

Piia Häkkinen

Ligniinin määrittäminen maanäytteestä

Ligniinin merkitys maaperätutkimuksessa

Ligniini on aromaattinen yhdiste, jota esiintyy putkilokasvien soluseinämässä. Se on toiseksi yleisin (15–30 %) kasvin jäännöksissä selluloosan jälkeen. Ligniinimolekyyli koostuu fenyylipropylyyksiköistä, jotka ovat kiinnittyneet toisiinsa erilaisin hiili- (C-C) ja eetterisidoksien (C-O-C sidokset). Ligniini on erittäin vaikeasti hajoava aine ja sen hajoaminen voi kestää maaperässä satoja, jopa tuhansia vuosia. Vain valkolahosieni voi hajottaa ligniinin rakenteen kokonaan. Ligniini on myös yksi humuksen tärkeä lähtöaine.

Ligniiniä on tutkittu perinteisesti paljon puukemian paperi- ja selluteollisuuden tarpeisiin. Metsätieteissä ligniiniä on analysoitu varsinkin karikkeen hajoamiskokeiden yhteydessä ja tutkittaessa maan orgaanisen aineen koostumusta. Myös ligniinin ja muiden yhdisteiden, kuten selluloosan ja tyren yhteyttä on tutkittu. Vaikka ligniinistä on jo saatu paljon tietoa, muun muassa sen rakenteesta ja hajoamisesta, on tutkimus edelleen ajankohtaista. Ilmastonmuutoksen on arveltu nopeuttavan maan orgaanisen aineen hajoamista ja muuttavan pohjoiset metsämaat hiilen nielusta hiilen lähteeksi. Hitaasti hajoavana yhdisteenä ligniinillä on tärkeä rooli tässä prosessissa.

Maa- ja kasvinäytteistä analysoidaan yleensä ligniinin pitoisuutta, mutta myös ligniinin rakenne ja sen muutokset ovat tärkeitä tekijöitä ligniiniä tutkittaessa. Ligniinin pitoisuus näytteessä antaa tietoa orgaanisen aineen hajoavuudesta. Ligniinin kemiallinen koostumus vaihtelee eri kasvilajeilla,

minkä vuoksi esimerkiksi lehti- ja havupuiden ligniini voidaan erottaa toisistaan. Ligniinimolekyylin rakenteen muutokset antavat tietoa ligniinin alkuperästä sekä hajoamisasteesta.

Ligniinin määrittämiseen käytetyt menetelmät

Kasviaineen ja maaperän ligniinin määrittämissä menetelmissä jaetaan yleensä gravimetrisiin menetelmiin, ligniinin rakennetta hajottaviin menetelmiin sekä spektroskooppisiin menetelmiin. Gravimetriset menetelmät perustuvat kiinteän aineen painoon ja niitä käytetään näytteen ligniinipitoisuuden määrittämiseen. Hajottavat menetelmät toimivat hajottamalla ligniinin rakenteen sidoksia kemikaalien ja lämmön avulla. Hajottavien menetelmien avulla saadaan ligniinipitoisuuden lisäksi tietoa ligniinin rakenteesta ja sen muuttumisesta. Spektroskooppiset menetelmät perustuvat tutkittavasta näytteestä vastaanotetun säteilyn tutkimiseen. Spektroskopian osa-alueita ovat muun muassa UV (ultravioletti), IR (infrapuna) ja NMR (ydinmagneettinen resonanssi) -spektroskopia. Spektroskooppisilla menetelmillä saadaan tietoa ligniinin pitoisuudesta, rakenteesta ja rakenteessa tapahtuvista muutoksista.

Kuparioksidihapetusmenetelmä

Kuparioksidihapetusmenetelmä kuuluu ligniinin rakennetta hajottaviin menetelmiin ja on yksi eniten

maanäytteiden ligniinin määrittämiseen käytetyistä menetelmistä. Kuparioksidia on käytetty ligniinin hapetuksessa puuaineesta jo 1940-luvulta saakka, mutta Hedgesin ja Ertelin (1982) kehittämä menetelmä on erityisesti suunniteltu pienten ligniinimäärien analysoimiseen vähän orgaanista ainetta sisältävistä näytteistä, kuten maa- ja sedimentinäytteistä. Eri tutkijat ovat vuosien varrella muokanneet menetelmää nopeammaksi ja helpommin käytettäväksi. Menetelmää on käytetty mineraalimaanäytteiden ja vesistöjen sedimenttien lisäksi myös kasvimateriaalin tutkimiseen. Kuparioksidihapetusmenetelmällä on mahdollista saada tietoa paitsi näytteen ligniinipitoisuudesta myös sen rakenteesta. Menetelmä antaa siten hyödyllistä tietoa kasvillisuuden ja maankäytön vaikutuksista maaperän hiilenkiertoon.

Kuparioksidihapetusmenetelmässä näyte hapeutetaan kuparioksidilla noin 170°C lämpötilassa typpikaasussa. Hapetuksessa vapautuu ligniinin fenolijohdannaisia, jotka voidaan uuttaa orgaanisella liuottimella ja analysoida kromatografisesti, esimerkiksi kaasukromatografi-massaspektrometrillä (GC/MS) tai nestekromatografilla (HPLC). Hapetus toimii rikkomalla ligniinin rakenteen eetterisidoksia, jolloin fenolijohdannaiset vapautuvat. Aromaattiset hiilidokset pysyvät ehjinä. Hapetusprosessi muistuttaa valkolahosienellä tapahtuvan ligniinin hajotuksen ensimmäistä vaihetta.

Ligniinin fenolijohdannaiset voidaan jakaa eri ryhmiin, jotka kuvastavat ligniinin alkuperää. Näitä ovat p-hydroksyyli-, vanillyyli-, syringyyli- ja sinnamyylifenoliryhmät, jotka koostuvat ketoneista, aldehydeistä ja karboksyylihapoista. Havupuiden ligniini koostuu enimmäkseen vanillyylifenoleista kun taas lehtipuissa on suunnilleen yhtä paljon vanillyyli- ja syringyylifenoleita. Sinnamyylifenolit ovat ominaisia puuvarrettomille kasveille, kuten heinille. Ligniinin alkuperää näytteessä kuvataankin yleensä syringyyli- ja vanillyylifenoleiden sekä sinnamyyli- ja vanillyylifenoleiden suhteilla.

Näytteen kokonaisligniinipitoisuutta kuvataan useimmiten vanillyyli-, syringyyli- ja sinnamyylifenoleiden yhteismäärällä. P-hydroksyylifenoleita ei yleensä oteta mukaan laskuihin, koska ne voivat olla myös muista lähteistä kuin ligniinistä, kuten aromaattisista aminohapoista. Kuparioksidihapetusmenetelmällä saadun ligniinin fenolijohdannaisen kokonaispitoisuuden on arvioitu olevan noin 10 %

kuusen ligniinin kokonaispitoisuudesta. Loppu koostuu kondensoituneista rakenneosista, kuten fenyylikumaraanista ja pinoresinolista. Ligniinin hajoisastetta voidaan tutkia eri fenoliryhmien happo- ja aldehydyhdisteiden suhteilla, koska ligniinin hajotessa happejen osuus aldehydeihin nähdään kasvaa.

Tioasidolyysimenetelmä

Myös tioasidolyysimenetelmä kuuluu ligniinin rakennetta hajottaviin menetelmiin. Menetelmää on käytetty pääasiassa puu- ja sellumateriaalin sisältävän ligniinin analysointiin, mutta sillä on analysoitu myös heinäkasveja. Tioasidolyysi perustuu ligniinin kemialliseen hajotukseen asidolyysillä ja fenolijohdannaisen kromatografiseen analysointiin. Menetelmä antaa tietoa ligniinin esiintymisestä, pitoisuudesta ja rakenteesta. Sitä voidaan käyttää tyypillisimpien ligniinin fenolijohdannaisen, kuten syringyyli- ja vanillyyliryhmien, tunnistamiseen ja luokitteluun.

Menetelmässä näyte liuotetaan dioksaani-etaanitioliin BF₃-eetteraatin kanssa. Tioasidolyysi toimii hajottamalla ligniinin rakenteen tyypillisimpiä sidoksia antaen näin tietoa ligniinin hajotuksessa vapautuvista fenolijohdannaisista. Fenolijohdannaisen avulla on mahdollista saada tietoa ligniinin alkupe-
räästä. Jos menetelmää jatketaan Raneyn nikkelillä tapahtuvalla desulfuraatiolla, saadaan tietoa myös muista ligniinin sidoksista, kuten C-C-sidoksesta. Näin saadaan enemmän tietoa ligniinin rakenteesta kuin menetelmän ensimmäisessä vaiheessa.

Klason-ligniininimetelmä

Klason-ligniininimetelmä, joka kuuluu gravimetriin menetelmiin, on kehitetty ligniinin määrittämiseksi puuaineesta. Menetelmää on käytetty paljon puu- ja sellumateriaalin, mutta myös kasvi- ja mineraalimaanäytteiden ligniinipitoisuuden määrittämiseen. Klason-ligniininimetelmä perustuu siihen, että näytteestä poistetaan muut aineet, jolloin jäljelle jää ligniini.

Menetelmässä näytteestä uutetaan lipidit (rasvat ja rasvamaiset yhdisteet) ja muut uuttuvat aineet or-

Taulukko 1. Testattujen ligniinin määrittämenetelmien vertailu.

Menetelmä	Tulos
Kuparioksidihapetus	ligniinin kokonaispitoisuus ja ligniinin fenolijohdannaisten pitoisuudet saatiin määritettyä eri maakerroksille
Klason-ligniini	ligniinin kokonaispitoisuus (sisältäen happoon liukenemattoman ja liukenevan ligniinin) saatiin määritettyä eri maakerroksille
Tioasidolyysi	ligniinin fenolijohdannaisia ei havaittu peltomaanäytteistä, turvemaanäytteille saatiin määritettyä tärkeimpien fenolijohdannaisten pitoisuudet
FTIR	ligniiniille tyypillisiä sidoksia havaittiin spektrissä

gaanisilla liuottimilla ja vedellä sekä lopuksi hydrolysoidaan (hajotetaan polymeerit) hiilihydraatit vahvalla rikkihapolla. Jäljelle jää happoon liukenematon orgaaninen jäännös, jota usein kutsutaan Klason-ligniiniksi menetelmän kehittäjän mukaan. Hydrolyysin suodoksesta voidaan edelleen määrittää happoon liukenevan ligniinin osuus UV-spektrofotometrillä. Määrittäminen tapahtuu aallonpituudella 205 nm ja suodosta laimennetaan niin, että absorbanssi on välillä 0,2–0,7. Happoon liukenematon ja happoon liukeneva ligniini muodostavat yhdessä näytteen kokonaisligniinipitoisuuden.

FTIR (Fourier Transform Infrared) -spektroskopia

Spektroskooppisia menetelmiä on käytetty paljon varsinkin kasvi- ja maanäytteiden sisältämien yhdisteiden tutkimiseen. FTIR-spektroskopiassa tutkitaan infrapunasäteilyn vaikutusta molekyyliin. Menetelmällä voidaan tunnistaa ligniini näytteessä sekä tarkastella ligniinin rakennetta ja sen hajoamisen aikana tapahtuvia rakenteellisia muutoksia. Spektrometri antaa tietoa tutkittavan näytteen kemiallisista sidoksista ja funktionaalisten ryhmien esiintymisestä. Myös näytteen ligniinipitoisuuden määrittäminen on mahdollista tulosten kalibroinnin avulla, esimerkiksi monimuuttujamenetelmiä käyttäen.

Kiinteää näytettä analysoidessa käytetään yleensä menetelmää, jossa jauhetusta näytteestä ja kaliumbromidista tehdään kirkas tabletti, joka asetetaan laitteeseen. Kaliumbromidia käytetään tabletin teossa koska se läpäisee infrapunasäteilyä. Tabletin tekoon käytettävät aineet eivät saa sisältää vettä, sillä se näkyisi voimakkaasti spektrissä. Myös nes-

temäistä näytettä voidaan tutkia, esim. laittamalla tippa näytettä kahden kaliumbromiditabletin väliin. Ligniinin voi tunnistaa FTIR-spektrin alueella molekyylin rakenteen perusteella. Esimerkiksi aromaattinen (C=C) sidos löytyy spektrin kohdasta 1620 cm^{-1} .

Menetelmien soveltuvuus maanäytteiden ligniinin määrittämiseen

Menetelmien soveltuvuutta maan ligniinin tutkimukseen testattiin käyttämällä metsitetyiltä pelloilta kerätyjä maanäytteitä (taulukko 1). Tioasidolyysimenetelmän soveltuvuutta tutkittiin myös turvenäytteillä.

Kun metsitetyn peltomaan kokonaisligniinipitoisuus mitattiin kuparioksidihapetusmenetelmällä ja Klason-ligniinimenetelmällä havaittiin, että jälkimmäinen menetelmä tuotti selvästi suuremman kokonaispitoisuuden. Karike- ja maanäytteiden Klason-ligniinimenetelmällä saadut ligniinin pitoisuudet ovat usein todellista pitoisuutta suurempia, johtuen siitä, että jäännös sisältää muutakin kuin ligniiniä.

Kun tioasidolyysimenetelmällä analysoitiin metsitetyiltä pelloilta otettua kivennäismaanäytettä ligniinin fenolijohdannaisia ei havaittu lainkaan. Koska kuparioksidihapetusmenetelmällä vastaavasta näytteestä pystyttiin tunnistamaan ligniinin johdannaiset, johtopäätelmä oli, että tioasidolyysimenetelmällä käytetty näytemäärä, 80 mg maata, oli liian pieni. Varsinkin jos näytteen sisältämä ligniini on erittäin hajonnutta, näytteen ja sisäisen standardin suhdetta tulisi kasvattaa. Turvenäytteistä löytyi tioasidolyysi-

simenetelmällä syringyyli- ja vanillyyliryhmät ja niille pystyttiin laskemaan pitoisuudet. FTIR-menetelmällä pystyttiin havaitsemaan osa ligniinille tyypillisistä sidoksista.

Testatuilla menetelmillä saadut tulokset olivat vertailukelpoisia aiempien tutkimusten kanssa. Kuparioksidihapetusmenetelmällä saadut metsitetyjen peltomaiden ligniinipitoisuudet olivat samaa suuruusluokkaa aiemmin tutkimuksissa esitettyjen tulosten kanssa. Ligniinin fenolijohdannaisten suhteet olivat keskimäärin pienempiä, mutta happo/aldehydi-suhteet olivat suurempia kirjallisuudessa esitettyihin lukuihin verrattuna. Klason-ligniinin menetelmällä saadut ligniinipitoisuudet olivat muihin tutkimuksiin verrattuna pienempiä. Tioasidolyysimenetelmällä saaduille turvemaan ligniinipitoisuuksille ei löytynyt vertailua kirjallisuudesta.

Sopivan menetelmän löytäminen

Koska ligniinin rakenne on heterogeeninen sisältäen monia erilaisia sidoksia, ei ole olemassa menetelmää, jolla pystyttäisiin määrittämään mineraalimaa- ja kasvinäytteen absoluuttinen ligniinipitoisuus.

Kuparioksidihapetusmenetelmä näyttäisi silti olevan sopivin maanäytteen ligniinin analysoimiseen. Vaikka menetelmä aliarvioi ligniinin kokonaiskonsentraation, antaa se tärkeää tietoa ligniinin rakenteesta, alkuperästä ja hajoamisasteesta. Yhdistettynä esimerkiksi FTIR-spektroskopian kanssa, menetelmällä saadaan kattavaa tietoa maaperän ligniinistä. Tioasidolyysimenetelmään verrattuna kuparioksidihapetusmenetelmä on yksinkertaisempi ja helpompi toteuttaa. Siinä käytettävät kemikaalit ovat vähemmän haitallisia ja menetelmän saanto suurempi. Tioasidolyysimenetelmää ei ole käytetty kovinkaan paljon maanäytteille, eikä sen käyttö luultavasti ole mielekästä.

Klason-ligniinin menetelmässä vahvan rikkihapon voidaan olettaa muuttavan ligniinin rakennetta. Happoon liukenemattoman jäännöksen on myös arveltu sisältävän muutakin kuin ligniiniä, esim. kutiinia ja suberiinia, ja näin yliarvioivan ligniinin pitoisuutta näytteessä. Menetelmää ei tutkijoiden mukaan tulisi käyttää hajoaville kasvimateriaaleille, koska hajoamisen aikana happoon liukenevan ligniinin määrä saattaa muuttua. Näin ollen Klason-ligniinin menetel-

mä ei ole paras mahdollinen menetelmä maaperän orgaanisen aineen tutkimiseen.

Spektroskooppiset menetelmät ovat kemiallisiin hajotuksiin verrattuna nopeampia ja helpompia toteuttaa. Näytteet eivät tarvitse aikaa vieviä esikäsittelyjä ja laitteiden kehityksen myötä analysoinnista on tullut entistä yksinkertaisempaa. Vaikka FTIR-spektroskopiolla on monia etuja kemiallisiin ligniinin rakennetta hajottaviin menetelmiin verrattuna, se ei kuitenkaan anna yhtä paljon tietoa ligniinin rakenteesta ja alkuperästä. Menetelmän käyttöä esimerkiksi yhdessä kuparioksidihapetusmenetelmän kanssa tulisi tutkia lisää.

Kirjallisuus

- Brinkmann, K., Blaschke, L. & Polle, A. 2002. Comparison of different methods for lignin determination as a basis for calibration of near-infrared reflectance spectroscopy and implications of lignoproteins. *Journal of Chemical Ecology* 28(12): 2483–2501.
- Hedges, J.I. & Ertel, J.R. 1982. Characterization of lignin by gas capillary chromatography of cupric oxide oxidation products. *Analytical Chemistry* 54: 174–178.
- Häkkinen, P. 2008. Determination of soil organic matter fractions in afforested agricultural soils. Maisterin tutkielma. Helsingin yliopisto, Metsäekologian laitos. 75 s.
- Kögel-Knabner, I. 2000. Analytical approaches for characterizing soil organic matter. *Organic Geochemistry* 31: 609–625.
- Lin, S.Y. & Dence, C.W. (toim.) 1992. *Methods in lignin chemistry*. Springer Series in Wood Science. 578 s.

■ MMM Piia Häkkinen, Suomen ympäristökeskus.
piia.hakkinen@ymparisto.fi