

Functional Groups and Structural Characterization of Unmodified and Functionalized Lignin by Titration, Elemental Analysis, ^1H NMR and FTIR Techniques

Ramin Bairami Habashi and Mahdi Abdollahi*

Department of Polymer Reaction Engineering, Faculty of Chemical Engineering,
Tarbiat Modares University, P.O.Box: 14115-114, Tehran, Iran

Received: 24 January 2017, accepted: 26 September 2017

ABSTRACT

Lignin is the second most abundant polymer in the world after cellulose. Therefore, characterization of the structure and functional groups of lignin in order to assess its potential applications in various technical fields has become a necessity. One of the major problems related to the characterization of lignin is the lack of well-defined protocols and standards. In this paper, systematic studies have been done to characterize the structure and functional groups of lignin quantitatively using different techniques such as elemental analysis, titration and ^1H NMR and FTIR techniques. Lignin as a black liquor was obtained from Choka Paper Factory and it was purified before any test. The lignin was reacted with α -bromoisobutyryl bromide to calculate the number of hydroxyl and methoxyl moles. Using ^1H NMR spectroscopic method on α -bromoisobutyrylated lignin (BiBL) in the presence of a given amount of N,N-dimethylformamide (DMF) as an internal standard, the number of moles of hydroxyl and methoxyl groups per gram of lignin was found to be 6.44 mmol/g and 6.64 mmol/g, respectively. Using aqueous titration, the number of moles of phenolic hydroxyl groups and carboxyl groups of the lignin were calculated as 3.13 mmol/g and 2.84 mmol/g, respectively. The findings obtained by ^1H NMR and elemental analysis indicated to phenyl propane unit of the lignin with C_9 structural formula as $\text{C}_9 \text{H}_{3.84}^{\text{Al}} \text{H}_{2.19}^{\text{Ar}} \text{S}_{0.2} \text{O}_{0.8} (\text{OH})_{1.38} (\text{OCH}_3)_{1.42}$. Due to poor solubility of the lignin in tetrahydrofuran (THF), acetylated lignin was used in the GPC analysis, by which number-average molecular weight (\bar{M}_n) of the lignin was calculated as 992 g/mol.

Keywords:

lignin,
chemical structure and
functional group
characterization,
spectroscopy,
titration,
molecular weight

(*To whom correspondence should be addressed.

E-mail: abdollahim@modares.ac.ir

Please cite this article using:

Bairami Habashi R. and Abdollahi M., Functional Group and Structural Characterization of Unmodified and Functionalized Lignin by Titration, Elemental Analysis, ^1H NMR and FTIR Techniques, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **30**, 405-418, 2018.

شناسایی گروه‌های عاملی و ساختار لیگنین اولیه و عامل‌دار شده با تیتراکدن، تجزیه عنصری و فنون رزونانس مغناطیسی هسته پروتون و زیرقرمز تبدیل فوریه

رامین بایرامی حبشی، مهدی عبداللهی*

تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده مهندسی شیمی، گروه مهندسی فرایندهای پلیمریزاسیون،
صندوق پستی ۱۱۴-۱۴۱۱۵

دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۵، پذیرش: ۱۳۹۶/۷/۴

مجله علوم و تکنولوژی پلیمر،

سال سی‌ام، شماره ۵،

صفحه ۴۱۸-۴۰۵، ۱۳۹۶

ISSN: 1016-3255

Online ISSN: 2008-0883

DOI: 10.22063/JIPST.2017.1515

چکیده

لیگنین دومین پلیمر طبیعی فراوان پس از سلولوز در دنیاست. از این‌رو، شناسایی ساختار و گروه‌های عاملی لیگنین برای ارزیابی کاربردهای بالقوه آن در حوزه‌های مختلف فنی به ضرورت تبدیل شده است. از مشکلات عمده در شناسایی لیگنین، نبود پروتکل‌ها و استانداردهای مشخص است. در این مقاله سعی شده تا مطالعه‌ای نظام‌مند درباره شناسایی کمی گروه‌های عاملی و ساختار لیگنین با استفاده از فنون مختلف مانند تیتراکدن، تجزیه عنصری و طیف‌سنجی‌های ^1H NMR و FTIR انجام شود. لیگنین به حالت مایع غلیظ سیاه‌رنگ از کارخانه کاغذسازی چوکا تهیه و خالص‌سازی شد. برای محاسبه مول گروه‌های هیدروکسیل، لیگنین با آلفابروموایزوبوتیریل برمید واکنش داده شد. با استفاده از طیف ^1H NMR لیگنین آلفابروموایزوبوتیریل‌دار (BiBL) در مجاورت مقدار مشخصی از N,N-دی‌متیل فرمامید (DMF) به‌عنوان استاندارد داخلی، مول گروه‌های هیدروکسیل و متوکسیل به ازای ۱ g لیگنین محاسبه و به ترتیب ۶/۴۴ و ۶/۶۴ mmol/g به دست آمد. به کمک تیتراکدن آبی، مول گروه‌های هیدروکسیل فنولی و کربوکسیل به ازای ۱ g از لیگنین محاسبه شد که به ترتیب مقدارهای ۳/۱۳ و ۲/۸۴ mmol/g به دست آمد. واحد فنیل پروپان لیگنین با فرمول ساختاری $\text{C}_9\text{H}_{3.84}\text{H}^{\text{Al}}\text{H}^{\text{Ar}}\text{S}_{0.2}\text{O}_{0.8}(\text{OH})_{1.38}(\text{OCH}_3)_{1.42}$ تعیین شد. برای تعیین وزن مولکولی لیگنین، به دلیل انحلال ضعیف لیگنین در تتراهیدروفوران، نمونه لیگنین استیل‌دار شده در آزمون رنگ‌نگاری ژل تراوایی (GPC) به کار گرفته شد و با انجام برخی محاسبات، وزن مولکولی لیگنین $(\bar{M})_n$ محاسبه شد که مقدار ۹۹۲ g/mol به دست آمد.

واژه‌های کلیدی

لیگنین،
شناسایی ساختار شیمیایی و
گروه‌های عاملی،
طیف‌سنجی،
تیتراکدن،
وزن مولکولی

مقدمه

لیگنین دومین پلیمر طبیعی فراوان پس از سلولوز در دنیاست و به‌عنوان ماده‌ای ارزان، غیرسمی و زیست‌تخریب‌پذیر، جایگزین خوبی برای پل‌ال‌های برپایه نفت است [۱]. روش‌های جدیدی برای شناسایی لیگنین توسعه یافته‌اند و روش‌های قدیمی بهبود پیدا کرده‌اند. همچنین، تلاش‌هایی برای حل برخی از مشکلات موجود در حوزه شناسایی ساختار لیگنین به‌عنوان درشت‌مونومر انجام شده است. بنابراین توسعه و استقرار روش‌های استاندارد تکرارپذیر به موضوع مهمی در حوزه پژوهشی لیگنین تبدیل شده است [۲].

اولین شرح دقیق درباره ساختار لیگنین را Brauns در ۱۹۶۰ بیان کرد [۳]. Neish اولین ساختار برای لیگنین استخراج شده از نرم‌چوب‌ها را در سال ۱۹۶۸ ارائه داد [۴]. در واقع، در سال ۱۹۷۷ Adler مدل جدیدی با ساختار شامل ۱۶ واحد C_6 مشتق شده از لیگنین موجود در درخت صنوبر ارائه داد که در آن لیگنین به‌عنوان پلیمر پرشاخه با انواع گروه‌های عاملی متفاوت از قبیل گروه‌های عاملی هیدروکسیل آلیفاتیک و آروماتیک، کربوکسیل، کربونیل و متوکسیل شناخته شد [۵، ۱].

با وجود محدودیت‌های مدل Adler، این مدل با توجه به ساختار گسترده لیگنین، منحصر به فرد است و به‌طور گسترده استفاده می‌شود. خواص فیزیکی و شیمیایی لیگنین به‌شدت تحت تأثیر ساختار و انواع گروه‌های عاملی موجود روی آن قرار می‌گیرد که به منبع استخراج و شیوه استخراج آن بستگی دارد [۶].

دانش و آگاهی از خواص لیگنین مانند واکنش‌پذیری، پایداری گرمایی و خواص درشت‌مونومری آن به مراتب با ارزش‌تر و منطقی‌تر از آن است که از آن فقط به‌عنوان سوخت کارخانه‌های کاغذسازی استفاده شود. هر کدام از روش‌های شناسایی ساختار و گروه‌های عاملی لیگنین، مزایا و معایبی دارند. بنابراین، شناسایی لیگنین به استفاده هم‌زمان از روش‌های مختلف نیاز دارد. از این‌رو، روش‌های شیمیایی مرطوب (استیل‌دار کردن، اکسایش با پرمنگنات و آمین‌کافت) و روش‌های طیف‌سنجی (UV، NMR، FTIR) یا ترکیبی از این فنون برای تعیین ساختار لیگنین استفاده می‌شوند [۷]. اکسایش با سدیم پریدات را گروه پژوهشی Adler توسعه داده است که به اکسایش گروه‌های فنولی در محیط آبی و تشکیل ترکیب ارتوکینون و متانول منجر می‌شود [۷].

روش آمین‌کافت را Mansson توسعه داد که شامل تعیین مقدار گروه‌های هیدروکسیل لیگنین با استفاده از استیل‌دار کردن گروه‌های هیدروکسیل فنولی و سپس واکنش آمین‌کافت آن‌ها با استفاده از پیرولیدون است [۸، ۹]. Chen برای تعیین گروه‌های کربونیل لیگنین

از واکنش اکسیددار کردن بهره جست که به‌عنوان معتبرترین روش برای شناسایی گروه‌های کربونیل شناخته شده است [۱۰]. از روش پتانسیل‌سنجی آبی برای تعیین گروه‌های کربوکسیل لیگنین و گروه‌های هیدروکسیل فنولی استفاده می‌شود. محدودیت اصلی این روش، سختی تعیین نقاط عطف است. Gosselink داده‌های معتبری را براساس این روش برای تعیین گروه‌های کربوکسیل لیگنین گزارش کرده است [۱۱].

فنون طیف‌سنجی برای شناسایی کمی و کیفی لیگنین به‌کار می‌روند. شناسایی‌های کمی، معمولاً به تعیین مقدار گروه‌های عاملی لیگنین مربوط است. از میان روش‌های طیف‌سنجی استفاده شده، طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته (NMR) در زمینه شناسایی لیگنین کاربرد گسترده‌ای دارد [۶].

درک خواص پلیمر لیگنین به اطلاعاتی درباره وزن مولکولی لیگنین و توزیع وزن مولکولی آن نیاز دارد. روش‌های متنوعی از قبیل پراکندگی نور، اسمزسنجی فشار بخار، رنگ‌نگاری ژل تراوایی، طیف‌سنجی جرمی زمان‌پروازی-یونش-واجذب لیزری به‌کمک زمینه (matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectroscopy) طیف‌سنجی جرمی با یونش الکتروافشانه‌ای (electrospray ionization-mass spectrometry) برای تعیین وزن مولکولی لیگنین به‌کار گرفته شده‌اند [۱۲، ۱۳].

گزارش‌های کمی در زمینه شناسایی ساختار و انواع گروه‌های عاملی لیگنین داخلی وجود دارد [۱۴-۱۶]. اما در این گزارش‌ها، روش‌های جامع شناسایی تمام گروه‌های عاملی و ساختار ارائه نشده است.

از این‌رو، در مطالعه حاضر ابتدا مایع سیاه و غلیظ، به‌عنوان ضایعات حاصل از فرایند کاغذسازی که دارای مقدار زیادی لیگنین است، از کارخانه کاغذسازی چوکا تأمین و سپس در محیط اسیدی رسوب داده شد. سپس، در اثر انحلال در تتراهیدروفوران، ناخالصی‌های آن از نوع قند، ترکیبات معدنی و سلولوز خالص‌سازی شد. برای تعیین گروه‌های هیدروکسیل لیگنین، طیف‌های 1H NMR لیگنین استیل‌دار و لیگنین آلفابروموایزوبوتیریل‌دار شده در مجاورت مقدار مشخصی از استاندارد دی‌متیل فرامید، ثبت شدند. با به‌کارگیری هم‌زمان نتایج حاصل از تیترا کردن، 1H NMR، تجزیه عنصری و GPC ساختار و گروه‌های عاملی لیگنین تعیین شدند. در این مطالعه، برای اولین بار از آلفابروموایزوبوتیریل‌دار کردن لیگنین برای شناسایی گروه‌های هیدروکسیل استفاده شد که در مقایسه با استیل‌دار کردن لیگنین مزیت‌هایی دارد. از جمله این مزیت‌ها می‌توان به واکنش کامل آن با تمام گروه‌های هیدروکسیل لیگنین اشاره کرد.

تجربی

استیل‌دار کردن لیگنین

مقدار ۵ mL از مخلوط استیل کلرید و استیک اسید به نسبت حجمی ۱ به ۴ (cm³/cm³) به‌طور دقیق به ۰/۵ g لیگنین در شیشه پنی‌سیلین ۱۰ mL اضافه شد. سپس، مخلوط واکنش با درپوش لاستیکی درزبندی شده و به‌مدت ۳۰ min با گاز نیتروژن هوازدایی شد. واکنش به‌کمک همزن مغناطیسی درون حمام آب در دمای ۴۰°C به‌مدت ۶ h ادامه یافت. پس از اتمام واکنش، به‌کمک گرم‌خانه خلأ، استیک اسید و استیل کلرید اضافی به‌مدت ۴۸ h در دمای ۶۰°C از محصول واکنش حذف شدند. فرایند خشک‌شدن تا جایی ادامه یافت که وزن نمونه ثابت شود [۱۸]. طرح ۱ واکنش استیل‌دار کردن لیگنین را نشان می‌دهد.

آلفابرموایزوبوتیریل‌دار کردن لیگنین

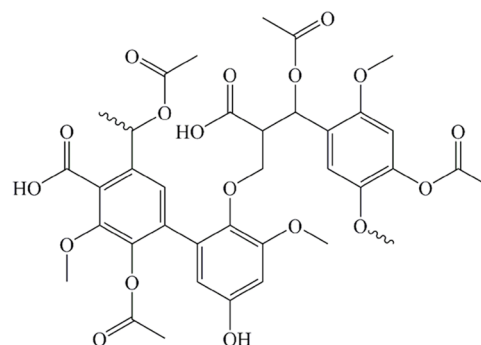
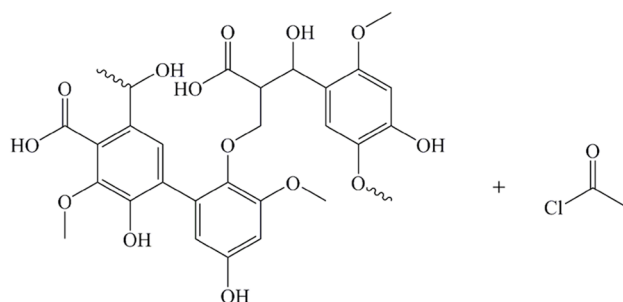
مقدار ۵ mL از مخلوط پیریدین و تتراهیدروفوران به نسبت حجمی ۳ به ۲ (cm³/cm³) به‌طور دقیق به ۰/۵ g لیگنین در شیشه پنی‌سیلین ۲۰ mL اضافه شد. سپس، ۱/۶ mL از آلفابرموایزوبوتیریل برمید با ۱ mL از تتراهیدروفوران رقیق شده و قطره‌قطره به مخلوط لیگنین-پیریدین-تتراهیدروفوران درون حمام آب و یخ اضافه شد. مخلوط واکنش درزبندی شده و به‌مدت ۳۰ min هوازدایی شد. واکنش به‌کمک همزن مغناطیسی در دمای محیط به‌مدت ۲۴ h پیش رفت. پس از اتمام واکنش، پیریدین و تتراهیدروفوران در دمای محیط تبخیر داده شدند و محصول واکنش در ۴،۱-دی‌اکسان حل شده و در سدیم بی‌کربنات اشباع رسوب داده شد. محصول رسوب داده شده با صافی از محلول جدا شد و به سرعت چند بار با آب مقطر شسته و خشک شد. لیگنین آلفابرموایزوبوتیریل‌دار شده (BiBL) به‌مدت ۳۰ min در محلول دی‌اتیل اتر با همزن مغناطیسی پخش شد. سپس، از صافی عبور داده شد و محصول باقی‌مانده روی کاغذ صافی به‌مدت ۴۸ h درون گرم‌خانه خلأ در دمای ۶۰°C خشک شد. فرایند خشک‌شدن تا جایی ادامه یافت که وزن نمونه ثابت شود [۱۹،۲۰]. بازده واکنش

مواد

مایع غلیظ سیاه‌رنگ با pH قلیایی به‌عنوان ضایعات کارخانه کاغذسازی از کارخانه کاغذسازی چوکا تهیه شد که دارای مقدار زیادی لیگنین قلیایی کرافت است. لیگنین موجود در آن در محلول هیدروکلریک اسید رقیق با pH حدود ۳ رسوب داده شد. سپس، در تتراهیدروفوران حل و شست‌وشو داده شد تا تمام ناخالصی‌های آن از قبیل قند، ترکیبات معدنی و سلولوز حذف شود [۱۷]. بیش از ۹۰٪ وزنی لیگنین رسوب داده شده با اسید در تتراهیدروفوران انحلال‌پذیر بود. بنابراین، بخش حل شده در تتراهیدروفوران می‌تواند نماینده لیگنین کرافت باشد. محلول استاندارد ۰/۱ نرمال هیدروکلریک اسید و محلول استاندارد ۰/۱ نرمال سدیم هیدروکسید به‌عنوان تیتراول از شرکت Merck خریداری و در تیتراکون‌ها استفاده شدند. آلفابرموایزوبوتیریل برمید با خلوص ۹۸٪ به‌عنوان عامل برم‌دار کردن لیگنین از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شد. استیل کلرید با خلوص ۹۸٪ به‌عنوان عامل استیل‌دار کردن لیگنین، پیریدین، سدیم هیدروکسید، N,N-دی‌متیل فرامید به‌عنوان استاندارد داخلی، تتراهیدروفوران، استیک اسید، دی‌اتیل اتر و ۴،۱-دی‌اکسان به‌عنوان حلال، از شرکت Merck خریداری شدند.

دستگاه‌ها و روش‌ها

در این پژوهش، طیف‌سنج زیرقرمز تبدیل فوریه (FTIR) Perkin Elmer، طیف‌سنج رزونانس مغناطیسی هسته پروتون (1H NMR) ۳۰۰ MHz مدل Avance Bruker، دستگاه تجزیه عنصری LECO مدل Tru Spec، pH سنج Ecomet مدل P15، رسانایی سنج Ecomet مدل C65 و رنگ‌نگار ژل تراوا مدل ۱۱۰۰ ساخت شرکت Agilent به‌کار گرفته شد.



طرح ۱- واکنش استیل‌دار کردن لیگنین با استیل کلرید.

تجزیه عنصری

تجزیه عنصری لیگنین به کمک دستگاه LECO انجام شد. پیش از آماده‌سازی نمونه برای آزمون، ابتدا لیگنین به مدت ۴۸ h در دمای ۸۰°C در خلأ خشک شد. برای تعیین درصد کربن، هیدروژن، نیتروژن، نمونه در کوره الکتریکی دستگاه در دمای ۹۵۰°C سوزانده و کربن و هیدروژن با سلول‌های زیرقرمز و نیتروژن با سلول رسانایی گرمایی دستگاه شناسایی شد. برای محاسبه درصد گوگرد نمونه در دمای ۱۳۵۰°C در محیط اکسیژن تبدیل به اکسید سولفید شده و مقدار آن به کمک سلول زیرقرمز تعیین شد. مقدار اکسیژن از تفاوت مقدار درصد سایر اجزا از ۱۰۰ محاسبه شد.

تیتراکون pH سنجی و رسانایی سنجی

گروه‌های کربوکسیل و هیدروکسیل فنولی لیگنین و لیگنین آلفابرموایزوبوتیریل‌دار شده با استفاده از روش Gosselink [۱۱] و به روش تیتراکون pH سنجی و رسانایی سنجی در دمای ثابت انجام شد. تیتراکون حداقل سه مرتبه تکرار و سپس میانگین گرفته شد. روش کار به شرح زیر بود:

تیتراکون لیگنین: ۰/۲ g لیگنین در ۵۰ mL آب مقطر قلیایی با pH برابر ۸، حل شده و به مدت ۲ h با همزن مغناطیسی همزده شد. محلول به کمک سدیم هیدروکسید غلیظ به ۱۲ رسانده شد. سپس، محلول با همزن مغناطیسی به مدت ۲ h همزده شده و با محلول استاندارد هیدروکلریک اسید ۰/۰۲ مولار تیتراکون، تغییرات pH و رسانایی محلول برحسب حجم تیتراکونده به ترتیب با pH سنج و رسانایی سنج اندازه‌گیری شد.

تیتراکون لیگنین آلفابرموایزوبوتیریل‌دار: نمونه لیگنین آلفابرموایزوبوتیریل‌دار شده به دلیل از بین رفتن گروه‌های آب‌دوست هیدروکسیل آن، در آب نامحلول است. برای رفع این مشکل، لیگنین آلفابرموایزوبوتیریل‌دار شده در مخلوط پروپانول و آب به‌طور کامل

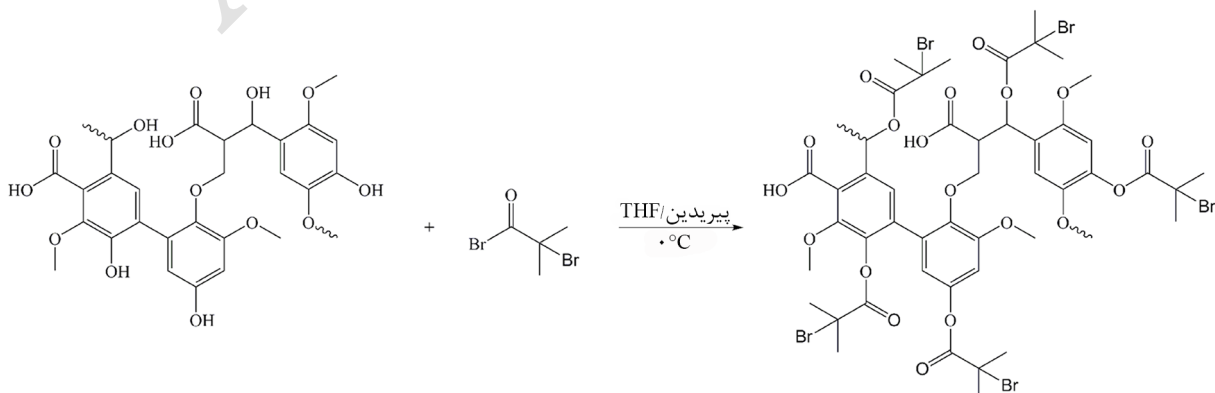
۹۵٪ وزنی به دست آمد. طرح ۲ واکنش آلفابرموایزوبوتیریل‌دار کردن لیگنین را نشان می‌دهد.

طیف‌سنجی زیرقرمز تبدیل فوریه

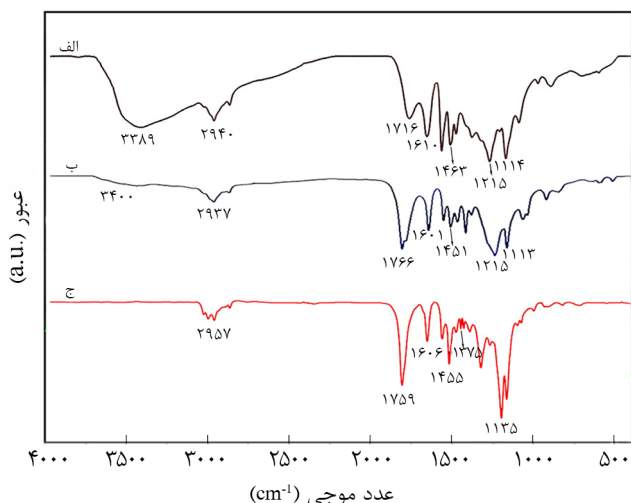
طیف FTIR نمونه لیگنین، لیگنین استیل‌دار شده و لیگنین آلفابرموایزوبوتیریل‌دار شده پس از آماده‌سازی قرص‌های KBr با غلظت وزنی ۱٪ تهیه شد. طیف FTIR نمونه‌ها در محدوده اعداد موجی 400 cm^{-1} تا 4000 cm^{-1} با قدرت تفکیک 1 cm^{-1} ثبت شد. برای حذف رطوبت، نمونه‌ها پیش از انجام آزمون به مدت ۲۴ h درون گرم‌خانه خلأ در دمای ۶۰°C خشک شدند.

طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته پروتون

لیگنین کرافت در حلال‌های آلی همچون CDCl_3 ، دی‌اکسان، اتانول، دی‌متیل سولفوکسید، استیک اسید، تتراهیدروفوران و پروپانول حل می‌شود. بنابراین، لیگنین برای طیف‌گیری NMR قابل آماده‌سازی در فاز مایع است. طیف $^1\text{H NMR}$ از نمونه‌های لیگنین (L)، لیگنین استیل‌دار شده (AcL) و لیگنین آلفابرموایزوبوتیریل‌دار شده، با استفاده از دستگاه NMR ثبت شد. طیف‌های حاصل از $^1\text{H NMR}$ در دمای ۲۵°C با تعداد ۳۲ روبش و زمان آسایش ۱۰ s ثبت شدند. طیف $^1\text{H NMR}$ نمونه لیگنین در حلال دی‌متیل سولفوکسید دوتریم‌دار (DMSO- d_6) و طیف $^1\text{H NMR}$ لیگنین استیل‌دار شده و لیگنین آلفابرموایزوبوتیریل‌دار شده (BiBL) در حلال کلروفرم دوتریم‌دار ثبت شد. به ازای ۱۹/۶ mg از لیگنین آلفابرموایزوبوتیریل‌دار شده، ۴/۸ mg دی‌متیل فرمامید به‌عنوان استاندارد داخلی در ۱ mL کلروفرم دوتریم‌دار حل شده و سپس طیف‌گیری انجام شد. ۲۰ mg لیگنین اصلاح‌نشده در ۱ mL از DMSO- d_6 و ۲۰ mg نمونه لیگنین استیل‌دار شده در ۱ mL کلروفرم دوتریم‌دار حل شدند و طیف‌های $^1\text{H NMR}$ آن‌ها ثبت شد.



طرح ۲- واکنش آلفابرموایزوبوتیریل‌دار کردن لیگنین با آلفابرموایزوبوتیریل‌برمید.



شکل ۱- طیف‌های FTIR نمونه‌های: (الف) لیگنین، (ب) لیگنین استیل‌دار شده و (ج) لیگنین آلفابروموایزوبوتیریل‌دار شده.

پیک‌های شاخص حلقه آروماتیکی لیگنین در اعداد موجی حدود 1460 و 1600 cm^{-1} است. همچنین، پیک‌های ظاهر شده در محدوده 3350 cm^{-1} تا 3450 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی گروه هیدروکسیل (OH) و پیک‌های ناحیه 2850 cm^{-1} تا 3000 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی کربن-هیدروژن (C-H) گروه‌های متیل و متیلن (به‌عنوان مثال گروه‌های متوکسیل) لیگنین است. پیک پهن در ناحیه 2500 cm^{-1} تا 3500 cm^{-1} مربوط به هیدروکسیل موجود در گروه کربوکسیلیک اسید است. نوار جذبی ظاهر شده در 1716 cm^{-1} مربوط به گروه کربونیل در گروه کربوکسیلیک لیگنین است. همچنین، ویژگی اصلی نمونه‌ها در هر سه طیف، پیک‌های شاخص حلقه آروماتیکی در اعداد موجی حدود 1460 cm^{-1} و 1600 cm^{-1} است.

تفاوت نمونه‌های لیگنین و لیگنین استیل‌دار شده و لیگنین آلفابروموایزوبوتیریل‌دار شده در ناحیه 1716 cm^{-1} تا 1770 cm^{-1} مربوط به گروه کربونیل (C=O) و ناحیه 1000 cm^{-1} تا 1200 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی C-O به‌وضوح مشخص است. همان‌طور که در طیف‌ها دیده می‌شود، انتگرال و موقعیت پیک گروه‌های کربونیل در طیف‌های لیگنین‌های عامل‌دار شده با لیگنین اولیه اصلاح‌نشده

حل شد. 1 g نمونه آلفابروموایزوبوتیریل‌دار شده در 50 mL مخلوط آب و پروپانول به نسبت حجمی 1 به 1 $(\text{cm}^3/\text{cm}^3)$ حل و به مدت 2 h با همزن مغناطیسی همزده شد. pH محلول با سدیم هیدروکسید غلیظ به 12 رسانده شد. سپس، محلول با همزن مغناطیسی به مدت 2 h همزده شده و مشابه با لیگنین اصلاح‌نشده، با محلول استاندارد هیدروکلریک اسید 0.2 مولار تیتراکون و pH و رسانایی محلول حین تیتراکون ثبت شد.

رنگ‌نگاری ژل تراوایی

توزیع وزن مولکولی (MWD) و وزن مولکولی متوسط عددی و وزنی (به ترتیب M_w و M_n) به کمک رنگ‌نگاری ژل تراوایی (GPC) با ستون‌هایی از پلی‌استیرین شبکه‌ای شده، اندازه‌گیری شد. به دلیل انحلال بهتر لیگنین استیل‌دار شده در تتراهیدروفوران و نزدیک شدن برهم‌کنش پلیمر در آزمون و حلال به برهم‌کنش پلی‌استیرین و حلال (تتراهیدروفوران در کار حاضر)، نمونه استیل‌دار شده به‌جای لیگنین به‌کار گرفته شد. لیگنین استیل‌دار شده در تتراهیدروفوران حل و به ستون تزریق شد. از تتراهیدروفوران به‌عنوان فاز متحرک با سرعت 1 mL/min استفاده شد. نمونه‌های پلی‌استیرین استاندارد با وزن‌های مولکولی متفاوت در محدوده وزن‌های مولکولی 580 ، 2930 ، 5920 ، 28500 g/mol و 59500 و توزیع وزن مولکولی باریک برای کالیبره کردن دستگاه استفاده شدند.

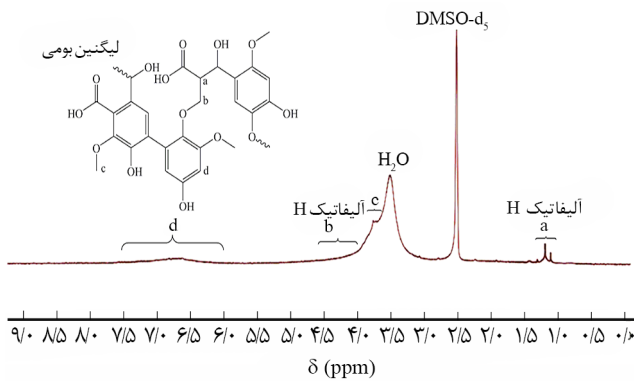
نتایج و بحث

طیف‌سنجی زیرقرمز تبدیل فوریه

طیف FTIR سه نمونه لیگنین، لیگنین استیل‌دار شده و لیگنین آلفابروموایزوبوتیریل‌دار شده در ناحیه عدد موجی 400 cm^{-1} تا 4000 cm^{-1} در شکل ۱ نشان داده شده است. برای سادگی گروه‌های کربوکسیل در ساختار نشان داده نشده است. جدول ۱ اعداد موجی اختصاص داده شده به هر یک از گروه‌های عاملی مهم را نشان می‌دهد.

جدول ۱- اعداد موجی اختصاص یافته به هر یک از گروه‌های عاملی نمونه‌های لیگنین، لیگنین استیل‌دار شده و لیگنین آلفابروموایزوبوتیریل‌دار شده.

نمونه	C-O (cm^{-1})	CH_3 (cm^{-1})	حلقه آروماتیک (cm^{-1})	C=O (cm^{-1})	OH (cm^{-1})
لیگنین	1215	-	1610 و 1463	1716	3389
لیگنین استیل‌دار (AcL)	1215	1375	1601 و 1451	1766	3400
لیگنین آلفابروموایزوبوتیریل‌دار (BiBL)	1135	1370 و 1380 (متیل دوقلو)	1606 و 1455	1759	-



شکل ۲- طیف $^1\text{H NMR}$ لیگنین ثبت شده در حلال DMSO-d_6 .

واکنش استیل‌دار کردن و آلفابرموایزوبوتیریل‌دار کردن لیگنین بهره جست. مطالعات $^1\text{H NMR}$ انجام شده روی لیگنین، لیگنین استیل‌دار شده و لیگنین آلفابرموایزوبوتیریل‌دار شده، پیک‌هایی با وضوح زیاد را نشان می‌دهد. بررسی لیگنین استیل‌دار شده با $^1\text{H NMR}$ به محاسبه همه گروه‌های هیدروکسیل لیگنین و نسبت گروه‌های هیدروکسیل آلیفاتیک به گروه‌های هیدروکسیل آروماتیک منجر می‌شود [۲۲، ۲۳]. همان‌طور که در طیف FTIR مشاهده شد، واکنش استری شدن لیگنین با استیل کلرید به‌طور کامل پیش نمی‌رود و مقدار کمی از گروه‌های هیدروکسیل واکنش نداده باقی می‌ماند. بنابراین مساحت پیک‌های مربوط به پروتون‌های گروه‌های استیل‌دار شده کمتر از مقدار واقعی آن‌ها می‌شود و در محاسبات خطا ایجاد می‌کند.

از طرف دیگر، استیک اسید به دلیل فراریت کم ناشی از دمای جوش زیاد حدود 118°C به‌سختی از لیگنین اصلاح‌شده جدا می‌شود. وجود احتمالی مقدار کمی استیک اسید در لیگنین استیل‌دار شده هنگام طیف‌گیری در ناحیه بین $1/5$ ppm تا $2/5$ ppm که به گروه‌های هیدروکسیل آلیفاتیک و آروماتیک لیگنین استیل‌دار شده مربوط است (شکل ۳ و جدول ۲) [۲۲]، موجب تداخل این پیک‌ها و خطا در انتگرال‌ها می‌شود. همچنین، به دلیل نبود مرز مشخص بین دو ناحیه گروه‌های هیدروکسیل آلیفاتیک و آروماتیک، محاسبه نسبت گروه‌های هیدروکسیل آلیفاتیک به آروماتیک با خطا مواجه می‌شود.

همان‌طور که از طیف FTIR در شکل ۱ مشخص است، از نبود پیک گروه هیدروکسیل در ناحیه 3350 تا 3450 cm^{-1} در لیگنین آلفابرموایزوبوتیریل‌برمیدار شده در مقایسه با لیگنین و لیگنین استیل‌دار شده با استیل کلرید، می‌توان به واکنش استری شدن کامل لیگنین با آلفابرموایزوبوتیریل‌دار در حلال تتراهیدروفوران و در مجاورت کاتالیزور بازی پیریدین پی برد. تحلیل طیف $^1\text{H NMR}$ لیگنین آلفابرموایزوبوتیریل‌دار شده که در شکل ۴ و جدول ۳ نشان داده شده است، به محاسبه کمی همه گروه‌های هیدروکسیل لیگنین و

متفاوت است. در نمونه لیگنین استیل‌دار شده (شکل ۱-ب) با توجه به ظهور پیک جدید گروه کربونیل در عدد موجی 1766 cm^{-1} در مقایسه با لیگنین، می‌توان به واکنش استری شدن لیگنین با استیل کلرید پی برد. اشکال عمده این روش به واکنش استری شدن لیگنین مربوط است که اغلب به‌طور ناقص انجام می‌شود و مقدار کمی از گروه‌های هیدروکسیل به صورت استیل‌دار نشده باقی می‌ماند [۲۱]. وجود پیک پهن گروه‌های هیدروکسیل واکنش نداده در شکل ۱-ب با انتگرال کم در ناحیه 3350 تا 3450 cm^{-1} شاهد این مدعا است. این رفتار هرچند در کارهای سایر پژوهشگران نیز مشاهده شده، اما نادیده گرفته شده است [۲۱]. بنابراین، محاسبات کمی گروه‌های هیدروکسیل لیگنین با اندکی خطا همراه خواهد بود. از این‌رو، در این مطالعه آلفابرموایزوبوتیریل‌دار کردن لیگنین برای اولین بار با هدف کمی‌سازی گروه‌های هیدروکسیل دنبال شد. در نمونه لیگنین آلفابرموایزوبوتیریل‌دار شده (شکل ۱-ج) با توجه به افزایش انتگرال پیک گروه کربونیل در ناحیه 1759 و 1766 cm^{-1} و نیز از بین رفتن کامل پیک گروه هیدروکسیل در ناحیه 3350 تا 3450 cm^{-1} در مقایسه با لیگنین، می‌توان به کامل بودن واکنش استری شدن لیگنین با آلفابرموایزوبوتیریل‌برمید پی برد.

وجود جفت پیک مربوط به گروه متیل (CH_3) در لیگنین آلفابرموایزوبوتیریل‌دار شده در عدد موجی 1375 cm^{-1} نسبت به دو نمونه پیشین می‌تواند شاهد دیگری بر اصلاح کامل لیگنین با آلفابرموایزوبوتیریل‌برمید باشد. بنابراین، می‌توان از نمونه لیگنین آلفابرموایزوبوتیریل‌دار شده برای محاسبات کمی تعیین گروه‌های هیدروکسیل آن استفاده کرد.

طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته پروتون

طیف $^1\text{H NMR}$ لیگنین در حلال DMSO-d_6 در شکل ۲ نشان داده شده است. پیک‌های ظاهر شده در ناحیه بین 1 ppm تا $1/7$ ppm و ناحیه بین $4/2$ ppm تا $4/7$ ppm که با نمادهای a و b نشان داده شده است، به هیدروژن‌های آلیفاتیک لیگنین مربوط است. ناحیه بین $3/2$ ppm تا 4 ppm که با نماد c و H_2O مشخص شده است، مربوط به گروه‌های متوکسیل لیگنین و نیز آب همراه DMSO-d_6 و ناحیه بین 6 ppm تا $7/9$ ppm که با نماد d مشخص شده است، مربوط به هیدروژن‌های حلقه آروماتیکی لیگنین است. جفت پیک ظاهر شده در ناحیه $2/5$ ppm و $3/3$ ppm به ترتیب مربوط به ناخالصی‌های حلال دوتریم‌دار DMSO-d_5 و آب موجود در آن است که با پیک مربوط به گروه متوکسیل لیگنین هم‌پوشانی کرده است. برای کمی کردن مقدار گروه‌های هیدروکسیل آروماتیک و آلیفاتیک لیگنین، می‌توان از

فرماید اضافه شده به محلول طیف‌گیری، مول گروه‌های هیدروکسیل به ازای یک گرم از لیگنین آلفابرموایزوبوتیریل دار شده (n'_{OH}/m_{BiBL}) از معادله (۱) محاسبه شد:

$$\frac{n'_{OH}}{m_{BiBL}} (\text{mol/g}) = \frac{I_{IH(BiB)}}{I_{IH(DMF)}} \frac{n_{DMF}}{m_{BiBL}} \quad (1)$$

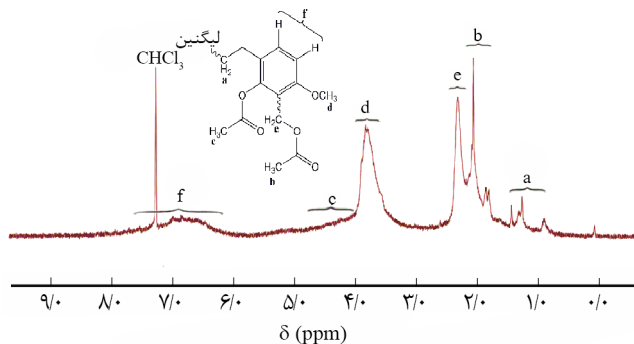
$$I_{IH(BiB)} = \frac{b}{6} \quad (2)$$

$$I_{IH(OCH_3)} = \frac{e}{3} \quad (3)$$

$$I_{IH(DMF)} = \frac{c+d+h}{7} \quad (4)$$

در معادلات بیان شده $I_{IH(BiB)}$ ، $I_{IH(OCH_3)}$ و $I_{IH(DMF)}$ به ترتیب انتگرال معادل ۱ پروتون از ۶ پروتون دو گروه متیل آلفابرموایزوبوتیریل، انتگرال معادل یک پروتون از گروه متوکسیل و انتگرال معادل یک پروتون از N,N -دی‌متیل فرماید هستند. همچنین n'_{OH} مول گروه‌های هیدروکسیل لیگنین آلفابرموایزوبوتیریل دار، n_{DMF} مول دی‌متیل فرماید اضافه شده به محلول به‌عنوان استاندارد داخلی، m_{BiBL} وزن لیگنین آلفابرموایزوبوتیریل دار شده در ثبت طیف شکل ۴ هستند. با استفاده از معادله (۱) و انتگرال پیک‌های مربوط (جدول ۲)، مول گروه‌های هیدروکسیل به ازای یک گرم از لیگنین آلفابرموایزوبوتیریل دار شده محاسبه شد (جدول ۳). برای به‌دست آوردن مقدار مول گروه‌های هیدروکسیل به ازای ۱ g از لیگنین، لازم است که وزن گروه‌های اضافه شده به لیگنین اولیه یعنی C_4H_6OBr در نظر گرفته شود (معادله ۵). در این صورت مول گروه‌های هیدروکسیل به ازای ۱ g از لیگنین اولیه محاسبه می‌شود (جدول ۳):

$$\frac{n_{OH}}{m_L} (\text{mol/g}) = \frac{n'_{OH}}{m_{BiBL} - (n'_{OH} \times (M_{BiB} - 1))} = \frac{1}{\frac{n'_{OH}}{m_{BiBL}} - (M_{BiB} - 1)} \quad (5)$$



شکل ۳- طیف 1H NMR لیگنین استیل‌دار ثبت شده در حلال کلروفرم دوتریم‌دار.

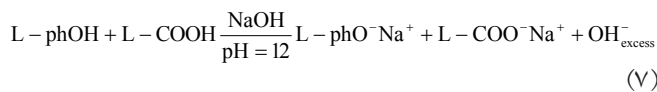
گروه‌های متوکسیل لیگنین منجر می‌شود. پیک‌های ظاهر شده در ناحیه بین ۱ ppm تا ۱/۵ ppm (a) مربوط به هیدروژن‌های آلیفاتیک و پیک ظاهر شده در ناحیه بین ۱/۶ ppm تا ۲/۴ ppm (b) مربوط به دو گروه متیل در عامل آلفابرموایزوبوتیرات است. دو پیک تک شاخه در جابه‌جایی شیمیایی ۲/۹ و ۳/۱ ppm (c و d) مربوط به ۶ هیدروژن در دو گروه متیل نامعادل و یک پیک تک‌شاخه در جابه‌جایی شیمیایی ۸/۱ ppm (h) مربوط به هیدروژن گروه آلدهیدی در N,N -دی‌متیل فرماید به‌عنوان استاندارد داخلی است. پیک ظاهر شده در ناحیه بین ۳/۴ ppm تا ۴/۲ ppm (e) مربوط به پروتون‌های گروه‌های متوکسیل، پیک‌های ظاهر شده در ناحیه بین ۴/۲ ppm تا ۵/۲ ppm (f) مربوط به هیدروژن‌های آلیفاتیک روی کربن متصل به اکسیژن و در نهایت پیک پهن ظاهر شده در ناحیه بین ۶/۱ ppm تا ۷/۹ ppm (g) مربوط به هیدروژن‌های حلقه آروماتیک در لیگنین آلفابرموایزوبوتیریل دار شده است. برای محاسبه کمی مقدار گروه‌های هیدروکسیل و متوکسیل لیگنین، انتگرال‌های زیر هر پیک به ازای یک پروتون به‌دست می‌آید (معادله‌های (۱) تا (۳)). مزیت و دلیل انتخاب پیک‌های ذکر شده، عدم هم‌پوشانی آن‌ها با سایر پیک‌هاست. با برقراری تناسب بین انتگرال‌ها و با در نظر گرفتن وزن لیگنین عامل‌دار شده و مول دی‌متیل

جدول ۲- محدوده جابه‌جایی شیمیایی و انتگرال زیر پیک‌های مختلف ظاهر شده در طیف 1H NMR لیگنین استیل‌دار شده (شکل ۳).

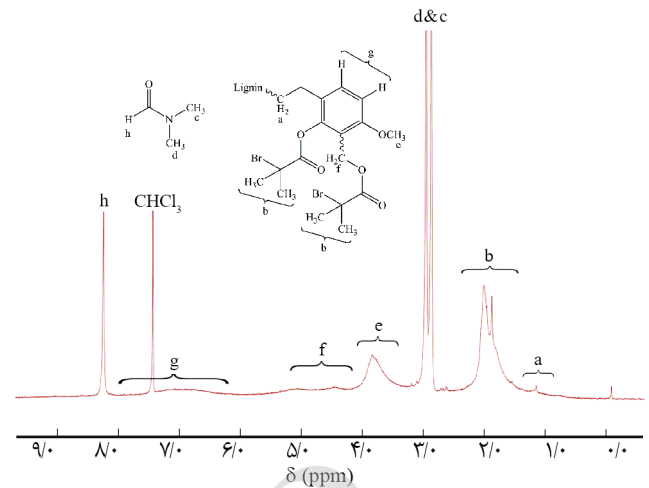
انتگرال پیک	گروه عاملی نسبت داده شده [۲۲]	محدوده δ (ppm)	نماد
۰/۳۴	پروتون‌های آلیفاتیک دور از عنصر الکترون‌خواه	۰/۹ - ۱/۵	a
۱	پروتون‌های متیل گروه استیل مربوط به گروه‌های هیدروکسیل استیل‌دار شده	۱/۵ - ۲	b
۰/۷۲	پروتون‌های متیل گروه استیل مربوط به گروه‌های هیدروکسیل آروماتیک استیل‌دار شده	۲/۲ - ۲/۶	c
۱/۴۱	پروتون‌های متیل گروه متوکسیل	۳/۴ - ۴/۲	d
۰/۲۴	پروتون‌های آلیفاتیک متصل به عنصر الکترون‌خواه	۴/۲ - ۵/۲	e
۰/۵۳	پروتون‌های آروماتیک	۶/۱ - ۷/۹	f

تیتراکون آبی اسید - باز

تیتراکون آبی با محلول استاندارد هیدروکلریک اسید به همراه pHسنجی یا رسانایی سنجی، روشی برای تعیین مقدار گروه‌های بازی موجود در محیط واکنش است. از آنجا که در لیگنین pK_a گروه‌های هیدروکسیل فنولی در حدود ۱۰/۵ و pK_a گروه‌های کربوکسیل نزدیک ۵ است [۲۳]، بنابراین، روش مزبور می‌تواند برای تعیین گروه‌های هیدروکسیل فنولی و کربوکسیل لیگنین به کار گرفته شود. مشکل اصلی در به‌کارگیری این روش، وجود ساختاری بسیار پیچیده به علت ناهمگنی گسترده و وزن‌های مولکولی متفاوت و ازدحام فضایی گروه‌های فنولی و کلافی بودن ساختار آن است. برای حل این مشکل، لیگنین به مدت ۲ h در آب مقطر قلیایی حل و سپس pH محیط به کمک محلول سدیم هیدروکسید غلیظ (NaOH) به حدود ۱۲ رسانده شد. برای اطمینان از تفکیک تمام گروه‌های هیدروکسیل فنولی و کربوکسیلیک اسید، محلول مدنظر به مدت ۲ h دیگر در همان pH همزده شد (معادله (۷)).



در این معادله، L-COOH و L-phOH به ترتیب نماد گروه‌های کربوکسیلیک اسید و هیدروکسیل فنولی لیگنین است. با قراردادن حسگرهای رسانایی سنج و pHسنج داخل محلول، تیتراکون با کلریدریک اسید با غلظت دقیق حدود ۰/۰۲ نرمال آغاز می‌شود. یون‌های هیدروکسیل (OH^-) اضافی، گونه‌های فنوکسی (L-phO^-) و کربوکسیلات (L-COO^-) موجود در محیط به ترتیب با افزودن تدریجی محلول استاندارد هیدروکلریک اسید (HCl) تیتراکون می‌شوند. با توجه به قابلیت‌های مختلف بازهای موجود در محلول برای واکنش



شکل ۴- طیف ^1H NMR لیگنین آلفابرموایزوبوتیریل دار شده به همراه مقدار مشخصی از استاندارد داخلی DMF در حلال کلروفرم دوتریم دار.

در معادله (۵)، M_{BiBL} وزن عامل آلفابرموایزوبوتیریل ($\text{C}_4\text{H}_6\text{OBr}$) اضافه شده به لیگنین اولیه و برابر $149/9 \text{ g/mol}$ است. عدد ۱ در $(M_{\text{BiBL}}-1)$ نشان‌دهنده پروتون حذف شده از OH لیگنین حین واکنش استری شدن است.

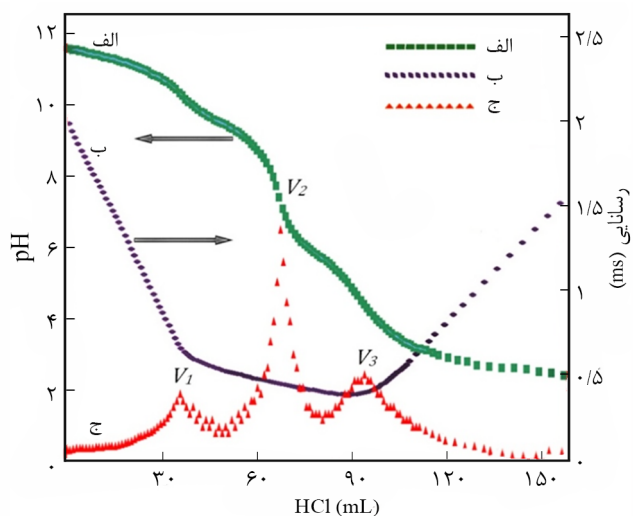
نسبت مولی گروه‌های هیدروکسیل به گروه متوکسیل را می‌توان به کمک معادله (۶) و با استفاده از انتگرال پیک‌های a و b در طیف ^1H NMR (شکل ۴ و جدول ۳) محاسبه کرد (جدول ۴).

$$\frac{n_{\text{OH}}}{n_{\text{OCH}_3}} (\text{mol/mol}) = \frac{I_{\text{H(BiB)}}}{I_{\text{H(OCH}_3)}} = \frac{a}{2b} \quad (6)$$

در معادله (۶)، n_{OCH_3} نشان‌دهنده مول گروه‌های متوکسیل لیگنین است.

جدول ۳- محدوده جابه‌جایی و انتگرال زیر پیک‌ها در طیف ^1H NMR لیگنین آلفابرموایزوبوتیریل دار شده (شکل ۴).

انتگرال پیک	گروه عاملی نسبت داده شده	محدوده δ (ppm)	نماد
۰/۵۵۰۲	پروتون‌های آلیفاتیک دور از عنصر الکترون‌خواه	۱-۱/۵	a
۵/۷۹۱۲	پروتون‌های دو گروه متیل مربوط به گروه‌های هیدروکسیل آلیفاتیک و آروماتیک آلفابرموایزوبوتیریل دار شده	۱/۵-۲/۵	b
۵/۹۱۲۱	پروتون‌های دو گروه متیل N,N-دی‌متیل فرمامید	۲/۸-۳/۱	d و c
۲/۹۸۳۲	پروتون‌های متیل گروه متوکسیل	۳/۴-۴/۲	e
۲/۱۴۰۱	پروتون‌های آلیفاتیک متصل به عنصر الکترون‌خواه	۵/۲-۴/۲	f
۱/۵۲۱۴	پروتون‌های آروماتیک	۷/۹- ۶	g
۱/۰۰۰۰	پروتون‌های آلدهیدی N,N-دی‌متیل فرمامید	۸/۱	h



شکل ۵- تغییرات: (الف) pH، (ب) رسانایی و (ج) مشتق تغییرات pH برحسب حجم تیتراکننده حاصل از تیتراکون محلول قلیایی آبی لیگنین با هیدروکلریک اسید ۰/۰۲ نرمال.

در نمودار رسانایی منجر می‌شود. زمانی که گروه‌های فنوکسی و کربوکسیلات به‌طور کامل خنثی شوند، شکست مجدد در نمودار رخ می‌دهد (شکل ۵-ب).

همان‌طور که انتظار می‌رفت، در نمودار تیتراکون مربوط به نمونه لیگنین آلفا برموایزوبوتیریل‌دار (شکل ۶-ب)، در pH حدود ۱۰/۵ هیچ پله‌ای مشاهده نمی‌شود و نمونه مدنظر در این قسمت به شکل اسید و باز معمولی تیترا می‌شود. این پدیده به دلیل از بین رفتن کامل گروه‌های هیدروکسیل فنولی اتفاق می‌افتد. پله اول نمودار تیتراکون مربوط به نقطه اکی‌والان خنثی شدن یون‌های هیدروکسیل اضافی موجود در محلول است. پس از خنثی شدن گروه‌های هیدروکسیل اضافی، گروه‌های کربوکسیلات در ادامه تیترا می‌شوند. بنابراین دو پله در نمودار تیتراکون مشاهده می‌شود که به ترتیب به تیترا شدن یون‌های هیدروکسیل (OH⁻) مازاد و گونه‌های کربوکسیلات (L-COO⁻) موجود در محیط قلیایی (pH=۱۲) با محلول استاندارد هیدروکلریک اسید (HCl) نسبت داده می‌شوند. مشاهده دو پله در نمودار تیتراکون نشان می‌دهد، گروه‌های هیدروکسیل فنولی به‌طور کامل با عامل برم‌دارکننده واکنش داده‌اند. برای تعیین دقیق نقاط اکی‌والان، نمودار مشتق تغییرات pH برحسب حجم هیدروکلریک اسید مصرفی رسم شده است (شکل ۶-ج). در نمودار رسانایی برحسب حجم هیدروکلریک اسید مصرفی، (شکل ۶-ب) به دلیل نبود گروه‌های فنوکسی برای واکنش با پروتون‌های کلریدریک اسید، رسانایی ابتدا با شیب تند و سپس با شیب کند کاهش می‌یابد که به ترتیب به تیترا شدن یون‌های OH⁻ اضافی و کربوکسیلیک نسبت داده می‌شود. به محض

جدول ۴- مقادیر مولی گروه‌های هیدروکسیل و متوکسیل به ازای ۱ g از لیگنین و لیگنین آلفا برموایزوبوتیریل‌دار شده محاسبه شده از طیف ¹H NMR (شکل ۴).

n'_{OH}/m_{BiBL} (mmol/g)	n_{OH}/m_L (mmol/g)	n_{OCH_3}/m_L (mmol/g)	n_{OH}/n_{OCH_3} (mmol/mmol)
۳/۲۸	۶/۴۴	۶/۶۴	۰/۹۷

با پروتون اسید، سه پله متفاوت در نمودارهای تیتراکون مشاهده می‌شود (شکل ۵). در نمودار تیتراکون نشان داده شده در شکل ۵، پله اول مربوط به نقطه اکی‌والان تیترا شدن یون‌های هیدروکسیل اضافی (معادله (۸))، پله دوم مربوط به نقطه اکی‌والان تیترا شدن گروه‌های فنوکسی (معادله (۹)) و پله سوم مربوط به نقطه اکی‌والان تیترا شدن گروه‌های کربوکسیلات است (معادله (۱۰)) [۲۳]:



شکل ۵-الف مربوط به تغییرات pH محلول حین خنثی شدن باز با اسید، ۵-ب مربوط به تغییرات رسانایی محلول و ۵-ج مربوط به مشتق نمودار تغییرات pH برحسب حجم تیتراکننده HCl حین تیتراکون است. مشتق نمودار تیتراکون برای تعیین دقیق نقاط اکی‌والان، رسم شد. برای حصول اطمینان از درستی نقاط اکی‌والان، در کنار pH سنج، رسانایی سنج نیز به کار گرفته شد. در مرحله اول، به دلیل واکنش خنثی شدن باز قوی با اسید قوی و کاهش غلظت یون‌های OH⁻ در محلول و جایگزینی آن با Cl⁻ مقدار رسانایی با شیب تند و نزولی کاهش می‌یابد. در ناحیه دوم که آنیون‌های فنوکسی و کربوکسیلات متصل به لیگنین به ترتیب با Cl⁻ جایگزین می‌شود، رسانایی با شیب ملایمی کم می‌شود. در مرحله بعد، پس از خنثی شدن کامل گروه‌های کربوکسیلات، به دلیل رسانایی پذیری زیاد یون‌های H⁺ و افزایش غلظت آن در محلول، مقدار رسانایی مجدداً افزایش می‌یابد. بنابراین، نمودار رسانایی برحسب میلی‌زیمنس (mS) به صورت تابعی از حجم هیدروکلریک اسید به دست می‌آید. در تیتراکون معمولی باز با اسید، کاهش شدید رسانایی برحسب حجم مصرفی تیتراکننده تا رسیدن به نقطه اکی‌والان مشاهده می‌شود. وجود گروه‌های هیدروکسیل فنولی و کربوکسیلیک اسید به شکست

جدول ۵- مول گروه‌های کربوکسیلیک اسید و هیدروکسیل آروماتیک و آلفاتیکی در لیگنین محاسبه شده با استفاده از نتایج تیتراکسید و طیف $^1\text{H NMR}$.

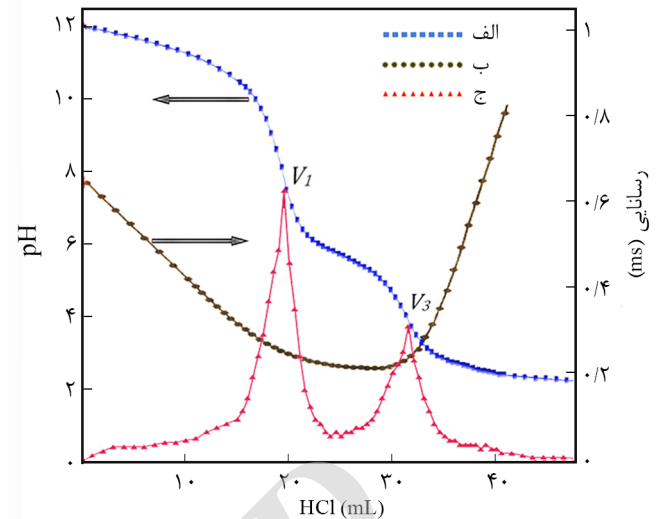
$n_{\text{OH}}(\text{Ar})/m_L$ (mmol/g)	$n_{\text{OH}}(\text{Al})/m_L$ (mmol/g)	n_{COOH}/m_L (mmol/mmol)	$n_{\text{OH}}(\text{Al})/n_{\text{OH}}(\text{Ar})$ (mmol/mmol)
۳/۱۳	۳/۳۱	۲/۸۴	۱/۰۵

به دلیل نبود پله دوم، V_2 در معادله (۱۱) برابر با V_1 در نظر گرفته شد ($V_1=V_2$). بدین ترتیب، در این نمونه، $n_{\text{OH}}(\text{Ar})$ برابر صفر به دست آمد.

تعیین ساختار واحد فنیل پروپان و وزن مولکولی لیگنین

تجزیه عنصری و طیف $^1\text{H NMR}$

در شیمی لیگنین، معمولاً ساختار لیگنین را به صورت واحدهای تکراری از فنیل پروپان در نظر می‌گیرند و به $n_{\text{OH}}(\text{Ar})$ عنوان فرمول ساختاری C_9 بیان می‌کنند که شش کربن آن در حلقه آروماتیک و سه کربن به شکل شاخه جانبی در پروپیل قرار دارند. تحلیل نتایج تجزیه عنصری، به تعیین فرمول ساختاری C_9 منجر شد. افزون بر ۹ اتم کربن ساختار فنیل پروپان، کربن گروه متوکسیل نیز در فرمول ساختاری C_9 نوشته می‌شود [۲۲]. در جدول ۶ نحوه محاسبه فرمول شیمیایی فنیل پروپان لیگنین بیان شده است. نتایج تجزیه عنصری لیگنین براساس درصد وزنی اتم‌ها به صورت S، N، H و C به ترتیب برابر ۳/۴، ۰/۰۱، ۵/۸۱ و ۶۲/۲ به دست آمد. به سبب مقدار ناچیز نیتروژن در محاسبات از آن صرف نظر شد. درصد اکسیژن نیز از کسر درصد وزنی اتم‌ها از صد، محاسبه شد که مقدار آن ۲۸/۵۸٪ به دست آمد. بنابراین، فرمول بسته ساختاری به صورت $C_{5.18}H_{5.81}O_{1.79}S_{0.1}$ به دست آمد. مقدار مول گروه‌های متوکسیل از انتگرال زیر پیک گروه متوکسیل طیف $^1\text{H NMR}$ لیگنین آلفابروموایزوبوتیریل‌دار شده با برقراری تناسب با داده‌های حاصل از تجزیه عنصری ($H_{5.81}$ برای کل پروتون‌ها در ساختار، جدول ۶) به دست آمد. با کم کردن مقدار اتم‌های کربن، هیدروژن و اکسیژن مربوط به واحد متوکسیل از عناصر فرمول ساختاری به دست آمده، فرمول بسته ساختار به صورت $C_{4.47}H_{3.59}S_{0.1}O_{1.08}(\text{OCH}_3)_{0.706}$ بین اتم‌ها ایجاد شد. همچنین، مقدار گروه‌های هیدروکسیل کلی از انتگرال‌های زیر پیک طیف $^1\text{H NMR}$ به ازای یک پروتون از گروه‌های آلفابروموایزوبوتیرات با برقراری تناسب بین داده‌های حاصل از تجزیه عنصری به دست می‌آید. مقدار هیدروژن‌های آلفاتیکی و آروماتیکی فرمول ساختاری فنیل پروپان لیگنین از طریق برقراری تناسب با مساحت‌های زیر پیک هر ناحیه با داده‌های حاصل از تجزیه عنصری به دست آمد. از این‌رو، فرمول ساختاری



شکل ۶- تغییرات: (الف) pH، (ب) رسانایی و (ج) مشتق تغییرات pH برحسب حجم تیتراکنده حاصل از تیتراکسید محلول قلیایی آبی لیگنین آلفابروموایزوبوتیریل برمید با هیدروکلریک اسید ۰/۰۲ نرمال.

خشی شدن آخرین گروه کربوکسیلات، نمودار رسانایی دچار شکست شده و رسانایی به‌طور ناگهانی افزایش می‌یابد.

با استفاده از معادله‌های (۱۱) و (۱۲)، به ترتیب مول گروه‌های هیدروکسیل فنولی و کربوکسیلیک اسید به ازای ۱ g از لیگنین محاسبه می‌شوند (جدول ۵). بنابراین با به‌کارگیری هم‌زمان نتایج حاصل از طیف $^1\text{H NMR}$ و تیتراکسید-باز لیگنین، مقدار مول گروه‌های هیدروکسیل آلفاتیکی به ازای ۱ g از لیگنین و نسبت مول گروه‌های هیدروکسیل آلفاتیکی به مول گروه‌های هیدروکسیل آروماتیک نیز محاسبه می‌شوند (جدول ۵):

$$\frac{n_{\text{OH}}(\text{Ar})}{m_L} (\text{mol/g}) = \frac{(V_2 - V_1)C_{\text{HCl}}}{m_L} \quad (11)$$

$$\frac{n_{\text{COOH}}}{m_L} (\text{mol/g}) = \frac{(V_3 - V_2)C_{\text{HCl}}}{m_L} \quad (12)$$

در معادله‌های (۱۱) و (۱۲) [۱۱، ۲۳]، $n_{\text{OH}}(\text{Ar})$ مقدار مول گروه‌های هیدروکسیل آروماتیک، n_{COOH} مقدار مول گروه‌های کربوکسیلیک اسید، V_1 حجم اسید مصرف شده برای تیتراکسید یون‌های هیدروکسیل (OH^-) اضافی، V_2 حجم مصرفی برای یون‌های هیدروکسیل (OH^-) مازاد و گونه‌های فنوکسی (Li-phO^-) و V_3 حجم اسید مصرفی برای تیتراکسید یون‌های هیدروکسیل (OH^-) مازاد، گونه‌های فنوکسی (Li-phO^-) و گروه‌های کربوکسیلات (L-COO^-) ، m_L وزن نمونه لیگنین تیترا شده و C_{HCl} نرمالیه محلول هیدروکلریک اسید استاندارد برابر ۰/۰۲ نرمال است. یادآور می‌شود، در نمونه لیگنین برم‌دار شده

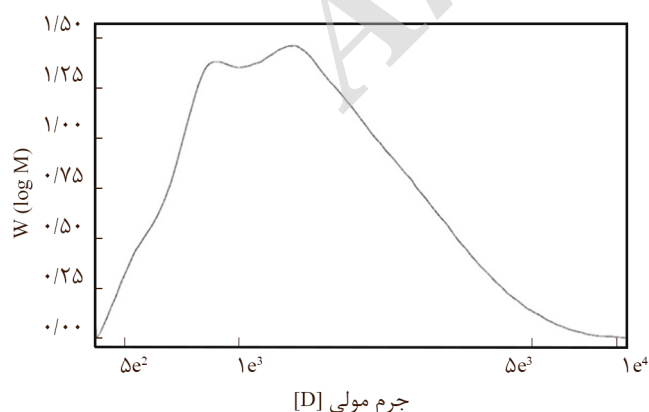
جدول ۶- محاسبه فرمول شیمیایی فنیل پروپان لیگنین با استفاده از نتایج طیف $^1\text{H NMR}$ لیگنین آلفابروموایزوبوتیریل دار شده و تجزیه عنصری لیگنین.

هیدروژن در		مساحت معادل در لیگنین اولیه	مساحت پیک (انتگرال) در لیگنین برم‌دار شده	گروه عاملی نسبت داده شده	محدوده δ (ppm)
C_9	$\text{C}_{5.18} \text{H}_{5.81} \text{O}_{1.79} \text{S}_{0.1}$				
۰/۷۸۹	۰/۳۹۲	۰/۵۵	۰/۵۵	پروتون‌های آلفاتیک دور از عنصر الکترون‌خواه	۱ - ۱/۵
۱/۳۸	۰/۶۸۸	۰/۹۶۵	۵/۷۹	پروتون‌های دو گروه متیل مربوط به گروه‌های هیدروکسیل آلفاتیک و آروماتیک آلفابروموایزوبوتیریل دار شده	۱/۵ - ۲/۵
۴/۲۶	۲/۱۲	۲/۹۸	۲/۹۸	پروتون‌های متیل گروه متوکسیل	۳/۴ - ۴/۲
۳/۰۶	۱/۵۲	۲/۱۴	۲/۱۴	پروتون‌های آلفاتیک متصل به عنصر الکترون‌خواه	۴/۲ - ۵/۲
۲/۱۹	۱/۰۹	۱/۵۲	۱/۵۲	پروتون‌های آروماتیک	۶ - ۷/۹
-	۵/۸۱	۸/۱۵	۱۲/۴۳	جمع	

توزیع وزن مولکولی لیگنین استیل‌دار شده $1/4$ به دست آمد (جدول ۷). برای به دست آوردن مقدار مول گروه‌های هیدروکسیل به ازای 1 g از لیگنین استیل‌دار شده، لازم است، وزن گروه‌های استیل (M_{AC}) اضافه شده به لیگنین اولیه یعنی $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}$ در نظر گرفته شود:

$$\frac{n_{OH}}{m_L} (\text{mol/g}) = \frac{1}{\frac{1}{n'_{OH}} - (M_{AC} - 1) \frac{1}{m_{AcL}}} \quad (13\text{-الف})$$

در معادله (۱۳-الف)، M_{AC} وزن مولکولی گروه‌های استیل اضافه شده و برابر 43 g/mol است. عدد ۱ در $(M_{AC} - 1)$ نشان‌دهنده پروتون حذف شده از OH لیگنین حین واکنش استری شدن است. m_{AcL} وزن لیگنین استیل‌دار و n'_{OH}/m_{AcL} مول گروه‌های هیدروکسیل به ازای



شکل ۷- نمودار توزیع وزن مولکولی لیگنین استیل‌دار شده به دست آمده از آزمون رنگ‌نگاری ژل تراوایی.

لیگنین به صورت $\text{C}_{4.47} \text{H}_{1.91} \text{H}^{\text{Ar}} \text{S}_{0.1} \text{O}_{0.4} (\text{OH})_{0.688} (\text{OCH}_3)_{0.706}$ نوشته می‌شود. عدد $1/91$ برای هیدروژن آلفاتیک از مجموع مساحت پیک‌های ظاهر شده در ناحیه $1/5 - 1$ ppm و $4/2 - 5/2$ ppm (شکل ۴) به دست آمد. بنابراین با تبدیل تعداد اتم‌های کربن فرمول ساختاری به عدد ۹، واحد فنیل پروپان لیگنین با فرمول ساختاری $\text{C}_9 \text{H}_{3.84} \text{H}^{\text{Ar}} \text{S}_{0.2} \text{O}_{0.8} (\text{OH})_{1.38} (\text{OCH}_3)_{1.42}$ به صورت حاصل شد. این فرمول بسته نشان می‌دهد، به ازای ۵ واحد فنیل پروپان، یک عاملیت گوگردی نیز در ساختار وجود دارد [۲۲].

رنگ‌نگاری ژل تراوایی

حجم هیدرودینامیک درشت‌مولکول لیگنین را می‌توان با استفاده از رنگ‌نگاری ژل تراوایی (GPC) تعیین کرد و سپس با استفاده از ستون کالیبره‌شده، وزن مولکولی متوسط عددی $(\bar{M})_n$ و وزن مولکولی متوسط وزنی $(\bar{M})_w$ را محاسبه کرد. در نتیجه، توزیع وزن مولکولی نیز محاسبه شدنی است. حین کار با دستگاه، جلوگیری از تجمع مولکول‌های لیگنین در حلال بسیار مهم است که به چالش جدی تبدیل شده است [۱۱]. به دلیل انحلال ضعیف لیگنین در حلال رایج GPC یعنی تتراهیدروفوران (THF)، نمونه استیل‌دار شده به کار گرفته شد. نتایج حاصل از رنگ‌نگاری ژل تراوایی نمونه لیگنین استیل‌دار شده به تعیین وزن مولکولی متوسط عددی $(\bar{M})_n$ و وزن مولکولی متوسط وزنی $(\bar{M})_w$ و توزیع وزن مولکولی لیگنین استیل‌دار منجر شد (شکل ۷). در شکل ۷ نمودار توزیع وزن مولکولی لیگنین استیل‌دار شده برحسب محور نرمال شده نشان داده شده است. وزن مولکولی متوسط عددی $(\bar{M})_n$ 1260 g/mol ، وزن مولکولی متوسط وزنی $(\bar{M})_w$ 1764 g/mol و

جدول ۷- وزن‌های مولکولی متوسط عددی و وزنی و توزیع وزن مولکولی لیگنین استیل‌دار شده به دست آمده از GPC و وزن مولکولی عددی لیگنین و مول گروه‌های هیدروکسیل به ازای ۱ mol زنجیر لیگنین.

لیگنین		لیگنین استیل‌دار شده		
n_{OH}/n_L (mol/mol) (معادله ۱۴)	M_n (g/mol) (معادله ۱۵)	PDI	M_w (g/mol)	M_n (g/mol)
۶/۳۹	۹۹۲	۱/۴	۱۷۶۴	۱۲۶۰

بنابراین، هر زنجیر لیگنین به‌طور متوسط یک عامل گوگردی دارد.

وزن لیگنین استیل‌دار شده است. با بازآرایی معادله (۱۳-الف)، معادله (۱۳-ب) به دست می‌آید. در این صورت، مول گروه‌های هیدروکسیل به ازای ۱ g از لیگنین استیل‌دار شده محاسبه می‌شود:

نتیجه‌گیری

شناسایی کمی گروه‌های عاملی لیگنین با استفاده از فنون مختلف از قبیل تیتراژ کردن pH سنجی و رسانایی سنجی، تجزیه عنصری، واکنش‌های استیل‌دار کردن و آلفابروموازیوبوتیریل‌دار کردن لیگنین و بررسی طیف‌های 1H NMR نمونه‌های عامل‌دار شده، انجام گرفت. به دلیل عدم پیشرفت کامل واکنش استیل‌دار کردن، واکنش آلفابروموازیوبوتیریل‌دار کردن لیگنین برای اولین بار به‌عنوان روش جایگزین به‌کار گرفته شد. تعیین گروه‌های کربوکسیل و هیدروکسیل فنولی لیگنین و آلفابروموازیوبوتیریل‌دار شده، به کمک تیتراژ انجام شد. بررسی لیگنین آلفابروموازیوبوتیریل‌دار شده با 1H NMR به محاسبه همه گروه‌های هیدروکسیل لیگنین و گروه‌های متوکسیل آن منجر شد. با تحلیل هم‌زمان نتایج حاصل از تجزیه عنصری و 1H NMR، فرمول ساختاری $C_9H_{3.84}^A H_{2.19}^R S_{0.2} O_{0.8} (OH)_{1.38} (OCH_3)_{1.42}$ به دست آمد. بنابراین، در هر زنجیر لیگنین به‌طور متوسط ۵ واحد فنیل پروپان و یک عامل گوگردی وجود دارد. با به‌کارگیری هم‌زمان داده‌های حاصل از طیف 1H NMR لیگنین آلفابروموازیوبوتیریل‌دار شده و GPC لیگنین استیل‌دار شده، مقدار مول گروه‌های هیدروکسیل به ازای یک زنجیر از لیگنین محاسبه شد. بنابراین روش‌های استفاده شده در این مطالعه، امکان شناسایی کمی تمام گروه‌های عاملی لیگنین و تعیین ساختار و وزن مولکولی آن را فراهم آورد.

$$\frac{n'_{OH}}{m_{AcL}} (\text{mol/g}) = \frac{\frac{n_{OH}}{m_L}}{1 + \frac{n_{OH}}{m_L} (M_{AC} - 1)} \quad (13\text{-b})$$

با داشتن n'_{OH}/m_{AcL} و به کمک معادله‌های (۱۴) و (۱۵) به ترتیب مول گروه‌های هیدروکسیل لیگنین به ازای ۱ mol زنجیر از آن و وزن مولکولی متوسط عددی لیگنین محاسبه شد:

$$\frac{n_{OH}}{n_L} (\text{mol/mol}) = \frac{n_{OH}}{m_L} \times M_{n,L} = \frac{n'_{OH}}{m_{AcL}} \times M_{n,AcL} \quad (14)$$

$$M_{n,L} = \frac{\frac{n'_{OH}}{m_{AcL}} \times M_{n,AcL}}{\frac{n_{OH}}{m_L}} \quad (15)$$

در معادله‌های (۱۴) و (۱۵)، $M_{n,AcL}$ وزن مولکولی لیگنین استیل‌دار شده، n_{OH}/n_L مول گروه‌های هیدروکسیل لیگنین به ازای ۱ mol زنجیر لیگنین و $M_{n,L}$ وزن مولکولی متوسط عددی لیگنین است. جدول ۷ وزن‌های مولکولی متوسط وزنی و عددی و توزیع وزن مولکولی لیگنین استیل‌دار شده، به همراه نتایج محاسبات برای وزن مولکولی عددی لیگنین و مول گروه‌های هیدروکسیل لیگنین به ازای ۱ mol زنجیر لیگنین را نشان می‌دهد. براساس \bar{M}_n به دست آمده برای لیگنین و فرمول ساختاری C_9 محاسبه شده در بخش پیشین، می‌توان نتیجه گرفت، هر زنجیر لیگنین به‌طور متوسط دارای ۵ واحد تکراری فنیل پروپان است.

مراجع

- Laurichesse S. and Avérous L., Chemical Modification of Lignins: Towards Biobased Polymers, *Prog. Polym. Sci.*, **39**, 1266-1290, 2014.
- Lora J. and Glasser W., Recent Industrial Applications of

- Lignin: A Sustainable Alternative to Non-renewable Materials, *J. Polym. Environ.*, **10**, 39-48, 2002.
3. Lu F. and Ralph J., *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels*, Amsterdam, Elsevier, Chapt. 6, 169-207, 2010.
 4. Neish A.C., *Monomeric Intermediates in the Biosynthesis of Lignin*, In: *Constitution and Biosynthesis of Lignin, Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics*. Freudenberg K. and Neish A.C. (Eds.) Berlin, Springer-Verlag, **2**, 1-43, 1968.
 5. Adler E., Lignin Chemistry-Past, Present and Future, *Wood Sci. Technol.*, **11**, 169-218, 1977.
 6. Sarkanen K. and Ludwig C., *Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions*, Wiley, New York, 1971
 7. Adler E. and Hernestam S., Estimation of Phenolic Hydroxyl Groups in Lignin, Periodate Oxidation of Guaiacol Compounds, *Anal. Chimica Acta*, **9**, 319-334, 1995.
 8. Lai Z., Determination of Phenolic Hydroxyl Groups., *Methods in Lignin Chemistry*, Lin S.Y. and Dence C.W (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, 423-434, 1992.
 9. Mansson P., Quantitative Determination of Phenolic and Total Hydroxyl Groups in Lignins, *Holzforschung*, 143-146, 1983.
 10. Chen C.L., Determination of Carbonyl Groups., *Methods in Lignin Chemistry*, Lin S.Y. and Dence C.W (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, 446-457, 1992.
 11. Gosselink R., Abächerli A., Semke H., Malherbe R., Käuper P., and Nadif A., Analytical Protocols for Characterisation of Sulphur-Free Lignin., *Crops Prod.*, **19**, 271-281, 2004.
 12. Evtuguin D., Domingues P., Amado F., Pascoal Neto C., and Correia A., Electrospray Ionization Mass Spectrometry as a Tool for Lignins Molecular Weight Determination and Structural Characterisation, *Holzforschung*, **53**, 525-528, 1999.
 13. Bayerbach R., Nguyen V., Schurr U., and Meier D., Characterisation of the Water Insoluble Fraction from Fast Pyrolysis Liquids (Pyrolytic Lignin) Part III. Molar Mass Characteristics by SEC, MALDI-TOF-MS, LDI-TOF-MS and Py-FIMS, *J. Anal. Appl. Pyrol.*, **77**, 95-101, 2006.
 14. Mirshokraie S.A., Abdulkhani A., and Karimi A., Chemical Structure Elucidation of Milled Wood Lignin and Cellulytic Lignin from Poplar, *Iran. J. Wood Paper Sci. Res. (Persian)*, **23**, 102-122, 2008.
 15. Mirshokraie S.A., Larie J., Mostaghni F., and Abdulkhani A., Analysis of Photodegraded Lignin and Lignin Model Compounds by ATR-FTIR Spectroscopy, *Iran. J. Wood Paper Sci. Res. (Persian)*, **29**, 343-353, 2014.
 16. Abdulkhani A., Mirshokraie S.A., Hamzeh Y., Hejazi S., and Nouri A., Elucidation of Chemical Structure of Wood Lignin by Dissolving in 1-Butyl-3-Methylimidazolium Chloride Ionic Liquid, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **24**, 279-289, 2011.
 17. Pourmahdi M., *Synthesis of Lignin/Acrylamide Graft Copolymer by Redox Radical Polymerization for Use in the Water-Based Drilling Fluid*, MSc Thesis, Tarbiat Modares University, 2015.
 18. Xue-qing Q. and Hao L., The Acetylation of Alkali Lignin and Its Use for Spherical Micelles Preparation, *J. Chem. Eng.*, **172**, 856-863, 2011.
 19. Kim Y., Youe W., Kim S., Lee O., and Lee. S, Preparation of a Thermoplastic Lignin-Based Biomaterial Through Atom Transfer Radical Polymerization, *J. Wood Chem. Technol.*, **35**, 251-259, 2015.
 20. Yong Q., Zhang Q., Qiu X., and Zhu S., CO₂-Responsive Diethylaminoethyl-Modified Lignin Nanoparticles and Their Application as Surfactants for CO₂/N₂-Switchable Pickering, *J. Green Chem.*, **16**, 4963-4968, 2014.
 21. Mansouri N. and Salvadó J., Analytical Methods for Determining Functional Groups in Various Technical Lignins, *Ind. Crops Prod.*, **26**, 116-124, 2007.
 22. Adilson R., Gonçalves U., and Maria L., Piassava Fibers (*Attalea funifera*): NMR Spectroscopy of Their Lignin, *J. Braz. Chem. Soc.*, **11**, 5, 491-494, 2000.
 23. Zhou M., Content Determination of Phenolic Hydroxyl and Carboxyl in Lignin by Aqueous Phase Potentiometric. *J. Ciesc.*, **63**, 258-265, 2012.