

Z Katedry Biochemii Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS  
Kierownik: doc. dr Jerzy Trojanowski

Jerzy TROJANOWSKI i Andrzej LEONOWICZ

**Pościowe oznaczanie ligniny Björkmana w roztworze  
przy pomocy reakcji z floroglucyną**

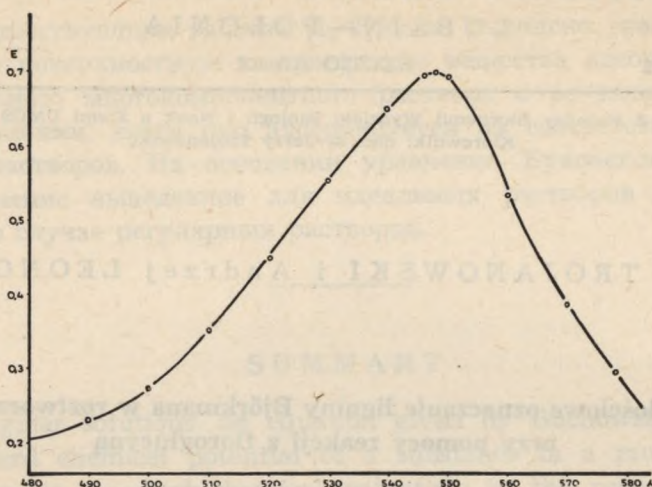
**Количественное определение лигнина Бёркмана в растворе  
с помощью реакции с флороглюцином**

**A Quantitative Determination of Björkman's Lignin in a Solution  
by Reaction with Phloroglucinol**

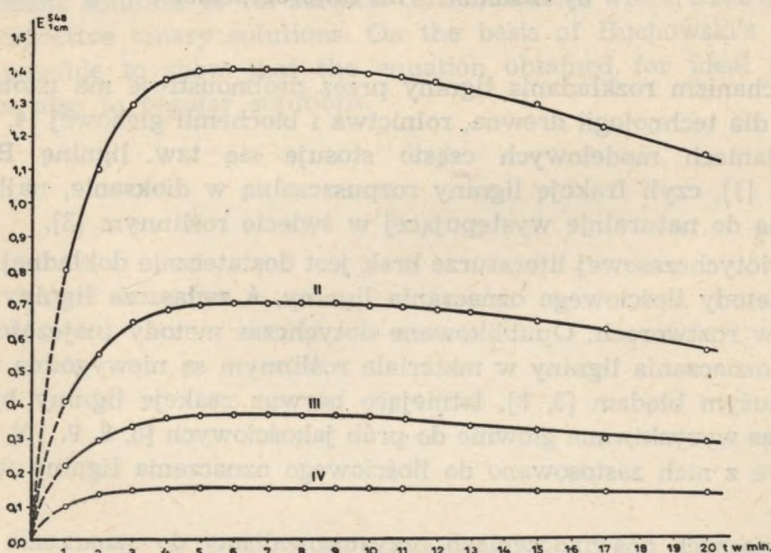
Mechanizm rozkładania ligniny przez drobnoustroje ma istotne znaczenie dla technologii drewna, rolnictwa i biochemii glebowej [4, 11, 12]. W badaniach modelowych często stosuje się tzw. ligninę Björkmana [1], czyli frakcję ligniny rozpuszczalną w dioksanie, najbardziej zbliżoną do naturalnie występującej w świecie roślinnym [3].

W dotychczasowej literaturze brak jest dostatecznie dokładnej i szybkiej metody ilościowego oznaczania ligniny, a zwłaszcza ligniny Björkmana w roztworach. Opublikowane dotychczas metody (najczęściej wagowe) oznaczania ligniny w materiale roślinnym są niewygodne i obciążone dużym błędem [5, 8]. Istniejące barwne reakcje ligniny były dotychczas wyzyskiwane głównie do prób jakościowych [6, 8, 9, 10], a tylko niektóre z nich zastosowano do ilościowego oznaczenia ligniny w drewnie [2].

W naszych doświadczeniach przystosowaliśmy do oznaczenia wolnej od celulozy ligniny Björkmana często cytowaną w literaturze barwną reakcję z floroglucyną [2, 13]. Odpowiednim do kolorymetrii rozpuszczalnikiem okazała się mieszanina etanol-dwuchloroetan 1:1. W wyniku reakcji ligniny z floroglucyną w obecności kwasu solnego, działającego jako katalizator, powstaje niezidentyfikowane chemicznie połączenie o zabarwieniu czerwonym, wykazujące maksimum absorpcji przy długości fali 548 milimikronów (ryc. 1). W obranych warunkach zabarwienie jest



Ryc. 1. Krzywa absorpcji światła widzialnego dla połączenia ligniny z floroglu-cyną w roztworze etanol-dwuchloroetan 1:1, koncentracja ligniny 0,4 mg/ml; pomiary dokonywane były pomiędzy piątą a ósmą minutą reakcji

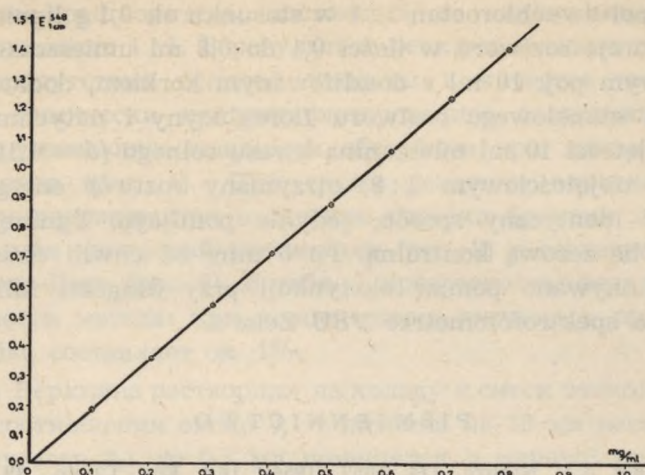


Ryc. 2. Krzywe wyrażające zależność wielkości  $E_{548}^{1cm}$  od czasu reakcji: I—0,8 mg ligniny w 1 ml roztworu, II — 0,4 mg, III — 0,2 mg, IV — 0,1 mg ligniny w 1 ml roztworu

trwałe przez okres czasu wystarczający do przeprowadzenia pomiaru ekstynkcji (ryc. 2) i spełnia prawo Lamberta-Beera (ryc. 3).

Tab. 1 podaje wyniki sprawdzenia dokładności metody — odpowiednią





Ryc. 3. Krzywa kalibracyjna do kolorymetrii ligniny, wykorzystująca reakcję z floroglucyną; pomiary wartości  $E_{1cm}^{548}$  dokonywane były pomiędzy piątą a ósmą minutą reakcji

Tab. 1. Sprawdzenie dokładności metody

Odważki ligniny w mg		W y n i k i				Różnica wyników w % do odważki		Różnica średnio w %
		$E_{1cm}^{548}$		Znaleziona ilość ligniny w mg				
próbna I	próbna II	próbna I	próbna II	próbna I	próbna II	próbna I	próbna II	
1,11	1,03	0,216	0,200	1,22	1,11	10	7	8,5
2,02	1,99	0,370	0,340	2,10	1,93	4	3,1	3,6
3,13	2,98	0,560	0,503	3,16	3,00	1	0,5	0,75
4,17	4,02	0,732	0,710	4,14	4,04	0,7	0,5	0,6
6,10	6,17	1,040	1,100	5,94	6,25	2,6	1,2	1,9
8,19	8,01	1,390	1,430	7,95	8,12	2,9	1,5	2,3

odważkę ligniny rozpuszczano w 1 ml mieszaniny etanol-dwuchloroetan 1 : 1, dodawano floroglucyny i roztworu kwasu solnego w etanolu do łącznej objętości 10 ml.  $E_{1cm}^{548}$  mierzono między piątą a ósmą minutą reakcji.

Przy koncentracji ligniny w próbce 0,3—0,4 mg/ml błąd wynosi około 1%.

#### WYKONANIE OZNACZENIA

Otrzymaną ze słomy żytniej [12] i wysuszoną pod próżnią nad pięciotlenkiem fosforu ligninę Björkmana rozpuszczano na zimno w mie-



szaninie etanol-dwuchloroetan 1 : 1 w stosunku ok. 0,1 g ligniny na 10 ml roztworu. Porcje roztworu w ilości 0,1 do 0,8 ml umieszczano w cylindrze miarowym poj. 10 ml z doszlifowanym korkiem, dodawano równą objętość 1% etanolowego roztworu floroglucyny i natychmiast dopełniano do objętości 10 ml mieszaniną kwasu solnego ( $d = 1,19$ ) i etanolu w stosunku objętościowym 2 : 8; otrzymany roztwór energicznie wytrząsano. W identyczny sposób, jedynie pomijając ligninę, przygotowywano próbę zerową kontrolną. Po 5 min. od chwili dodania kwasu solnego wykonywano pomiar ekstynkcji przy długości fali 548 milimikronów na spektrofotometrze VSU Zeiss'a.

#### PIŚMIENICTWO

1. Björkman A.: Nature, **174**, 1057 (1954); Ind. Eng. Chem., **49**, 1395 (1957).
2. Cross C. F., Bevan E. J., Briggs J. F.: Ber., **40**, 3119 (1907); Chem.-Ztg., **31**, 725 (1907); Papier.-Ztg., **32**, 4113 (1907).
3. Czudakow M. I.: Uspiechi Chimii, **30**, 184 (1961).
4. Flaig W., Haider K.: Planta Medica, **9**, 123 (1961).
5. Freudenberg K., Ploetz Th.: Ber., **73**, 754 (1940).
6. Gierer J.: A. Chem. Scand., **8**, 1319 (1954); Ber., **89**, 257 (1956).
7. Klason P.: Cellulosechem., **4**, 81 (1923).
8. Nakamura T., Kitaura S.: Ind. Eng. Chem., **49**, 1388 (1957).
9. Pew J. C.: J. Am. Chem. Soc., **74**, 5748 (1952).
10. Runge F. E.: Pogg. Ann., **31**, 65 (1834).
11. Trojanowski J.: Postępy Biochemii, **7**, 543 (1961).
12. Trojanowski J., Leonowicz A.: Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C, **18** (1963).
13. Wiesner J.: Sitzber. Akad. Wiss. Wien, Math. naturw. Klasse, **77**, 60 (1878).

#### РЕЗЮМЕ

В научной литературе до настоящего времени нет точного и быстрого метода количественного определения лигнина, особенно лигнина Бёркмана в растворах. Опубликованные до сих пор методы (преимущественно весовые) определения лигнина в растительном материале мало удобны и неточны [5, 7]. Цветные реакции лигнина использовались главным образом для качественных проб [6, 8, 9, 10] и лишь некоторые из них применялись с целью количественного определения лигнина в древесине [2]. В наших опытах мы применили часто цитированную в научной литературе цветную реакцию с флороглюцином [2, 13] для определения лишенного целлюлозы лигнина Бёркмана. Подходящим для колориметрических определе-



ний оказался растворитель, состоящий из смеси: этанол-дихлорэтан в соотношении 1 : 1. В результате реакции лигнина с флороглюцином в присутствии соляной кислоты в качестве катализатора образуется химически неидентифицированное соединение красного цвета обнаруживающее максимум абсорбции при длине волны 548 миллимикрон (рис. 1). При таких условиях окраска довольно устойчива и удерживается в течение отрезка времени достаточного для проведения измерений экстинкции (рис. 2) и согласуется с законом Лямберта-Бера (рис. 3). В табл. 1 представлены результаты проверки точности метода: при концентрации лигнина в пробе 0,3—0,4 мг/мл ошибка составляет ок. 1%.

Лигнина Бёркмана растворяли на холоду в смеси этанолдихлорэтан (1 : 1) при соотношении около 0,1 г лигнина на 10 мл раствора. Раствор в количестве 0,1 до 0,8 мл помещался в мерный цилиндр емкостью 10 мл с дошлифованной пробкой и к нему прибавлялся равный объем 1% этанолового раствора флороглюцина и сразу же жидкость дополнялась до объема 10 мл смесью соляной кислоты ( $d=1,19$ ) и этанола при объемном соотношении 2 : 8. Полученный раствор подвергался энергичному встряхиванию. Идентичным образом была приготовлена контрольная проба без лигнина. После истечения пяти минут с момента прибавления соляной кислоты производились измерения  $E_{1\text{cm}}^{548}$  на спектрофотометре.

## SUMMARY

In up-to-date literature there is no description of a precise and quick method of quantitative determination of lignin, especially of Björkman's lignin, in solutions. The methods reported so far, especially those concerned with the determination of lignin in plant material (mostly weight determination), were not convenient and highly erroneous [5, 7]. The existing lignin colour reactions have been used for qualitative tests and only some of them were used to estimate the amount of lignin in wood [2]. In the present experiments the authors adapted, often quoted in literature, colour reactions to phloroglucinol in order to estimate the amount of Björkman's lignin, free from cellulose [2, 13]. The mixture of ethyl alcohol and ethylene chloride (1 : 1) proved a suitable solvent in colorimetry. Lignin reaction to phloroglucinol, in the presence of hydrochloric acid acting as a catalyst, resulted in an unidentified chemical compound, red in colour, which showed the maximum absorption if the wavelength was 548 millimicrons (Fig. 1). Under the present conditions



the colour sustained long enough to allow measurements of extinction, and it conformed to the Lambert—Beer law (Fig. 3). Table 1 presents the degree of the precision of the method; if the concentration of lignin in the test-tube ranged from 0.3 to 0.4 mg./ml. the error amounted to about 1%. The solution of lignin was dissolved in a mixture of cold ethyl alcohol and ethylene chloride (1:1) at a proportion of about 0.1 g of lignin to 10 ml. of the solution. To the portions of the solution ranging from 0.1 to 0.8 ml. in a calibrated flask of 10 ml. equal amounts of 1% ethyl alcohol and ethylene chloride were added; to fill up the volume of 10 ml. hydrochloric acid ( $d = 1.19$ ) and ethanol to the proportion 2:3 were added. The obtained solution was thoroughly shaken. In an identical way an experiment without lignin was prepared to serve as control. After five minutes from the moment of the addition of hydrochloric acid the measurement  $E_{1\text{cm}}^{548}$  was made on a Zeiss VSU spectrophotometer.