

CAMERA SEPARATORIA

Volume 9, Number 2 / December 2017, pp. 131-154

Paulina NOWAK, Rafał ŁUKAJTIS, Marian KAMIŃSKI*

Katedra Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, ul. Gabriela Narutowicza 11/12
80-233 Gdańsk

*Autor do korespondencji: markamin@pg.edu.pl

Zastosowanie wysokosprawnej kolumnowej chromatografii cieczowej w odwróconych układach faz (RP-HPLC) do rozdzielania i wstępnej identyfikacji składników hydrofilowych mieszanin po hydrolizie zasadowej biomasy ligno-celulozowej (BMLC)

Streszczenie: Wzrost konsumpcji paliw kopalnych, ich pozyskiwanie oraz eksploatacja niesie ze sobą wiele zagrożeń dla środowiska, dlatego alternatywnym źródłem energii stają się biopaliwa, w tym bio-wodór pozyskiwany w konwersji biomasy ligno-celulozowej, która poddawana jest obróbce wstępnej. Najczęściej wykorzystywaną metodą obróbki wstępnej jest hydroliza alkaliczna, podczas której powstają bardzo dużo produktów ubocznych, nieprzydatnych do wytwarzania paliw, szczególnie powstałych z hydrolizy ligniny. Najczęściej wykorzystywaną techniką identyfikacji i oznaczania składu hydrolizatów biomasy ligno-celulozowej jest chromatografia cieczowa realizowana w różnych układach faz oraz z wykorzystaniem elucji gradientowej. W przypadku badania hydrolizatów zawierających hydrofobowe składniki, najbardziej korzystne wydają się warunki odwróconych układów faz – RP-HPLC. W niniejszej pracy porównano dwie metodyki wysokosprawnej kolumnowej chromatografii cieczowej w odwróconych układach faz (RP-HPLC) do rozdzielania i wstępnej identyfikacji składników hydrofilowych mieszanin po hydrolizie zasadowej biomasy ligno-celulozowej, w celu optymalizacji procesu konwersji biomasy ligno-celulozowej (BMLC) do uzyskania najlepszej efektywności procesu hydrolizy. Wyniki tych badań powinny doprowadzić w przyszłości do procedur pozyskania ubocznych produktów, powstających podczas procesu hydrolizy BMLC, przydatnych użytkowo. Konieczne będą badania uzupełniające, wykonywane w warunkach dwu-wymiarowej elucyjnej gradientowej kolumnowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej, z uwzględnieniem spektrometrii Mas (MS), oprócz detektora spektrofotometrycznego z detektorem typu DAD (Diode Array) - 2D-Grad-HPLC-UV-VIS-DAD / MS.

Słowa kluczowe: Biomasa ligno-celulozowa – BMLC; Hydroliza zasadowa; Składniki hydrolizy ligniny; Rozdzielanie; Odwrócone układy faz - RP-HPLC; Elucja gradientowa; Detekcja UV-VIS-DAD; Identyfikacja na podstawie widm UV-VIS.

Application of high performance column liquid chromatography in reversed phase to separation and pre-identification ingredients of hydrophilic mixtures after alkaline hydrolysis of lignocellulosic biomass

Abstract: The increase in the consumption of fossil fuels, their acquisition and exploitation carries a lot of threats to the environment, therefore an alternative source of energy are biofuels, including biohydrogen obtained in the conversion of ligno-cellulosic biomass, which undergoes pre-treatment. The most frequently used method of pre-treatment is alkaline hydrolysis, during which a lot of by-products are generated, unsuitable for the production of fuels, especially those resulting from hydrolysis of lignin. The most commonly used technique for identifying and determining the composition of lignocellulose biomass hydrolysates is liquid chromatography carried out in various phase systems and using gradient elution. In the case of testing hydrolysates containing hydrophobic components, the conditions of reversed phase systems - RP-HPLC seem to be most favorable. This paper compares two methods of high performance reverse phase column chromatography (RP-HPLC) for the separation and initial identification of components of hydrophilic mixtures after basic hydrolysis of lignocellulose biomass, in order to optimize the process of converting lignocellulose biomass (BMLC) to the best the effectiveness of the hydrolysis process. The results of these tests should lead in the future to procedures for obtaining by-products of BMLC hydrolysis which are useful for use. Supplementary tests will be required, performed in two-dimensional, elution, gradient, columnar high performance liquid chromatography, including Mas (MS) spectrometry, in addition to a spectrophotometric detector with a DAD detector (Diode Array) - 2D-Grad-HPLC-UV-VIS-DAD / MS.

Key words RP-HPLC, Alkaline hydrolysis, lignocellulosic biomass, separation, identification, UV-VIS-DAD detection

1. Wstęp (Introduction)

Wzrost konsumpcji paliw kopalnych, ich pozyskiwanie oraz eksploatacja niesie ze sobą wiele zagrożeń dla środowiska. Innowacyjne technologie pozyskiwania energii z biomasy i odpadów rolno-spożywczych są perspektywiczną szansą dla zminimalizowania ilości odpadów biodegradowalnych, pozyskania odnawialnej i ekologicznej energii, a także, otrzymywania użytecznych organicznych związków chemicznych, szczególnie produktów hydrolizy ligniny. Wykorzystywanie biomasy jako surowca dla celów energetycznych, nie tylko ogranicza emisje wtórnych zanieczyszczeń, ale także stwarza możliwość spełnienia unijnych dyrektyw [1].

Zgodnie z definicją UNFCCC (*ang. United Nations Framework Convention on Climate Change*) przyjętą w 2005 roku, biomasa lignocelulozowa to biodegradowalny materiał pochodzenia roślinnego, zwierzęcego lub mikrobiologicznego, nie będącego kopalną [2]. Budowa chemiczna oraz wysoka wartość kaloryczna biomasy lignocelulozowej (BMLC), pozwala na wykorzystywanie szeregu różnych procesów, prowadzących do wytwarzania znacznych ilości energii w formie zarówno gazowej, stałej, jak i ciekłej. Pod względem wielkości i dostępności zasobów, biomasa uznawana jest za trzecie źródło energii na świecie [3-6].

Biomasa lignocelulozowa to materia organiczna składająca się z trzech biopolimerów, do których należy celuloza, hemiceluloza oraz lignina [7]. Zawarta w materiale lignina stabilizuje struktury lignocelulozowe utrudniając dotarcie enzymów celulozolitycznych do polisacharydów, przez co utrudnia bezpośrednie wykorzystanie biomasy do produkcji biopaliw. Dlatego też pojawia się potrzeba zastosowania obróbki wstępnej materiału. Jedyną z metod obróbki wstępnej biomasy może być de-lignifikacja, która rozrywa struktury ligniny, a w konsekwencji powoduje wzrost podatności surowca na hydrolizę enzymatyczną, lub kwaśną oraz fermentację. Najczęściej do wstępnej obróbki biomasy ligno-celulozowej stosuje się proces hydrolizy chemicznej. Produkty końcowe tego etapu, takie jak lotne kwasy tłuszczowe, sacharydy i niektóre inne związki węgla organicznego, w dalszych etapach konwersji są metabolizowane przez mikroorganizmy biorące udział w fermentacji metanowej, dzięki czemu zwiększają jej wydajność. Jednakże, w przypadku bakteryjnych metodyk otrzymywania bio-wodoru, wiele z tych organicznych związków chemicznych wykazuje działanie inhibicyjne. Wówczas powinny zostać usunięte przed procesem otrzymywania bio-wodoru w procesach ciemnej fermentacji bakteryjnej.

Delignifikacja metodami chemicznymi stwarza dodatkową „szansę” dla enzymów, stwarzając lepszy dostęp czynników hydrolitycznych do celulozy [8,9]. Podczas procesu hydrolizy chemicznej, szczególnie kwaśnej, do hydrolizatu uwalniane są znaczne ilości glukozy, z której zbudowana jest celuloza. Glukoza jest najbardziej pożądanym substratem dla dalszych etapów procesu, decydującym o charakterystyce produkowanego biopaliwa [10].

Obecnie biomasę wykorzystuje się jako surowiec do produkcji bio-metanu oraz bioetanolu w technologiach fermentacyjnych. Niestety, ze względu na swoją budowę, a w szczególności na zawartość ligniny, wymaga ona obróbki wstępnej. Struktury biomasy powinny być przetworzone na tyle, by wydajność procesów anaerobowych była jak najwyższa, przy jednoczesnym niskim koszcie procesowym [11]. Dobór optymalnych warunków prowadzenia procesu hydrolizy biomasy lignocelulozowej w celu maksymalizacji wydajności procesu otrzymywania cukrów i innych substancji jest aktualnie przedmiotem wielu badań [12-14]. Efektywne prowadzenie procesu wiąże się z potrzebą kontroli technicznej - monitorowania wsadu i przebiegu hydrolizy. W związku z tym, celowe jest opracowanie nowych metodyk, umożliwiających ustalenie z określoną czułością, precyzją i dokładnością jakościowego i ilościowego składu hydrolizatów. To powinno pozwolić na racjonalne sterowanie procesem.

Dotychczas opracowana analityka składu hydrolizatów odpadowej biomasy ligno-celulozowej pozwala na identyfikację i oznaczenie powstałych cukrów. Natomiast, należy zauważyć, że „matryca” hydrolizatu jest mieszaniną związków chemicznych bardziej złożoną i zależną od rodzaju hydrolizy i warunków prowadzenia procesu. W składzie hydrolizatów BMLC, zwłaszcza alkalicznych znajdują się nie tylko cukry i produkty ich ewentualnej konwersji, ale także różnego typu kwasy organiczne, związki fenolowe i polifenolowe, pochodne alkoholi, czy eterów oraz cykliczne aldehydy i ich pochodne.

Celem tej pracy, jako jednej z serii prac, jest opracowanie nowych optymalnych procedur technicznej analityki składu hydrolizatów otrzymanych z różnego rodzaju odpadowej biomasy ligno-celulozowej (BMLC), bez i z uwzględnieniem utleniania oraz wykorzystania „reagentów wspomagających”, takich, jak gliceryna, glikole, etanolo-aminy. W badaniach będzie stosowana wysokosprawna kolumnowa chromatografia cieczowa (HPLC).

Znaczące zróżnicowanie polarności oraz hydrofobowości, a także istotne zróżnicowanie lotności składników mieszanin powstałych w wyniku hydrolizy BMLC, szczególnie hydrolizy alkalicznej z rozkładu ligniny będącej bio-polimerem bardzo wielu różnych organicznych związków chemicznych, powoduje, że konieczne będzie stosowanie warunków elucji gradientowej, lub tzw. skokowej, tzn. programowanie składu eluentu w HPLC.

Badania przedmiotowej serii prac powinny też pomóc w opracowaniu nowych procedur grupowego rozdzielania składników hydrolizatów BMLC. Szczególnie ważne jest opanowanie możliwie prostych i mało

kosztownych procedur rozdzielania hydrolizatów na frakcje: związków nieorganicznych / cukrów / innych związków organicznych.

Natomiast, grupa „innych związków organicznych” powinna być dzielona na: kwasy alifatyczne / hydroksy-kwasy / aldehydy i ketony / alkohole / poli-fenole i kwasy aromatyczne / inne związki organiczne. Niniejsza praca dotyczy zbadania wpływu określonych warunków wykorzystania odwróconych układów faz do rozdzielania mieszanin wzorcowych złożonych z potencjalnych składników szczególnie alkalicznych hydrolizatów BMLC oraz rozdzielania mieszanin składników hydrolizatów BMLC, otrzymanych w różnych warunkach hydrolizy.

2. Przegląd literatury – metodyki rozdzielania i identyfikacji składników hydrolizatów (Literature review – methodologies of separation and identification components of hydrolysates)

Najczęściej wykorzystywaną techniką identyfikacji i oznaczania składu hydrolizatów biomasy ligno-celulozowej jest chromatografia. Wykorzystuje się zarówno cieczową, jak i gazową chromatografię. Ostatnia, może dotyczyć wyłącznie składników o określonej lotności. Chromatografię cieczową można wykorzystać do identyfikacji i oznaczenia zawartości zarówno nielotnych, jak i lotnych składników / grup składników hydrolizatów (a także płynów fermentacyjnych).

W tabeli 1 oraz 2 przedstawiono techniki chromatograficzne oraz warunki rozdzielania opisane w literaturze i wykorzystywane dotychczas w analizie składu hydrolizatów biomasy ligno-celulozowej.

Celem badań niniejszej pracy było porównanie dwóch nowych metodyk zastosowania wysokosprawnej kolumnowej elucyjnej chromatografii cieczowej w odwróconych układach faz (RP-HPLC) w warunkach elucji gradientowej do rozdzielania i wstępnej identyfikacji składników hydrofilowych mieszanin po hydrolizie zasadowej biomasy ligno-celulozowej oraz zbadanie możliwości zastosowania ich w analizie technicznej składu hydrolizatów.

Tabela 1. Techniki chromatografii cieczowej wykorzystywane w analizie składu hydrolizatów biomasy ligno-celulozowej

Tabela 1. Liquid chromatography techniques used in the analysis of composition of lignocellulosic biomass hydrolysates

Lp. No	Technika Technique	Detektor Detector	Oznaczane składniki Determined components	Lit. Lit.	
1.	Wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconych układach faz (RP-HPLC High performance liquid chromatography in reversed phase)	UV 280 nm	Pochodne ligniny	[15]	
2.		DAD (Diode Array Detector)	Związki fenolowe (wanilina, aldehyde syryngowy, kwas galusowy)	[16]	
3.			Inhibitory fermentacji (Hydroxymetylofurfural, furfural)		
4.			Inhibitory fermentacji (furfural)	[17]	
5.	Chromatografia jonowymienna (aniono wymienna) (IEC Ion Exchange Chromatography)	Detektor konduktometryczny i UV 204 nm	Kwasy karboksylowe	[18]	
6.		DAD (Diode Array Detector)	Kwasy organiczne	[16]	
7.	Chromatografia wykluczania jonowego (IExclC Ion Exclusion Chromatography)	RID (refractive index detector)	Cukry (glukoza, ksyloza)	[19]	
8.			Cukry i polisacharydy (glukoza, ksyloza, celuloza)	[20]	
9.			Cukry i inhibitory fermentacji (glukoza, ksyloza, arabinoza, mannoza, galaktoza, 5-hydroksymetylofurfural, kwas octowy)	[21]	
10.			Cukry i kwasy organiczne (ksyloza, glukoza, kwas octowy)	[17]	
11.			Cukry (glukoza, ksyloza i arabinoza)	[18]	
12.			DAD (Diode Array Detector)	Kwasy organiczne (kwas lewulinowy, kwas octowy)	[22]
13.			PAD (pulsed amperometric detection)	Cukry (glukoza, ksyloza, galaktoza, mannoza, ramanoza)	[23]
14.	MS/MS Tandemowy spektrometr mas	Cukry (glukoza, ksyloza, galaktoza, arabinoza, mannoza, ksylobioza, ryboza, celobioza, arabinoza, celotrioza, mannabioza, ksylotrioza, 3-galaktozo-	[24]		

			arabinoza) i kwasy organiczne (kwas glukonowy, galakturonowy, glukoronowy, laktobionowy)	
15.	Chromatografia wymiany ligandów (<i>LEC Ligand Exchange Chromatography</i>)	RID (refractive index detector)	Cukry	[25]
16.			Cukry	[26]
17.			Alkohole cukrowe	[27]
18.	Chromatografia oddziaływań hydrofilowych (<i>HILIC Hydrophilic interaction liquid chromatography</i>)	RID (refractive index detector)	Cukry	[28]
19.			Cukry (glukoza)	[16]
20.	Chromatografia wykluczania (GPC Gel permeation chromatography)	RID (refractive index detector)	Rozkład masy cząsteczkowej polisacharydów	[26]

Tabela 2. Techniki chromatografii gazowej wykorzystywane w analizie składu hydrolizatów biomasy lignocelulozowej

Table 2. Gas chromatography techniques used in the analysis of composition of lignocellulosic biomass hydrolysates.

Lp. No.	Technika Technique	Detektor Detector	Oznaczone składniki Determined components	Lit. Lit.
1.	Chromatografia gazowa (<i>GC Gas chromatography</i>)	Detektor płomieniowo-jonizacyjny (<i>FID Flame Ionization Detector</i>)	Kwasy tłuszczowe	[29]
2.			Związki lipofilowe (po ekstrakcji)	[15]
3.			Alkohole (etanol, butanol) i ketony (aceton)	[16]
4.		Spektrometr mas MS	Produkty degradacji ligniny	[26]
5.			Fenole, aldehydy fenolowe, kwasy fenolowe	[18]
6.			Fenole, aldehydy fenolowe, kwasy fenolowe, ketony fenolowe	[30]

3. Część eksperymentalna (*Experimental part*)

3.1. Materiały (*Materials*)

Składnikami rozdzielanej mieszaniny wzorców, rozpuszczonymi w eluencie początkowym (mieszanka woda, 1,5 ml ACCN, 1 ml HCOOH) były:

- 6,6 mg/ml 2,6-dimetoksyfenol 99%, Sigma-Aldrich, Indie
- 5,7 mg/ml Kwas 4-hydroksybenzoesowy 99%, Sigma-Aldrich, Chiny
- 6,1 mg/ml 2-metoksyfenol (gwajakol) Sigma-Aldrich, Chiny
- 7,1 mg/ml 2-fur-aldehyd (furfural) Sigma Aldrich, Chiny
- 6,1 mg/ml 1,2-dihydroksybenzen 99%, Sigma Aldrich
- 6,0 mg/ml 5-hydroksymetylo-2-furaldehyd Sigma Aldrich, Chiny
- 6,3 mg/ml kwas 4-hydroksy 3-metoksybenzoesowy (kwas wanilinowy) Sigma Aldrich, Chiny
- 6,3 mg/ml 4-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd (wanilina) 99%, Sigma Aldrich, Niemcy
- 6,2 mg/ml Kwas trans-felurowy (kwas €-3-(4-hydroksy-3-metoksyfenilo)-prop-2-enowy) 99%, Sigma Aldrich, Chiny
- 6,6 mg/ml Kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy 97%, Sigma Aldrich, Chiny
- 6,2 mg/ml kwas -4-OH-3,5-metoksybenzoesowy (kwas syryngowy) Sigma Aldrich, Chiny
- 6,2 mg/ml kwas 3,4-dihydroksycynamonowy (kwas kawowy) 98,0% Sigma-Aldrich, Chiny
- 20,3 mg/ml Glukoza 99,5, Sigma-Aldrich, USA
- 10,5 mg/ml Kwas metanowy (kwas mrówkowy) 80%, POCH, Polska
- 10,0 mg/ml Kwas etanowy (kwas octowy) 99,5-99,9%, POCH, Polska

Do procesu hydroliz zasadowych oraz neutralizacji powstałych hydrolizatów wykorzystano materiały przedstawione w tabeli 3.

Tabela 3. Materiały wykorzystane w procesie hydroliz zasadowych oraz neutralizacji powstałych hydrolizatów.

Table 3. *Materials used in the process of alkaline hydrolysis and neutralization of generated hydrolysates.*

Lp. No	Nazwa procesu <i>Process name</i>	Materiały <i>Materials</i>
1.	Hydroliza zasadowa	- 200 ml roztwór 5% NaOH - 200 ml roztwór 5% Na ₂ CO ₃ - 200 ml roztwór 5% Ca(OH) ₂ - 6 g biomasy lignocelulozowej – gałęzie wierzby energetycznej
2.	Proces zobojętniania	- 10% HCl - 3% HCl

W badaniach wykorzystano następujące materiały jako eluenty, lub ich składniki:

- Woda demineralizowana
- Acetonitryl (≥99,9% czystość dla cieczonej chromatografii, Merck, Niemcy)
- Kwas mrówkowy (80%, POCH, Polska)
- Metanol (Merck, Niemcy)

Badanymi próbkami hydrolizatów były:

- Hydrolizat zasadowy po 24 godz. z wykorzystaniem jako katalizatora roztworu 5% NaOH,
- Hydrolizat zasadowy po 24 godz. z wykorzystaniem jako katalizatora roztworu 5% Na₂CO₃,
- Hydrolizat zasadowy po 24 godz. z wykorzystaniem jako katalizatora roztworu 5% Ca(OH)₂.

3.2. Aparatura i wyposażenie (*Apparatus and equipment*)

W tabeli 4 przedstawiono wyposażenie i aparaturę wykorzystaną do przygotowania procesu hydrolizy, a także do przygotowaniu próbek hydrolizatów do badań.

Tabela 4. Aparatura oraz wyposażenie wykorzystane w procesie hydroliz oraz przygotowaniu próbek hydrolizatów do badań.

Table 4. *Apparatus and equipment used in hydrolysis process and preparation of samples of hydrolysates for testing.*

Lp. No	Nazwa procesu <i>Process name</i>	Aparatura oraz wyposażenie <i>Apparatus and equipment</i>
1.	Hydroliza	- trzy butelki szklane, ciśnieniowe o pojemności 250 ml z korkiem młyn ogrodowy (Meec Tools) - młynie ultra odśrodkowym ZM 200 (Retsch) - suszarka laboratoryjna - ekzykator (z substancją suszącą NaOH) - łaźnia wodna - waga analityczna
2.	Proces filtracji	- zestaw do filtracji (w tym kolba stożkowa o pojemności 1000 ml ze szlifem zewnętrznym, podstawa filtra z bocznym króćcem ssawnym (ze spiekami), lej filtracyjny szklany o pojemności 300mL i średnicy 47 mm, aluminiową klamra oraz filtry nylonowe o średnicy 47 mm, wielkości porów 47 μm) - pompka wodna z butlą Woulfe'a - metalowe szczypce - zlewka 50 ml - 3 szczelnie zamykane próbki szklane o pojemności 20 ml
3.	Proces zobojętniania	- mieszadło magnetyczne, - mieszadło magnetyczne - pHmetr z elektrodą szklaną - zlewka szklana (min. 50 ml) - statyw metalowy - 2 metalowe łapa laboratoryjne - biureta szklana 20 ml

Chromatograf cieczonej wykorzystany do rozdzielania i identyfikacji hydrolizatów składał się z interfejsu Merck, Hitachi D-7000, pompy Merck, Hitachi L-7100, termostatu Columven L-7350 Merck, Peltier Cooling Module for L-7350/7351, detektora refraktometrycznego RI Detector 2300 KNAUER oraz detektora UV-VIS / DAD Merck, Hitachi L-7450A LaChrom.

3.3. Metodyka (Methods)

Przygotowanie próbek (Preparation of samples)

W badaniach wykorzystano oprócz mieszaniny wybranych wzorców substancji powstających podczas hydrolizy zasadowej biomasy lignocelulozowej (tzn. wierzba energetyczna), próbki hydrolizatów. Proces hydrolizy wykonywany był z trzema różnymi katalizatorami, następnie próbki hydrolizatów zostały przefiltrowane i zobojętnione przed wykonaniem rozdzielania i wstępnej identyfikacji. Poniżej przedstawiano szczegółową procedurę przygotowania hydrolizatów.

Materiał biomasy lignocelulozowej (wierzba energetyczna) pocięto na zrębki o wymiarach 10 x 20 mm za pomocą młyna ogrodowego (Meece Tools). Następnie, tak przygotowany materiał, zmielono w młynie ultra odśrodkowym ZM 200 (Retsch). Materiały wstępnie rozdrobnione poddano zmieleniu z wykorzystaniem sita o średnicy otworów równych 4 mm, a następnie 0,75 mm i docelowo 0,25 mm. Odpowiednio rozdrobniony materiał suszono (przez minimum 4 godziny) w suszarce laboratoryjnej w temperaturze 105°C, do stałej masy. Wysuszony materiał umieszczono w eksykatorze z NaOH (jako substancją suszącą), do ostygnięcia. Po ostygnięciu odważono do trzech butelek ciśnieniowych po 2 g wierzby (s.m.) na 200 ml roztworu katalizatora (odpowiednio roztwory: pierwszy katalizator- 5% NaOH, drugi katalizator - 5% Na₂CO₃, trzeci katalizator - 5% Ca(OH)₂). Ustawiono temperaturę 90°C na wytrząsarce połączonej z łaźnią wodną. Przygotowano, w kolbach stożkowych o objętości 250 ml, 200 ml roztworu katalizatora, odpowiednio w trzech kolbach 5% NaOH, 5% Na₂CO₃, 5% Ca(OH)₂. Następnie do butelek z wcześniej przygotowanym wsadem dodano roztwór katalizatora i umieszczono butelki z wsadem w łaźni wodnej na 24 godz.

Po 24 godz. wyjęto z łaźni wodnej butelki z hydrolizatami i ostudzono do temperatury pokojowej. Następnie przefiltrowano za pomocą filtra nylonowego o średnicy porów 0,45 µm każdą próbkę hydrolizatu - oddzielnie do szklanych, szczelnie zamykanych fiolek.

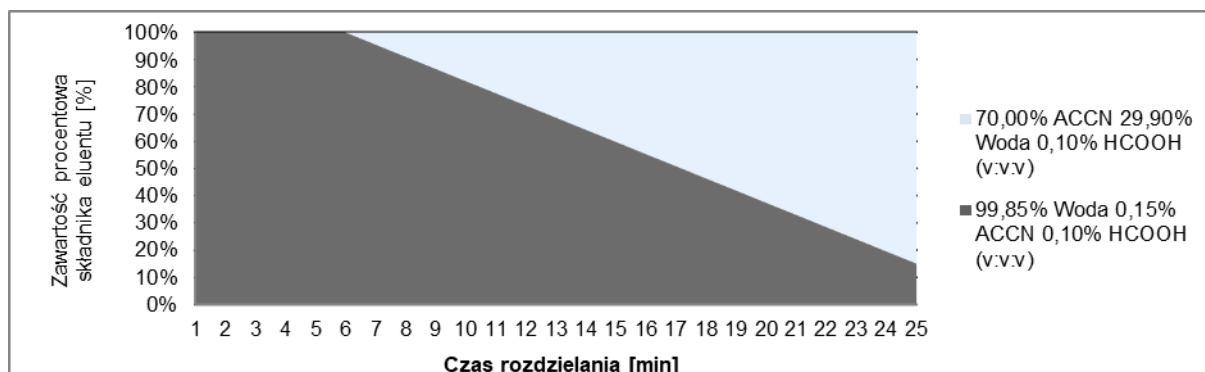
Następnie każdy hydrolizat zobojętniono do wartości pH mieszczącej się w zakresie pH równym 4-5. Hydrolizat z wykorzystaniem katalizatora 5% NaOH zobojętniono roztworem 10% HCl, natomiast dwa pozostałe hydrolizaty zobojętniono z wykorzystaniem roztworu 3% HCl. Fiolki zobojętnionych hydrolizatów oznaczono i przechowywano przez 2 tyg. w temperaturze poniżej 4°C, do czasu badań. Badano próbki w temp. pokojowej.

W badaniach zastosowano dwie metodyki rozdzielania i wstępnej identyfikacji mieszanin wzorcowych oraz próbek rzeczywistych hydrolizatów, po procesie hydrolizy zasadowej.

Wykorzystano dwie metodyki badań hydrolizatów:

Warunki metody A - Warunkami chromatograficznymi pierwszej metodyki były:

- przepływ: 1,2 ml/min,
- kolumna: Accocore aQ 150x4,6 mm 2,6 µm wypełnienie RP producent Thermo, elucja gradientowa, program: 0-6 min 100% - mieszanina: 99,85% Woda 0,15% ACCN 0,10% HCOOH (v/v), 6-25 min 0-85% - narost mieszaniny: 70,00% ACCN 29,90% Woda 0,10% HCOOH (v/v) (rys. 1)
- objętość dozowanej próbki: 50µl
- detekcja: RID, UV-VIS DAD

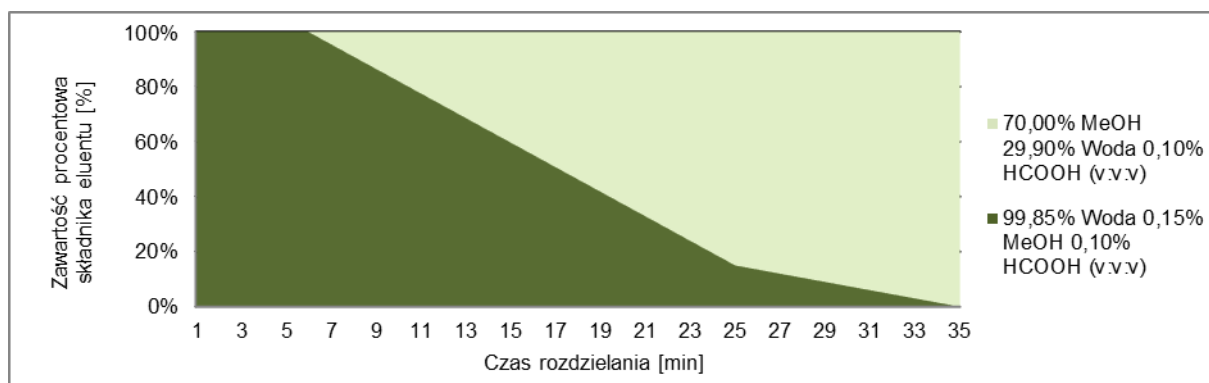


Rys. 1. Program elucji – dla metody A
Fig. 1. Elution program – for method A

Warunki metody B - Warunkami chromatograficznymi drugiej metodyki były:

- przepływ: 1,2 ml/min,
- kolumna: Accocore aQ 150x4,6 mm 2,6 µm wypełnienie RP producent Thermo,

- elucja gradientowa, program: 0-6 min 100% 0-6 min 100% - mieszanina: 99,85% Woda 0,15% MeOH 0,10% HCOOH (v:v), 6-25 min 0-85% - narost mieszaniny: 70,00% MeOH 29,90% Woda 0,10% HCOOH (v:v), 25-30 min 85-100% - narost mieszaniny: 70,00% MeOH 29,90% Woda 0,10% HCOOH (v:v) (rys. 2)
- objętość dozowanej próbki: 50µl
- detekcja: RID, UV-VIS DAD.



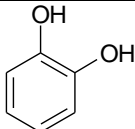
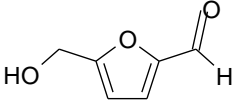
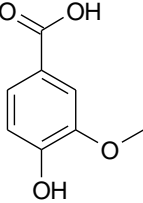
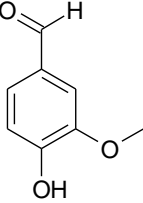
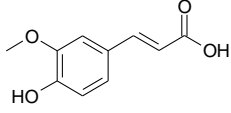
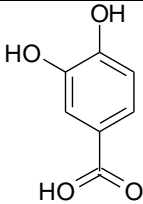
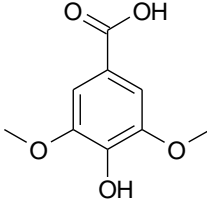
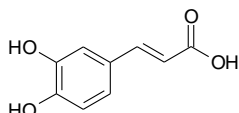
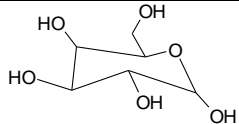
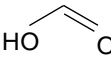

Rys. 2. Program elucji – dla metody B
Fig. 2. Elution program – for method B

4. Wyniki i dyskusja (Results and discussion)

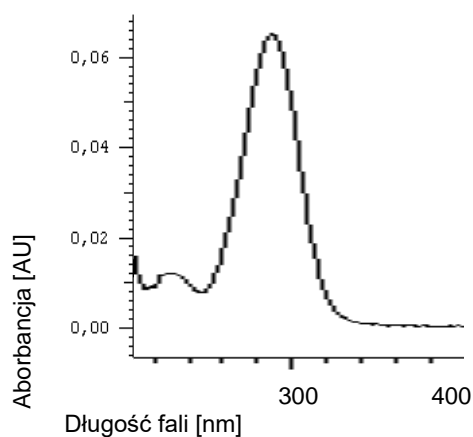
W tabeli nr 5 przedstawiono składniki mieszaniny wzorcowej wybrane w do niniejszych badań jako organiczne związki chemiczne reprezentujące najważniejsze składniki których należy spodziewać się w hydrolizatach BMLC, szczególnie w hydrolizatach alkalicznych. Stanowiły one skład tzw. mieszaniny wzorców. W tabeli 5 zamieszczono nazwy, struktury molekularne i wybrane właściwości fizykochemiczne tych związków chemicznych, szczególnie te, które mają znaczenie dla przewidywania optymalnych warunków rozdzielania technikami HPLC, a także C-GC.

Tabela 5. Zestawienie związków chemicznych – składników mieszaniny wzorcowej.
Table 5. List of chemical compounds – components of standards mixture.

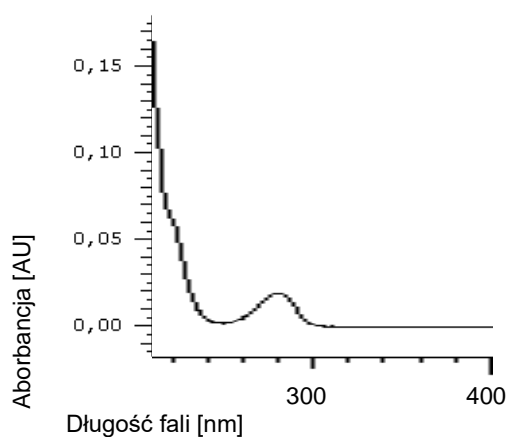
Lp. No.	Nazwa Name of chemical compound	Wzór sumaryczny Molecular formula	Wzór strukturalny Structural formula	pKa pKa	logP logP	Temp. Topnienia Melting point [°C]	Temp. Wrzenia Boiling point [°C]
1.	2,6-dimetoksyfenol 2,6-dimethoxyphenol	C ₈ H ₁₀ O ₃		10,59	2,4	43-45	203
2.	Kwas 4-hydroksybenzoesowy 4-Hydroxybenzoic acid	C ₇ H ₆ O ₃		4,54	1,58	214,5	336±25
3.	2-metoksyfenol (gwajakol) 2-methoxyphenol (Guaiacol)	C ₇ H ₈ O ₂		9,98	1,32	26-32	205
4.	2-fur-aldehyd (furfural) Fur-2-aldehyd (furfural)	C ₅ H ₄ O ₂		-	0,73	-33,6	163-169

5.	1,2-dihydroksybenzen <i>1,2-dihydroxybenzene</i>	C ₆ H ₆ O ₃		9,48	0,88	102	245
6.	5-hydroksymetylo-2-furaldehyd <i>5-hydroxymethyl-2-furaldehyd</i>	C ₆ H ₆ O ₃		12,82	0,45	27-34	292
7.	kwasy 4-hydroksy 3-metoksybenzoesowy (kwasy wanilinowy) <i>4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid (vanillic acid)</i>	C ₈ H ₈ O ₄		4,51	1,33	210-213	353,4± 27
8.	4-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd (wanilina) <i>4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (vanillin)</i>	C ₈ H ₈ O ₃		7,78	1,23	81	285
9.	Kwas trans-felurowy (kwasy-3-(4-hydroksy-3-metoksyfenilo)-prop-2-enowy) <i>Trans-feluric acid</i>	C ₁₀ H ₁₀ O ₄		4,5 8,7	1,64	172,9- 173,9	372,3± 27
10.	Kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy <i>3,4-dihydroxybenzoic acid</i>	C ₇ H ₆ O ₄		4,48	1,16	202-203 (rozkład)	410,7± 35
11.	kwasy -4-OH-3,5-metoksybenzoesowy (kwasy syryngowy) <i>4-OH-3,5-methoxybenzoic acid (syringic acid)</i>	C ₉ H ₁₀ O ₅		4,2 9,1	1,13	205-209	379±49
12.	kwasy 3,4-dihydroksycynamonowy (kwasy kawowy) <i>3,4-dihydroxycinnamic acid (coffee acid)</i>	C ₉ H ₈ O ₄		4,62	1,42	225 (rozkład)	416±35
13.	Glukoza <i>Glucose</i>	C ₆ H ₁₂ O ₆		12,12	-3,02	146-152	527±50
14.	Kwas metanowy (kwasy mrówkowy) <i>Methane acid (formic acid)</i>	CH ₂ O ₂		3,75	-0,54	7-8,6	100- 102
15.	Kwas etanowy (kwasy octowy) <i>Ethanic acid (acetic acid)</i>	C ₂ H ₄ O ₂		4,76	-0,17	17	117

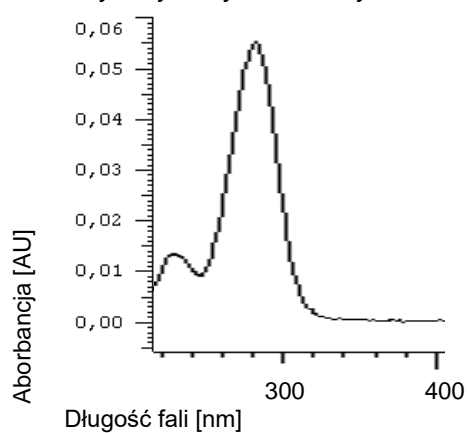
Na rysunkach 3-14 przedstawiono widma w zakresie UV-VIS związków chemicznych użytych w tych badaniach jako mieszanin wzorców.



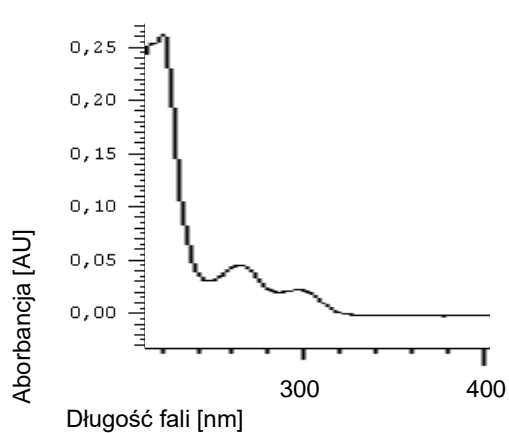
Rys. 3. Widmo UV-VIS
5-hydroksymetylo-2-furaldehyd
Fig. 3. UV-VIS spectrum
5-hydroxymethyl-2-furaldehyd



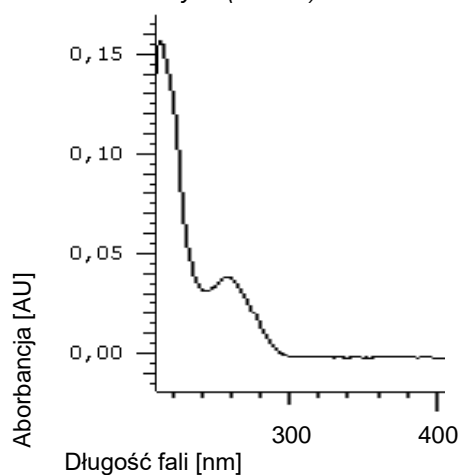
Rys. 4. Widmo UV-VIS 1,2-dihydroksybenzen
Fig. 4. UV-VIS spectrum
1,2-dihydroxybenzene



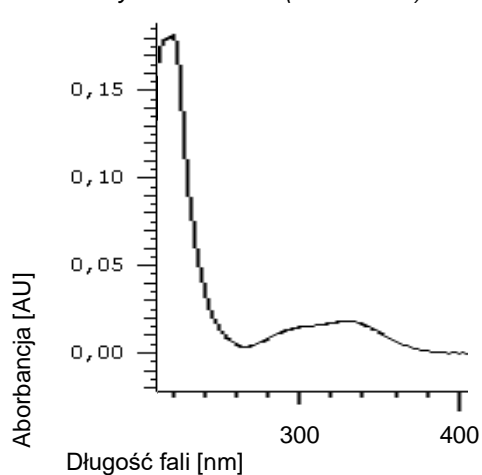
Rys. 5. Widmo UV-VIS
2-fur-aldehyd (furfural)
Fig. 5. UV-VIS spectrum
2-fur-aldehyde (furfural)



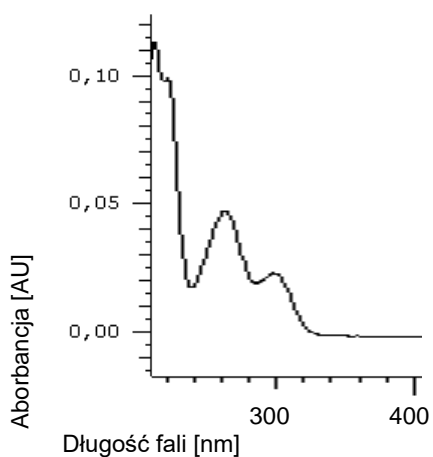
Rys. 6. Widmo UV-VIS kwas 4-hydroksy 3-
detoksybenzoesowy (kwas wanilinowy)
Fig. 6. UV-VIS spectrum 4-hydroxy-3-
deoxybenzoic acid (vanillic acid)



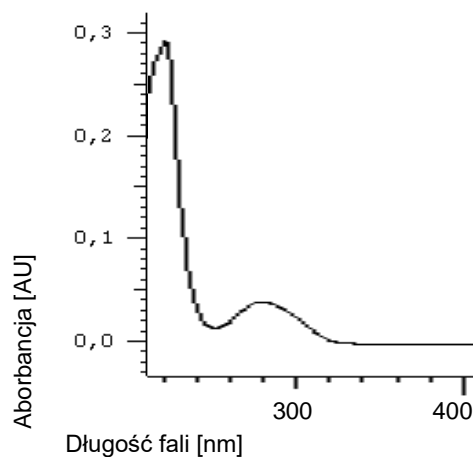
Rys. 7. Widmo UV-VIS
Kwas 4-hydroksybenzoesowy
Fig. 7. UV-VIS spectrum 4-Hydroxybenzoic
acid



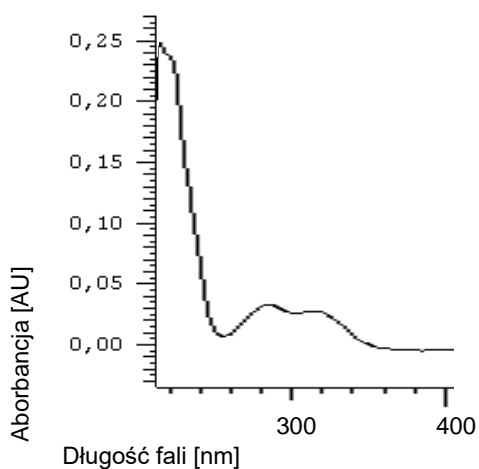
Rys. 8. Widmo UV-VIS Kwas 3,4-
dihydroksycynamonowy (kwas kawowy)
Fig. 8. UV-VIS spectrum 3,4-dihydroxycinnamic
acid (coffee acid)



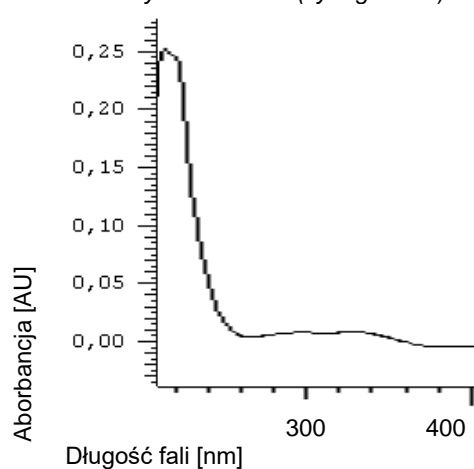
Rys. 9. Widmo UV-VIS
Kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy
Fig. 9. UV-VIS spectrum 3,4-dihydroxybenzoic acid



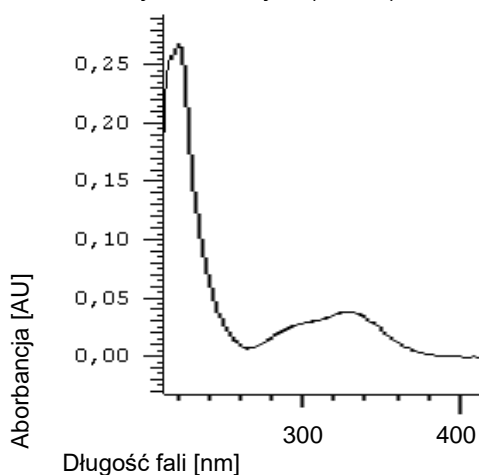
Rys. 10. Widmo UV-VIS Kwas 4-OH-3,5 metoksybenzoesowy (kwas syringowy)
Fig. 10. UV-VIS spectrum. 4-OH-3,5 methoxybenzoic acid (syringic acid)



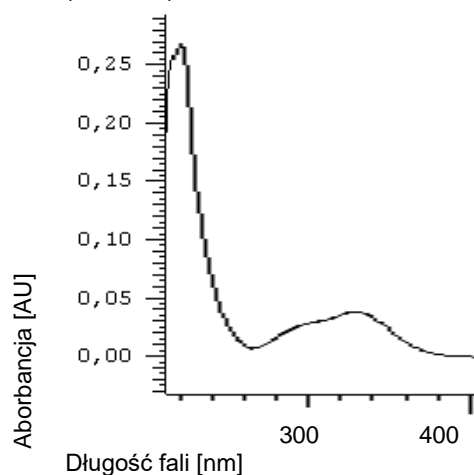
Rys. 11. Widmo UV-VIS 4-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd (wanilina)
Fig. 11. UV-VIS spectrum 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (vanillin)



Rys. 12. Widmo UV-VIS 2-metoksyfenol (gwajakol)
Fig. 12. UV-VIS spectrum 2-methoxyphenol (Guaiacol)



Rys. 13. Widmo UV-VIS
Kwas t-felurowy
Fig. 13. UV-VIS spectrum t-feluric acid



Rys. 14. Widmo UV-VIS
2,6-dimetoksyfenol
Fig. 14. UV-VIS spectrum 2,6-dimethoxyphenol

Dane w tabeli 3, w tym szczególnie, istnienie hydrofobowych elementów struktur molekularnych związków chemicznych reprezentujących składniki hydrolizatów otrzymanych w rezultacie hydrolizy alkalicznej, a także wyższe od zera wartości log P wielu związków chemicznych reprezentujących te hydrolizaty, wskazują, że rozdzielanie dużej części składników hydrolizatów BMLC, a także znacznej części aglikonów metabolitów roślinnych powinno być realizowane w warunkach chromatografii cieczowej w odwróconych układach faz, szczególnie z wykorzystaniem RP-HPLC lub RP-UPLC. Jednakże, znaczny zakres zmienności wartości Log P tej grupy związków chemicznych pokazuje także, że konieczna będzie elucja gradientowa, lub – w przypadku skali semi-preparatywnej, lub preparatywnej - elucja skokowa o rosnącej zawartości organicznego dodatku do eluentu. Przy czym, na początku programu elucji eluent powinien mieć stały skład oraz powinien zawierać bardzo niską, albo brak zawartości składnika organicznego. W ten sposób istnieje potencjalna możliwość rozdzielania grupowo składników hydrolizatów o zakresie logP od 0 do -1 oraz drugiej grupy o log P<-1.

Na podstawie danych w tabeli 3 widać też, że część składników mieszaniny wzorcowej charakteryzuje się właściwościami słabych kwasów organicznych, gdy pKa jest mniejsze od ok 6. To implikuje konieczność zakwaszenia eluentu do wartości pH niższej przynajmniej o 0.5 jednostki od najniższej wartości pKa rozdzielanych indywidualnie związków chemicznych, by zapewnić ich elucję w postaci niejonowej. Znaczenie wydaje się posiadać także rodzaj kwasu dodawanego do eluentu w celu zakwaszenia, a także wartość pH eluentu podczas rozdzielania w warunkach RP, tak, w warunkach RP-HPLC, jak i w warunkach RP-TLC. Określony poziom kwasowości eluentu podwyższa hydrofobowość składników rozdzielanej mieszaniny o charakterze słabych kwasów organicznych, poprzez cofanie dysocjacji elektrolitycznej. To zapewnia możliwość efektywnego wykorzystania hydrofobowych oddziaływań tych związków chemicznych z hydrofobową powierzchnią sorpcyjną.

Warto dodać, że w warunkach stosowania detektora typu UV-VIS DAD, widma w zakresie UV-VIS stanowią ważną podstawę dla identyfikacji wielu związków chemicznych. Wykorzystuje się je dodatkowo w tym celu oprócz dokonywania identyfikacji na podstawie parametrów retencji - czasu retencji (tr), czy współczynnika retencji (k).

W związku z powyższym, korzystne jest by kwas dodawany do eluentu nie absorbował, albo tylko w niewielkim stopniu absorbował światło UV w całym zakresie ultrafioletu, w tym, w zakresie niskich wartości długości fali (200 – 230 nm). Wówczas do identyfikacji można by wykorzystywać widma rozdzielanych składników mieszaniny zarejestrowane całym zakresie UV. Kwasy organiczne, takie jak, kwas trójfluoroctowy (TFA), mrówkowy, czy octowy, absorbują UV w zakresie do ok 230 nm. Mogą one i często w badaniach opisanych w literaturze, stanowić dodatek do eluentu w celu jego zakwaszenia. Jednakże wówczas nie jest możliwe wykorzystywanie do identyfikacji tych części widma UV identyfikowanych związków chemicznych, która zawiera się w zakresie poniżej 230 nm. Z tego punktu widzenia bardziej korzystne jest stosowanie dodatku kwasów nieorganicznych do eluentu, nie absorbujących UV powyżej 200 nm, takich, jak kwas siarkowy, fosforowy, czy solny. Należy, jednak mieć świadomość, że są to kwasy o niskiej lotności, a do tego powodujące korozję metalowych elementów, np. spektrometru mas.

Wyniki niniejsze badań mają na celu opracowanie optymalnych warunków rozdzielania, które mogłyby być wykorzystywane w sprzężeniu HPLC / UPLC – MS. Dlatego do zakwaszania eluentu zastosowano tu dość lotny i nie powodujący korozji, gdy znajduje się w fazie pary - kwas mrówkowy.

Na rysunkach 15-38 przedstawiono wyniki rozdzielania w postaci chromatogramów, otrzymanych dwiema metodami, dla tych samych próbek poddawanych rozdzielaniu,

Chromatogramy zamieszczone na rysunkach 15-18 oraz 23-30 wykonane są z wykorzystaniem **metody A** - układ: RP-HPLC, przepływ: 1,2 ml/min, kolumna: Accocore aQ 150x4,6 mm 2,6 µm, wypełnienie RP 18, producent Thermo, elucja gradientowa - program: 0-6 min 100% - mieszanina: 99,85% Woda 0,15% ACCN 0,10% HCOOH (v:v), 6-25 min 0-85% - narost mieszaniny: 70,00% ACCN 29,90% Woda 0,10% HCOOH (v:v).

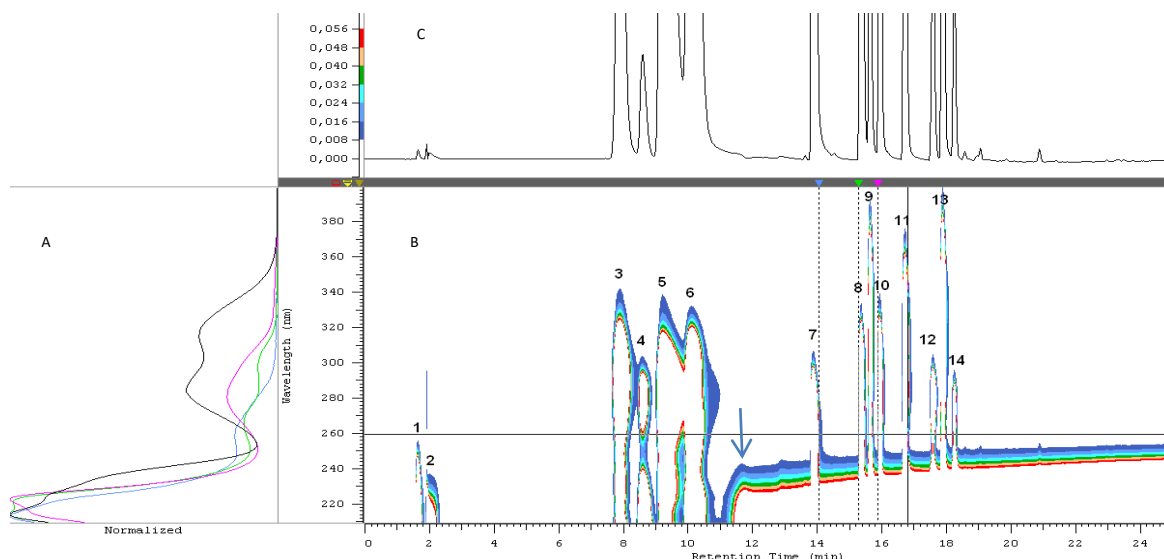
Natomiast, chromatogramy zamieszczone na rysunkach 19-22 oraz 31-36 wykonane są z wykorzystaniem **metody B** - układ: RP-HPLC, przepływ: 1,2 ml/min, kolumna: Accocore aQ 150x4,6 mm 2,6 µm wypełnienie RP18 producent Thermo, elucja gradientowa, program: 0-6 min 100% 0-6 min 100% - mieszanina: 99,85% Woda 0,15% MeOH 0,10% HCOOH (v:v), 6-25 min 0-85% - narost mieszaniny: 70,00% MeOH 29,90% Woda 0,10% HCOOH (v:v), 25-30 min 85-100% - narost mieszaniny: 70,00% MeOH 29,90% Woda 0,10% HCOOH (v:v).

Strzałka umieszczona na chromatogramach oznacza początek elucji gradientowej na wylocie z kolumny HPLC. Tzn., od tego momentu mają miejsce istotne zmiany składu eluentu na wylocie z kolumny HPLC. To powoduje, że Do tego zakresu elucji jest możliwe oraz jest efektywne wykorzystywanie różnicowego detektora refraktometrycznego (RID).

Tabela 6. Zestawienie podstawowych parametrów poszczególnych składników mieszaniny wzorców dla obu metodyk dla rozdzielania.

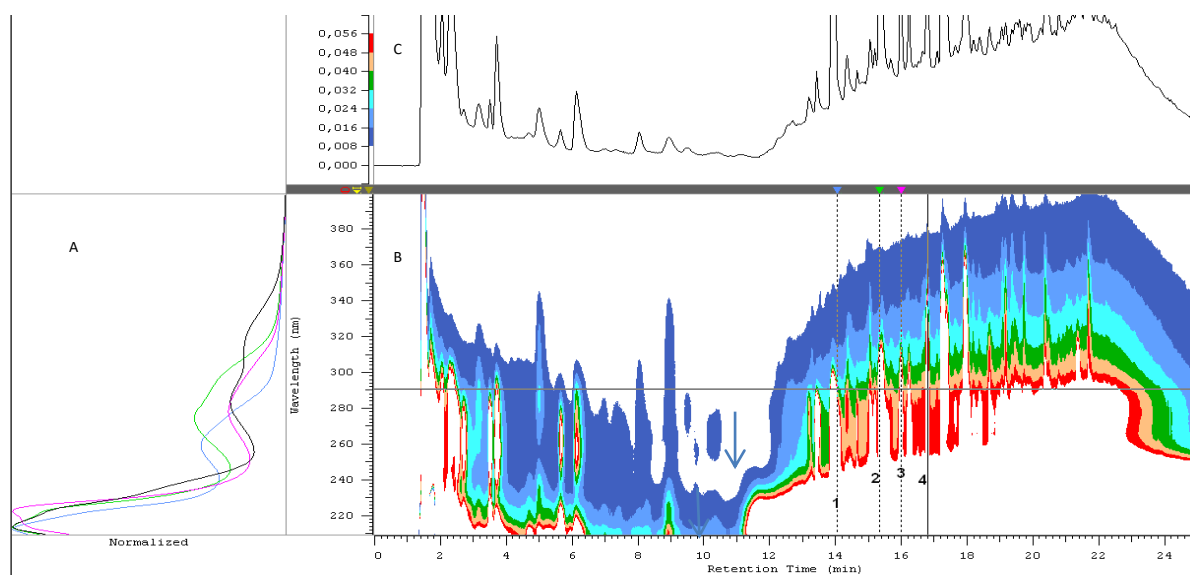
Table 6. List of basic parameters of individual components of a mixture of standards for both methodologies for the separation.

Lp. / No.	Nazwa substancji / Name of chemical compound	Metoda / Method					
		Metodyka A / Method A			Metodyka B / Method B		
Parametr: Parameter		t _r [min]	k [-]	α [-]	t _r [min]	k [-]	α [-]
Detekcja: RID / RID detection							
1.	Glukoza Glucose	1,58	-	-	1,71	-	-
2.	Kwas metanowy (kwas mrówkowy) Methane acid (formic acid)	1,77	0,12	-	1,90	0,11	-
3.	Kwas etanowy (kwas octowy) Ethanic acid (acetic acid)	2,12	0,34	2,84	2,29	0,34	3,05
Detekcja: 280 nm / detection of 280 nm							
4.	5-hydroksymetylo-2-furaldehyd 5-hydroxymethyl-2-furaldehyd	7,88	3,99	-	7,85	3,59	-
5.	1,2-dihydroksybenzen 1,2-dihydroxybenzene	8,59	4,44	1,11	8,33	3,87	1,08
6.	2-fur-aldehyd (furfural) 2-fur-aldehyde (furfural)	9,21	4,83	1,09	9,56	4,59	1,19
7.	kwas 4-hidroksy 3-dezoksybenzoesowy (kwas wanilinowy) 4-hydroxy-3-deoxybenzoic acid (vanillic acid)	15,35	8,72	1,80			
8.	Kwas 4-hidroksybenzoesowy 4-Hydroxybenzoic acid	13,87	7,78	0,89			
9.	kwas 3,4-dihydroksycynamonowy (kwas kawowy) 3,4-dihydroxycinnamic acid (coffee acid)	15,63	8,89	1,14	18,28	9,69	1,26
10.	Kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy 3,4-dihydroxybenzoic acid	10,09	5,39	0,61	18,93	10,07	1,04
11.	kwas 4-OH-3,5-metoksybenzoesowy (kwas syringowy) 4-OH-3,5-methoxybenzoic acid (syringic acid)	15,93	9,08	1,69	20,00	10,70	1,06
12.	4-hidroksy-3-metoksybenzaldehyd (wanilina) 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (vanillin)	16,71	9,58	1,05			
13.	2-metoksyfenol (gwajakol) 2-methoxyphenol (guaiacol)	17,57	10,12	1,06	20,64	11,07	1,03
14.	Kwas t-felurowy t-feluric acid	17,87	10,31	1,02	23,13	12,53	1,13
15.	2,6-dimetoksyfenol 2,6-dimethoxyphenol	18,24	10,54	1,02	22,59	12,21	0,97



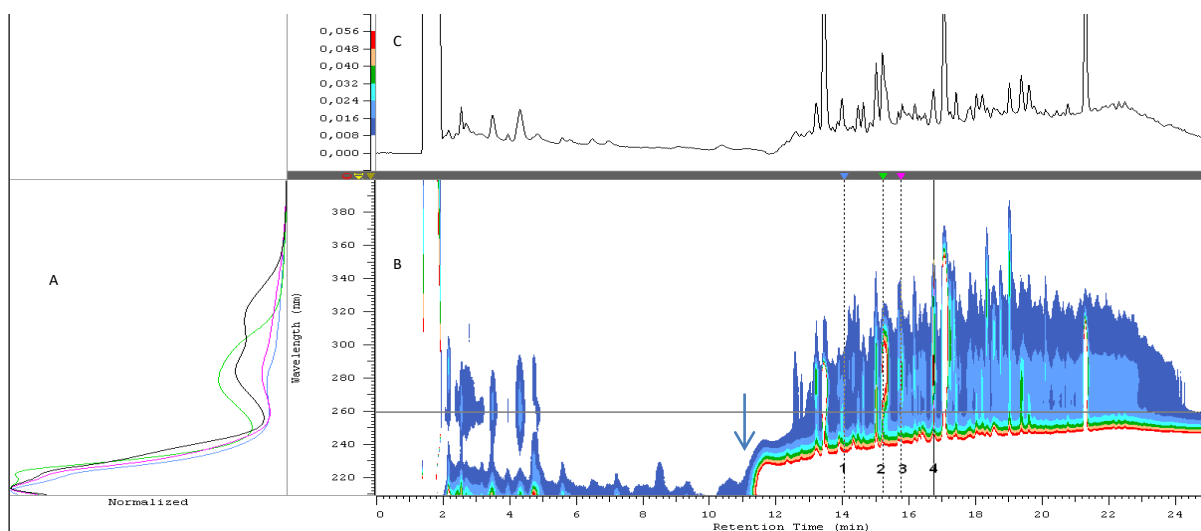
Rys. 15. Chromatogram rozdzielania **mieszanki wzorców** (tab. 5), warunki rozdzielania: metoda A, objętość dozowana: 50 μ l, **A** –widma wybranych składników, **B** – Chromatogram detektora UV-VIS DAD w odwzorowaniu poziomicowym, **C**-Chromatogram dla 260 nm, Piki: 1- kwas metanowy, 2- kwas etanowy, 3-5-hydroksymetylo-2-furaldehyd, 4-1,2-dihydroksybenzen, 5-furfural, 6-kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy, 7-kwas 4-hydroksybenzoesowy, 8-kwas 4-hydroksy 3-detoksybenzoesowy, 9-kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy, 10-kwas 4-OH-3,5-metoksybenzoesowy, 11-4-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd, 12-2-metoksyfenol, 13-kwas t-ferulowy, 14-2,6-dimetoksyfenol

Fig. 15. Chromatogram of separation of the **standards mixture** (Table 5), separation conditions: Method A, dosing volume: 50 μ l, A –spectrums of selected components, B - Chromatogram of UV-VIS DAD detector in the contour mapping, C-Chromatogram for 260 nm, Peaks: 2-formic acid, 3-ethanoic acid, 4-1,2-dihydroxybenzene, 5-furfural, 6-3,4-dihydroxybenzoic acid, 7-hydroxybenzoic acid, 8-4-hydroxy-3-deoxybenzoic acid, 9-acid 3.4-dihydroxybenzoic acid, 10-4-OH-3,5-methoxybenzoic acid, 11-4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde, 12-2-methoxyphenol, 13-t-ferulic acid, 14-2,6-dimethoxyphenol



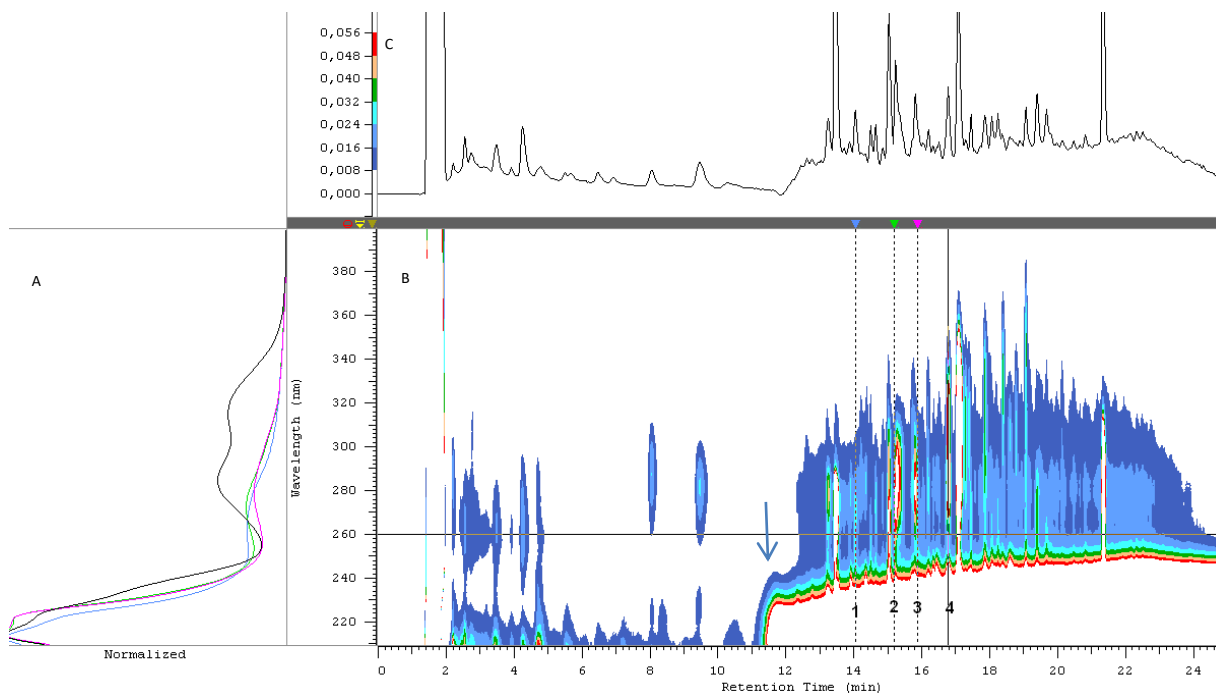
Rys. 16. Chromatogram rozdzielania hydrolyzatu wierzby energetycznej, warunki hydrolyzy: katalizator: 5% NaOH, temp. 90°C, czas: 24 h, warunki rozdzielania: metoda A, objętość dozowana: 50 μ l, **A** –widma wybranych składników, **B** – Chromatogram detektora UV-VIS DAD w odwzorowaniu poziomicowym, **C**-Chromatogram dla 260 nm, Piki: 1-kwas 4-hydroksybenzoesowy, 2-kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy, 3-kwas 4-OH-3,5-metoksybenzoesowy, 4-4-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd, reszta pików niezidentyfikowana

Fig. 16. Chromatogram of separation of energetic willow hydrolyzate, hydrolysis conditions: catalyst: 5% NaOH, temp. 90°C, time: 24 h, separation conditions: Method A, dosing volume: 50 μ l, A –spectrums of selected components, B - Chromatogram of UV-VIS DAD detector in the contour mapping, C-Chromatogram for 260 nm, Peaks: 1-4-hydroxybenzoic acid, 2-4-dihydroxybenzoic acid, 3-OH-3,5-methoxybenzoic acid, 4-4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde, the rest of peaks are unidentified



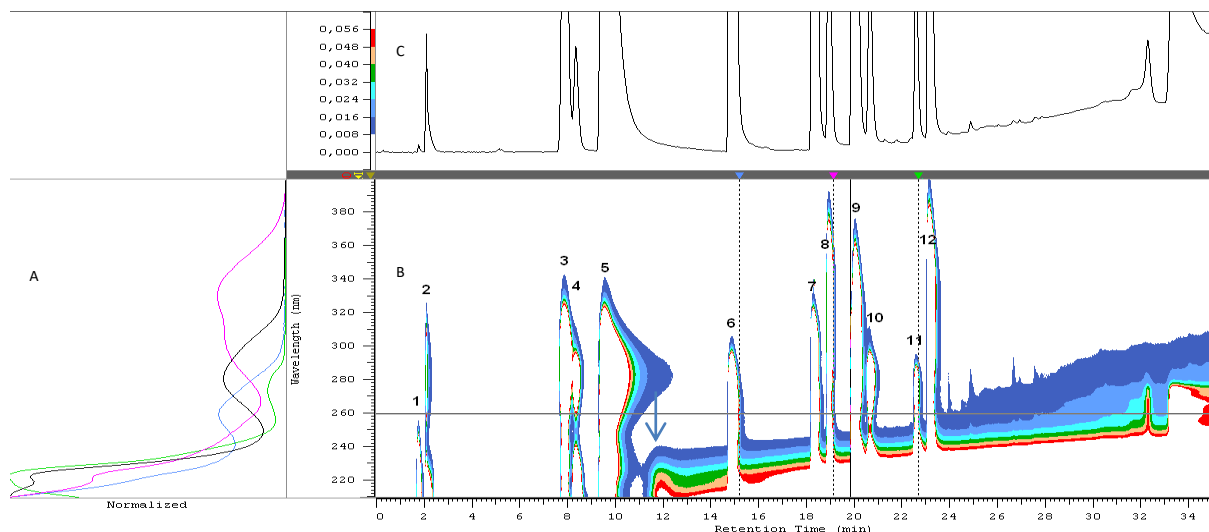
Rys. 17. Chromatogram rozdzielania hydrolyzatu wierzby energetycznej, warunki hydrolyzy: katalizator: **5% Ca(OH)₂**, temp. 90°C, czas: 24 h, warunki rozdzielania: metoda A, objętość dozowana: 50 µl, **A** –widma wybranych składników, **B** – Chromatogram detektora UV-VIS DAD w odwzorowaniu poziomicowym, **C**-Chromatogram dla 260 nm, Piki: **1**-kwas 4-hydroksybenzoesowy, **2**-kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy, **3**-kwas 4-OH-3,5-metoksybenzoesowy, **4**-4-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd, reszta pików niezidentyfikowana

Fig. 17. Chromatogram of separation of energetic willow hydrolyzate, hydrolysis conditions: catalyst: **5% Ca(OH)₂**, temp. 90°C, time: 24 h, separation conditions: Method A, dosing volume: 50 µl, **A** –spectrums of selected, Peaks: **1**-4-hydroxybenzoic acid, **2**-4-dihydroxybenzoic acid, **3**-OH-3,5-methoxybenzoic acid, **4**-4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde, the rest of peaks are unidentified



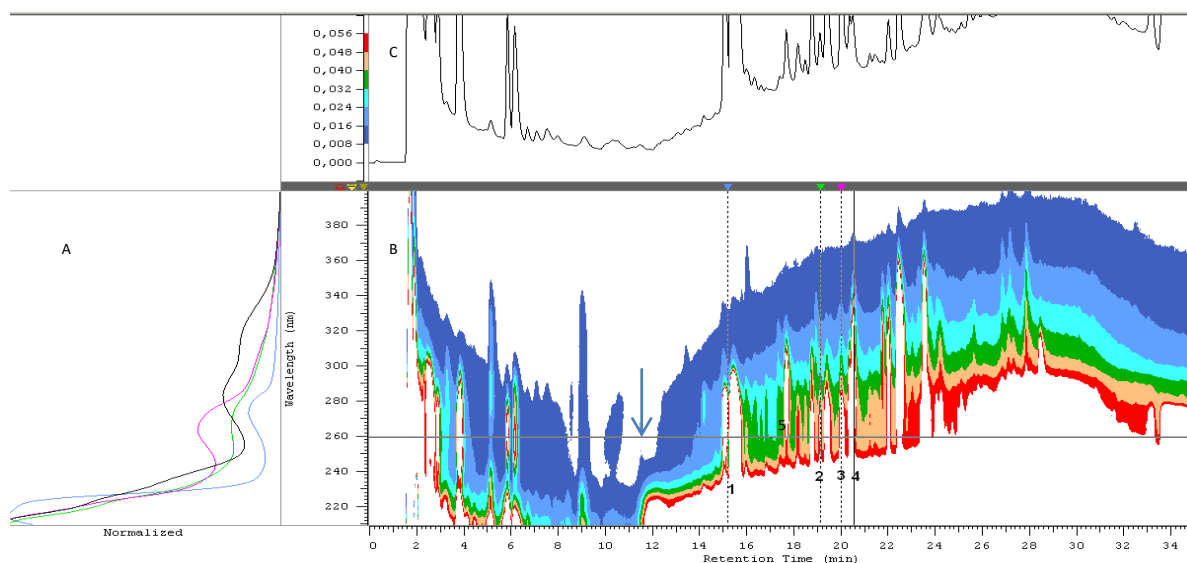
Rys. 18. Chromatogram rozdzielania hydrolyzatu wierzby energetycznej, warunki hydrolyzy: katalizator: **5% Na₂CO₃**, temp. 90°C, czas: 24 h, warunki rozdzielania: metoda A, objętość dozowana: 50 µl, **A** –widma wybranych składników, **B** – Chromatogram detektora UV-VIS DAD w odwzorowaniu poziomicowym, **C**-Chromatogram dla 260 nm, Piki: **1**-kwas 4-hydroksybenzoesowy, **2**-kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy, **3**-kwas 4-OH-3,5-metoksybenzoesowy, **4**-4-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd, reszta pików niezidentyfikowana

Fig. 18. Chromatogram of separation of energetic willow hydrolyzate, hydrolysis conditions: catalyst: **5% Na₂CO₃**, temp. 90°C, time: 24 h, separation conditions: Method A, dosing volume: 50 µl, **A** –spectrums of selected, Peaks: **1**-4-hydroxybenzoic acid, **2**-4-dihydroxybenzoic acid, **3**-OH-3,5-methoxybenzoic acid, **4**-4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde, the rest of peaks are unidentified.



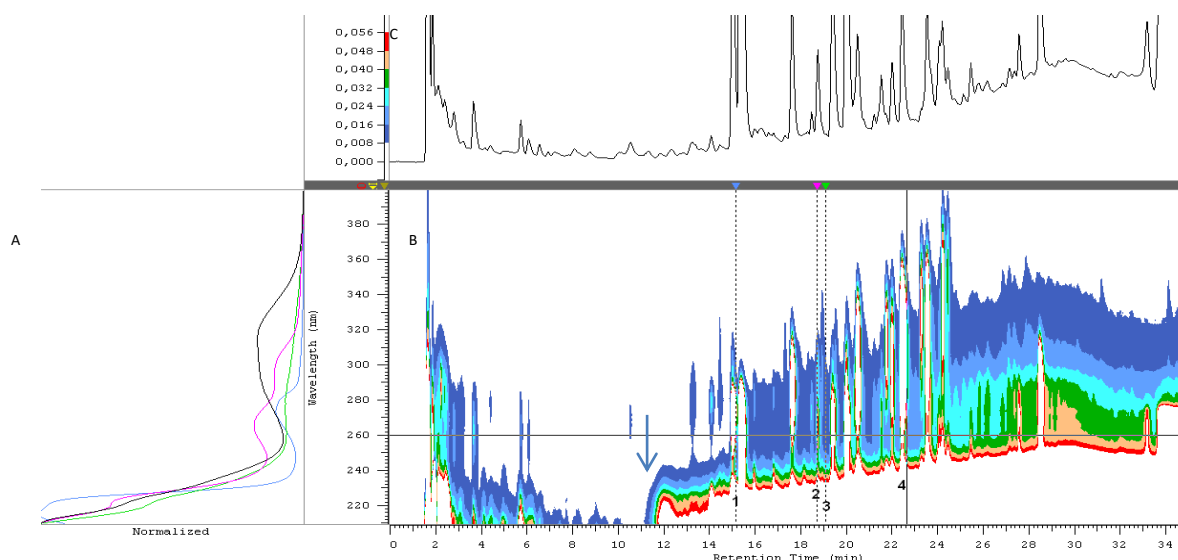
Rys. 19. Chromatogram rozdzielania **mieszanki wzorców** (tab. 5), warunki rozdzielania: metoda B, objętość dozowana: 50 μ l, **A** –widma wybranych składników, **B** – Chromatogram detektora UV-VIS DAD w odwzorowaniu poziomicowym, **C**-Chromatogram dla 260 nm, Piki: 1- kwas metanowy, 2- kwas etanowy, 3-5-hydroksymetylo-2-furaldehyd, 4-1,2-dihydroksybenzen, 5- furfural i kwas 4-hydroksy 3-detoksybenzoesowy, 6- kwas 4-hydroksybenzoesowy, 7- kwas 3,4-dihydroksycynamonowy, 8- kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy, 9- kwas 4-OH-3,5-metoksybenzoesowy i 4-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd, 10-2-metoksyfenol, 11- kwas t-ferulowy, 12-2,6-dimetoksyfenol

Fig. 19. Chromatogram of separation of the **standards mixture** (Table 5), separation conditions: Method B, dosing volume: 50 μ l, **A** –spectrums of selected components, **B** - Chromatogram of UV-VIS DAD detector in the contour mapping, **C**-Chromatogram for 260 nm, Peaks: 1-methane, 2- ethane acid, 3-5 hydroksymetylo-2-furaldehyd, 4-1,2-dihydroxybenzene, 5- furfural and 3-hydroxy 3-detoxo benzoic acid, 6- 4-hydroxybenzoic acid, 7- 3,4-dihydroxycinnamic acid, 8- 3,4-dihydroxybenzoic acid, 9- 4-OH-3,5-methoxybenzoic acid and 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde, 10-2-methoxyphenol, 11- t-ferulic acid, 12-2,6-dimethoxyphenol



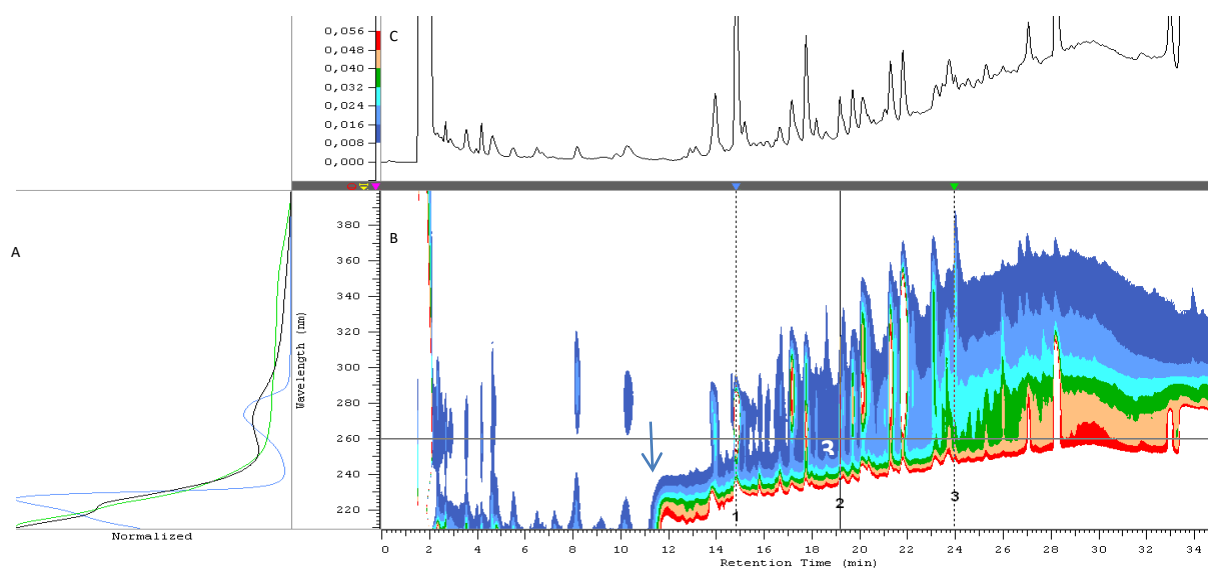
Rys. 20. Chromatogram rozdzielania hydrolyzatu wierzby energetycznej, warunki hydrolyzy: katalizator: **5% NaOH**, temp. 90°C, czas: 24 h, warunki rozdzielania: metoda B, objętość dozowana: 50 μ l, **A** –widma wybranych składników, **B** – Chromatogram detektora UV-VIS DAD w odwzorowaniu poziomicowym, **C**-Chromatogram dla 260 nm, Piki: 1- kwas 4-hydroksybenzoesowy, 2- kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy, 3- kwas 4-OH-3,5-metoksybenzoesowy i 4-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd, 4-2-metoksyfenol, 5- kwas t-ferulowy, reszta pików niezidentyfikowana

Fig. 20. Chromatogram of separation of energetic willow hydrolyzate, hydrolysis conditions: catalyst: **5% NaOH**, temp. 90°C, time: 24 h, separation conditions: Method B, dosing volume: 50 μ l, **A** –spectrums of selected components, **B** - Chromatogram of UV-VIS DAD detector in the contour mapping, **C**-Chromatogram for 260 nm, Peaks: 1- 4-hydroxybenzoic acid, 2- 3,4-dihydroxybenzoic acid, 3- 4-OH-3,5-methoxybenzoic acid and 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde, 4-2-methoxyphenol, 5- t-ferulic acid, the rest of peaks are unidentified



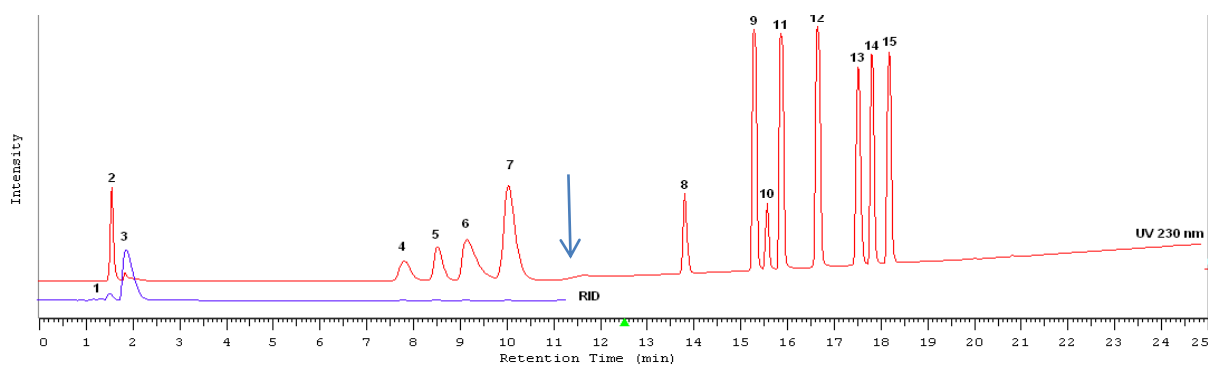
Rys. 21. Chromatogram rozdzielania hydrolizatu wierzby energetycznej, warunki hydrolizy: katalizator: 5% $\text{Ca}(\text{OH})_2$, temp. 90°C , czas: 24 h, warunki rozdzielania: metoda B, objętość dozowana: 50 μl , **A** –widma wybranych składników, **B** – Chromatogram detektora UV-VIS DAD w odwzorowaniu poziomym, **C**-Chromatogram dla 260 nm, Piki: 1- kwas 4-hydroksybenzoesowy, 2- kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy, 3- kwas 4-OH-3,5-metoksybenzoesowy i 4-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd, 4- kwas t-ferulowy, reszta pików niezidentyfikowana

Fig. 21. Chromatogram of separation of energetic willow hydrolyzate, hydrolysis conditions: catalyst: 5% $\text{Ca}(\text{OH})_2$, temp. 90°C , time: 24 h, separation conditions: Method B, dosing volume: 50 μl , **A** –spectrums of selected, Peaks: 1- 4-hydroxybenzoic acid, 2- 3,4-dihydroxybenzoic acid, 3- 4-OH-3,5-methoxybenzoic acid and 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde, 4- t-ferulic acid, the rest of peaks are unidentified



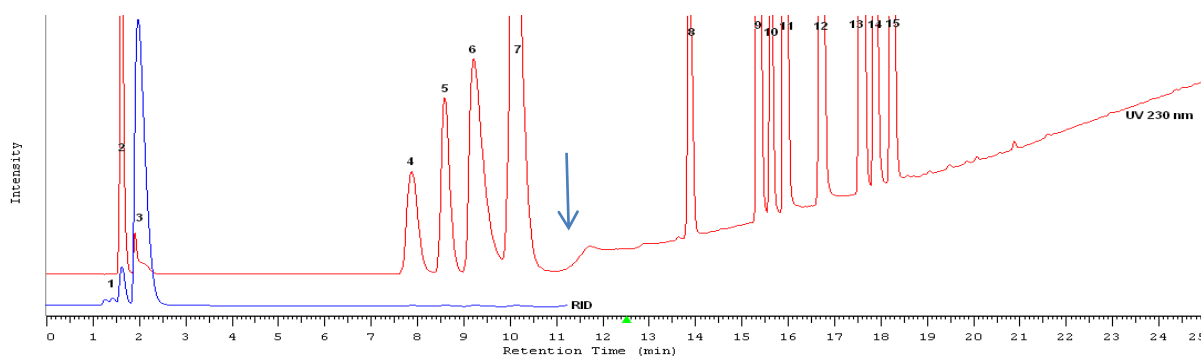
Rys. 22. Chromatogram rozdzielania hydrolizatu wierzby energetycznej, warunki hydrolizy: katalizator: 5% Na_2CO_3 , temp. 90°C , czas: 24 h, warunki rozdzielania: metoda A, objętość dozowana: 50 μl , **A** –widma wybranych składników, **B** – Chromatogram detektora UV-VIS DAD w odwzorowaniu poziomym, **C**-Chromatogram dla 260 nm, Piki: 1- kwas 4-hydroksybenzoesowy, 2- kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy, 3-2,6-dimetoksyfenol, reszta pików niezidentyfikowana

Fig. 22. Chromatogram of separation of energetic willow hydrolyzate, hydrolysis conditions: catalyst: 5% Na_2CO_3 , temp. 90°C , time: 24 h, separation conditions: Method A, dosing volume: 50 μl , **A** –spectrums of selected, Peaks: Peaks: 1- 4-hydroxybenzoic acid, 2- 3,4-dihydroxybenzoic acid, 3-2,6-dimethoxyphenol the rest of peaks are unidentified



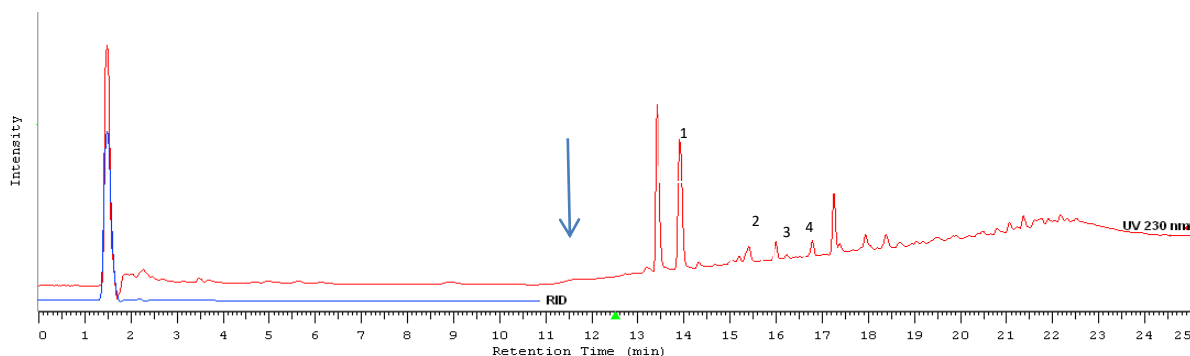
Rys. 23. Nałożone chromatogramy z detektora RID (niebieska linia) oraz UV 230 nm (czerwona linia) – **mieszanina wzorców** – objętość dozowana - 50 μ l, warunki rozdzielania: **metoda A**, Piki: 1- glukoza, 2- kwas metanowy, 3- kwas etanowy, 4-5-hydroksymetylo-2-furaldehyd, 5-1,2-dihydroksybenzen, 6-furfural, 7-kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy, 8-kwas 4-hydroksybenzoesowy, 9-kwas 4-hydroksy 3-detoksybenzoesowy, 10-kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy, 11-kwas 4-OH-3,5-metoksybenzoesowy, 12-4-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd, 13-2-metoksyfenol, 14-kwas t-ferulowy, 15-2,6-dimetoksyfenol

Fig. 23. Superimposed chromatograms for detectors: RID (blue line) and UV 230 nm (red line) – **the standard mixture** – dosing volume - 50 μ l, separation condition: **method A**, Peaks: 1- glucose, 2-formic acid, 3-ethanoic acid, 4-5-hydroxymethyl; 5 -1,2-dihydroxybenzene, 6-furfural, 7-3,4-dihydroxybenzoic acid, 8-hydroxybenzoic acid, 9-4-hydroxy-3-deoxybenzoic acid, 10-acid 3,4 -dihydroxybenzoic acid, 11-4-OH-3,5-methoxybenzoic acid, 12-4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde, 13-2-methoxyphenol, 14-t-ferulic acid, 15-2,6-dimethoxyphenol



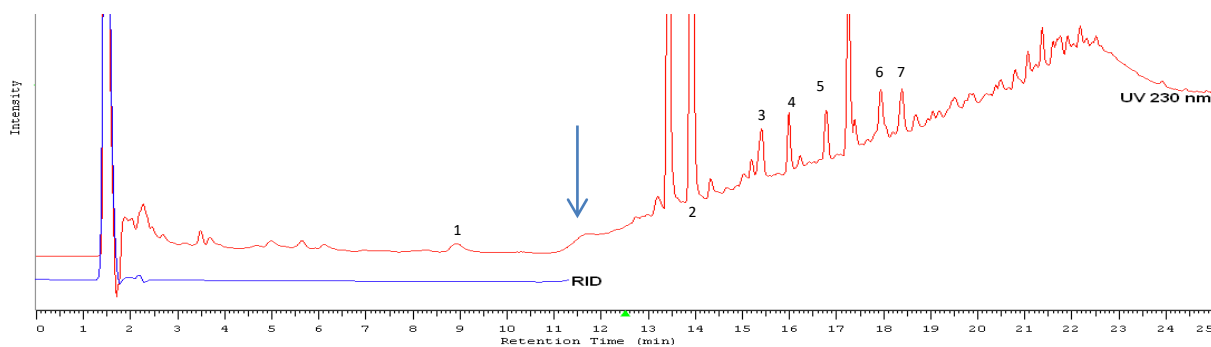
Rys. 24. Nałożone chromatogramy z detektora RID (niebieska linia) oraz UV 230 nm (czerwona linia) – **mieszanina wzorców** – objętość dozowana - 50 μ l, warunki rozdzielania: **metoda A**, Piki: 1- glukoza, 2- kwas metanowy, 3- kwas etanowy, 4-5-hydroksymetylo-2-furaldehyd, 5-1,2-dihydroksybenzen, 6-furfural, 7-kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy, 8-kwas 4-hydroksybenzoesowy, 9-kwas 4-hydroksy 3-detoksybenzoesowy, 10-kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy, 11-kwas 4-OH-3,5-metoksybenzoesowy, 12-4-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd, 13-2-metoksyfenol, 14-kwas t-ferulowy, 15-2,6-dimetoksyfenol - powiększenie

Fig. 24. Superimposed chromatograms for detectors: RID (blue line) and UV 230 nm (red line) – **the standard mixture** – dosing volume - 50 μ l, separation condition: **method A**, Peaks: 1- glucose, 2-formic acid, 3-ethanoic acid, 4-5-hydroxymethyl; 2-furfural, 5 -1,2-dihydroxybenzene, 6-furfural, 7-3,4-dihydroxybenzoic acid, 8-hydroxybenzoic acid, 9-4-hydroxy-3-deoxybenzoic acid, 10-acid 3,4 -dihydroxybenzoic acid, 11-4-OH-3,5-methoxybenzoic acid, 12-4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde, 13-2-methoxyphenol, 14-t-ferulic acid, 15-2,6-dimethoxyphenol, enlargement



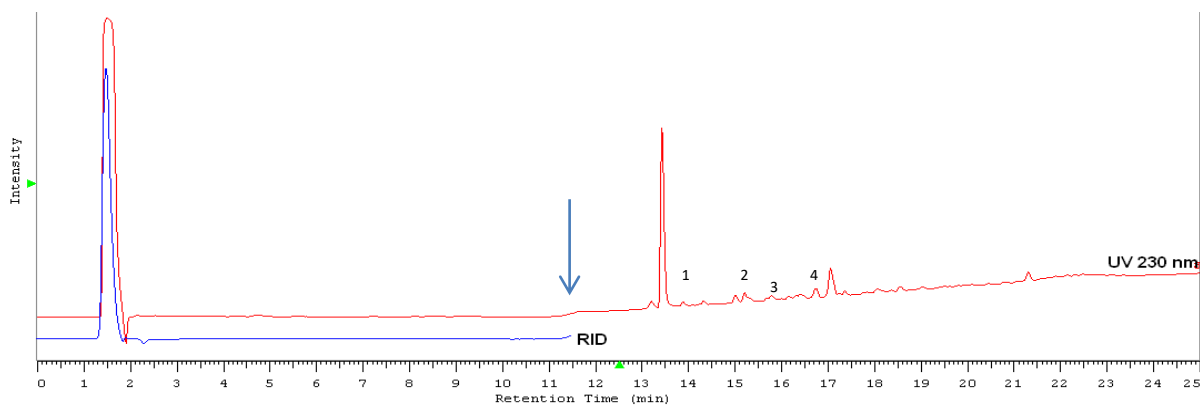
Rys. 25. Nałożone chromatogramy z detektora RID (niebieska linia) oraz UV 230 nm (czerwona linia) -**Hydrolyzate 5% NaOH**, temp. 90°C, czas: 24 h — objętość dozowana - 50 μ l, warunki rozdzielania: **metoda A**, Piki: 1-kwas 4-hydroksybenzoesowy, 2- kwas 4-hydroksy 3-detoksybenzoesowy, 3- kwas 4-OH-3,5-metoksybenzoesowy, 4- 4-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd, reszta pików niezidentyfikowana

Fig. 25. 50 μ l **Hydrolyzate 5% NaOH** after 24 hours, superimposed chromatograms from detectors: UV 230 nm (red line) and RID (blue line), Peaks: 1-4-hydroxybenzoic acid, 2- 4-hydroxy-3-deoxybenzoic acid, 3- 4-OH-3,5-methoxybenzoic acid, 4- 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde, the rest of peaks are unidentified



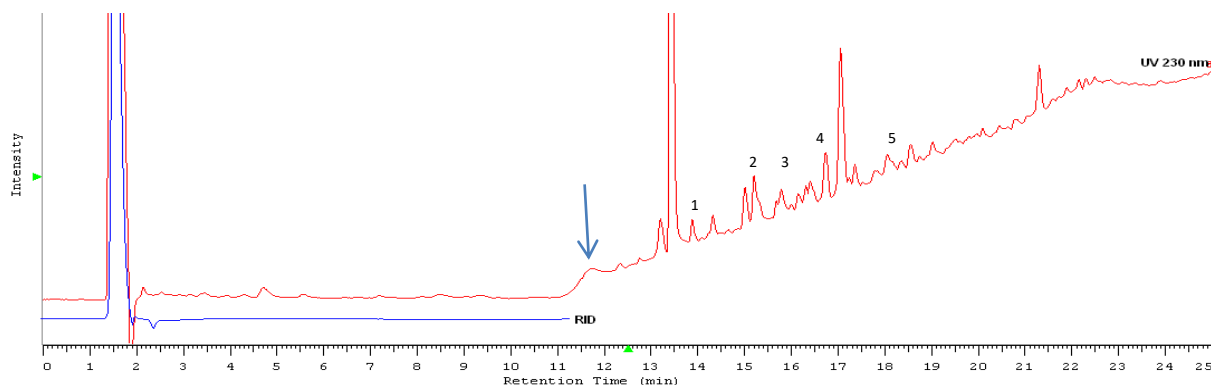
Rys. 26. Nałożone chromatogramy z detektora RID (niebieska linia) oraz UV 230 nm (czerwona linia) -**Hydrolyzate 5% NaOH**, temp. 90°C, czas: 24 h — objętość dozowana - 50 μ l, warunki rozdzielania: **metoda A**, Piki: 1-1,2-dihydroksybenzen, 2-kwas 4-hydroksybenzoesowy, 3- kwas 4-hydroksy 3-detoksybenzoesowy, 4- kwas 4-OH-3,5-metoksybenzoesowy, 5-4-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd, 6- kwas t-ferulowy, 7-2,6-dimetoksyfenol, reszta pików niezidentyfikowana - powiększenie

Fig. 26. Superimposed chromatograms for detectors: RID (blue line) and UV 230 nm (red line) – **hydrolyzate 5% NaOH**, temp. 90°C, time: 24 h – dosing volume - 50 μ l, separation condition: **method A**, Peaks: 1-1,2-dihydroxybenzene, 2- 4-hydroxybenzoic acid, 3- 4-hydroxy-3-deoxybenzoic acid, 4- 4-OH-3,5-methoxybenzoic acid, 5-4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde, 6- t-ferulic acid, 7-2,6-dimethoxyphenol, the rest of peaks are unidentified - enlargement



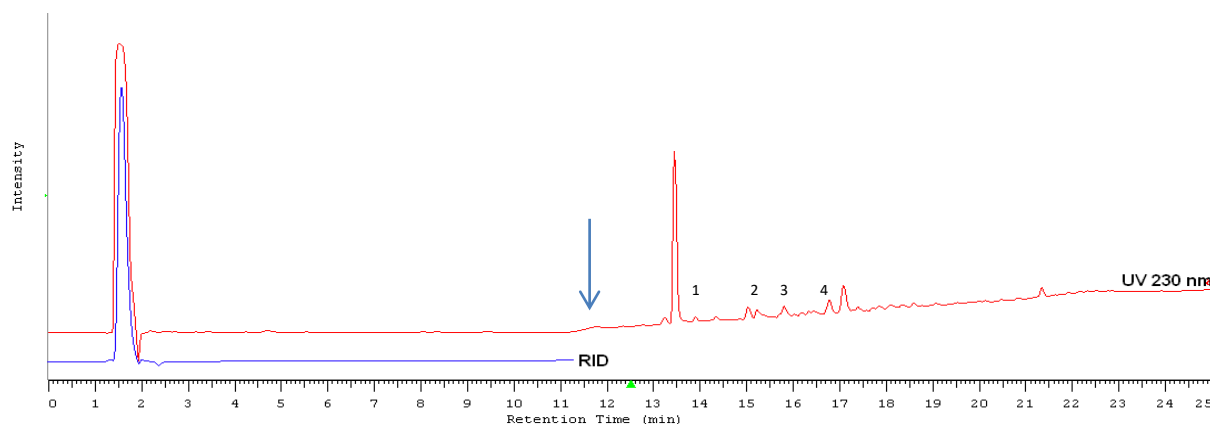
Rys. 27. 50 μ l **Hydrolyzate 5% Ca(OH)₂ po 24 godz.**, nałożone chromatogramy z detektorów: UV 230 nm (czerwona linia) i RID (niebieska linia), Piki: 1-kwas 4-hydroksybenzoesowy, 2- kwas 4-hydroksy 3-detoksybenzoesowy, 3- kwas 4-OH-3,5-metoksybenzoesowy, 4- 4-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd, reszta pików niezidentyfikowana

Fig. 27. Superimposed chromatograms for detectors: RID (blue line) and UV 230 nm (red line) – **hydrolyzate 5% Ca(OH)₂**, temp. 90°C, time: 24 h – dosing volume - 50 μ l, separation condition: **method A**, Peaks: 1-4-hydroxybenzoic acid, 2- 4-hydroxy-3-deoxybenzoic acid, 3- 4-OH-3,5-methoxybenzoic acid, 4- 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde, the rest of peaks are unidentified



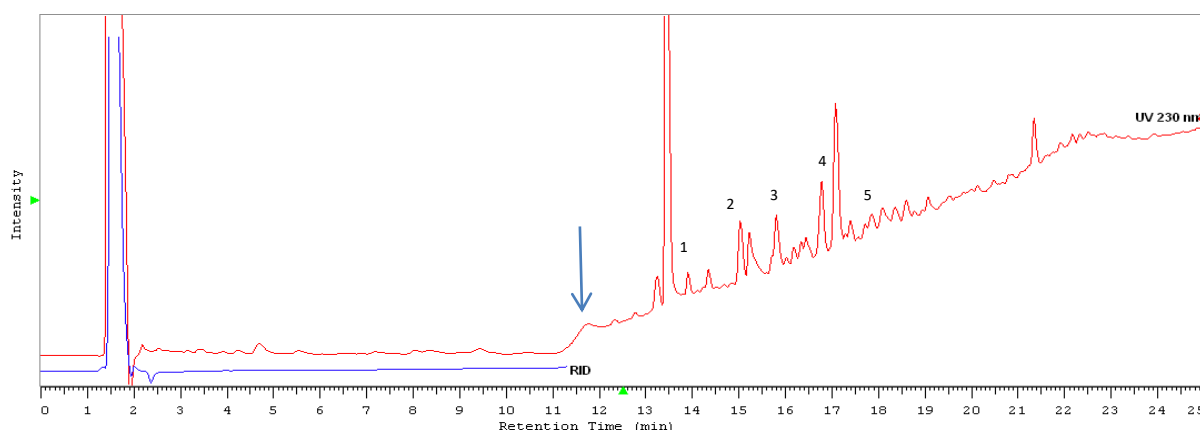
Rys. 28. Nałożone chromatogramy z detektora RID (niebieska linia) oraz UV 230 nm (czerwona linia) -**5% Ca(OH)₂ Hydrolyzate**, temp. 90°C, czas: 24 h — objętość dozowana - 50 μ l, warunki rozdzielania: **metoda A**, Piki: 1-kwas 4-hydroksybenzoesowy, 2- kwas 4-hydroksy 3-detoksybenzoesowy, 3- kwas 4-OH-3,5-metoksybenzoesowy, 4- 4-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd, 5-4-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd, reszta pików niezidentyfikowana, powiększenie

Fig. 28. Superimposed chromatograms for detectors: RID (blue line) and UV 230 nm (red line) – **hydrolyzate 5% Ca(OH)₂**, temp. 90°C, time: 24 h – dosing volume - 50 μ l, separation condition: **method A**, Peaks: 1-4-hydroxybenzoic acid, 2-hydroxy-3-deoxybenzoic acid, 3- 4-OH-3,5-methoxybenzoic acid, 4- 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde, 5-4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde, the rest of peaks are unidentified – enlargement.



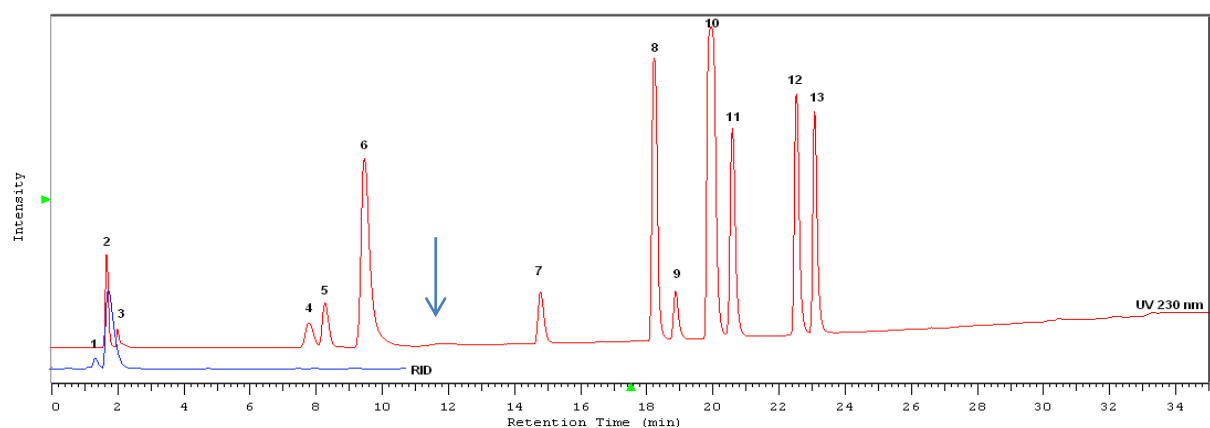
Rys. 29. Nałożone chromatogramy z detektora RID (niebieska linia) oraz UV 230 nm (czerwona linia) -5% Na_2CO_3 **Hydrolyzate**, temp. 90°C, czas: 24 h — objętość dozowana - 50 μl , warunki rozdzielania: **metoda A**, Piki: 1-kwas 4-hydroksybenzoesowy, 2- kwas 4-hydroksy 3-detoksybenzoesowy, 3- kwas 4-OH-3,5-metoksybenzoesowy, 4- 4-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd, reszta pików niezidentyfikowana

Fig. 29. Superimposed chromatograms for detectors: RID (blue line) and UV 230 nm (red line) – **hydrolysate 5% Na_2CO_3** , temp. 90°C, time: 24 h – dosing volume - 50 μl , separation condition: **method A**, Peaks: 1-4-hydroxybenzoic acid, 2- 4-hydroxy-3-deoxybenzoic acid, 3- 4-OH-3,5-methoxybenzoic acid, 4- 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde, the rest of peaks files.



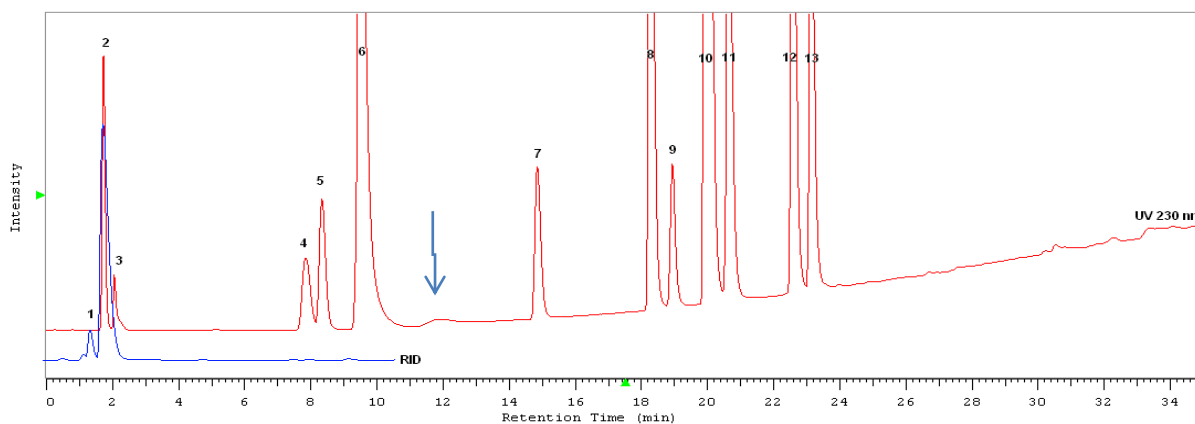
Rys. 30. Nałożone chromatogramy z detektora RID (niebieska linia) oraz UV 230 nm (czerwona linia) -5% Na_2CO_3 **Hydrolyzate**, temp. 90°C, czas: 24 h — objętość dozowana - 50 μl , warunki rozdzielania: **metoda A**, Piki: 1-kwas 4-hydroksybenzoesowy, 2- kwas 4-hydroksy 3-detoksybenzoesowy, 3- kwas 4-OH-3,5-metoksybenzoesowy, 4- 4-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd, 5-4-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd, reszta pików niezidentyfikowana, powiększenie

Fig. 30. Superimposed chromatograms for detectors: RID (blue line) and UV 230 nm (red line) – **hydrolysate 5% Na_2CO_3** , temp. 90°C, time: 24 h – dosing volume - 50 μl , separation condition: **method A**, Peaks: 1-4-hydroxybenzoic acid, 2-hydroxy-3-deoxybenzoic acid, 3- 4-OH-3,5-methoxybenzoic acid, 4- 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde, 5-4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde, the rest of peaks are unidentified – enlargement



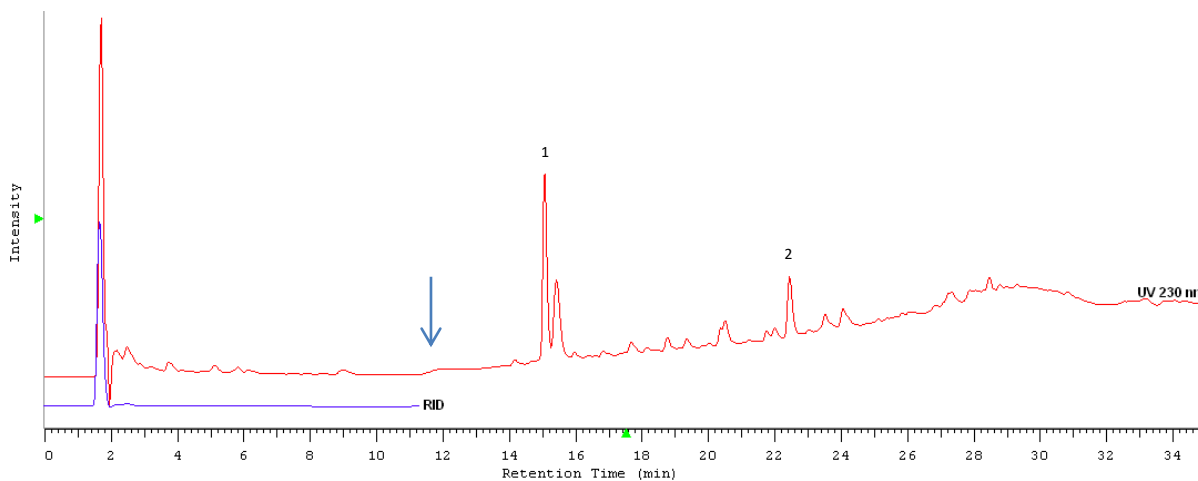
Rys. 31. Nałożone chromatogramy z detektora RID (niebieska linia) oraz UV 230 nm (czerwona linia) – **mieszanka wzorców** – objętość dozowana - 50 μl , warunki rozdzielania: **metoda B**, Piki: 1- glukoza, 2- kwas metanowy, 3- kwas etanowy, 4-5-hydroksymetylo-2-furaldehyd, 5-1,2-dihydroksybenzen, 6- furfural i kwas 4-hydroksy 3-detoksybenzoesowy, 7- kwas 4-hydroksybenzoesowy, 8- kwas 3,4-dihydroksycynamonowy, 9- kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy, 10- kwas 4-OH-3,5-metoksybenzoesowy i 4-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd, 11-2-metoksyfenol, 12- kwas t-ferulowy, 13-2,6-dimetoksyfenol

Fig. 31. Superimposed chromatograms for detectors: RID (blue line) and UV 230 nm (red line) – **the standard mixture** – dosing volume - 50 μ l, separation condition: **method B**, Peaks: 1- glucose, 2-methane, 3- ethane acid, 4-5 hydroxymetylo-2-furaldehyd, 5-1,2-dihydroxybenzene, 6- furfural and 3-hydroxy 3-detoxybenzoic acid, 7- 4-hydroxybenzoic acid, 8- 3,4-dihydroxycinnamic acid, 9- 3,4-dihydroxybenzoic acid, 10- 4-OH-3,5-methoxybenzoic acid and 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde, 11-2-methoxyphenol, 12- t-ferulic acid, 13-2,6-dimethoxyphenol.



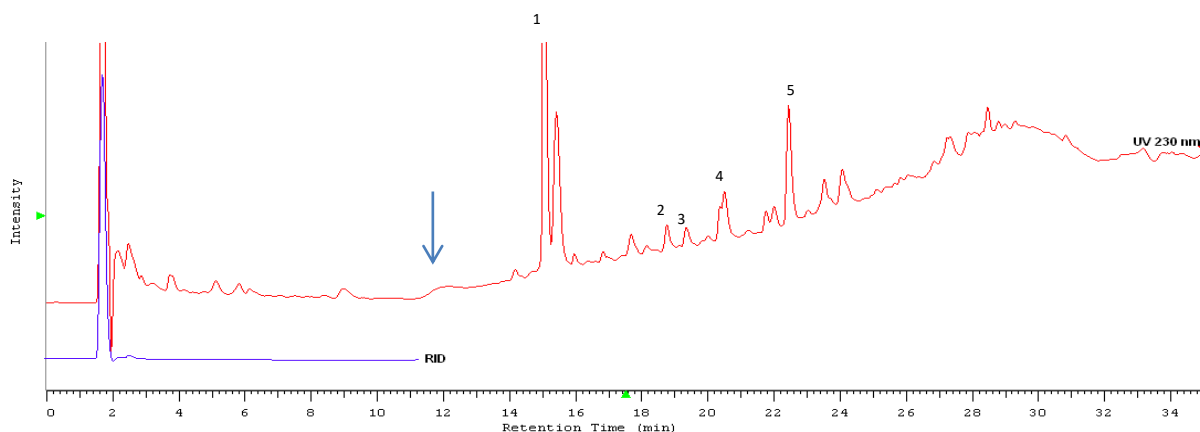
Rys. 32. Nałożone chromatogramy z detektora RID (niebieska linia) oraz UV 230 nm (czerwona linia) – **mieszanina wzorców** – objętość dozowana - 50 μ l, warunki rozdzielania: **metoda B**, Piki: 1- glukoza, 2- kwas metanowy, 3- kwas etanowy, 4-5-hydroksymetylo-2-furaldehyd, 5-1,2-dihydroksybenzen, 6- furfural i kwas 4-hydroksy 3-detoksybenzoesowy, 7- kwas 4-hydroksybenzoesowy, 8- kwas 3,4-dihydroksycynamonowy, 9- kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy, 10- kwas 4-OH-3,5-metoksybenzoesowy i 4-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd, 11-2-metoksyfenol, 12- kwas t-ferulowy, 13 - 2,6-dimetoksyfenol - powiększenie

Fig. 32. Superimposed chromatograms for detectors: RID (blue line) and UV 230 nm (red line) – **the standard mixture** – dosing volume - 50 μ l, separation condition: **method B**, Peaks: 1- glucose, 2-methane, 3- ethane acid, 4-5 hydroxymetylo-2-furaldehyd, 5-1,2-dihydroxybenzene, 6- furfural and 3-hydroxy 3-detoxybenzoic acid, 7- 4-hydroxybenzoic acid, 8- 3,4-dihydroxycinnamic acid, 9- 3,4-dihydroxybenzoic acid, 10- 4-OH-3,5-methoxybenzoic acid and 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde, 11-2-methoxyphenol, 12- t-ferulic acid, 13-2,6-dimethoxyphenol- enlargement

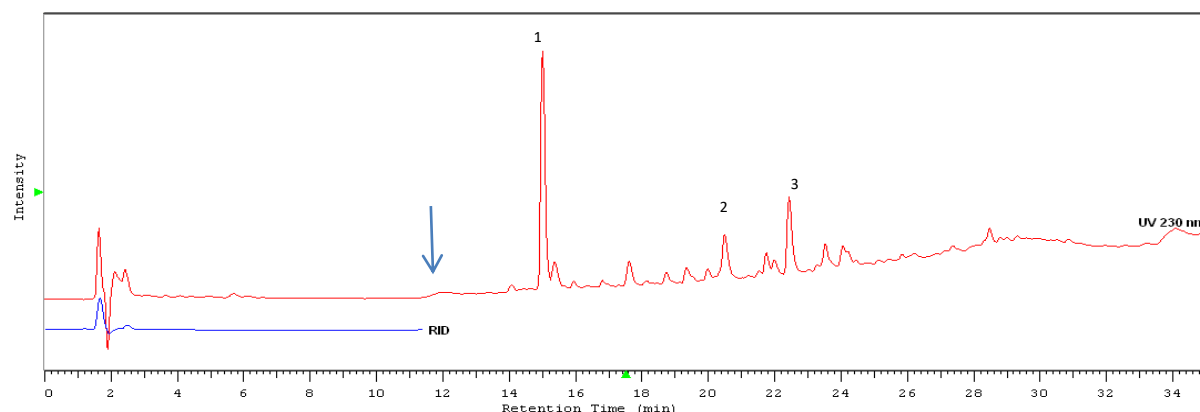


Rys. 33. Nałożone chromatogramy z detektora RID (niebieska linia) oraz UV 230 nm (czerwona linia) -**Hydrolyzate 5% NaOH**, temp. 90°C, czas: 24 h — objętość dozowana - 50 μ l, warunki rozdzielania: **metoda B**, Piki: 1- kwas 4-hydroksybenzoesowy, 2- kwas t-ferulowy, reszta pików niezidentyfikowana

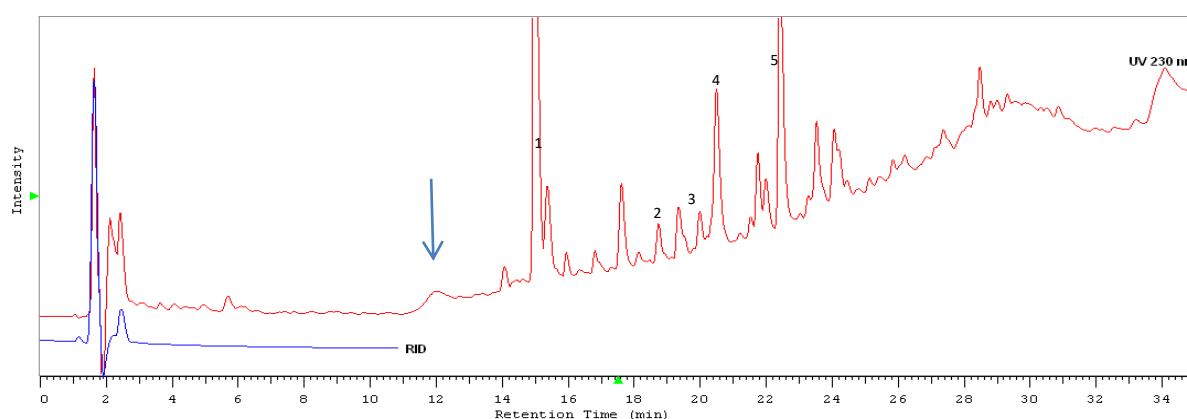
Fig. 33. Superimposed chromatograms for detectors: RID (blue line) and UV 230 nm (red line) – **hydrolyzate 5% NaOH**, temp. 90°C, time: 24 h – dosing volume - 50 μ l, separation condition: **method B**, Peaks: 1- 4-hydroxybenzoic acid, 2- t-ferulic acid, the rest of peaks are unidentified



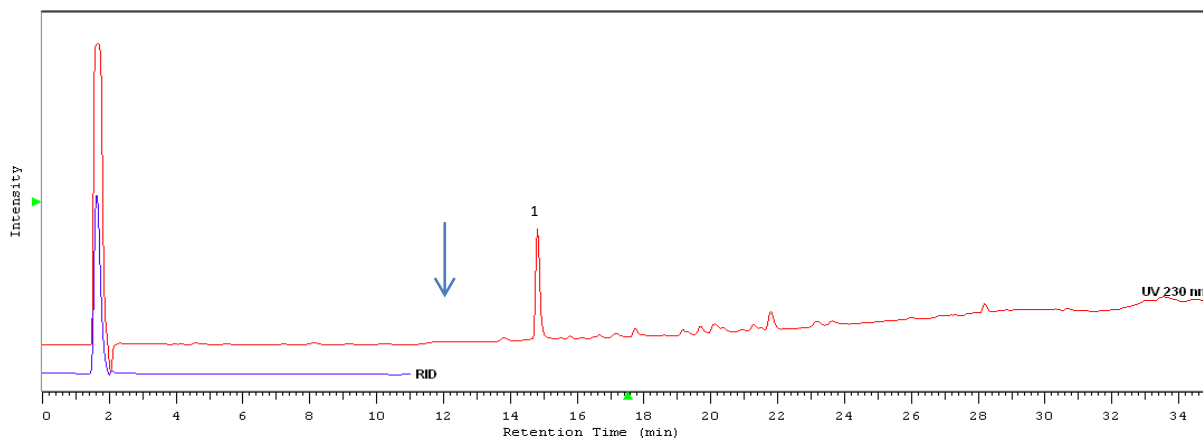
Rys. 34. Nałożone chromatogramy z detektora RID (niebieska linia) oraz UV 230 nm (czerwona linia) -**Hydrolyzate 5% NaOH**, temp. 90°C, czas: 24 h — objętość dozowana - 50 μ l, warunki rozdzielania: **metoda B**, Piki: 1- kwas 4-hydroksybenzoesowy, 2- kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy, 3- kwas 4-OH-3,5-metoksybenzoesowy i 4-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd, 4-2-metoksyfenol, 5- kwas t-ferulowy, reszta pików niezidentyfikowana-powiększenie
 Fig. 34. Superimposed chromatograms for detectors: RID (blue line) and UV 230 nm (red line) – **hydrolysate 5% NaOH**, temp. 90°C, time: 24 h – dosing volume - 50 μ l, separation condition: **method B**, Peaks: 1- 4-hydroxybenzoic acid, 2- 3,4-dihydroxybenzoic acid, 3- 4-OH-3,5-methoxybenzoic acid and 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde, 4-2-methoxyphenol, 5- t-ferulic acid, the rest of peaks are unidentified –enlargement.



Rys. 35. Nałożone chromatogramy z detektora RID (niebieska linia) oraz UV 230 nm (czerwona linia) -**5% Ca(OH)₂ Hydrolyzate**, temp. 90°C, czas: 24 h — objętość dozowana - 50 μ l, warunki rozdzielania: **metoda B**, Piki: 1- kwas 4-hydroksybenzoesowy, 2-2-metoksyfenol, 3- kwas t-ferulowy, reszta pików niezidentyfikowana
 Fig. 35. Superimposed chromatograms for detectors: RID (blue line) and UV 230 nm (red line) – **hydrolysate 5% Ca(OH)₂**, temp. 90°C, time: 24 h – dosing volume - 50 μ l, separation condition: **method B**, Peaks: 1- 4-hydroxybenzoic acid, 2-2-methoxyphenol, 3- t-ferulic acid, the rest of peaks are unidentified

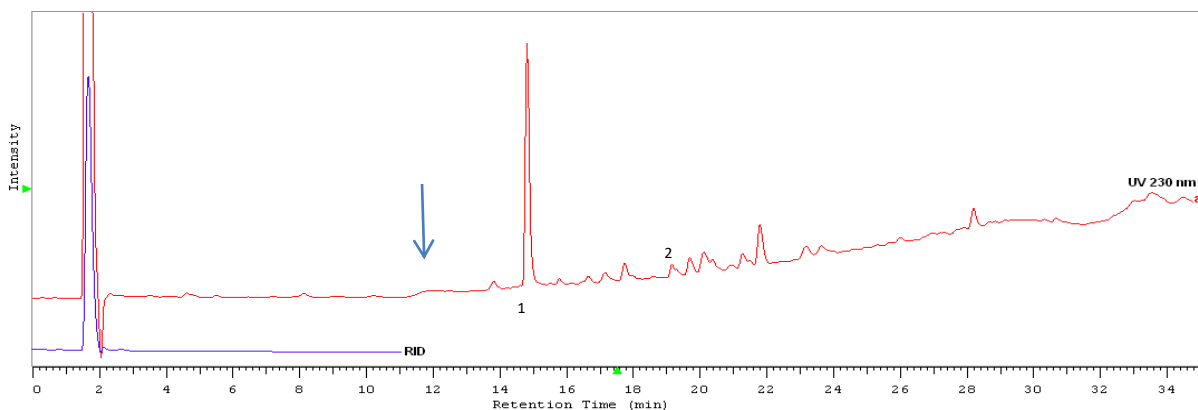


Rys. 36. Nałożone chromatogramy z detektora RID (niebieska linia) oraz UV 230 nm (czerwona linia) -**5% Ca(OH)₂ Hydrolyzate**, temp. 90°C, czas: 24 h — objętość dozowana - 50 μ l, warunki rozdzielania: **metoda B**, Piki: 1- kwas 4-hydroksybenzoesowy, 2- kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy, 3- kwas 4-OH-3,5-metoksybenzoesowy i 4-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd, 4-2-metoksyfenol, 5- kwas t-ferulowy, reszta pików niezidentyfikowana-powiększenie
 Fig. 36. Superimposed chromatograms for detectors: RID (blue line) and UV 230 nm (red line) – **hydrolysate 5% Ca(OH)₂**, temp. 90°C, time: 24 h – dosing volume - 50 μ l, separation condition: **method B**, Peaks: 1- 4-hydroxy-1-4-hydroxybenzoic acid, 2- 3,4-dihydroxybenzoic acid, 3- 4-OH-3,5-methoxybenzoic acid and 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde, 4-2-methoxyphenol, 5- t-ferulic acid, benzoic acid, the rest of peaks are unidentified – enlargement



Rys. 37. Nałożone chromatogramy z detektora RID (niebieska linia) oraz UV 230 nm (czerwona linia) -5% Na_2CO_3 **Hydrolyzatu**, temp. 90°C, czas: 24 h — objętość dozowana - 50 μl , warunki rozdzielania: **metoda B**, Piki: 1- kwas 4-hydroksybenzoesowy, reszta pików niezidentyfikowana

Fig. 37. Superimposed chromatograms for detectors: RID (blue line) and UV 230 nm (red line) – **hydrolysate 5% Na_2CO_3** , temp. 90°C, time: 24 h – dosing volume - 50 μl , separation condition: **method B**, Peaks: 1- 4-hydroxybenzoic acid, the rest of peaks are unidentified



Rys. 38. Nałożone chromatogramy z detektora RID (niebieska linia) oraz UV 230 nm (czerwona linia) -5% Na_2CO_3 **Hydrolyzatu**, temp. 90°C, czas: 24 h — objętość dozowana - 50 μl , warunki rozdzielania: **metoda B**, Piki: 1- kwas 4-hydroksybenzoesowy, 2- kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy, reszta pików niezidentyfikowana-powiększenie

Fig. 38. Superimposed chromatograms for detectors: RID (blue line) and UV 230 nm (red line) – **hydrolysate 5% Na_2CO_3** , temp. 90°C, time: 24 h – dosing volume - 50 μl , separation condition: **method B**, Peaks: 1- 4-hydroxybenzoic acid, 2- 3,4-dihydroxybenzoic acid, the rest of peaks are unidentified -enlargement

5. Wnioski końcowe

Wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconych układach faz (RP-HPLC) realizowana w warunkach zakwaszenia eluentu, początkowo z elucją izokratyczną z eluentem nie zawierającym praktycznie dodatku organicznego, a następnie z elucją gradientową oraz z wykorzystaniem w warunkach elucji izokratycznej dwóch technik detekcji – różnicowego detektora refraktometrycznego (RID) oraz detektora spektrofotometrycznego w zakresie UV-VIS typu DAD, to bardzo ważne narzędzie technicznej analityki procesów hydrolizy różnego rodzaju biomasy lignocelulozowej (BMLC), szczególnie alkalicznej hydrolizy ligniny, a także hemicelulozy;

Badania tej pracy wykazały, że acetonitryl (AcCN) jest bardziej korzystnym od metanolu (MeOH) dodatkiem do eluentu w warunkach programowania składu fazy ruchomej w wysokosprawnej kolumnowej chromatografii cieczowej w odwróconych układach faz (RP-HPLC) dla rozdzielania i-składników hydrolizatów BMLC.

Zastosowane tu warunki rozdzielania, tym, programy elucji, zostały uzyskane w rezultacie optymalizacji wykonanej metodą prób i błędów. Są one optymalne do rozdzielania i ewentualnego oznaczania mieszaniny wzorców reprezentujących składniki hydrolizatów. Jednakże, te warunki nie są wystarczające do uzyskania pełnego rozdzielania składników hydrolizatów z alkalicznej hydrolizy biomasy ligno-celulozowej (BMLC). W tym celu potrzebne są dalsze badania nad optymalizacją warunków rozdzielania. Najprawdopodobniej celowe będzie zastosowanie kolumny o większej długości oraz programu elucji o mniejszej prędkości wzrostu organicznego dodatku w eluencie. W celu zachowania czasu rozdzielania, celowe będzie jednocześnie zwiększenie długości kolumny oraz wielkości ziaren wypełnienia z 2.3 μm , do 5 μm . Jeśli to okaże się niewystarczające, konieczne będzie wykorzystanie dwuwymiarowego rozdzielania, albo typu UPLC i dwukrotnie dłuższej kolumny, wypełnionej sorbentem 2.3 μm , lub 1.7 μm .

Niniejsze badania pokazały też, że technika RP-SPE, a być może korzystnie - wykorzystanie semi-preparatywnej kolumny HPLC o wielkości ziarna ok 10-15 μm i szeregowo połączonych detektorów UV-VIS DAD oraz RID, i elucji skokowej, może zostać z powodzeniem wykorzystane do wydzielenia frakcji cukrów / kwasów alifatycznych / grupy względnie hydrofobowych organicznych związków chemicznych z hydrolizatów; Opracowanie optymalnej procedury grupowego rozdzielania hydrolizatów, także wymaga dalszych badań;

W badaniach wykonywanych w niniejszej pracy jest celowe stosowanie detektora refraktometrycznego w początkowej okresie elucji izokratycznej, szczególnie gdy kwaśnym dodatkiem do eluentu jest organiczny kwas karboksylowy, który absorbuje światło UV do ok. 230 nm. Wówczas detektor RID dobrze służy, tak do detekcji cukrów, jak i kwasów karboksylowych, obecnych w wyższych stężeniach.

Conclusions

High performance liquid chromatography in reverse phase systems (RP-HPLC) was carried out initially under conditions of acidification eluent initially isocratic elution with an eluent which does not contain practically an organic additive, and then eluted with a gradient and using the conditions isocratic two detection techniques – Refractive Index Detector (RID) and spectrophotometric detector UV-VIS type DAD- in the area of isocratic and gradient elution, is a very important tool for the implementation of technical analysis of lignocellulosic biomass (BMLC) hydrolysis processes of various types, especially alkaline hydrolysis of lignin, as well as hemicellulose.

This study has shown that acetonitrile (AcCN) is more preferred from methanol (MeOH) as additive to the eluent in conditions of programming composition of the mobile phase in high performance liquid chromatography column of reverse-phase systems (RP-HPLC) to separate components and hydrolysates of BMLC.

The separation conditions of the hydrophobic components resulting from the BMLC alkaline hydrolysis used in this research, including the elution program utilized with the use of AcCN, are optimal for the separation and possible determination of the mixture of standards representing the components of the hydrolysates. However, these conditions are not sufficient to achieve complete separation of the hydrolyzate components from the alkaline hydrolysis of BMLC. For this purpose, further research is needed to optimize the separation conditions. Most probably, it will be expedient to use a two-dimensional separation, or at least an UPLC apparatus and twice the long column, filled with a 2.3 μm sorbent.

This study also showed that the technique of RP-SPE, and perhaps preferably - using semi-preparative HPLC column with a grain size of about 10-15 μm and are connected in series UV-VIS detector DAD and RID and elution cylinder can be successfully used to isolate fractions of sugar / aliphatic acids / a group of relatively hydrophobic organic chemicals from hydrolysates; The development of an optimal procedure requires further research.

In studies carried out in this work it is expedient to use the refractometric detector in the initial period of isocratic elution, especially when the acid additive to the eluent is an organic carboxylic acid, which absorbs UV light to approx. 230 nm. Then, the RID detector is well suited to the detection of sugars as well as carboxylic acids, especially those present in higher concentrations.

Praca finansowana z grantu NCN, pt. „Badania zasadowej hydrolizy biomasy ligno-celulozowej oraz warunków konwersji produktów do biogazów” [nr projektu:2014/13/B/ST8/04258].

This work was supported by the National Science Centre, „Research of alkaline hydrolysis of lignocellulosic biomass and conversion of hydrolysis products to bio-gases” [grant number 2014/13/B/ST8/04258].

6. Literatura (Literature)

1. A. Kacprzak, K. Michalska, „Chemiczna hydroliza biomasy – innowacyjne technologie dla procesu fermentacji metanowej”, *Chemical hydrolysis of biomass - innovative technologies for methane fermentation*, Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 40 (2011).
2. G. Bali, X. Meng, J.I. Deneff, *The Effect of Alkaline Pretreatment Methods on Cellulose Structure and Accessibility*, Bioresources Technology, 144 (2013).
3. P. I. Boerjesson, *Energy analysis of biomass production and transportation*, Biomass Bioenergy, 11 (1996) 305-318.
4. P. Capros, L. Mantzos, N. Tasios, A. De Vita, N. Kouvatakis, *EU energy trends to 2030 (update 2009)*, Bruksela. Directoriat General for Energy, 180 (2010)
5. A. Dunnetta, N. Shan, *Prospects for Bioenergy*, Journal of Biobased Materials and Bioenergy, 1 (2007) 1-18.

6. A. Roszkowski, "Bioenergia – pola i lasy zastąpią węgiel, ropę i gaz?", *Bioenergy - fields and forests will replace coal, oil and gas* ?, 1 (2009) 243-257.
7. P. Gołos, A. Kaliszewski, Wybrane aspekty wykorzystania biomasy drzewnej do celów energetycznych, *Aspects of using wood biomass for energy production*, Leśne Prace Badawcze, 1 (2009) 243-257.
8. N. Mosier, C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y.Y. Lee, M. Holtzapfle, M. Ladisch, *Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass*, *Bioresources Technology*, 96 (2005) 673-686.
9. Y. Sun, J. Cheng, *Hydrolysis of lignocellulosic material for ethanol production: a review*, *Bioresources Technology*, 83 (2002) 1-11.
10. A. T. W. M. Hendriks, G. Zeeman, *Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass*, *Bioresources Technology*, 100 (2009) 10-18.
11. C.E. Wyman, B.E. Dale, R.T. Elander, M. Holtzapfle, M.R. Ladisch, Y.Y. Lee, *Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies*, *Bioresources Technology*, 96 (2005) 1956-1966.
12. J.Y. Zhu, X. Pan, S. Ronald, J. Zalesny, *Pretreatment of woody biomass for biofuel production: energy efficiency, technologies, and recalcitrance*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87 (2010).
13. J. Zhu, et al., *Swine manure fermentation for hydrogen production*, *Bioresources Technology*, 100 (2009).
14. V.B. Agbor, N. Cicek, R. Sparling, A. Berlin, D.B. Levin, *Biomass pretreatment: Fundamentals toward application*, *Biotechnology Advances*, 29 (2011).
15. A. Boussaid, Y. Cai, J. Robinson, D. J. Gregg, Q. Nguyen, J. N. Saddler, *Sugar Recovery and Fermentability of Hemicellulose Hydrolysates from Steam-Exploded Softwoods Containing Bark*, *Biotechnology Progress*, 17 (2001).
16. F. Mechmech, H. Chadjaa, M. Rahni, M. Marinova, N.B. Akacha, M. Gargouri, *Improvement of butanol production from a hardwood hemicelluloses hydrolysate by combined sugar concentration and phenols removal*, *Bioresources Technology*, 192 (2015).
17. I.S.M. Rafiqul, A.M. Mimi Sakinah, *Kinetic studies on acid hydrolysis of Meranti wood sawdust for xylose production*, *Chemical Engineering Science*, 71 (2012).
18. H.B. Klinke, B.K. Ahring, A.S. Schmidt, A.B. Thomsen, *Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw*, *Bioresources Technology*, 82 (2002).
19. Y. Su, R. Du, H. Guo, M. Cao, Q. Wu, R. Su, W. Qi, Z. He, *Fractional pretreatment of lignocellulose by alkaline hydrogen peroxide: Characterization of its major components*, *Food and Bioproduction Processing*, 94 (2015).
20. C.F. Crespo, M. Badshah, M.T. Alvarez, B. Mattiasson, *Ethanol production by continuous fermentation of D-(+)-cellobiose, D-(+)-xylose and sugarcane bagasse hydrolysate using the thermos anerobe *Caloramator boliviensis**, *Bioresources Technology*, 103 (2012).
21. A.K. Gautam, T.J. Menkhaus, *Performance evaluation and fouling analysis for reverse osmosis and nanofiltration membranes during processing of lignocellulosic biomass hydrolysate*, *Journal of Membrane Science*, 451 (2014).
22. R. Xie, M. Tu, Y. Wu, S. Adhikari, *Improvement in HPLC separation of acetic acid and levulinic acid in the profiling of biomass hydrolysate*, *Bioresources Technology*, 102 (2011).
23. K. Ziemiński, I. Romanowska, M. Kowalska, *Enzymatic pretreatment of lignocellulosic wastes to improve biogas production*, *Waste Management*, 32 (2012).
24. L. Coulier, Y. Zha, R. Bas, P.J. Punt, *Analysis of oligosaccharides in lignocellulosic biomass hydrolysates by high-performance anion-exchange chromatography coupled with mass spectrometry (HPAEC-MS)*, *Bioresources Technology*, 133 (2013).
25. A. Wei, X. Zhang, D. Wei, G. Chen, Q. Wu, S.-T. Yang, *Effects of cassava starch hydrolysate on cell growth and lipid accumulation of the heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides**, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36 (2009).
26. B. Kaya, S. Irmak, A. Hasanoglu, O. Erbatas, *Evaluation of various carbon materials supported Pt catalysis for aqueous-phase reforming of lignocellulosic biomass hydrolysate*, *International Journal of Hydrogen Energy*, 39 (2014).
27. R. Datar, J. Huang, P. Manessa, A. Mohagheghia, S. Czernika, E. Chornetb, *Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process*, *International Journal of Hydrogen Energy*, 32 (2007).
28. A. Converti, M.D. Borghi, *Inhibition of the fermentation of oak hemicelulose acid hydrolisate by minor sugars*, *Journal of Biotechnology*, 64 (1998).
29. J. Chen, X. Liu, D. Wei, G. Chen, *High yields of fatty acid and neutral lipid production from cassava bagasse hydrolysate (CBH) by heterotrophic *Chlorella protothecoides**, *Bioresources Technology*, 64 (1998).
30. F. C. Martín, M. Galbe, N.O. Nilvebrant, L. J. Jönsson, *Comparison of the fermentability of enzymatic hydrolyzates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 4 (2002) 98-100.