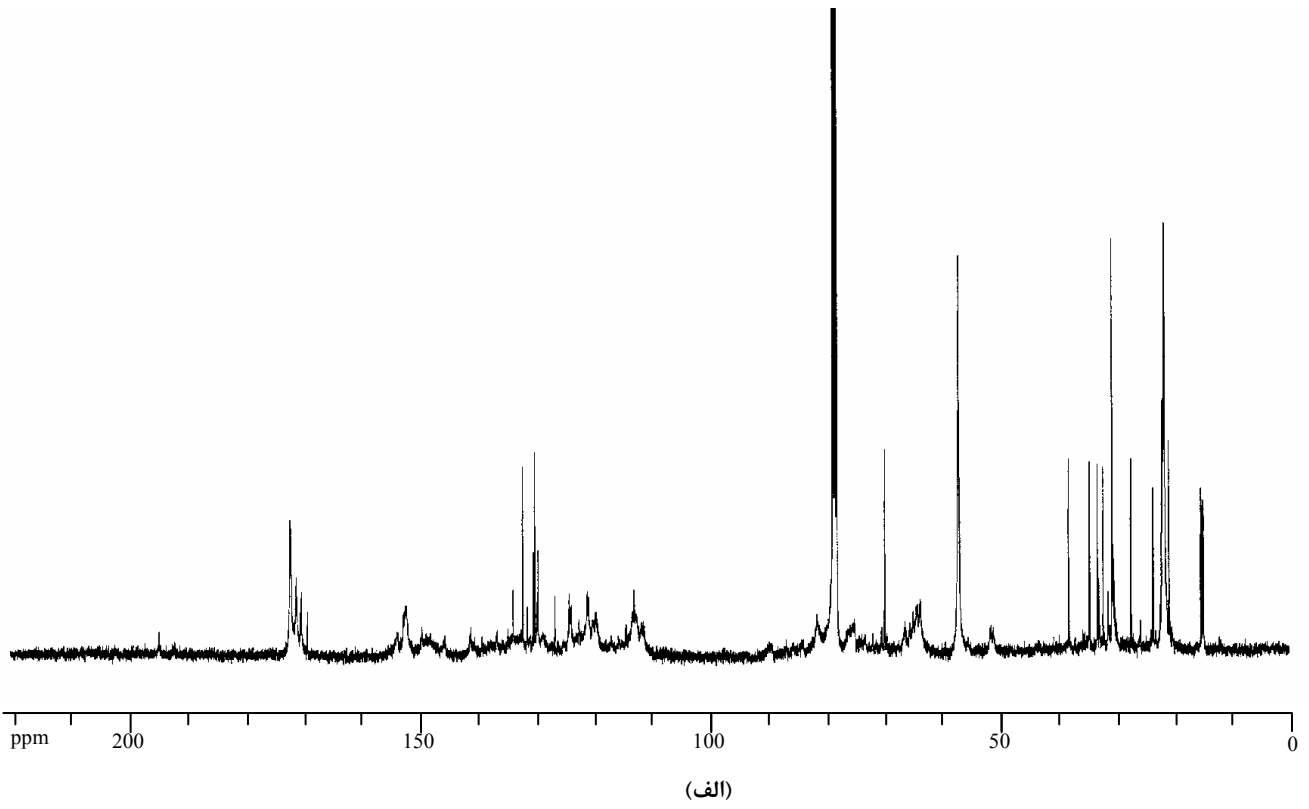
از مقایسه طیف‌های $^{13}\text{C-NMR}$ لیگنین استیل‌دار شده MWL سرو پیش و پس از DFRC (شکل‌های ۶-الف و ۶-ب)، نتایج مندرج در جدول ۴ حاصل شده است.

جدول ۴- مقایسه نتایج $^{13}\text{C-NMR}$ لیگنین MWL سرو پیش و پس از انجام واکنش‌های DFRC

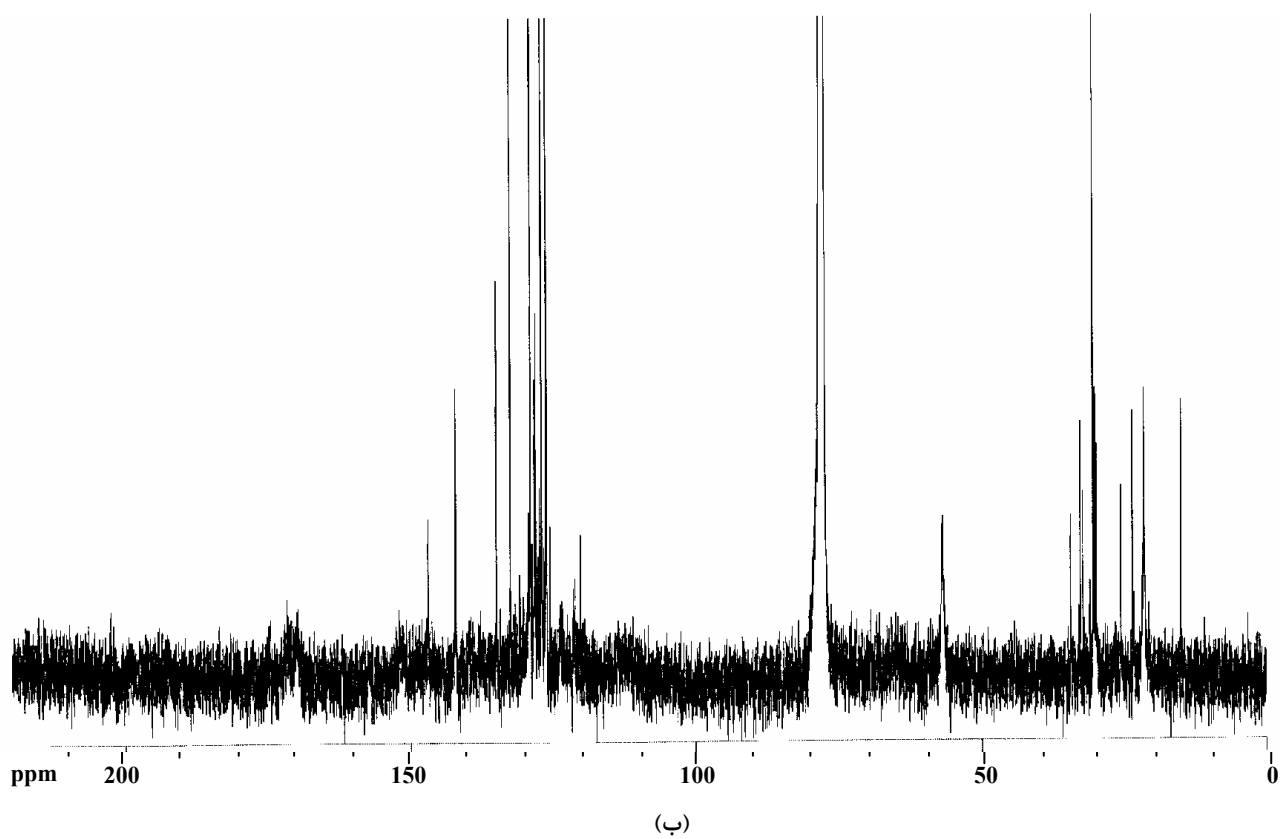
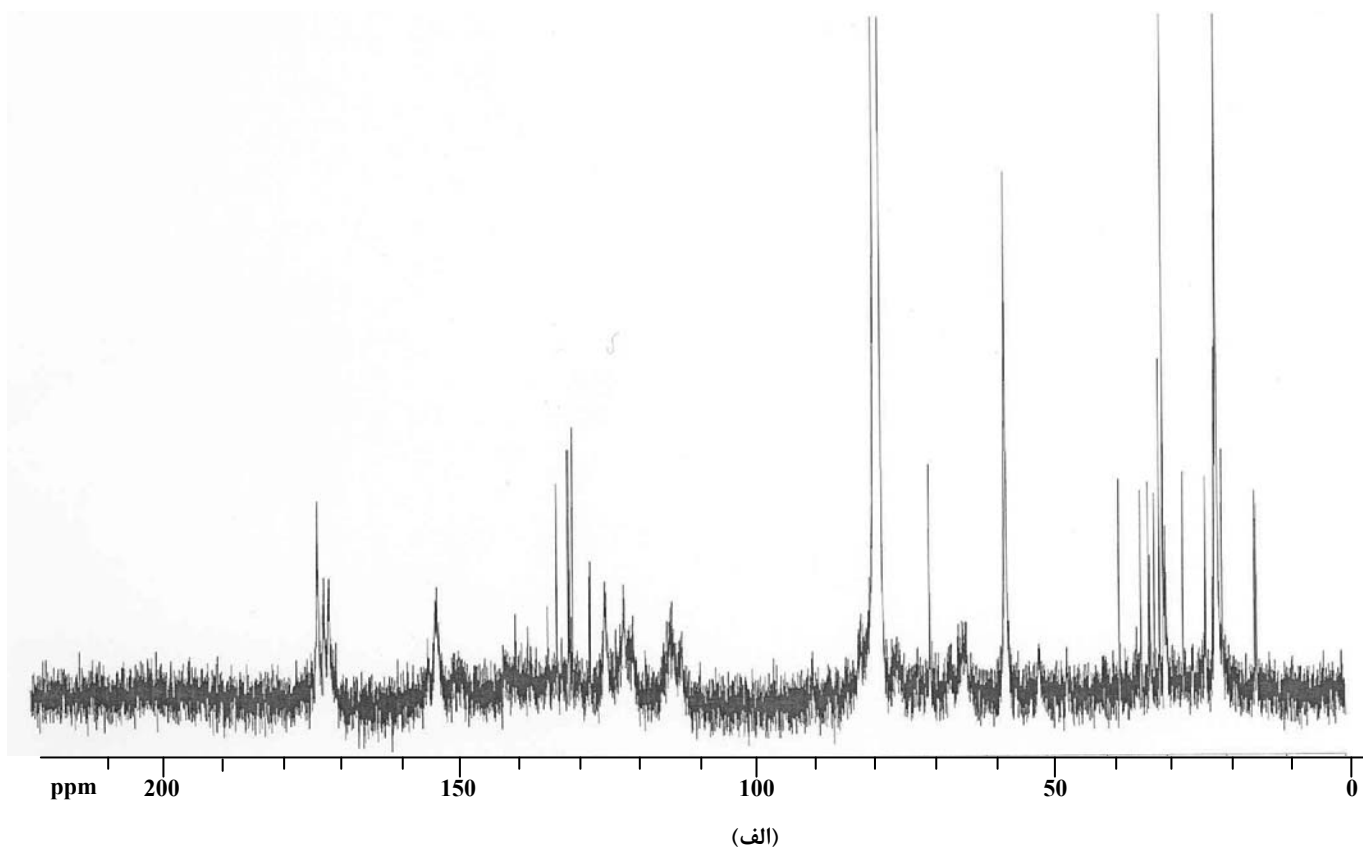
گروه ساختاری	حدود پیک (لیگنین استیل‌دار) (ppm) DFRC قبل از	حدود پیک (لیگنین استیل‌دار تخریب شده) (ppm) DFRC پس از
متیل گروه استوکسی کربن‌های α	۲۷/۱۶ - ۳۷/۹	----
متیل گروه استوکسی کربن‌های β	----	----
متیل گروه استوکسی کربن ۴	۱۴/۸ - ۱۵/۱	۲۱/۶ - ۳۷/۹
متیل گروه استوکسی کربن γ	۲۰/۶ - ۲۳/۳۹	----
متیل متوکسی کربن ۳	۵۶/۷	۵۶/۷
متیلن CH_2 کربن γ	۶۳/۳ - ۶۹/۳	-----
متین CH کربن α	۷۷/۸	۱۴۶/۹
متین CH کربن β	۷۸/۱ - ۷۸/۵	۱۲۹/۶ - ۱۲۹/۸
حلقه آروماتیک	۱۲۹ - ۱۵۱/۵	۱۲۶/۱ و ۱۲۷/۰۱ و ۱۳۴/۹۵ و ۱۴۱/۷
کربونیل استوکسی کربن ۴	۱۶۸/۵	۱۷۰/۱ - ۱۷۱/۳
کربونیل استوکسی کربن α	۱۶۹/۵ - ۱۷۰/۵	----
کربونیل استوکسی کربن γ	۱۷۱/۵	----
کربونیل آلدهیدی (کربن γ)	----	۲۰۷/۸

جدول ۵- مقایسه نتایج $^{13}\text{C-NMR}$ لیگنین دیوکسان استیل‌دار شده سرو پیش و پس از انجام واکنش‌های DFRC

گروه ساختاری	حدود پیک (لیگنین استیل‌دار) (ppm) DFRC قبل از	حدود پیک (لیگنین استیل‌دار تخریب شده) (ppm) DFRC پس از
متیل (کربن γ) متصل به کربن β	----	۱۴/۸ - ۱۵/۱
متیل گروه استوکسی کربن‌های α	۲۱/۲ - ۲۱/۸	----
متیل گروه استوکسی کربن‌های β	----	----
متیل گروه استوکسی کربن ۴	۲۲/۴ - ۳۵/۰۲	۲۰/۶ - ۲۱/۴
متیل گروه استوکسی کربن‌های α و γ	۲۲/۴ - ۳۵/۰۲	----
متیل متوکسی کربن‌های α و β	۵۶/۷	۵۶/۶ - ۵۶/۹
متیلن CH_2 کربن γ	۶۳ - ۶۹	----
متین CH کربن α	۷۸/۲	۱۲۸ - ۱۲۸/۹
متین CH کربن β	۸۱/۵	۱۲۰/۱
پیوند دوگانه بین کربن‌های α و β (ساختار فنیل پروپن)	----	۱۲۰/۱ - ۱۲۸
حلقه آروماتیک	۱۲۹ - ۱۳۸ و ۱۰۴	۱۰۴ و ۱۲۳/۶ ۱۳۱ - ۱۳۴/۹
کربونیل استوکسی کربن ۴	۱۶۹/۷	۱۷۱
کربونیل استوکسی کربن γ	۱۷۰/۶	----
کربونیل استوکسی کربن α	۱۷۱/۶	----



شکل ۶- طیف ^{13}C -NMR لیگنین MWL استیل‌دار شده سرو: الف) پیش از DFRC و ب) پس از DFRC



شکل ۷- طیف ^{13}C -NMR لیگنین. دیوکسان استیل‌دار شده سرو: الف) پیش از DFRC و ب) پس از DFRC

بحث و نتیجه‌گیری

- تاثیر فرایند تخریب بر توزیع وزن مولکولی لیگنین‌ها

بررسی و مقایسه نتایج مربوط به توزیع وزن مولکولی لیگنین‌های تهیه شده قبل و پس از تخریب DFRC نشان می‌دهد که:

الف) در هر دو نوع لیگنین واکنش‌های تجزیه و تخریب روی داده است.

ب) در مقایسه با لیگنین دیوکسان، گستره تخریب لیگنین MWL بیشتر است که می‌تواند ناشی از تخریب مکانیکی لیگنین یورکمن در جریان تهیه آن باشد.

ج) مقاومت لیگنین دیوکسان در برابر تخریب بیشتر است که علت آن می‌تواند ناشی از وقوع واکنش‌های تراکمی در محیط اسیدی استحصال لیگنین دیوکسان باشد.

این مشاهدات بیانگر آنست که در شرایط تخریبی DFRC پیوندهای اتری در لیگنین‌ها مورد حمله واقع و گسسته می‌شوند. این نتایج بیانگر آن است که در فرآیند تهیه لیگنین دیوکسان (در محیط اسیدی) تا حدودی واکنش‌های تراکمی روی می‌دهد. در حالی که در مورد لیگنین MWL، بدلیل آسیب‌های مکانیکی، وزن‌های مولکولی کمتر و پراکندگی وزن مولکولی بیشتری انتظار می‌رود. همچنین، بیشتر بودن توزیع وزن مولکولی فرآورده‌های تخریبی ناشی از لیگنین دیوکسان را می‌توان ناشی از وزن مولکولی بیشتر لیگنین دیوکسان دانست. به نظر می‌رسد وجود پیوندهای مقاوم کربن-کربن ناشی از واکنش‌های تراکمی، مانع از تخریب گسترده لیگنین دیوکسان در فرآیند DFRC می‌شود.

- تحلیل نتایج حاصل از کروماتوگرافی گازی

طیف‌سنجی جرمی (GC-Mass)

ترکیبات و اجزای مشاهده شده در کروماتوگرام‌ها و طیف‌های جرمی حاکی از آنست که:

الف) در هر دو لیگنین MWL و لیگنین دیوکسان سرو، گسستن پیوندهای β -O-4 روی داده است،

ب) تخریب ساختار لیگنین MWL و گسستن در موقعیت‌های β -O-4 منجر به ایجاد ترکیب A (جدول ۳) شده است. این مشاهده با وجود ساختارهای گواپایسیل در بخش‌هایی از لیگنین سوزنی برگان مطابقت دارد.

ج) جزء شناسایی شده حاصل از واکنش‌های DFRC در لیگنین دیوکسان، ترکیب B می‌باشد که می‌تواند ناشی از

وقوع گسست در پیوندهای β -O-4 باشد.

- تحلیل نتایج حاصل از طیف‌های $^{13}\text{C-NMR}$

الف) تشکیل پیوند دوگانه بین کربن‌های α و β حاکی از وجود ساختارهای فنیل پروپن در فرآورده‌های تخریب است.

ب) در مورد لیگنین MWL نتایج DFRC حاکی از شکستن β -O-4 است که در آن کربن در گروه انتهایی γ -CH₂OH به گروه آلدیدی تبدیل شده است.

ج) در مورد لیگنین دیوکسان نیز نتایج DFRC گسستن β -O-4 را تأیید می‌کند.

د) تشکیل پیوند دوگانه بین کربن‌های α و β حاکی از وجود ساختارهای فنیل پروپن است.

ه) در محصول حاصل از DFRC لیگنین دیوکسان، کربن γ استوکسیل‌دار نشده و در واقع واکنش احیای:



روی داده که می‌تواند ناشی از وجود عامل کاهنده Zn در مخلوط واکنش باشد.

و) پس از اجرای فرآیند DFRC، شدت پیک ناحیه حدود ۵۶-۵۷ (ppm) که مربوط به گروه متوکسی می‌باشد، تا حدی کاهش یافته که به نظر می‌رسد ناشی از گسست پیوندهای اتری در شرایط واکنش باشد؛ شرایطی که در آن پیوندهای β -O-4 نیز گسسته می‌شوند.

با توجه به مشاهدات و نتایج حاصل از روش کروماتوگرافی تراوش ژلی، کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی و طیف‌های $^{13}\text{C-NMR}$ و مقایسه این نتایج با یکدیگر، می‌توان استنباط کرد که در خصوص ساختار لیگنین‌های مورد مطالعه، پیش و پس از واکنش‌های DFRC، نتایج حاصل از سه روش آنالیز با یکدیگر همخوانی و هماهنگی دارند و مؤید یکدیگر می‌باشند.

سپاسگزاری

از همکاری خانم‌ها زهره اسماعیلی و رقیه قدیمخانی در انجام کارهای آزمایشگاهی و همچنین از خانم آرزو نوری، کارشناس دستگاه NMR مرکز پژوهش‌های پلیمر و پتروشیمی ایران، بدلیل همکاری و مساعدت‌های صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد. همچنین از پشتیبانی مالی معاونت پژوهشی دانشگاه پیام‌نور در اجرای این پژوهش سپاسگزاری می‌گردد.

References

- Adler E. 1977. Lignin chemistry: past, present and future. *Wood Science Technology*. 11(3): 169-218..
- Adler, E. and Hemestam, S. 1955. Estimation of phenolic hydroxyl groups in lignin: 1. periodate oxidation of guaiacil compounds. *Acta Chemica Scandinavica*. 9:319-344.
- Bagby, M. O. Cunningham, R. L. and Maloney, R. L. 1973. Ultraviolet spectral determination of lignin. *Tappi Journal*. 56(4): 162-163.
- Bjorkman, A. 1954. Isolation lignin from finely divided wood with neutral solvent. *Nature*.174:1057-1058.
- Brauns, F. E. and Brauns, D. A. 1960. *The Chemistry of Lignin, Supplements Volume*, Academic Press, New York, 804 pp.
- Capanema, E. A. Balakshin, M. Y. and Kadla, J. F. 2005. Quantitative characterization of a hardwood milled wood lignin by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(25): 9639-9649.
- Casey J. P. 1981. *Lignin In: Pulp and Paper-Chemistry and Chemical Technology*, 3rd ed., Vol. 1, Wiley-Interscience, New York, 592 pp.
- Chang, H. M. Cowling, B. E. Brawn, W. Adler E. and Miksche, G. 1975. Comparative studies on cellulolytic enzyme lignin and milled wood lignin of Sweetgum and Spruce. *Holzforschung*. 29(5):153-159.
- Fujimoto, A. Matsumoto, Y. Chang, H. M. and Meshitsuka, G. 2005. Quantitative evaluation of milling effects on lignin structure during the isolation process of milled wood lignin. *Journal of Wood Science*. 23:75-83.
- Gellerstedt, G. and Northey, R. A. 1989. Analysis of birch wood lignin by oxidative-degradation. *Wood Science and Technology*. 51:89-91.
- Holtman, K. M. Chang, M. H. and Kadla, J. F. 2004. Solution state-state nuclear magnetic resonance study of the similarities between milled wood lignin and cellulolytic enzyme lignin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(4):720-726.
- Ikeda, T. Holtman, K. Kadla, J. F. Chang, H. M. and Jameel, H. 2002. Studies on the effect of ball milling on lignin structure using a modified DFRC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(1): 129-135.
- Lai, Y. Z. Sarkanen, K. V. and Ludwig, C. H. 1971. *Isolation and Structural Studies in Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions*, Wiley-Interscience, New York, 297 pp.
- Lapierre, C. B. Monties, and C. Rolando, 1985. Thioacidolysis of lignin: comparison with acidolysis. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. 5(2):277-292.
- Lawther, J. M. Sun, R. C. and Banks, W. B. 1996. Extraction and comparative characterization of ball-milled lignin (LM), enzyme lignin (LE) and alkali lignin (LA) from wheat-straw. *Cellulose Chemistry and Technology*. 30, 395-410.
- Lu, F. and Ralph, J. 1996. Reactions of lignin model β -aryl ethers with acetyl bromide. *Holzforschung*. 50:360-364.
- Lu, F. and Ralph, J. 1997. Derivatization followed by Reductive Cleavage (DFRC Method), a new method for lignin analysis: Protocol for analysis of DFRC monomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45(7): 2590-2592.
- del Rio, J. C. Gutierrez, A. Martinez, M. J. and Martinez, A. T. 2001. Py-GC-MS study of Eucalyptus globules wood treated with different fungi. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 58-59:441-452.
- Sederoff, R. and Chang, H-m. 1991. Lignin Biosynthesis, in Lewin, M. and Goldstein, I. S. (Eds.), *Wood Structure and Composition*. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 263-285 pp

The Structural Study of Milled Wood and Dioxane Lignin of *Cupressus Sempervirens* Using DFRC Method

T. Partovi^{1*} and S.A. Mirshokraie²

¹ Assistant Professor, Chemistry Department, Faculty of Sciences, Payam-e-Noor University, I.R. Iran.

² Professor, Chemistry Department, Faculty of Sciences, Payam-e-Noor University, I.R. Iran.

(Received: 3 January 2010, Accepted: 23 October 2011)

Abstract

In this study, derivatization followed by reductive cleavage (DFRC) method was used to investigate the structures of milled wood lignin and dioxane lignin of Spruce (*Cupressus sempervirens*). After performing DFRC reactions, the structures of constituents resulted from these two kinds of lignins were investigated by using Spectroscopic methods such as ¹³CNMR, GC-mass and gel permeation chromatography (GPC). The results obtained from chromatography and spectroscopy studies were compared. These comparative results show that the dominant structural components of these two kinds of lignin are obtained from the cleavage of β -O-4 bonds. The main components obtained from dioxane lignin and milled wood lignin are 4-hydroxy-3-methoxy-1-phenyl propene and 4-hydroxy-3-methoxy-1-phenyl- propenal (guaiacyl structures), respectively.

KeyWords: Spruce, Milled Wood Lignin (MWL), Dioxane Lignin, Derivatization Followed by Reductive Cleavage Method (DFRC).