

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова»

На правах рукописи



Сыпалова Юлия Александровна

**ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ЛИГНИНОВ
ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ МЕТОДАМИ СПЕКТРОСКОПИИ
ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА**

4.3.4 – Технологии, машины и оборудование для лесного хозяйства
и переработки древесины

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
кандидат химических наук, профессор
Кожевников Александр Юрьевич

Архангельск 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1 ЛИГНИН И МЕТОДЫ ЕГО ХАРАКТЕРИСТИКИ (АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	10
1.1 Лигноцеллюлозная биомасса.....	10
1.2 Особенности химической структуры лигнина.....	14
1.2.1 Фрагментный состав лигнина.....	19
1.2.2 Функциональный состав лигнина.....	25
1.3 Некоторые физические свойства лигнина.....	29
1.4 Методы выделения препаратов лигнина.....	31
1.5 Методы изучения структуры лигнина.....	35
1.6 Спектроскопия ядерного магнитного резонанса.....	37
1.6.1 Жидкостная ЯМР-спектроскопия.....	38
1.6.3 ЯМР-спектроскопия твердого тела.....	45
1.7 Выводы по обзору литературы, постановка цели исследования.....	47
2 МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ.....	49
2.1 Техническое оснащение.....	49
2.2 Характеристика реактивов.....	49
2.3 Объекты исследования.....	51
2.4 Отбор и подготовка проб растительности.....	52
2.5 Анализ химического состава растительного сырья.....	53
2.6 Извлечение препаратов лигнина.....	57
2.7 Вспомогательные методы анализа.....	57
2.8 Анализ химического состава, структуры и свойств препаратов диоксанлигнина методами ЯМР-спектроскопии.....	58
2.8.1 Подготовка образцов для анализа группового и фрагментного состава методами жидкостной ЯМР-спектроскопии.....	58
2.8.2 Подготовка образцов для анализа сорбционной способности лигнинов методом твердотельной ЯМР-спектроскопии.....	59

2.8.3	Параметры регистрации спектров ЯМР	60
2.8.4	Обработка и анализ спектров ³¹ P и HSQC ЯМР	61
2.8.5	Обработка и анализ спектров ЯМР твердого тела	62
3	СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПОДХОДА К АНАЛИЗУ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП ЛИГНИНА МЕТОДОМ ³¹ P ЯМР СПЕКТРОСКОПИИ.....	64
3.1	Определение гидроксильных групп в модельном соединении.....	65
3.2	Определение гидроксильных групп лигнина.....	66
3.4	Определение параметров регистрации спектров ³¹ P ЯМР	67
4	СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЛИГНИНОВ ДРЕВЕСНЫХ И НЕДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ.....	71
4.1	Характеристика объектов исследования	71
4.2	Анализ функционального состава исследуемых лигнинов	73
4.3	Анализ основных типов связей в исследуемых лигнинах	77
4.4	Возможные пути валоризации лигнина в зависимости от его структурных особенностей	86
5	ИЗУЧЕНИЕ СОРБЦИОННЫХ СВОЙСТВ ЛИГНИНОВ МЕТОДОМ ТВЕРДОТЕЛЬНОЙ ЯМР СПЕКТРОСКОПИИ	89
5.1	Анализ методом ¹ H ЯМР спектроскопии твердого тела.....	89
5.2	Анализ методом ¹³ C ЯМР спектроскопии твердого тела.....	92
	ВЫВОДЫ	100
	СОКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ	102
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	104

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Современные тенденции развития биорефайнинга предполагают максимальное комплексное использование всех компонентов древесины. Несмотря на то, что общемировое получение лигнина, как побочного продукта целлюлозно-бумажной промышленности, составляет около 50 млн. т/год, во вторичные продукты перерабатывается не более 1 млн. тонн лигнина в год. Валоризация лигнина ограничена проблемами нерегулярности его строения и частичной модификации его структуры в процессах делигнификации, что не позволяет внедрить комплексные системы переработки. Кроме того, структурные особенности лигнинов влияют не только на процессы делигнификации, но и на физико-химические свойства вторичных продуктов, получаемых из лигнинов.

Другим аспектом интереса к структурным различиям лигнинов высших растений является изучение процессов биосинтеза полимеров и их различий в зависимости от видовой и семейственной принадлежности растения. Известно, что лигнины, полученные из различных видов растительной биомассы, обладают специфичными структурными особенностями. Однако данные особенности не систематизированы, и не имеют четких критериев оценки.

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса широко используется для изучения структуры лигнина. Одномерная ЯМР-спектроскопия позволяет оценить содержание функциональных групп различных типов в лигнине, двумерная ЯМР спектроскопия позволяет проследить тонкую структуру лигнина и оценить количество различных типов связей между фенилпропановыми единицами. Новые возможности для изучения структуры лигнина открывает применение твердотельной ЯМР-спектроскопии. Главным преимуществом этого метода является возможность изучать нерастворимые препараты лигнина. Кроме того, использование методов твердотельной ЯМР-спектроскопии в комплексе с классическим анализом методами жидкостной

ЯМР-спектроскопии позволяет проанализировать некоторые физические свойства полимеров, однако в силу сложности данного метода используется исследователями крайне редко.

Таким образом, изучение структурных особенностей лигнинов различного биологического происхождения позволит углубить имеющиеся фундаментальные знания, а также выявить закономерности изменения физико-химических свойств потенциальных продуктов вторичной переработки лигнинов, что послужит научной основой для разработки комплексных применений.

Цель работы заключается в изучении структурных особенностей лигнинов древесных и недревесных растений методами спектроскопии ядерного магнитного резонанса, а также влияния этих особенностей на сорбционные свойства лигнинов.

Для достижения цели поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить и сравнить распределение молекул воды по центрам гидратации лигнинов хвойной и лиственной древесины методами твердотельной ЯМР спектроскопии.

2. Усовершенствовать подход к анализу функционального состава лигнинов методом ^{31}P ЯМР спектроскопии.

3. Изучить структурные особенности лигнинов различного биологического происхождения в части функционально-группового и фрагментного состава методами 1D и 2D ЯМР спектроскопии.

4. На основе полученного массива экспериментальных данных предложить возможные стратегии переработки лигнина из конкретных видов растительного сырья.

Научная новизна проведённого исследования заключается в следующем:

– с использованием комплекса физико-химических методов анализа разработаны критерии оценки структурных особенностей макромолекулы

лигнина и создана база данных о количестве различных типов связей и структур для 18 препаратов лигнина. Выявлены различия функционального и фрагментного состава лигнинов в зависимости от вида и семейства, к которому принадлежит растение;

– впервые применён метод твердотельной ЯМР-спектроскопии к анализу сорбционных свойств лигнинов, определены приоритетные центры сорбции, проведен анализ количественного распределения молекул сорбата по структурным фрагментам лигнина.

Теоретическая и практическая значимость работы. Исследование носит преимущественно фундаментальный характер. Составлен подробный структурный профиль для 18 препаратов диоксанлигнинов, выделенных из растений различного биологического происхождения. Отмечена структурная вариабельность лигнинов не только между разными видами растений, но и в зависимости от семейства, к которому принадлежит растение. Полученные результаты оформлены в качестве РИД (базы данных), и могут быть использованы при практическом подборе сырья для получения новых функциональных продуктов на основе лигнина. Таким образом, создана основа как для разработки стратегий эффективной переработки лигнина, так и для уточнения процессов биосинтеза при росте растений.

Усовершенствован подход к анализу функциональных групп лигнина методом ^{31}P ЯМР. Оптимизация методики позволила снизить время проведения эксперимента и его себестоимость. Показана целесообразность использования обычного пиридина в качестве растворителя лигнина, вместо дейтерированного, что позволило снизить себестоимость одного эксперимента более чем в 25 раз. Оптимизация параметров регистрации спектров ^{31}P ЯМР позволила также снизить время записи одного спектра в 17 раз без потери качества результата, что подтверждено вычислением отношения «сигнал/шум» в спектрах.

На основании полученного массива структурной информации проанализированы перспективные способы валоризации лигнина в вопросах

комплексного использования всех компонентов биомассы. Исследованы процессы сорбции лигнинов хвойной и лиственной древесины для изучения влияния структурных особенностей различных лигнинов на их физико-химические свойства.

Методология и методы исследования. Методической базой данной работы является сочетание методов физико-химического анализа. Комплекс современных методов одномерной и двумерной ЯМР-спектроскопии является основополагающим данной работы. Впервые с помощью методов спектроскопии ЯМР твердого тела исследованы сорбционные свойства лигнинов. Применены методики CP/MAS для улучшения разрешения спектров.

Для анализа исходного растительного сырья и препаратов диоксанлигнина использовались следующие вспомогательные методы: метод каталитического сжигания для анализа элементного состава; метод эксклюзионной хроматографии для определения молекулярной массы; УФ-спектроскопия.

Степень достоверности результатов проведенных исследований обеспечивается значительным объемом обработанного экспериментального материала, подтверждается публикациями в журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus. Экспериментальные исследования проводились на современном оборудовании и измерительных приборах, методами количественного и качественного химического анализа с применением высокочувствительных инструментальных методов. Экспериментальные данные получены в результате многократных измерений и постобработки и согласуются с имеющимися литературными данными.

На защиту выносятся следующие положения:

- Подход к анализу функционального состава лигнинов методом спектроскопии ^{31}P ЯМР;
- Результаты исследования структурных особенностей лигнинов различного биологического происхождения;

– Результаты исследования сорбционных свойств лигнинов методами твердотельной ЯМР-спектроскопии.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах, входящих в базы данных Web of Science и Scopus, а также 5 тезисов докладов. Получено 1 свидетельство об интеллектуальной собственности.

Апробация результатов исследования. Основные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на международных научных конференциях: «Физикохимия растительных полимеров» (г. Архангельск, 2017, 2019, 2021 г.); «Magnetic resonance and its applications. Spinus» (г. Санкт-Петербург, 2019, 2021 г.).

Финансовая поддержка. Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования научным оборудованием «Арктика» Северного (Арктического) федерального университета имени М.В. Ломоносова при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований, грант № 20-33-90126/20 «Изучение структурных особенностей нативных лигнинов, из растений различного биологического происхождения», Государственного задания FSRU-2021-0009 «Поиск, выделение и характеристика биологически активных веществ растений Арктического региона как основа для создания новых поколений фармацевтических препаратов», гранта РНФ № 22-13-20015 «Изучение структурных особенностей и структурных превращений лигнинов при различных способах делигнификации».

Соответствие диссертации научной специальности. Представленная на рассмотрение диссертационная работа соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук. Название и содержание диссертации соответствует паспорту специальности 4.3.4 – Технологии, машины и оборудование для лесного хозяйства и переработки древесины: п. 2. Химия, физико-химия и

биохимия основных компонентов биомассы дерева и иных одревесневших частей растений, композиты, продукты лесохимической переработки.

Личный вклад автора заключается в том, что с учетом рекомендаций руководителя, он принимал непосредственное участие на всех этапах диссертационного исследования, включая постановку целей и задач работы, аналитический обзор литературных данных по теме исследования, планирование и проведение экспериментальных работ. Автор самостоятельно проводил обработку, интерпретацию и обобщение полученных данных, формулировку выводов, а также подготовку к публикации полученных результатов.

Объем и структура диссертационной работы. Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, общих выводов, списка обозначений и сокращений, а также списка цитируемой литературы. Основное содержание изложено на 124 страницах машинописного текста, включающих 32 рисунка и 17 таблиц. Библиографический список включает 185 наименований цитируемых работ.

1 ЛИГНИН И МЕТОДЫ ЕГО ХАРАКТЕРИСТИКИ (АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Лигноцеллюлозная биомасса

Биомасса растений является важным сырьем для производства энергии, химикатов и возобновляемого топлива. Наиболее распространенной формой растительной биомассы является лигноцеллюлоза, состоящая из лигнина, целлюлозы и гемицеллюлоз (рис. 1) в различных соотношениях с незначительным содержанием таких компонентов как пигменты, смолы, таннины и пр. [1].

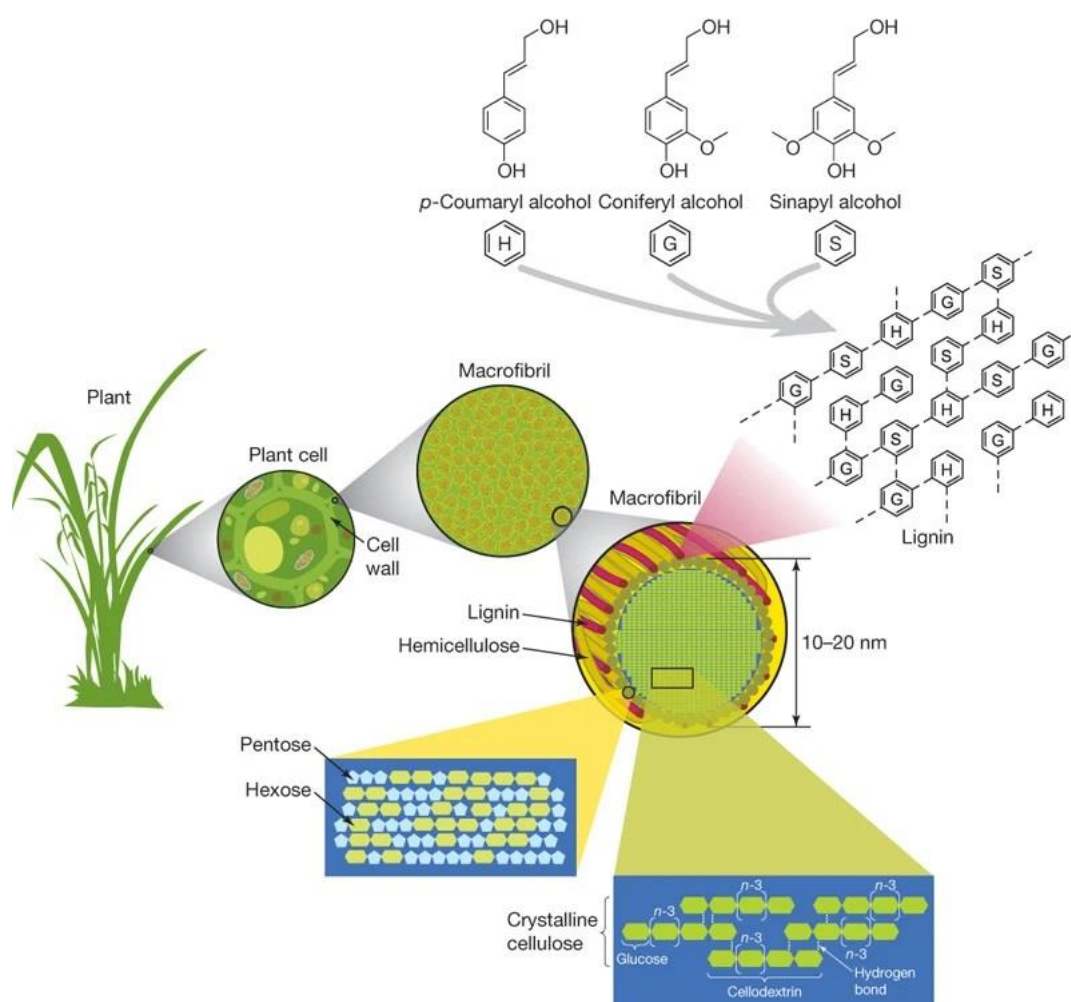


Рисунок 1 – Пример визуализации строения лигноцеллюлозы [1]

Содержание и состав трех основных компонентов биомассы зависят от её источника. Так, хвойные породы древесины содержат 33-42 % целлюлозы,

22-40 % гемицеллюлоз, 27-32 % лигнина и 2-4 % экстрактивных веществ. Лиственные породы содержат 38-51 % целлюлозы, 17-38 % гемицеллюлоз, 21-31 % лигнина и 3 % экстрактивных веществ. В травянистых растениях количество лигнина, целлюлозы, гемицеллюлоз и экстрактивных веществ варьируется в широком диапазоне и может составлять 0-40 % лигнина, 20-50 % гемицеллюлоз, 25-95 % целлюлозы и 4-9 % экстрактивных веществ [2, 3].

Целлюлоза – наиболее распространенный биополимер, состоящий из связанных единиц глюкозы. Является основным компонентом клеточных стенок растений. Помимо древесины и других растений, целлюлозу также можно найти в различных видах бактерий, грибах, водорослях и некоторых морских беспозвоночных животных [4].

Полимер целлюлозы представляет собой линейный гомополисахарид (рис. 2), состоящий из звеньев β -D-ангидроглюкопиранозы, связанных вместе β -1,4-гликозидными связями.

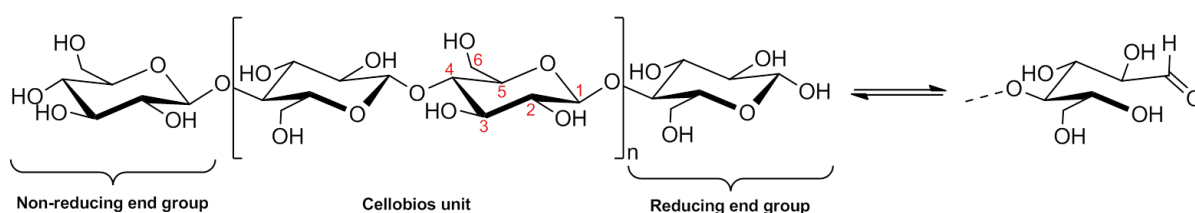


Рисунок 2 – Молекулярная структура целлюлозы [4]

Для целлюлозы характерна высокая степень полимеризации (СП). В древесной целлюлозе СП может достигать 14 000, а в волокнах хлопчатника – до 20 000. В связи с чем целлюлоза стала важным товарным продуктом целлюлозно-бумажной промышленности [5].

Ежегодно в мире производится ~ 180 млн. тонн целлюлозы [6]. Долгое время основные усилия были сконцентрированы на получении целлюлозы как основного продукта традиционной целлюлозно-бумажной промышленности, но в последние десятилетия все больше и больше запасов целлюлозы превращается в продукты с добавленной стоимостью в области химикатов, пластмасс и топлива путем химической, термической или биообработки. На

сегодняшний день коммерциализированы несколько заводов по производству целлюлозного этанола [7].

Гемицеллюлозы (ГЦ) – группа смешанных нецеллюлозных полисахаридов, являются вторыми по содержанию высокомолекулярными углеводами. Условно ГЦ делят на пентозаны $(C_5H_8O_4)_n$ и гексозаны $(C_6H_{10}O_5)_n$ [3].

Массовая доля ГЦ в древесине колеблется в широких пределах – от 15 до 40 %. Колебания в содержании зависят не только от родовой принадлежности, но и от места произрастания одного и того же ботанического вида. Лиственные породы содержат в 1,5 раза больше ГЦ, чем хвойные. Состав гемицеллюлоз значительно варьируется в зависимости от вида растения. Древесина лиственных пород содержит от 17 до 30 % пентозанов и всего 1-6 % гексозанов, в то время как в древесине хвойных пород гексозаны являются преобладающими ГЦ (8-20 %) [3]. В лиственной древесине преобладающей структурой гемицеллюлозы является ксилан (рис. 3а), который может составлять до 80-90 % [8], в то время как галактоманнан (рис. 3б) – преобладающая структура ГЦ хвойных пород [3, 9]. По сравнению с целлюлозой степень полимеризации гемицеллюлоз относительно ниже (~ 200), а водородные связи намного слабее.

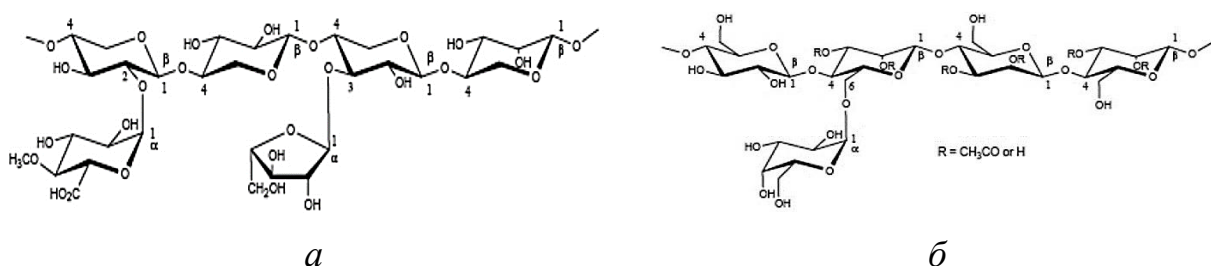


Рисунок 3 – Преобладающие структуры гемицеллюлоз лиственных пород – глюкуроноксилан (а) и хвойных пород – галактоглюкоманнан (б) [8]

В клеточных стенках растений ГЦ способствуют соединению фибрилл целлюлозы между собой и вносят вклад в гибкость композитных материалов. В традиционной целлюлозно-бумажной промышленности гемицеллюлозы

являются побочным продуктом и не используются эффективно [10]. Небольшая часть гемицеллюлоз используется для производства этанола и ксилита [11].

В настоящее время химическая технология переработки древесины сосредоточена на получении целлюлозы в качестве конечного продукта. Отходом такого производства является лигнин, количество которого может достигать до 35 % от исходного сырья [6, 7].

Лигнин – ароматический гетерополимер нерегулярного строения, находится в клеточной стенке растения вместе с целлюлозой и гемицеллюлозами [12]. Обеспечивает жесткость клетки, водонепроницаемость и устойчивость против микробного действия [13]. Структура лигнина аморфна и разветвлена простыми эфирными и углерод-углеродными связями. Многие особенности строения лигнина еще не раскрыты [14].

Общий запас древесины в России составляет около 80 млрд м³. А количество лигнина в растениях колеблется от 15 до 35 % по массе [15, 16]. Из-за такого обилия Россия в настоящее время имеет возможность производить около 10 млн т лигнина в год, что намного превышает текущий рынок продуктов на основе лигнина [17]. Лигнин в основном получают как отход целлюлозно-бумажной промышленности, который используется в качестве топлива для рекуперации энергии [18]. В зависимости от технологического процесса делигнификации древесины при производстве целлюлозы образуются различные виды лигнина.

Ожидается, что в ближайшем будущем мировой рынок лигнина может оцениваться более чем в 130 млрд. \$ в результате потенциальной конверсии в углеводороды, и таким образом станет возобновляемым заменителем сырой нефти [19]. Однако на сегодняшний день валоризация лигнина ограничена проблемами нерегулярности строения лигнина и сильной модификации технических лигнинов.

Вторичная переработка лигнина должна базироваться на использовании его свойств, обусловленных как особенностями строения лигнина, так и наличием и количеством различных функциональных групп [7, 9, 16, 18]. В связи с этим определение структурных особенностей лигнинов различного биологического происхождения является весьма актуальным.

1.2 Особенности химической структуры лигнина

Структурные единицы лигнина состоят из фенилпропановых единиц (ФПЕ) различного строения. Многие фенольные смолы в настоящее время признаны «мономерами лигнина» [12, 20]. Однако, классически, лигнины считаются производными *n*-кумарового, кониферилового и синапового спиртов, имеющих фенилпропановую структуру. В зависимости от типа биомассы фенилпропановые звенья различаются заместителями в 3-м и 5-м положениях ароматического кольца (рис. 4).

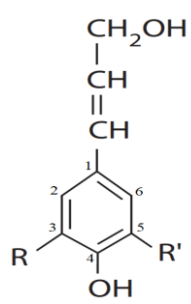
	Заместители	Монолигнгол	Тип биомассы
	R = R' = H	<i>n</i> -кумаровый спирт	Травы, компрессионная древесина
	R = H, R' = OCH ₃	кониферилловый спирт	Лиственные и хвойные породы
	R = R' = OCH ₃	синаповый спирт	Лиственные породы

Рисунок 4 – Мономерные структурные звенья лигнина

Основным мономером лигнинов хвойной древесины является кониферилловый спирт, который имеет метоксильную группу в положении С3. Лигнины лиственных пород имеют два основных мономера: кониферилловый спирт и синаповый спирт, который имеет метоксильные группы в положениях С3 и С5 углеродного кольца. Третий мономер, *n*-кумаровый спирт, наиболее представлен в травах и компрессионной древесине.

Теория, лежащая в основе лигнификации, была представлена Фрейденобергом и Нейшем в 1968 г. [21] на основе химических процессов, включающих окислительное сочетание фенолов и добавление к полимеру

доступных фенольных субстратов [22, 23]. В результате окисления образуется фенольный радикал, в котором электронная плотность делокализована в положениях С1, С3, С5 и О-4 ароматического кольца, а также в пропанольном С_β, образуя резонансные структуры. Положение фенокси С_β является наиболее реакционноспособным, так как в этом положении задействовано наибольшее количество связей в лигнине (β-О-4, β-5, β-β и др.) [24].

Лигнификация происходит за счет «концевого» связывания мономеров с растущим полимером. Как только образуются радикалы, полимеризация становится чисто химической и не контролируется ферментами и белками [25]. В результате образования свободных радикалов мономерные единицы лигнина собираются в сложную макромолекулу посредством комбинаторного свободнорадикального связывания, что приводит к образованию в полимере мономерных субъединиц: гваяцильные звенья (G) – производные кониферилового спирта, имеющие одну арил-ОСН₃ группу; сирингильные звенья (S) – производные синапового спирта, имеющие две арил-ОСН₃ группы; *n*-гидроксифенильные звенья (H) – не имеют ОСН₃ групп и являются производными *n*-кумарового спирта (рис. 5) [20, 21].

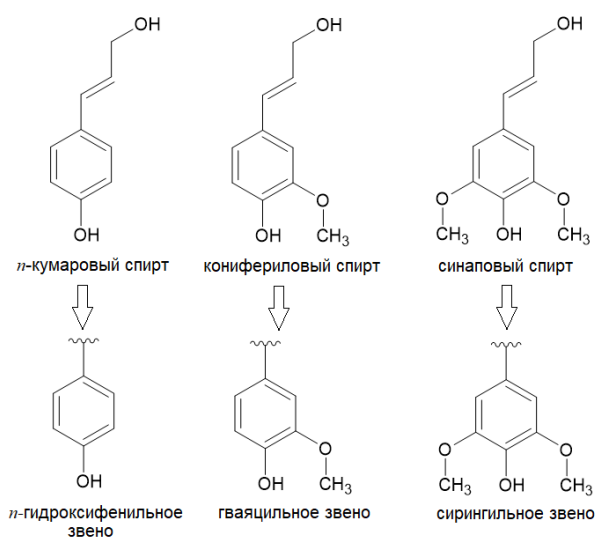


Рисунок 5 – Фенилпропановые звенья лигнина [21]

По содержанию мономерных фрагментов лигнины условно делят на три типа: хвойные, лиственные и травянистые. Лигнины лиственных пород

древесины построены из G- и S-звеньев [26, 27], тогда как лигнины хвойных пород состоят только из G-звеньев (с небольшим количеством H-единиц) [21, 26, 28, 29]. Для лигнинов травянистых растений характерно наличие всех трех типов структурных единиц с содержанием H-звеньев около 2 % [22, 30, 31]. Структура лигнинов травянистых растений является наименее изученной.

Для макромолекул лигнина характерны нерегулярность строения и поливариантность связей, поэтому однозначно описать макромолекулу лигнина простой комбинацией связей нескольких монолигнолов невозможно.

Исследования структуры лигнина исторически были сосредоточены на полимеризационных процессах, вопросах структурных разветвлений этого процесса и на том, как эти структурные изменения влияли на последующую переработку. Из множества существующих моделей строения макромолекулы лигнина, схема, предложенная Фрейденобергом в 1965 г. [32] (рис. 6) долгое время считалась наиболее близкой к протолигнину, хорошо согласовалась с аналитическими данными, а также объясняла основные свойства и реакции лигнина.

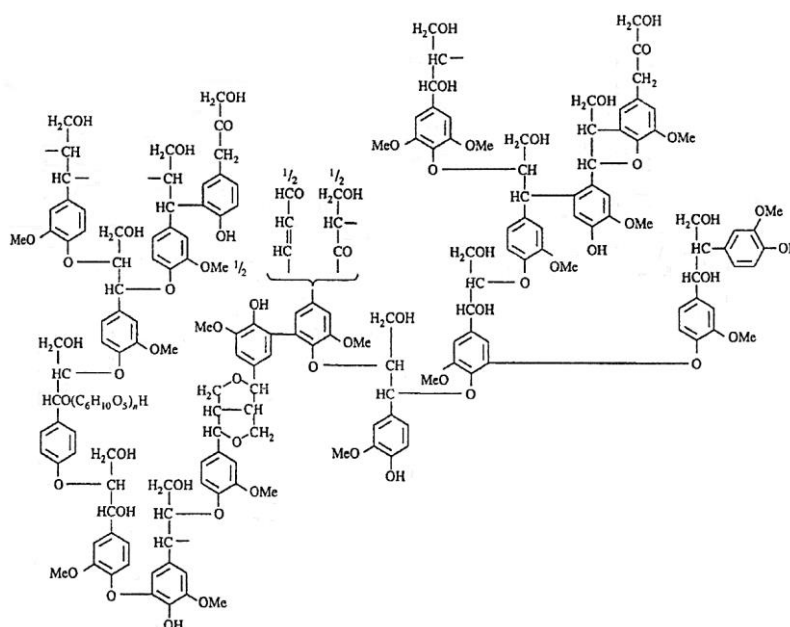


Рисунок 6 – Структурная модель макромолекулы лигнина хвойных пород древесины по Фрейденобергу [32]

Структурная модель лигнина по Фрейденбергу включает 18 фенолпропановых единиц и отражает соотношение основных типов структурных единиц, связей и функциональных групп. Однако применение современных более мощных аналитических методов позволяет совершенствовать существующие представления о структуре макромолекулы лигнина.

В недавнем обзоре группа исследователей под руководством Дж. Ральфа [33] предложила обобщенную схему репрезентативных структур лигнина (рис. 7) для трех основных классов растений. Авторы изобразили фрагменты макромолекул лигнина в линейной форме, что вызвало много вопросов и споров.

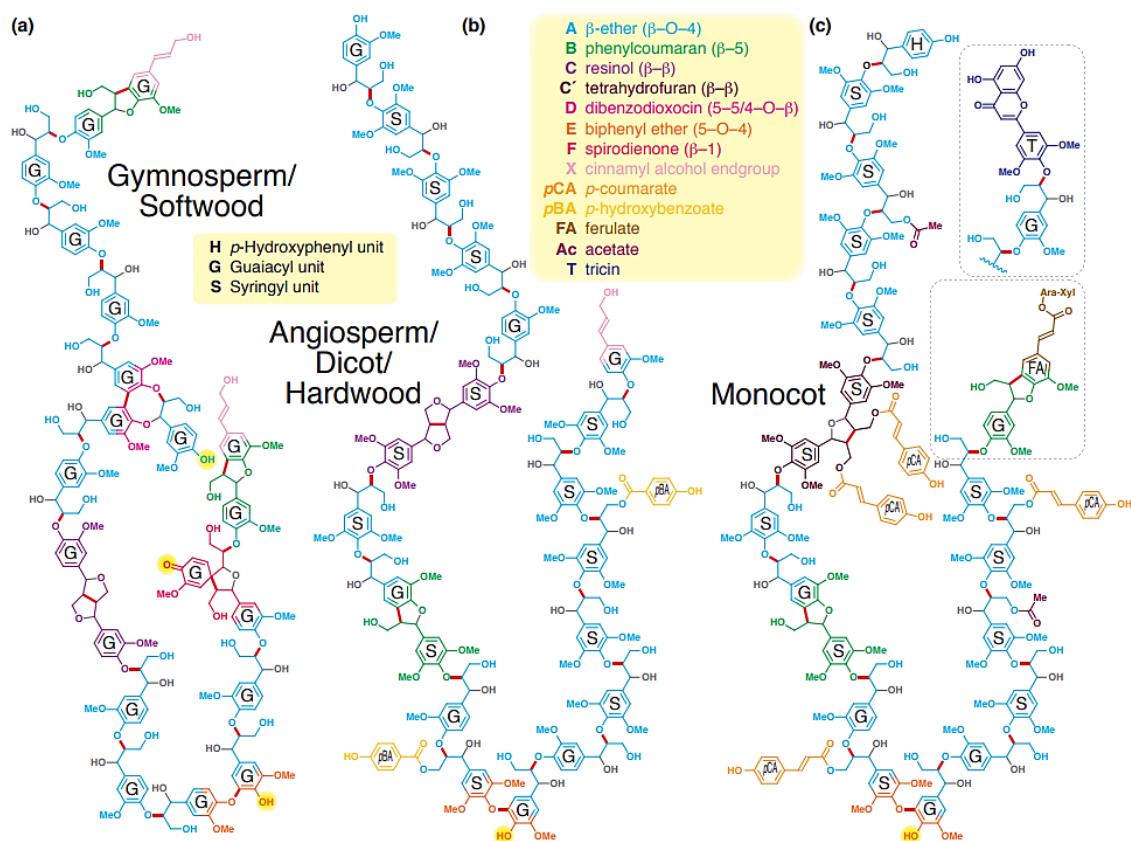


Рисунок 7 – Модельные структуры лигнина. 20-мерные модели лигнина показаны для: (а) голосеменных/хвойных растений, (б) покрытосеменных/лиственных растений и (с) однодольных растений [33]

В 2020 году исследовательская группа М.Ю. Балакшина [34] поставила под вопрос представление о «линейности» структур лигнина. Было установлено, что ~36 % структур лигнина участвуют в разветвлении и сшивании. Результаты показали, что примерно половина разветвлений и сшивающих связей включает ароматические кольца, преимущественно 5-5'-этерифицированные звенья; при этом значительное количество связей расположено в боковых цепях. Количественный анализ методом ^{13}C ЯМР позволил предположить, что ответвления включают различные типы алифатических эфиров (алкил-О-алкил) в α - и γ -положениях боковой цепи с неповрежденными связями β -О-4. Таким образом, существующая теория лигнификации не согласовалась с наличием указанных фрагментов. Авторы предложили количественную структурную модель макромолекулы лигнина ели (рис. 8), которая полностью подтвердила имеющиеся в настоящее время структурные данные [34].

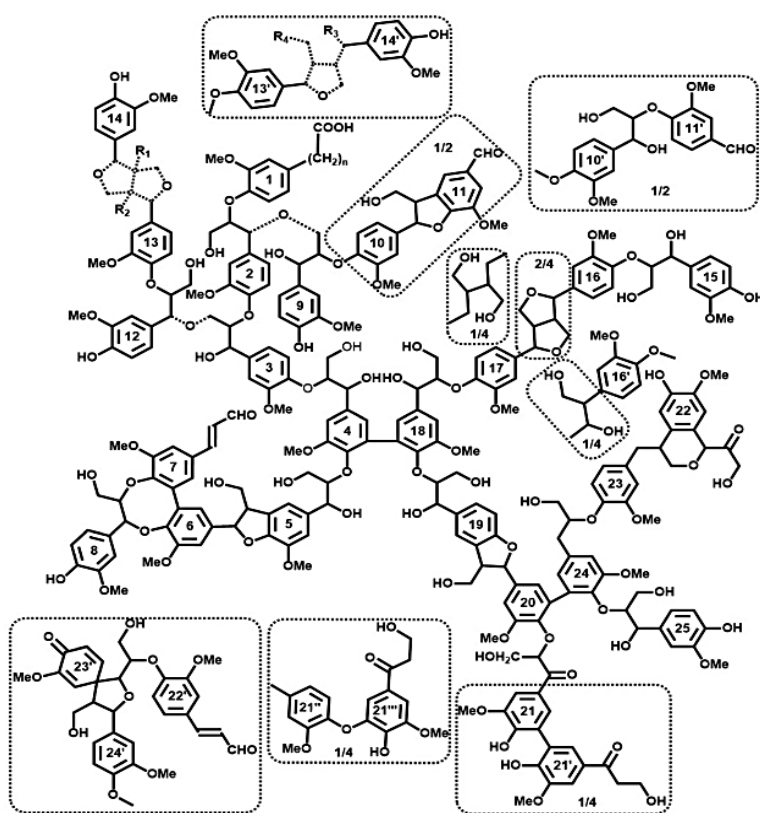


Рисунок 8 – Структурная модель макромолекулы лигнина ели, предложенная Балакшиным [34]

Тем не менее, ни одна из существующих моделей не может однозначно описать структуру макромолекулы лигнина в целом, поскольку большое видовое разнообразие, условия произрастания, а также способы обработки сырья приводят к специфическим структурным особенностям. Вариации фрагментного состава трактуют конечные свойства материалов на основе лигнина, и для каждого вида растительного сырья должны рассматриваться отдельно.

1.2.1 Фрагментный состав лигнина

Для выявления типов связей между структурами, лигнин обычно разрушают до низкомолекулярных фрагментов (мономеров, димеров и олигомеров) и затем анализируют с использованием различных инструментальных методов. На основе этих методов в сочетании с компьютерным моделированием были определены типы связей и их относительное содержание в макромолекуле лигнина. На рисунке 9 суммированы основные типы связей в нативном лигнине и лигноуглеводном комплексе. Среди них β -O-4, β - β , β -5 и 5-5'. Связи типа β -1, 4-O-5, дифенил и α -O-4 встречаются реже и обычно не превышают 10 % от общего количества связей [35]. Относительное содержание каждого типа связи зависит от вида биомассы, метода выделения препаратов лигнина и метода анализа [36].

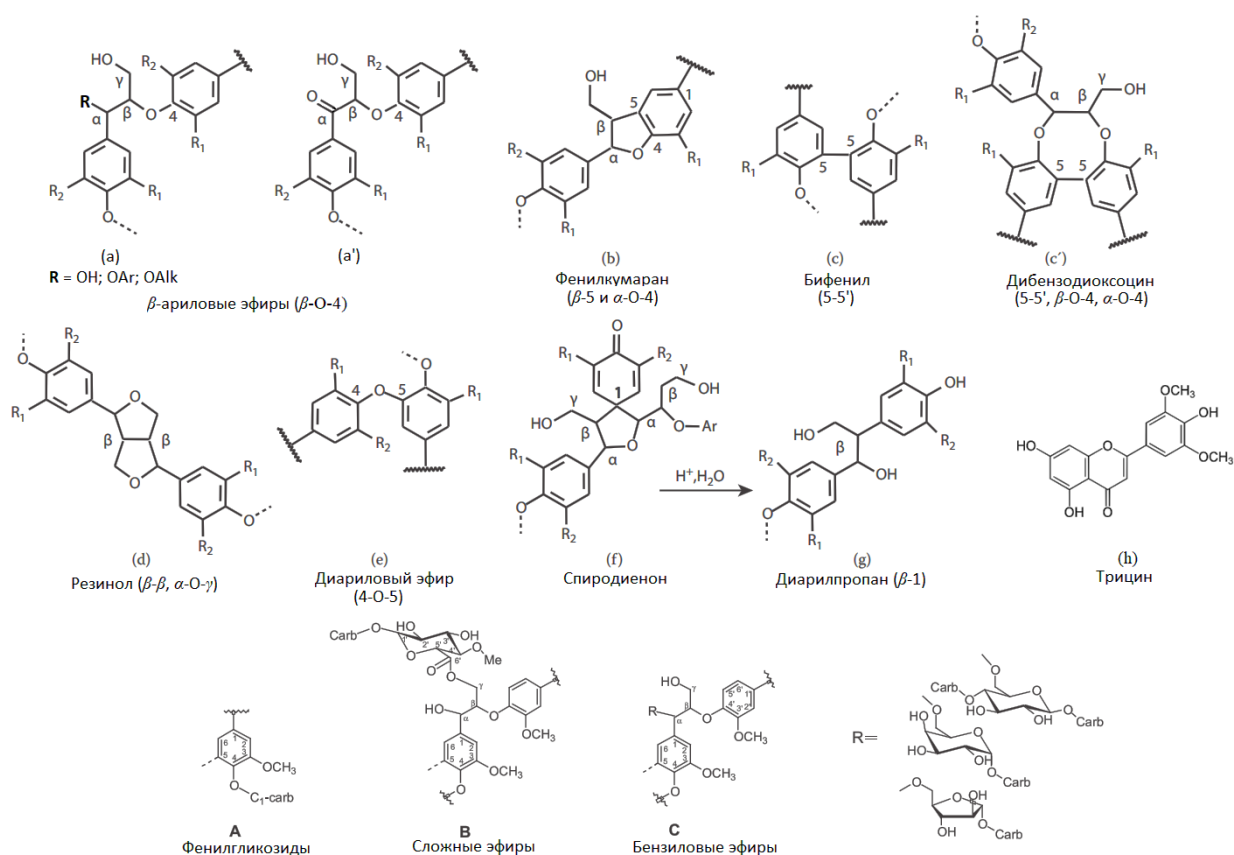


Рисунок 9 – Основные структурные фрагменты нативных лигнинов (a-g) и основные лигноуглеводные связи (A-C) [24, 40]

β -арилловый эфир (β -O-4)

Установлено, что преобладающими фрагментами, обнаруженными в лигнине, являются структуры β -арилового эфира (структуры *a* и *a'*, рис. 9) и составляют от 40 до 65 % всех связей в лигнинах древесины [35, 37]. Адлер и соавт. [38] сообщили, что структура β -арилового эфира разрушается до кетонов Гибберта посредством ацидолиза и оценили содержание β -O-4 связей в лигнине ели на уровне 25-30 на 100 ФПЕ. Лапьер и др. [39] обнаружили, что тиацидолиз специфически расщепляет структуру β -арилового эфира и сообщили как о количестве связей β -O-4, так и об отношении S/G/H единиц для лигнинов, выделенных их различного вида биомассы, включая травянистые растения.

Кроме того, количество β -O-4-связей можно надежно устанавливать с использованием спектроскопических методов анализа. Так, с помощью 1H

ЯМР можно быстро оценить содержание β -О-4, например, для ацетилизованного лигнина. Количественная ^{13}C ЯМР спектроскопия позволяет анализировать недереватизированные образцы лигнина. Относительно недавно было показано, что усовершенствованный метод HSQC двумерной ЯМР спектроскопии позволяет определять относительное содержание β -О-4-связей в цельной клеточной стенке [40-42]. Для лигнина хвойных пород количество β -О-4-связей определено на уровне 45 на 100 ФПЕ, для лигнина лиственных пород – 60-65 на 100 ФПЕ [40].

Основываясь на результатах спектроскопических методов и методов химического разложения подтверждено, что звено β -арилового эфира является преобладающим типом связи между структурами лигнина и имеет решающее значение в процессах деполимеризации [40].

Резинол (β - β)

Структура пинорезинола (структура *d*, рис. 9) была впервые обнаружена в полимере, образованном путем ферментативной дегидрирующей полимеризации кониферилового спирта [43], в то время как другие звенья резинола, такие как сирингарезинол, эписирингарезинол, ларицирезинол и диметоксиларицирезинол также были выделены из перколяционного гидролизата и продуктов гидрирования лиственной древесины [44]. Относительное содержание β - β -связей составляет 2 на 100 ФПЕ для лигнина ели и 3-5 на 100 ФПЕ для лигнина березы [31, 34]. На основании количественных данных отмечено, что лигнин древесины лиственных пород содержит больше резинольных структур, чем лигнины хвойных пород, а в лигнине кукурузы и вовсе отсутствуют [42].

Фенилкумаран (β -5)

Структура фенилкумарана (структура *b*, рис. 9) была впервые обнаружена при анализе гидролизата диоксан-вода (1:1, об/об) [45]. Путем количественного определения структуры фенилкумарона в УФ-видимой области, которая была преобразована из структуры фенилкумарана при

ацидолизе, было определено, что содержание β -5-связи составляет 11 на 100 ФПЕ [46]. На основании количественного анализа изогемипиновой кислоты после окисления перманганатом калия, количество β -5 звеньев было также оценено как 5 на 100 ФПЕ для лигнина березы и 9-12 на 100 ФПЕ для лигнина ели [47]. Спектры HSQC ЯМР образцов цельных клеточных стенок показали, что у тополя меньше единиц β -5, чем у сосны, а лигнин кукурузы не имеет структур фенилкумарана [42].

Бифенил (5-5')

Структура бифенила (структура *c*, рис. 9) подтверждена выделением дегидродиванилина из продуктов нитробензольного окисления [47]. Другие бифенильные димеры также были обнаружены в продуктах гидронолиза. Различить полностью этерифицированные, полуэтерифицированные и неэтерифицированные 5-5' фрагменты очень сложно, что приводит к неопределенности в отношении наличия и относительного количества этих структур в лигнине. Примечательно, что в лигнинах хвойных пород содержание 5-5' связей может достигать 24-27 на 100 ФПЕ, в то время как в лигнинах лиственных пород это значение не превышает 9 на 100 ФПЕ [31, 48].

Степень конденсации является важной характеристикой лигнина, поскольку она часто коррелирует (отрицательно) с реакционной способностью лигнина. Определение фрагментов конденсированного лигнина, встречающегося в литературе, не всегда ясно. Чаще всего структуры конденсированного лигнина представляют собой фрагменты лигнина, связанные с другими звеньями лигнина через 2, 5 или 6 положения ароматического кольца (в *H*-звеньях также положение С3) [49]. Наиболее распространенными конденсированными структурами являются структуры 5-5', β -5 и 4-О-5. Так как С5 положение сирингильного ароматического кольца занято метоксильной группой и не может участвовать в конденсации, лигнины лиственных пород менее конденсированы, чем лигнины хвойных пород [40, 50].

Бруноу и его коллегами было обнаружено, что некоторые структуры бифенила участвуют в 8-членных кольцевых структурах дибензодиоксицина [50].

Дибензодиоксицин (5-5'/ β -O-4) и спиродиенон (β -1/ α -O- α)

Структура дибензодиоксицина (структура *c'*, рис. 9) была обнаружена Кархуненом и соавт. [51] в лигнине хвойной древесины с помощью методов двумерной ЯМР-спектроскопии. Эта структура в малых количествах также была обнаружена в лигнине механического размола лиственной древесины [52]. Позже, используя конфокальную лазерную сканирующую флуоресцентную микроскопию, Куккола и др. обнаружили, что дибензодиоксицин локализуется в слое S3 клеточной стенки ксилемы ели и березы [53].

До сих пор ведутся споры об относительной важности некоторых типов связей, количество которых варьируется в зависимости от используемого метода анализа. Так, например, продукты деструкции со скелетом диарилпропана (структуры *f* и *g*, рис. 9) извлекаются в значительном количестве, когда нативные лигнины подвергаются ацидолизу [54] или тиацидолизу [55], тогда как другие исследования [56, 57] выявили лишь небольшое количество этих структур. Установлено, что в нативных лигнинах структуры спиродиенона превращаются в 1,2-диарилпропановые структуры, когда лигнины подвергаются гидролитическим или кислотным условиям [20]. Диеноновая гипотеза, предложенная еще в 1965 году для объяснения образования β -1 связей, теперь подтверждается ЯМР сигналами спиродиеноновых структур [20, 31]. Согласно исследованиям с использованием методов одномерной (1D) и двумерной (2D) ЯМР спектроскопии было обнаружено, что спиродиеноновая структура является преобладающей формой β -1 связей, присутствующих в нативном лигнине как хвойной, так и лиственной древесины. Спирудоиеноновая структура

гваяцильного типа характерна для хвойных пород, сирингильного типа – для лиственных и определяется в количестве 3-4 на 100 ФПЕ [58].

Флавоноидные структуры

Недавно флавоноид трицин (структура *h*, рис. 9) был идентифицирован на спектрах HSQC ЯМР лигнинов однодольных растений [59, 60]. Однако механизм вовлечения трицина в структуру лигнина и его роль оставалась неизвестной. В 2016 году группа исследователей под руководством Дж. Ральфа [61] показала существенные результаты о том, что трицин включается в лигнины однодольных растений через механизм свободно-радикального связывания и между трицином и макромолекулой лигнина существует ковалентная связь β -O-4. Авторы предположили, что трицин служит инициатором роста полимерной цепи лигнина в однодольных растениях. Это послужило доказательством существования иного пути биосинтеза лигнина. Количество трицина, интегрированного в лигнин, было определено на уровне 3,3 на 100 ФПЕ [61].

Ритгер и Рассел в своих исследованиях получали данные, подтверждающие полифлавоновую структуру для голосеменных растений. Данные по метилированию и ацетилированию допускали присутствие флавоновой кольцевой структуры в лигнине. Однако предложенные ими структуры были отвергнуты исследователями химии лигнина [62]. Современные методы спектроскопии ЯМР позволили идентифицировать фрагменты дигидрокверцетина в структуре лигнина лиственницы [63]. Из-за структурной аналогии флавоноидов, трицин-лигниновые структуры были переименованы во флавонолигнинные единицы [61].

Связи между лигнином и углеводами

Известно, что лигнин в древесине связан с полисахаридами, в основном через гемицеллюлозы (рис. 1) [64]. Основными типами лигноуглеводных связей в древесине являются фенилгликозидные связи (структура *A*, рис. 9),

сложные эфиры (структура В, рис. 9) и бензиловые эфиры (структура С, рис. 9) [44, 65, 66].

Для выделения и анализа лигноуглеводного комплекса использовались различные методы деградации. Этот подход включает расщепление связей лигнин-углевод и последующую идентификацию продуктов щелочного гидролиза, кислотного гидролиза, расщепления по Смитту и др. [44]. Однако большинство этих методов дают информацию только об углеводной составляющей и не дают прямых доказательств наличия лигноуглеводных связей. Использование спектроскопических методов затрудняется из-за сильного перекрывания сигналов различных структур.

Использование методов двумерной ЯМР-спектроскопии дает большое преимущество в анализе лигноуглеводного комплекса, предлагая прямое наблюдение связей различных типов [66]. Применение данного метода позволило впервые обнаружить фенилгликозидные связи в препаратах, выделенных из сосны и эвкалипта [65, 67]. Другим важным открытием было обнаружение γ -эфира лигноуглеводной связи вместо обычно считающихся бензил(α -)сложных эфиров [65]. Кроме того, с помощью методов 2D-ЯМР спектроскопии доказано наличие бензилэфирных связей между лигнином и различными углеводными участками в образцах как нативных, так и технических лигнинов [65, 68]. Присутствие стабильных лигноуглеводных связей в нативных лигнинах является одной из основных причин, препятствующих селективному разделению компонентов древесины в процессах биорефайнинга, поэтому в настоящее время разрабатываются варианты использования функциональных гибридов лигнина и углеводов для производства высокоценных продуктов [40, 69].

1.2.2 Функциональный состав лигнина

Лигнин характеризуется наличием функциональных групп различных типов (рис. 10). К ним относятся ароматические и алифатические гидроксильные группы, метоксильные группы, карбоксильные и

карбонильные группы. Количество этих групп напрямую влияет на реакционную способность лигнина.

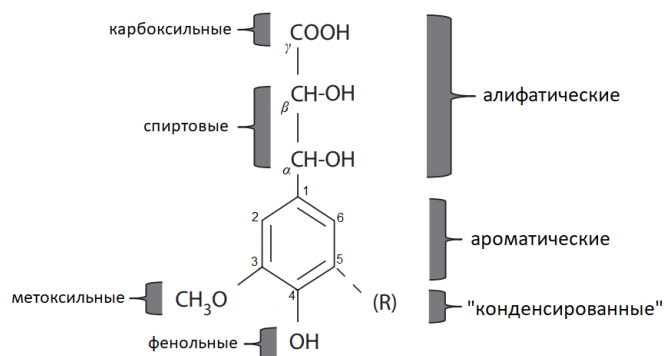


Рисунок 10 – Функциональные группы лигнина [24]

Метоксильные группы

Метоксильные группы являются характерными для всех лигнинов и их содержание сильно варьируется в зависимости от метода выделения лигнина и от вида растения. В лигнинах хвойных пород древесины общая массовая доля метоксильных групп 14–16 %. В лигнинах лиственных пород древесины содержание метоксильных групп составляет 17–22 % [70]. В лигнинах трав – колеблется от 12 до 22 % [71].

Данные группы содержатся почти в каждой арилпропановой структурной единице. В гваяцилпропановых звеньях метоксильные группы присоединены к третьему углеродному атому, а в сирингилпропановых звеньях – к третьему и пятому углеродным атомам ароматического кольца [3, 9, 16, 70].

Содержание метоксильных групп в образце лигнина является качественным показателем при оценке чистоты препарата, поскольку препараты лигнина часто содержат примеси неметоксилированных веществ, в основном углеводов. Кроме того, при определении содержания гидроксильных групп методом метилирования необходимы данные о количестве метоксильных групп [72]. Таким образом, определение

содержания метоксильных групп необходимо практически во всех исследованиях химических превращений лигнина.

Гидроксильные группы

Макромолекула лигнина содержит фенольные и спиртовые (алифатические) гидроксильные группы. Они могут быть как в свободном состоянии, так и в связанном. Общее содержание гидроксильных групп составляет примерно 10–11 % от массы лигнина [22].

- Фенольные гидроксилы. Каждая молекула мономеров лигнина содержит один фенольный гидроксил (рис. 5). Однако в лигнинах массовая доля фенольных гидроксильных групп невелика (1–3 %). Фенольные гидроксилы играют важную роль как в процессах биосинтеза лигнина [73], так и в реакциях деполимеризации [74]. Содержание фенольных гидроксильных групп варьируется в зависимости от способа выделения препаратов лигнина, а также метода их последующего анализа. Так, например, для лигнина Бьеркмана, наиболее близкого к протолигнину, Фрейденберг и Нейш определили содержание фенольных групп в пределах от 0,30 до 0,35 на 1 ФПЕ [21, 75]. Для лигнинов Браунса указывается величина от 0,46 до 0,48 на 1 ФПЕ [76]. Фенольным гидроксильным группам лигнина присущи все свойства фенолов. Наибольшее практическое значение в химии лигнина имеет реакция образования фенолятов под действием щелочей, которая играет важную роль при варке целлюлозы щелочными способами [3].

- Алифатические (спиртовые) ОН-группы. Гидроксильная группа в C_{α} -положении (бензилспиртовая) в сочетании со свободной ОН-группой в *пара*-положении наиболее реакционноспособна. Общее количество гидроксильных групп бензилового спирта составляет 0,2 на 1 ФПЕ; около трети из них находятся в звеньях, содержащих свободную фенольную ОН-группу. Количество гидроксильных групп в C_{γ} -положении составляет примерно 0,84 на 1 ФПЕ [29].

Существует несколько аналитических методов, позволяющих количественно определять гидроксильные группы в лигнинах [77]. Например, УФ-спектроскопия [78], амиолиз [79], ацетилирование с последующим определением методом количественной ^{13}C ЯМР спектроскопии [77]. Сравнительно недавно был разработан количественный метод ^{31}P ЯМР спектроскопии для оценки содержания в лигнинах гидроксильных групп различных типов [80].

Карбонильные группы

В боковых цепях лигнина есть несколько типов карбонильных групп. Они входят в состав кетонов ($\text{R}-\text{CO}-\text{R}'$), альдегидов ($\text{R}-\text{CHO}$), карбоновых кислот ($\text{R}-\text{COOH}$) и хиноидных группировок. Общее количество карбонильных групп в малоизмененном лигнине примерно равно 0,2 на 1 ФПЕ (или 3,06 % от массы лигнина) [81].

Альдегидные группы находятся только в γ -положении (0,04 на 1 ФПЕ), т. е. на конце пропановой боковой цепи, кетонные – в α - и β -положениях. СО-группы при C_α (например, в пропиогваяконе) и при C_γ в структурах типа кониферилового альдегида называются сопряженными карбонильными группами. Структуры типа $\text{C}_\beta=\text{O}$ называются несопряженными [77]. Высокая реакционная способность альдегидных групп обусловлена наличием полярной двойной связи с большим дипольным моментом, а также объясняется поляризуемостью электронного облака кратных связей [82].

Карбоксильные группы (COOH) не представлены ни в формуле Фрейденберга (рис. 6), ни в структурных моделях Ральфа (рис. 7), и вопрос об их наличии в природном лигнине окончательно не решен. На основании ИК-спектроскопических исследований некоторые авторы считают, что содержание COOH групп в лигнине Бьеркмана составляет около 0,05 на 1 ФПЕ. Карбоксильные группы приобретаются лигнином в процессе делигнификации. Так, в процессе щелочной делигнификации содержание

COOH-групп повышается до 0,15-0,16 на 1 ФПЕ. Необходимо отметить, что COOH-группы оказывают влияние не только на гидрофильность лигнина, но и влияют на реакционную способность других функциональных групп [82]. Кроме того, карбоксильные группы могут образовывать внутри- и межмолекулярные водородные связи с другими функциональными группами макромолекулы лигнина и тем самым способствовать увеличению сетчатости лигнина [83].

1.3 Некоторые физические свойства лигнина

Физические свойства лигнина (термические, механические) зависят, в большей степени, от его химического состава. Лигнин содержит как гидрофильные функциональные группы, так и липофильный углеродный скелет, что говорит о возможном сродстве как к водной, так и органической фазам [84].

Исследование растительных биополимеров в качестве сорбентов в настоящее время является перспективным направлением химической технологии. В зависимости от исходного сырья и метода выделения, лигнины имеют различное строение и разное соотношение функциональных групп, ответственных за сорбционные свойства.

Развитая внутренняя и внешняя поверхности лигнина, а также наличие специфических взаимодействий с растворенными веществами свидетельствуют о проявлении сорбционных свойств по отношению к газам, жидкостям и растворенным веществам. Результаты исследований [85, 86] показывают, что лигнин может быть хорошим адсорбентом в широком диапазоне концентраций. Однако до сих пор возникают существенные споры о том, является ли поглощение лигнином сорбата процессом простой физической адсорбции или комбинацией процессов физической и химической сорбции.

По мнению некоторых исследователей, несмотря на меньшее содержание OH-групп в лигнинах, некоторые лигнины поглощают примерно

столько же воды, сколько и целлюлоза [87]. Изотермы сорбции воды, как установили Макнайт и Мейсон [88] проявляют характерный гистерезис, что свидетельствует о различном характере капиллярно-пористой структуры лигнинов, выделенных из древесины растворением углеводов, и лигнинов, выделенных экстракцией с последующим осаждением из раствора. У первых большую роль в поглощении водяного пара играет капиллярная конденсация, и они сорбируют больше воды, чем другие, у которых капиллярная конденсация выражена слабо. При относительной влажности воздуха 60 % равновесная влажность лигнинов может достигать 8 %.

Хорошие сорбционные свойства лигнинов проявляются также по отношению к SO_2 , парам метанола и этанола, бензол сорбируется значительно хуже. Макнайт и Мейсон проводили сорбцию SO_2 периодатлигнином и установили, что небольшая часть газа прочно абсорбировалась за счет хемосорбции [88]. Клейнерт и Маррачини [89] применяли сорбцию SO_2 из раствора для измерения внутренней поверхности лигнина. Авторы обнаружили, что сорбция полностью обратима, и наблюдается заметное уменьшение поверхности в результате коалесценции лигнина при нагревании древесины в воде при 180-185 °С. Сушка при температуре выше 100 °С приводит к снижению сорбционной емкости, особенно для образцов с высокой влажностью. Сорбция способность также уменьшается после нагревания лигнина с водой при 150 °С [88].

Лигнины проявляют и катионообменные свойства. Первые публикации были сделаны Ведекиндом и Герри [90, 91], которые изучали поглощение лигнинами соляной и серной кислот, гидроксидов калия и аммония, иода в растворе иодида калия. Было высказано предположение, что поглощение изменяется линейно в зависимости от соотношения растворенного вещества и лигнина и что процесс частично обратим с кислотами, но не обратим со щелочами. Было также сказано, что ассимиляция соляной кислоты вызвана образованием твердого раствора, а не адсорбцией, тогда как поглощение гидроксида калия и гидроксида аммония включало химическую связь между

основанием и лигнином. Авторы также изучали сорбцию красителей и было замечено, что красители полностью поглощались лигнином. В этом отношении лигнин сильно отличается от целлюлозы, которая не фиксирует кислотно-щелочные красители [92].

Кроме того, группой исследователей под руководством Косякова Д.С. широко исследована способность лигнина сорбировать компоненты ракетного топлива [93, 94].

Таким образом, помимо развитой поверхности, сорбционные свойства лигнинов обусловлены наличием и количеством функциональных групп, выступающих в качестве сорбционных центров. При этом разные функциональные группы в структуре полимера проявляют разную сорбционную способность, и изучение распределения сорбата по центрам сорбции необходимо для понимания влияния специфических структурных особенностей лигнинов различных растений, а также для прогнозирования свойств вторичных продуктов на основе лигнина.

1.4 Методы выделения препаратов лигнина

Методы выделения лигнина были классифицированы, описаны и детально проанализированы Перлом [95], Лаем и Сарканеном [22], Фенгелем и Вегенером [96] в нескольких академических монографиях. По существу, процедуры выделения лигнина классифицируются в соответствии с тем, переходит лигнин в раствор или нет в процессе извлечения. В «идеальном» методе лигнин должен извлекаться количественно, не содержать примесей нелигнинной природы и химически не модифицироваться. Однако, ни один из доступных в настоящее время методов не удовлетворяет этим требованиям [77].

Тем не менее, несколько методик были одобрены как наиболее близкие к указанным требованиям, среди них препараты лигнина, выделенные по методу Браунса [97], Бьёркмана [98] и Пеппера [99].

В таблице 1 сведены наиболее применяемые методы выделения препаратов лигнина.

Таблица 1. Методы извлечения препаратов лигнина

Препарат лигнина	Методология извлечения	Примечания
Лигнин Бьеркмана (лигнин механического размола; ЛМР; MWL) [77, 98, 100]	Экстракция тонкоизмельченной древесины водным диоксаном	Выход ~20 %; считается репрезентативным образцом нативного лигнина
Ферментный лигнин измельченной древесины (MWEL) [77, 101]	Выделяется остаток после ферментного гидролиза углеводов в тонкоизмельченной древесине	Выход >80 %, но содержит 10-12 % углеводных примесей. Не полностью растворим в типичных растворителях для лигнина
Целлюлолитический ферментный лигнин (CEL) [100, 102]	Фракционирование MWEL, основанное на растворимости лигнина в водном диоксане	Растворимая фракция MWEL; низкий выход
Нативный лигнин Браунса [76, 97]	Экстракция опилок этанолом при комнатной температуре	Низкий выход; низкомолекулярная фракция лигнина
Лигнин Пеппера (диоксанлигнин; ДЛ) [76, 99]	Экстракция водным диоксаном при нагревании в присутствии соляной кислоты	Сравнительно мягкие условия выделения; деполимеризация лигнина в ходе ацидолиза
Технические лигнины (крафт и сульфитный) [3, 100]	Растворение лигнина при высокой температуре и давлении с помощью химикатов	Не являются представителями природного лигнина; основные побочные продукты производства целлюлозы на ЦБП
Лигнин Класона [3, 77]	Нерастворимый конденсированный остаток после гидролиза полисахаридов серной кислотой	Не является представителем природного лигнина; используется для оценки содержания лигнина в древесине

Наиболее известным препаратом лигнина является лигнин Класона, который получают путем обработки древесины серной кислотой [3, 77, 100]. Полисахариды гидролизуются до водорастворимых сахаров, а лигнин выделяют в виде нерастворимого осадка. Несмотря на то, что этот метод выделения лигнина широко используют в качестве аналитического средства определения общего содержания лигнина в древесине, получаемый препарат не подходит ни для структурной характеристики, ни для исследования биологической модификации и деградации в силу высокой конденсированности и сильного структурного преобразования в процессе извлечения [100].

Самым используемым препаратом лигнина является лигнин Бьёркмана, также известный как лигнин механического размола (ЛМР) [98]. ЛМР выделяют из водного диоксанового экстракта тонкоизмельченной древесины, предварительно экстрагированной органическими растворителями для удаления посторонних компонентов. Считается, что ЛМР является репрезентативным образцом протолигнина и подходит для большинства структурно-химических и биологических исследований. ЛМР может быть получен с выходом 20-30 % от общего количества лигнина. Несмотря на преимущества данного метода, процедура извлечения ЛМР достаточно трудоёмка и получаемый препарат нельзя назвать истинным протолигнином, так как его структурные особенности напрямую зависят от процедуры шарового измельчения [77]. Препарат ЛМР без очистки считается наиболее подходящим для исследования структуры лигноуглеводного комплекса [66].

Древесину, измельченную в шаровой мельнице (как для экстракции ЛМР), можно обработать полисахаридазными ферментами для растворения углеводных компонентов. Таким образом, образуется остаток, который содержит почти весь лигнин древесины. Этот лигнин, называемый ферментным лигнином измельченной древесины, является наиболее представительным из всех типов препаратов [66, 77, 103]. Его выход может достигать 95 % от общего количества лигнина [100]. Однако данный препарат содержит относительно высокое остаточное содержание углеводов (10-12 %), ковалентно связанных с фрагментами лигнина. Кроме того, из-за своей высокой молекулярной массы он не полностью растворим в обычных растворителях лигнина, таких как водный раствор диоксана, уксусная кислота, диметилформамид и диметилсульфоксид, что создает экспериментальные трудности при обработке, очистке и анализе [100].

Одним из препаратов лигнина, для которого не требуется какое-либо интенсивно измельчающее оборудование, является лигнин Браунса (также известный как нативный лигнин Браунса). Древесные опилки сначала экстрагируют холодной водой, а затем эфиром для удаления посторонних

компонентов. Последующая стадия экстракции 95 % этанолом и несколько ступеней очистки дают нативный лигнин Браунса [3, 97]. Препарат впервые был выделен Браунсом в 1939 году из еловых опилок и считалось, что в таких условиях не происходит химических изменений лигнина. Однако дальнейшие исследования показали, что нативный лигнин Браунса представляет собой не истинный лигнин, а лишь его низкомолекулярную фракцию или же вовсе смесь полифенолов, не имеющую сетчатой структуры и связей с углеводами [3]. Кроме того, низкий выход препарата (около 8 % от общего лигнина) не позволяет назвать его репрезентативным [76, 97].

Альтернативой лигнинам механического размола являются органосольвентные лигнины. К ним относятся этаноллигнин, диоксанлигнин, уксуснокислотный и муравьинокислотный лигнины, феноллигнин и др. Эти препараты отличаются сравнительно мягкими условиями выделения, в которых исходное сырье обрабатывается водными органическими растворителями в присутствии кислотного катализатора. Одним из достоинств органосольвентных лигнинов является простота и экспрессность их извлечения. Из этой группы препаратов наибольшую известность получил диоксанлигнин (ДЛ), который долгое время считался наиболее близким к природному. Впервые ДЛ был получен Пеппером в 1959 году [99]. Принцип метода заключается в обработке древесины смесью диоксан-вода (9:1) в присутствии 0,5 % соляной кислоты при кипячении. Выход ДЛ составляет около 15 % от общего количества лигнина для хвойной древесины и 20-35 % для лиственной [3].

Диоксанлигнин широко используется исследователями для изучения структуры, свойств и реакций лигнина [104-106]. Однако данный препарат также не может считаться нативным. В процессе ацидолиза протекают две конкурирующие реакции – это гидролитическая деструкция основных связей в лигнине (β -O-4) и конденсация, приводящая к образованию новых С-С связей [3]. Вследствие чего характеристика ДЛ затруднена и требует внесения поправок, учитывающих коэффициенты деградации и сшивания.

Таким образом, на сегодняшний день не существует идеального селективного метода извлечения лигнина и выбор того или иного метода зависит от конкретных целей и задач исследования.

1.5 Методы изучения структуры лигнина

Анализ структуры лигнина является важной проблемой в химии древесины и целлюлозы. Аналитические методы определения характеристик лигнина делятся на две основные группы: разрушающие (деструктивные) и неразрушающие (недеструктивные) методы.

К деструктивным методам относятся тиацидолиз [107], окисление нитробензолом [77, 108] и дериватизация с последующим восстановительным расщеплением [59, 109]. Продукты реакций затем детектируются с использованием современных инструментальных методов, в частности масс-спектрометрии высокого разрешения [59]. Применение данных методов позволяет получить информацию о составе отдельных фенилпропановых единиц лигнина, но не даёт представление о структуре макромолекулы лигнина в целом.

К неразрушающим методам относятся различные спектроскопические методы, например, инфракрасная спектроскопия с фурье-преобразованием и методы ядерного магнитного резонанса. Детальный обзор этих методов описан в нескольких обзорных статьях и академических монографиях [110, 111].

Электронная спектроскопия (УФ-спектроскопия) относится к абсорбционной спектроскопии в УФ-области (200–400 нм). Ароматическая природа лигнина приводит к сильному поглощению в УФ-области. Максимумы наблюдаются при 205 и 280 нм. Этот метод традиционно использовался для определения фенольных гидроксильных групп в препарате лигнина, для оценки чистоты препарата, определения кислоторастворимого лигнина, оценки антиоксидантной активности лигнина [3, 77, 111, 112], однако

в настоящее время УФ-спектроскопия используется всё реже, в силу наличия более информативных методов анализа.

Нативный лигнин в древесине слабо окрашен, что говорит о малом количестве в нем хромофорных групп. Хромофоры (сопряженные с бензольным кольцом двойные связи и карбонильные группы и др.) в лигнине накапливаются в процессе его выделения из древесины. Хинонные структуры различного типа являются хромофорами и способны поглощать в видимой области [3].

Инфракрасная (ИК) спектроскопия с 1948 г. широко применяется для исследования растительного сырья, в том числе для изучения природных, остаточных (технических) и перешедших в раствор лигнинов, полученных различными методами [28, 77, 113]. На первых этапах исследования лигнина методом ИК-спектроскопии проводился только качественный анализ спектров [28]. Развитие метода ИК-спектроскопии и появление методов внутреннего и внешнего стандартов, а также метода Фурье-преобразования, привело к возможности количественной оценки ИК-спектров древесины и ее производных [77].

ИК-спектр является индивидуальной характеристикой полимера, в том числе лигнинов. ИК спектры различных препаратов лигнина очень похожи. Группировки полос и их внешний вид настолько типичны, что ИК-спектры могут служить объективной характеристикой, позволяющей идентифицировать лигнин. Каждый тип связи поглощает излучение характерной для него частоты (длины волны) [114].

Прогрессивным методом изучения свойств лигнина является также метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), который позволяет определять молекулярную массу лигнина и исследовать его молекулярно-массовое распределение, форму молекул, поведение лигнина в растворе, процессы конденсации и деструкции его при выделении из древесного сырья [115].

На сегодняшний день масс-спектрометрические методы занимают одну из лидирующих позиций в изучении структуры и свойств лигнина [116, 117]. Масс-спектрометрия, которая обладает преимуществами с точки зрения скорости, специфичности и чувствительности, оказалась очень мощным инструментом в сочетании с большим количеством химических и термических методов деградации для выяснения структуры лигнинов [118]. Более того, недавняя разработка новых методов ионизации в масс-спектрометрии: ионизация электроспреем (ESI-MS) [119] и матричная активированная лазерная десорбция/ионизация (MALDI-MS) представила новые возможности для анализа цельной макромолекулы лигнина [120].

Хотя были достигнуты значительные успехи в области деструктивных методов, современное понимание состава и структуры макромолекулы лигнина основано на интерпретациях и экстраполяциях данных деградационных процессов, которые составляют только часть всего полимера [42]. ЯМР-спектроскопия оказалась надежным и всеобъемлющим методом в области химии древесины. Развитие методов ЯМР способствовало развитию исследований структурного состава лигнинов.

В настоящее время ЯМР является лидером среди недеструктивных методов анализа лигнина [121]. Методы ЯМР-спектроскопии способствовали определению структурных звеньев этого сложного полимера [24].

1.6 Спектроскопия ядерного магнитного резонанса

Явление ядерного магнитного резонанса, открытое в 1946 г. Блохом и Парселлом [122, 123], привело к созданию нового вида спектроскопии. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) является одним из наиболее информативных методов изучения строения и динамических превращений молекул, межмолекулярных взаимодействий, механизмов химических реакций и количественного анализа [124].

В основе спектроскопии ЯМР лежат магнитные свойства атомного ядра. Все ядра с нечетным числом протонов (^1H , ^2H , ^{14}N , ^{19}F , ^{31}P ...) или ядра с

нечетным числом нейтронов (например, ^{13}C) обладают магнитными свойствами, необходимыми для ЯМР. Ядра с четным числом как протонов, так и нейтронов (^{12}C , ^{16}O , ^{28}Si , ^{32}S ...) не обладают требуемыми магнитными свойствами [121, 124], следовательно, их нельзя исследовать методом ЯМР.

При изучении биологических систем наиболее интересны ядра ^1H , ^{13}C , ^{31}P и ^{19}F . Методы одномерной ЯМР спектроскопии, включая ^1H -, ^{13}C - и ^{31}P -ЯМР в растворе использовались для стандартного определения количества гидроксильных групп, межструктурных связей, количества S, G и H единиц в лигнине. На основе этих методов были составлены базы данных химических сдвигов для различных атомных группировок [125, 126].

1.6.1 Жидкостная ЯМР-спектроскопия

^1H ЯМР

Протонный ЯМР (^1H ЯМР) стал первым методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса, использованным для характеристики, классификации и определения структуры лигнина. В 1964 г. Людвиг и соавт. [127] опубликовали всестороннее ^1H ЯМР-исследование лигнинов и модельных соединений лигнина. ^1H ЯМР спектры ацетилированного лигнина использовали для определения различных гидроксильных групп.

В течение 1970-х и 1980-х годов произошли важные изменения, связанные с методами, используемыми для записи ЯМР спектров. Самым важным событием стало изобретение высокочастотных приборов с Фурье-преобразованием, которые позволили получить хорошо разрешенные ^1H ЯМР спектры и высокое отношение сигнал/шум. Эти усовершенствования позволили определять следовые количества (~0,1 %) некоторых звеньев лигнина (например, звеньев бензальдегида). Большой вклад внесла группа исследователей под руководством Лундквиста, которая опубликовала много работ о исследовании лигнинов методом ^1H ЯМР, тем самым установив надежность этого метода для первичной структурной характеристики лигнина [77, 128]. Однако из-за полимерной природы лигнина, разнообразия протонов

из различных структур и нерегулярности межструктурных связей в лигнине, сигналы на спектрах ^1H ЯМР (рис. 11) перекрываются и их трудно объяснить [128].

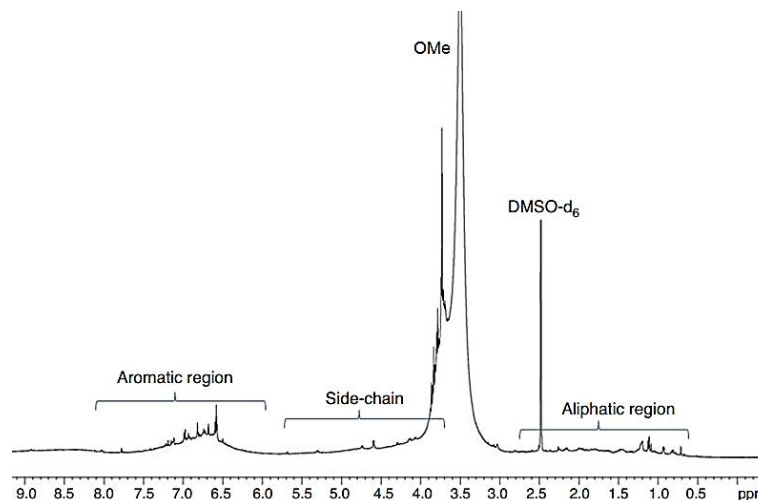


Рисунок 11 – Типичный ^1H ЯМР спектр лигнинов лиственных пород древесины [129]

^{13}C ЯМР

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса начала развиваться быстрыми темпами с момента появления первых коммерческих спектрометров в начале 1960-х годов и разработки сверхпроводящих магнитов, которые могут поддерживать более высокое стабильное магнитное поле, чем электромагниты. Параллельно разработка микропроцессоров для сбора сигнала и обработки данных в сочетании с более глубоким пониманием явления ядерного магнитного резонанса стимулировала развитие структурного определения многочисленных природных соединений и полимеров [130].

С развитием методов ЯМР в характеристике лигнина стал популярным метод ^{13}C ЯМР, который имеет ряд преимуществ по сравнению с ^1H ЯМР при определении структуры органических соединений. В ^{13}C ЯМР спектральные данные получают от «скелета» молекулы, а не от ее внешней части, как в ^1H ЯМР. Спектр ^{13}C ЯМР дает информацию о природе всех атомов углерода в

молекуле, в то время как спектр ^1H ЯМР не даст информации о природе четвертичных атомов углерода, например, в карбонильных группах. Второе преимущество заключается в том, что спектры ^{13}C ЯМР не осложнены спин-спиновым взаимодействием. Вероятность наличия в одной молекуле двух ядер ^{13}C , расположенных рядом друг с другом настолько мала (1/10000), что возможностью ^{13}C - ^{13}C взаимодействия можно пренебречь. Кроме того, импульсные последовательности для ^{13}C ЯМР спектроскопии позволяют получить спектры с протонной развязкой, устраняя возможность расщепления пиков [131]. Таким образом, для каждого ^{13}C -резонанса наблюдаются одиночные сигналы.

Третье преимущество заключается в том, что диапазон химических сдвигов большинства диамагнитных органических соединений в ^{13}C ЯМР составляет 240 м.д. по сравнению с 12 м.д. для ^1H ЯМР [132]. Это свидетельствует о лучшем разрешении и меньшем перекрытии сигналов в спектрах ^{13}C ЯМР органических соединений, что особенно выгодно при анализе природных полимеров, таких как лигнин (рис. 12).

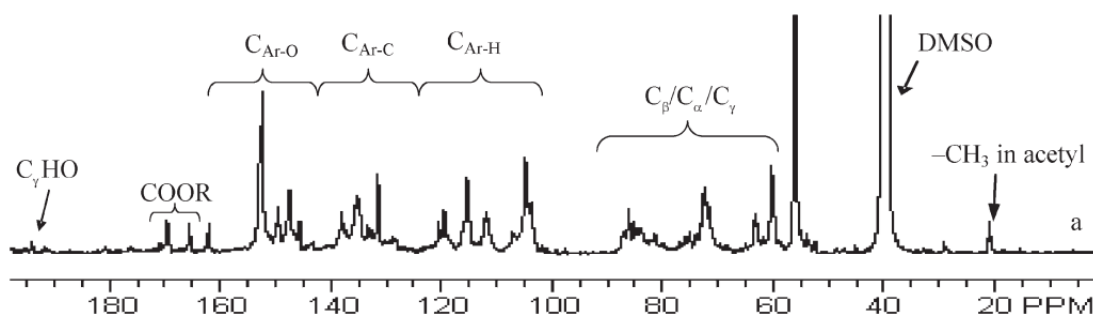


Рисунок 12 – Спектр ^{13}C ЯМР лигнина тополя [133]

С 1980-х годов было проведено много исследований лигнина методом ^{13}C ЯМР-спектроскопии, который является мощным инструментом, способным выявить большое количество структурной информации о лигнине, включая присутствие ариловых эфиров, а также конденсированных и неконденсированных ароматических и алифатических атомов углерода [77, 134, 135]. Было показано, что среди множества физических и химических

методов характеристики лигнинов, количественная ^{13}C ЯМР спектроскопия является одним из наиболее надежных и всеобъемлющих методов, особенно в части понимания структурных изменений полимера в процессах варки целлюлозы и других процессах выделения [136, 137]. Благодаря быстрому прогрессу в технологии ЯМР, сейчас трудно интерпретировать серьезные структурные исследования сложных молекул без него.

Однако из-за чрезвычайно низкого содержания изотопа ^{13}C в природе (~ 1,1 %) метод ^{13}C ЯМР гораздо менее чувствителен, поэтому для увеличения интенсивности сигналов ^{13}C ЯМР, особенно для количественного анализа, необходимо длительное время сбора данных (~ 19 ч) и высокие концентрации образца (~ 400 мг/мл), что ограничивает его применение [24]. Несмотря на такие препятствия, всегда был огромный интерес к ^{13}C ЯМР, поскольку углерод является основой органических соединений. Другим преимуществом ^{13}C ЯМР является большой диапазон химических сдвигов для углерода (около 250 м.д. по сравнению с примерно 10 м.д. для ^1H), позволяющий разделять определенные группы атомов, которые не могут быть разрешены с помощью ^1H ЯМР. Поэтому стратегии ЯМР для усиления сигнала ^{13}C особенно интересны для анализа природных полимеров [138].

^{31}P ЯМР

Спектроскопия ^{31}P ЯМР лигнина позволяет количественно определять содержание гидроксильных групп различных типов (алифатические, фенольные, карбоксильные) [24]. Свойства лигнинов и их реакционная способность напрямую зависят от наличия и количества функциональных групп, поэтому их оценка важна для структурного анализа [26].

Для определения гидроксильных групп в лигнине методом ^{31}P ЯМР необходима предварительная модификация образца, предусматривающая включение фосфорного фрагмента в структуру лигнина [15, 26, 139, 140].

Существуют две модификации в анализе ^{31}P ЯМР лигнина. Первоначально был предложен 2-хлор-1,3,2-диоксафосфолан [141] в качестве

фосфитирующего агента. Позже было показано, что фосфитирование с помощью 2-хлор-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксафосфолана (TMDP) обеспечивает лучшее разделение сигналов, и в настоящее время используется как основной метод ^{31}P ЯМР для анализа лигнина. Хотя и была достигнута хорошая сходимость результатов, полученных с использованием этих двух дериватирующих реагентов [139], представленный позже обзор данных не подтвердил это [40].

Метод, предложенный в работах [15, 26, 139, 140] признан наиболее подходящим для анализа гидроксильных групп лигнина. В реакции лигнина с TMDP (рис. 13) протоны OH-групп лигнина замещаются на фрагмент фосфорсодержащего агента. Такая дериватизация позволяет избавиться от протонного обмена между OH-группами, что в свою очередь повышает информативность спектров (рис. 14).

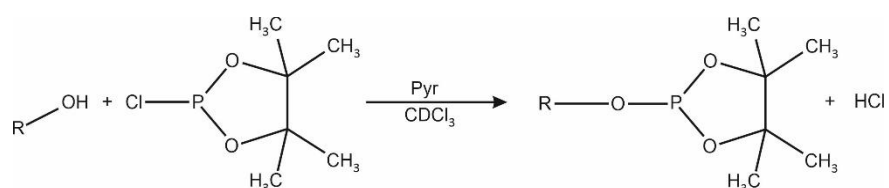


Рисунок 13 – Схема фосфитирования гидроксильных групп лигнина

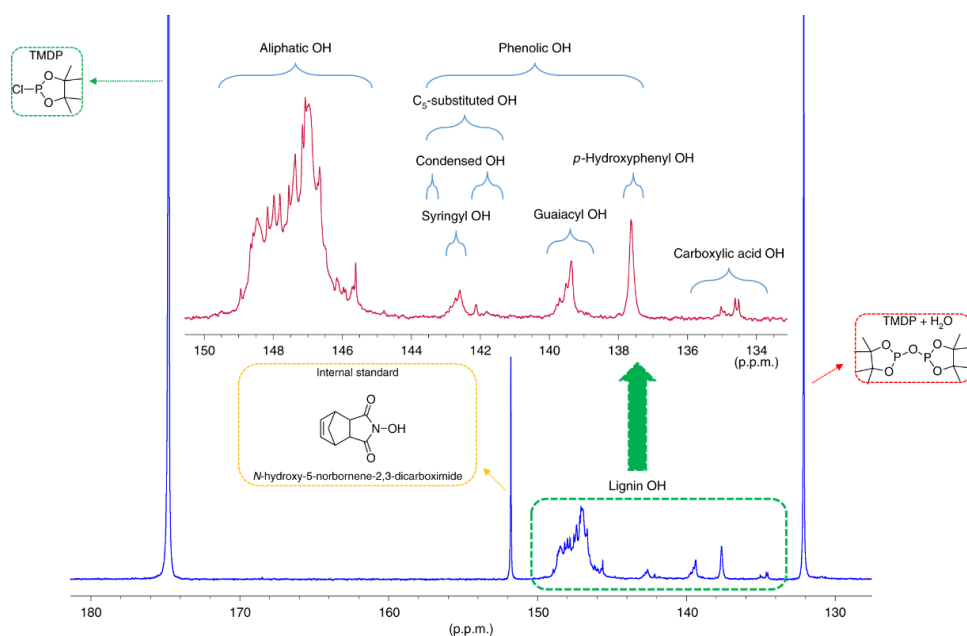


Рисунок 14 – Спектр ^{31}P ЯМР лигнина тополя [142]

Однако основным недостатком метода является необходимость большого количества сканирований для достижения эквивалентного соотношения сигнал/шум, что влияет на общее время регистрации спектра. По общепринятой методике, предложенной проф. Д. Аргиропулосом в 1994 г. [80], время регистрации одного спектра составляет ~ 4 ч. В последней работе научной группы Д. Аргиропулоса сообщается о некоторых модификациях методики, в частности и спектральных параметров [142]. Авторы предложили параметры эксперимента, согласно которым время регистрации одного спектра сократилось до 30-120 мин, что показывает перспективность проведения дальнейших экспериментов по оптимизации данных подходов, в частности в вопросах продолжительности анализа.

Несмотря на преимущества одномерных методов, существует ряд ограничений для их применения. Одномерные методы ЯМР-спектроскопии не позволяют однозначно идентифицировать структурные фрагменты лигнина.

Серьезные успехи в изучении лигнинов были достигнуты благодаря применению двумерных методов спектроскопии ЯМР. Они значительно облегчили исследования структурных аспектов такого сложного полимера как лигнин [143].

2D ЯМР-спектроскопия

Из существующего многообразия двумерных экспериментов для изучения структуры лигнина наибольшее применение нашли только некоторые из них (рис. 15) [24].

Для того чтобы определить, какие атомы углерода связаны с протонами, регистрируется двумерный спектр HSQC – Heteronuclear Single Quantum Correlation. Спектр HSQC показывает корреляции между атомами углерода (или другими ядрами со спином $I=1/2$) и связанными с ними протонами [59, 144].

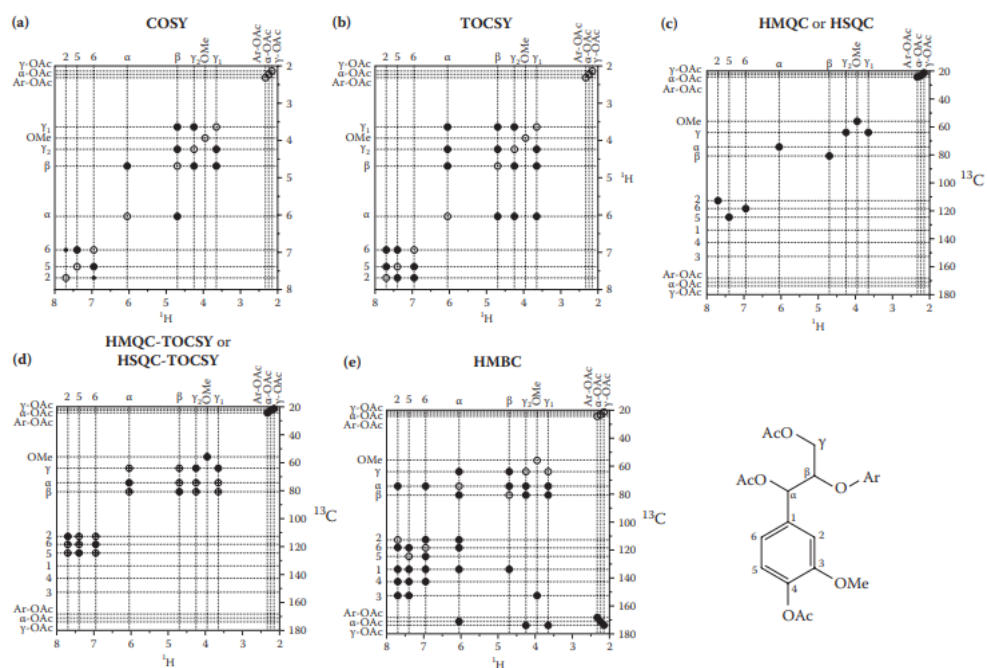


Рисунок 15 – Примеры 2D ЯМР экспериментов [24]

Для идентификации протонов, находящихся в одной спиновой системе, применяются двумерные корреляционные спектры COSY (COrrrelation SpectroscopY) [145] и TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY). Спектры COSY показывают корреляции между протонами в соседних группах, спектры TOCSY [144, 145] отображают корреляции всех протонов в одной спиновой системе.

Для окончательного установления структуры молекулы исследуемого вещества необходимо определить, каким образом соединены между собой фрагменты молекулы, структура которых уже установлена.

Спектры NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) показывают корреляции между протонами, которые возникают при проявлении ядерного эффекта Оверхаузера – переноса намагниченности не через связи и спин-спиновые взаимодействия, а напрямую через пространство между близко расположенными протонами [146]. Этот эффект позволяет определить протоны, расположенные рядом друг с другом в пространстве, но не взаимодействующие через связи, т.к. находятся в разных спиновых системах.

Спектры НМВС (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) показывают корреляции протонных сигналов с сигналами атомов углерода, находящихся в других спиновых системах на расстоянии 3-4 химических связей от них [59, 144]. Таким образом, в спектре НМВС видны взаимодействия протонов не только с протонированными углеродами, но и с непротонированными, что дает важную информацию о способе соединения фрагментов молекулы.

Одним из последних достижений в области двумерных методов ЯМР является структурный анализ лигнина в состоянии цельной клеточной стенки [147]. Преимуществами данного метода являются простота и быстрая пробоподготовка, а также способность рассмотреть состав клеточной стенки растения практически без структурного изменения [41, 42, 147].

Кроме того, новые возможности для изучения структуры лигнина открывает применение твердотельной ЯМР-спектроскопии [148, 149]. Её преимуществом является возможность изучать препараты лигнина, нерастворимые в большинстве органических растворителей, применяемых в спектроскопии ЯМР (технические лигнины). Также, использование методов твердотельной ЯМР-спектроскопии в комплексе с классическим анализом методами жидкостной ЯМР-спектроскопии позволяет проанализировать некоторые физические свойства полимеров [150]. Однако низкая разрешающая способность твердотельного метода и перекрытие сигналов приводит к трудной интерпретации результатов [151].

1.6.3 ЯМР-спектроскопия твердого тела

Несмотря на то, что явление ядерного магнитного резонанса впервые наблюдалось в твердых телах, первые 20 лет развитие методов ЯМР твердого тела шло медленнее жидкостных [152]. Из-за сильного диполь-дипольного взаимодействия ядер спектры ЯМР твердого тела имели низкое разрешение [153]. В связи с этим разрабатывались различные способы сужения спектральных линий, позволяющие добиться хорошего разрешения при исследовании твердых тел [152].

Усредняя диполь-дипольное взаимодействие, Эндрю [154] и Лоу [155] впервые получили спектры высокого разрешения в твердом теле. Они применили макроскопическое вращение образца под магическим углом – $54,7^\circ$ (MAS; magic angle spinning) (рис. 16), при котором гетероядерное диполь-дипольное взаимодействие между ^1H и ^{13}C исчезает [121].

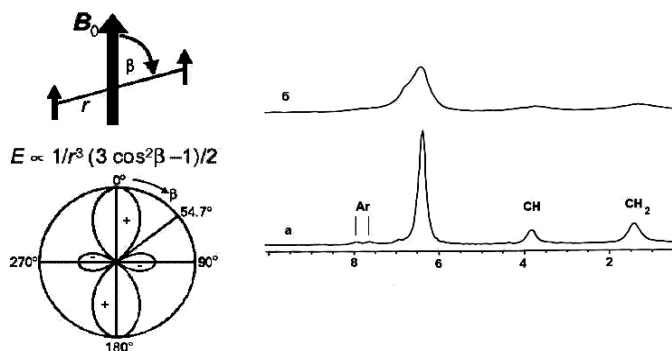


Рисунок 16 – Принцип действия вращения под магическим углом
(а – с использованием MAS; б – без вращения)

Также, для улучшения разрешения был предложен метод, основанный на двойном резонансе, позволяющий наблюдать в твердотельных образцах сигналы даже «слабочувствительных» ядер [156]. Принцип метода заключается в том, чтобы поляризовать редкие спины (^{13}C) путем переноса поляризации от распространенных спинов (^1H) для того, чтобы устранить дипольное уширение линий. Данный метод называется кросс-поляризацией (CP/MAS) [156, 157]. Применение методики CP/MAS приводит к сужению сигналов спектров примерно вдвое [152].

Таким образом, сочетание методов спектроскопии ЯМР, а также комбинирование данных методов с другими физико-химическими методами анализа является наиболее перспективным направлением в области исследования структуры лигнинов.

1.7 Выводы по обзору литературы, постановка цели исследования

Анализ литературных данных показал, что накоплена обширная как методическая, так и экспериментальная база о структуре лигнинов и их превращениях. Однако разногласий о структурах фрагментов и их количестве в различных лигнинах становится только больше. Таким образом, в настоящее время стоит вопрос формирования единых представлений на максимально широком и разнообразном круге лигнинов. Кроме того, в литературе мало сведений о лигнинах травянистых растений, особенно луговых трав.

Помимо этого, исследователи озадачены вопросом извлечения природного лигнина в неизменном виде, так как существующие методики подразумевают химическую модификацию протолигнина. Наиболее исследуемым препаратом лигнина является лигнин механического размола, но процедура его извлечения достаточно трудоёмка, а получаемый препарат трудно очистить от примесей полисахаридов не изменив структуру лигнина. Альтернативой ЛМР стал лигнин Пеппера, однако к анализу таких препаратов следует подходить с осторожностью, учитывая процессы, происходящие при ацидолизе.

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса широко используется для изучения структуры лигнина. Одномерная ЯМР-спектроскопия позволяет оценить содержание функциональных групп различных типов в лигнине, двумерная ЯМР спектроскопия позволяет проследить тонкую структуру лигнина и оценить количество различных типов связей между фенилпропановыми единицами. Новые возможности для изучения структуры лигнина открывает применение твердотельной ЯМР-спектроскопии, однако в силу сложности данного метода используется исследователями крайне редко.

На сегодняшний день отмечается тенденция роста интереса к лигнину как возобновляемому биоресурсу. Предлагается внедрение технологий биорефайнинга, направленных на производство продуктов с высокой добавленной стоимостью на основе лигнина. Однако использование такого

вида сырья невозможно без точных фундаментальных знаний о его составе и свойствах, которые варьируются в зависимости от происхождения биомассы.

В связи с этим, цель настоящего исследования заключается в изучении структурных особенностей лигнинов древесных и недревесных растений методами спектроскопии ядерного магнитного резонанса, а также влияния этих особенностей на сорбционные свойства лигнинов.

2 МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

2.1 Техническое оснащение

Основным аналитическим оборудованием, использованным в данной работе, является импульсный ЯМР-спектрометр AVANCE III™ 600 (Bruker, Германия) с рабочей частотой для протонов 600 МГц. Для анализа растворенных образцов применялся двухканальный широкополосный датчик высокого разрешения BBO 600 MHz S3, твердые образцы анализировались с помощью двухканального широкополосного датчика MAS DVT 3.2, регистрирующего спектры методом CP/MAS. Спектры обрабатывались с использованием стандартного программного обеспечения TopSpin 3.2 (Bruker, Германия).

Кроме того, в работе использовано следующее вспомогательное оборудование:

- микровесы (Mettler Toledo, Швейцария);
- анализатор влажности (Mettler Toledo, Швейцария);
- сушильный шкаф с принудительной конвекцией (Memmert, Германия);
- вакуумный сушильный шкаф (BINDER, Германия);
- ротационный испаритель (IKA, Германия);
- аналитическая ножевая мельница (IKA, Германия);
- элементный CHNS анализатор EA-3000 (EuroVector, Италия);
- система эксклюзионной хроматографии на базе жидкостного хроматографа LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония).

2.2 Характеристика реактивов

Все реагенты, использованные в данной работе, и их характеристика представлены в таблицах 2 и 3.

Все химические вещества применялись без дополнительной очистки.

Для создания заданной относительной влажности воздуха в эксикаторах, с целью анализа сорбционных свойств лигнина методом твердотельной ЯМР-спектроскопии, использовались насыщенные растворы солей [158], приведенные в таблице 3.

Таблица 2. Характеристика реагентов

Реагент	Формула	Квалификация	Поставщик
Анализ химического состава сырья:			
Серная кислота	H ₂ SO ₄	ос.ч.	ООО «Сигма Тек»
D-(+)-глюкоза	C ₆ H ₁₂ O ₆	99,5 %	Sigma-Aldrich
D-(+)-ксилоза	C ₅ H ₁₀ O ₅	99,0 %	Sigma-Aldrich
D-(+)-манноза	C ₆ H ₁₂ O ₆	99,0 %	Sigma-Aldrich
D-(+)-галактоза	C ₆ H ₁₂ O ₆	99,0 %	Sigma-Aldrich
D-(+)-арабиноза	C ₅ H ₁₀ O ₅	98,0 %	Sigma-Aldrich
Экстракция сырья и извлечение препаратов диоксанлигнина:			
Ацетон	C ₃ H ₆ O	ч.	ГК «Ясхим»
1,4-диоксан	C ₄ H ₈ O ₂	ч.д.а.	ООО «Химмед»
Соляная кислота	HCl	ос.ч.	ООО «Сигма Тек»
Бикарбонат натрия	NaHCO ₃	х.ч.	ООО «Нева-Реактив»
Диэтиловый эфир	(C ₂ H ₅) ₂ O	ч.д.а.	ООО «Химмед»
Дериватизация для ЯМР-анализа:			
ДМСО-d6	C ₂ D ₆ OS	99,8 %	Deutero GmbH
Пиридин	C ₅ H ₅ N	99,8 %	Sigma-Aldrich
Пиридин-d5	C ₅ D ₅ N	99,5 %	Deutero GmbH
Хлороформ-d1	CDCl ₃	99,8 %	Deutero GmbH
Трис-ацетилацетонат хрома (III)	Cr(C ₅ H ₇ O ₂) ₃	99,99 %	Sigma-Aldrich
2-хлор-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксафосфолан	C ₆ H ₁₂ ClO ₂ P	95,0 %	Sigma-Aldrich
N-гидрокси-5-норборнен-2,3-дикарбосимид	C ₉ H ₉ NO ₃	97,0 %	Sigma-Aldrich

Таблица 3. Характеристика используемых солей

Соль	Формула	Квалификация	Поставщик	Относительная влажность воздуха над раствором, %
Лития хлорид	LiCl	х.ч.	АО «Вектон»	11
Кальция хлорид	CaCl ₂	ч.	АО «Вектон»	32
Натрия бромид	NaBr	ч.д.а.	АО «Вектон»	58
Натрия хлорид	NaCl	х.ч.	АО «Вектон»	75
Натрия гидрофосфат	Na ₂ HPO ₄	х.ч.	АО «Вектон»	95

2.3 Объекты исследования

В качестве объектов исследования использованы препараты диоксанлигнина, выделенные из 18 видов древесных (хвойных и лиственных) и травянистых растений, относящихся к 8 различным семействам. Это позволило выявить особенности структуры лигнина не только между разными видами, но и в пределах семейства, к которому принадлежит растение.

Таблица 4. Объекты исследования

Виды растений	Семейство	Русское название	Латинское название
Хвойные породы	Сосновые	Ель обыкновенная	<i>Picea abies</i> L.
		Сосна обыкновенная	<i>Pinus sylvestris</i> L.
		Пихта сибирская	<i>Abies sibirica</i>
Лиственные породы	Берёзовые	Береза повислая	<i>Bétula péndula</i>
		Граб обыкновенный	<i>Carpinus betulus</i> L.
		Ольха чёрная	<i>Alnus glutinosa</i> L.
	Буковые	Дуб черешчатый	<i>Quercus robur</i> L.
		Бук европейский	<i>Fagus sylvatica</i> L.
		Каштан посевной	<i>Castanea sativa</i> Mill.
	Ивовые	Ива козья	<i>Salix caprea</i> L.
		Тополь белый	<i>Populus alba</i> L.
		Осина обыкновенная	<i>Populus tremula</i> L.
	Розовые	Малина обыкновенная	<i>Rubus idaeus</i> L.
		Рябина обыкновенная	<i>Sorbus aucuparia</i> L.
		Яблоня домашняя	<i>Malus domestica</i> Borkh
Травянистые растения	Зонтичные	Тмин обыкновенный	<i>Carum carvi</i> L.
	Кипрейные	Кипрей узколистный	<i>Epilobium angustifolium</i> L.
	Злаки	Ежа сборная	<i>Dactylis glomerata</i> L.

Написание латинских наименований приведено согласно атласу-определителю растений «Плантариум» [159].

В качестве представителей хвойных пород выбраны наиболее изученные виды с большим массивом литературных данных. Ель обыкновенная (*Picea abies*) – основная лесообразующая порода и сырьё в ЦБП. Пихта сибирская (*Abies sibirica*) – ценное сырьё для ЦБП, отличается отсутствием смоляных

ходов в макроструктуре древесины, имеет самый низкий коэффициент теплопроводности среди других пород [9].

Основной упор данного исследования сделан на сравнение лигнинов лиственных пород древесины. Для изучения лиственных пород выбраны представители четырёх семейств: березовые, буковые, ивовые и розовые. Кроме того, малина обыкновенная (*Rubus idaeus*) рассматривается как переходная форма растительности, в некоторых источниках обозначена как «полудревесное-полутравянистое растение» [160].

В качестве представителей травянистых растений выбраны одни из наиболее распространенных луговых трав Архангельской области: тмин обыкновенный (*Carum carvi*), кипрей узколистный (*Epilobium angustifolium*) и ежа сборная (*Dactylis glomerata*). Семейственная принадлежность определена по принципу максимального отличия друг от друга, с целью более значимого расхождения структуры лигнина из каждого вида.

2.4 Отбор и подготовка проб растительности

Часть образцов отобрана на территории Северо-Западного федерального округа РФ в разных точках Архангельской области (Холмогорский район и Красноборский район). Дендрологический сад имени И.М. Стратановича предоставил образцы лиственных пород. Для сравнения также были получены дикоросы таких пород как береза, граб, ольха, дуб, бук и каштан, произраставшие на территории Краснодарского края. Для получения репрезентативных растительных проб образцы каждого представителя отбирались точечно в трёх повторениях и в дальнейшем усреднялись с целью получения объективной информации о содержании основных структурных единиц, входящих в состав лигнина определенного вида растения.

Средний возраст лиственных деревьев составил 21-38 лет, хвойных – 56-70 лет. В качестве представительного образца древесных растений отбиралась стволовая часть дерева (торцевой спил толщиной 3-4 см). При отборе образцов малины выбирались одревесневшие двухлетние ветки и срезалась их средняя

часть. При отборе травянистых растений извлекалась вся надземная часть, листья и цветки удалялись.

Образцы древесины очищали от коры и измельчали в щепу. Ветки малины также зачищали от коры и измельчали. У травянистых растений отделяли стебли. Щепу и стебли высушивали на воздухе и измельчали с использованием аналитической ножевой мельницы. Влажность воздушно-сухих образцов составляла 3-7 %. Затем опилки были обессмолены путем экстракции ацетоном в аппарате Сокслета.

2.5 Анализ химического состава растительного сырья

Определение содержания лигнина

Массовая доля лигнина в исходном растительном сырье определена по методу Класона [161]. Для этого 1 г измельченного сырья и 15 мл 72 %-ной серной кислоты смешивали в конической колбе на 50 мл. Колбу выдерживали при 25 °С в течение 2,5 ч. Затем смесь разбавляли дистиллированной водой до концентрации кислоты 4 %. Разбавленную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 1 ч. Затем лигнин отфильтровывали на стеклянном пористом фильтре с диаметром пор 5-15 мкм, высушенном до постоянной массы. Аликвоту гидролизата разбавляли в 100 раз и переносили в хроматографическую виалу для последующего определения моносахаридного состава.

Осадок на фильтре промывали горячей водой до нейтральной реакции индикаторной бумаги. Фильтр с лигнином сушили при температуре 103±2 °С до постоянной массы. Массовую долю лигнина (X_L), в % от абсолютно сухого необессмоленного сырья (а.с.в.), рассчитывали по формуле:

$$X_L = \frac{m_1 - m}{g} \cdot K_9 \cdot 100, \quad (1)$$

где m_1 – масса фильтра с лигнином, г; m – масса пустого фильтра, г; g – масса а.с.в.; K_9 – коэффициент экстрагирования.

После разбавления реакционной смеси и кипячения некоторая часть лигнина переходит в фильтрат в виде кислоторастворимого лигнина. Определение доли кислоторастворимого лигнина в фильтрате проводили УФ-спектрофотометрическим методом при длине волны 205 нм [161]. Коэффициент разбавления подбирали таким образом, чтобы измеряемая оптическая плотность находилась в пределах 0,7-1,0. Массовую долю кислоторастворимого лигнина (КРЛ) рассчитывали в % от абсолютно сухой древесины по формуле:

$$\text{КРЛ} = \frac{D \cdot K_{\text{разб}} \cdot V}{\varepsilon \cdot g \cdot l} \cdot 100, \quad (2)$$

где D – оптическая плотность; $K_{\text{разб}}$ – коэффициент разбавления; V – объем фильтрата, мл; ε – коэффициент поглощения лигнина при 205 нм (110 для лиственных пород и 125 для хвойных); g – масса а.с.в., г; l – длина кюветы, см.

Общую долю лигнина в исходном растительном сырье определяли как сумму лигнина Класона и кислоторастворимого лигнина.

Определение содержания отдельных моносахаридов

Углеводы составляют основную часть биомассы, поэтому их определение является неотъемлемой частью комплексного анализа растительного сырья. Определение моносахаридов проводили в соответствии с ASTM E-175801 [162].

В качестве исследуемых аналитов были выбраны пять коммерчески доступных ($\geq 98\%$, Aldrich, Германия) моносахаридов: манноза (Man), арабиноза (Ara), галактоза (Gal), ксилоза (Xyl) и глюкоза (Glu). Определение моносахаридов проводили с использованием ВЭЖХ-системы Nexera XR (Shimadzu, Япония), оснащенной вакуумным дегазатором, тремя насосами LC-20AD, автосамплером SIL-20AC, термостатом колонок CTO-20AC, флуориметрическим детектором RF-20A и камерой для химических реакций CRB-6A. Управление системой и обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения LabSolution (Shimadzu, Япония).

Разделение осуществляли на колонке Shim-pack ISA-07/S2504 (Shimadzu, Япония), размер 250×4,0 мм при температуре 65 °С. Подвижная фаза: А – 0,1 М буфер бората калия (рН 8), В – 0,4 М буфер бората калия (рН 9).

Использовалась постколоночная дериватизация. В качестве реагента применялся водный раствор 1 % аргинина и 3 % борной кислоты. Скорость потока реагента – 0,5 мл/мин. Реакционная температура – 150 °С. Флуориметрическое детектирование проводили при длине волны: $E_x=320$ нм, $E_m=430$ нм.

Массовую долю каждого моносахарида (C_x) рассчитывали в % от а.с.в. по формуле:

$$C_x = \frac{C_{ВЭЖХ} \cdot V}{g} \cdot 100, \quad (3)$$

где $C_{ВЭЖХ}$ – концентрация сахара по данным ВЭЖХ, мг/л; V – объем фильтрата, мл; g – масса а.с.в., г.

Компонентный состав исходного растительного сырья представлен в таблице 5.

Таблица 5. Химический состав исходного растительного сырья и выход диоксанлигнина

Семейство	Образец	% от массы а.с.д.									Выход ДЛ ²
		Ara	Gal	Glc	Xyl	Man	Всего сахаров	Лигнин Класона	КРЛ ¹	Всего лигнина	
Сосновые	Ель	1,5±0,1	1,9±0,1	43,3±3,1	5,3±0,2	8,7±0,3	60,7±3,8	27,5±0,1	0,1±0,0	27,6±0,1	22,2±1,1
	Пихта	1,9±0,0	1,9±0,1	42,1±0,8	5,4±0,1	7,8±0,3	59,1±1,3	31,0±0,3	0,1±0,0	31,1±0,3	23,0±1,8
	Сосна	1,6±0,0	2,5±0,1	46,6±3,4	5,9±0,1	11,3±0,1	67,9±3,7	29,4±0,1	0,0±0,0	29,4±0,1	36,4±2,7
Берёзовые	Берёза	1,1±0,0	1,7±0,2	36,5±1,8	18,2±0,8	1,3±0,0	58,8±2,8	20,9±0,0	1,6±0,1	22,5±0,1	46,8±2,3
	Граб	1,1±0,1	1,4±0,0	38,1±0,2	18,6±0,1	1,5±0,1	60,7±0,5	20,7±0,3	2,3±0,1	21,0±0,4	65,1±3,1
	Ольха	1,1±0,0	1,4±0,0	39,4±1,2	13,5±0,3	1,5±0,0	56,9±1,5	23,9±0,4	0,8±0,1	24,7±0,5	50,7±2,5
Буковые	Дуб	1,3±0,0	1,7±0,1	34,7±0,3	12,6±0,1	1,4±0,0	51,7±1,0	23,7±0,1	1,7±0,1	25,4±0,2	44,2±2,6
	Бук	1,2±0,0	1,7±0,1	40,0±1,5	15,3±0,3	1,2±0,1	59,4±2,0	23,2±0,1	1,4±0,1	24,6±0,2	50,4±4,5
	Каштан	1,1±0,1	1,6±0,1	33,0±0,3	12,6±0,0	1,4±0,0	49,7±1,0	26,9±0,4	2,4±0,1	29,3±0,1	49,0±2,4
Ивовые	Ива	2,1±0,1	1,1±0,0	46,7±1,7	17,5±0,1	2,8±0,0	70,2±1,9	21,5±0,1	1,1±0,1	22,6±0,2	46,3±4,1
	Тополь	1,8±0,1	1,2±0,1	49,9±1,3	17,4±0,1	4,7±0,2	75,0±1,8	18,1±0,0	0,8±0,1	18,9±0,1	38,1±0,9
	Осина	1,7±0,0	0,0±0,0	44,9±0,8	16,8±0,0	2,9±0,1	66,3±0,9	20,7±0,1	1,4±0,0	22,1±0,1	54,0±3,2
Розовые	Малина	1,8±0,1	1,8±0,1	38,5±1,4	17,3±0,9	1,7±0,0	61,1±2,5	21,4±0,0	1,6±0,0	23,0±0,0	41,1±2,1
	Рябина	1,4±0,1	2,2±0,0	43,2±1,0	18,5±0,8	1,8±0,1	67,1±2,0	21,8±0,0	1,3±0,0	23,1±0,0	37,9±2,3
	Яблоня	1,8±0,0	0,0±0,0	46,0±1,8	19,8±0,1	2,1±0,1	69,7±2,0	23,8±0,3	1,7±0,2	25,5±0,5	43,3±3,5
Зонтичные	Тмин	2,1±0,0	2,4±0,0	34,0±1,3	14,1±0,2	1,9±0,2	54,5±1,7	25,5±0,0	1,2±0,0	26,7±0,0	14,1±0,7
Кипрейные	Кипрей	1,4±0,0	2,1±0,0	41,8±2,0	19,2±0,6	1,5±0,1	66,0±2,7	22,2±0,0	0,8±0,0	23,0±0,0	18,7±1,1
Злаки	Ежа	2,8±0,0	1,4±0,1	41,6±2,3	22,8±0,5	0,0±0,0	68,6±2,9	21,5±0,0	0,9±0,0	22,4±0,0	29,4±2,0

¹ кислоторастворимый лигнин

² в % от лигнина Класона

2.6 Извлечение препаратов лигнина

Процедуру извлечения диоксанлигнинов проводили по методу Пеппера для всех образцов [99]. Обессмоленные опилки обрабатывали смесью диоксан/вода (9:1, об./об.) в присутствии ~ 2 % (об.) концентрированной соляной кислоты при 90 °С в течение 2 ч в токе аргона. Экстракт отделяли, нейтрализовали бикарбонатом натрия и барботировали аргоном в течение 5 мин. Затем раствор отфильтровывали и фильтрат упаривали на роторном испарителе. Полученный концентрат вносили по каплям в 8-кратный избыток воды. Осажденный диоксанлигнин-сырец отделяли от раствора центрифугированием и высушивали в вакуумном шкафу.

Для очистки от примесей полисахаридов, лигнин растворяли в 5-кратном избытке диоксана. Затем раствор по каплям приливали к 8-кратному объему диэтилового эфира. Осадок отфильтровывали через нейлоновый фильтр, промывали эфиром до обесцвечивания промывных вод и высушивали в вакуумном сушильном шкафу. Выход препаратов диоксанлигнина варьировался в диапазоне от 14,1 до 65,1 % от лигнина Класона (табл. 5).

2.7 Вспомогательные методы анализа

Определение элементного состава

Элементный состав диоксанлигнинов определяли с помощью элементного (CHNS) анализатора EA-3000 (EuroVector, Италия). Навеска вещества порядка 1 мг сжигалась при температуре 1000-1100 °С в окислительной среде в атмосфере гелия. Полное сгорание вещества и удаление мешающих продуктов осуществлялось благодаря применению оксидно-каталитических компонентов (Cr_2O_3 , WO_3 , PbO_2 и др.). Получаемые продукты – CO_2 , H_2O , N_2 и SO_2 разделялись на газохроматографической колонке и детектировались катарометром. Содержание кислорода рассчитывали, принимая суммарное содержание С, Н, N, S, О равным 100 %.

Определение молекулярной массы и молекулярно-массового распределения

Молекулярные массы выделенных препаратов лигнина и степень полидисперсности определяли методом эксклюзионной хроматографии с использованием системы ВЭЖХ LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония), со спектрофотометрическим детектором SPD-20A. Разделение проводили на колонке МСХ 300×8 мм с размером пор 1000 Å (PSS, Германия) при 40 °С. Раствор гидроксида натрия (0,1 М) использовали в качестве подвижной фазы и растворителя образца. Детектирование проводили при длине волны 275 нм. Систему калибровали по стандартным монодисперсным образцам полистиролсульфоната натрия (PSS, Германия).

2.8 Анализ химического состава, структуры и свойств препаратов диоксанлигнина методами ЯМР-спектроскопии

2.8.1 Подготовка образцов для анализа группового и фрагментного состава методами жидкостной ЯМР-спектроскопии

Для анализа лигнинов методом ^{31}P ЯМР в данной работе использован подход, описанный в работах [26, 27, 80, 147, 163]. Метод предусматривает фосфитилирование гидроксильных групп лигнина специальным агентом с последующей регистрацией спектров на ядрах ^{31}P . В качестве фосфитилирующего агента использован 2-хлор-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксафосфолан.

Навеску лигнина (~ 40 мг) растворяли в 400 мкл смеси пиридина и хлороформа-d1 (1,6:1, об/об). К образцу добавляли 100 мкл внутреннего стандарта (N-гидрокси-5-норборнен-2,3-дикарбоксимид) с концентрацией 0,12 М и 50 мкл релаксанта (трис-ацетилацетонат хрома (III)) с концентрацией 11,4 мг/мл. Растворы обоих реагентов готовили с использованием вышеуказанной смеси растворителей.

Отношение внутреннего стандарта к лигнину составляло примерно 0,3 мкмоль/мг лигнина [26, 139]. Для фосфитилирования гидроксильных групп к смеси добавляли 100 мкл 2-хлор-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксафосфолана. После завершения реакции (~ 5 мин) содержимое пробирки тщательно перемешивали. Затем 600 мкл раствора переносили в ампулу для ЯМР-анализа диаметром 5 мм.

В двумерных экспериментах [^1H - ^{13}C] HSQC ЯМР в качестве растворителя лигнина использовали дейтерированный диметилсульфоксид (ДМСО- d_6). Образец лигнина (70-80 мг) растворяли в 600 мкл ДМСО- d_6 и тщательно перемешивали. Раствор переносили в ампулу для ЯМР-анализа.

2.8.2 Подготовка образцов для анализа сорбционной способности лигнинов методом твердотельной ЯМР-спектроскопии

Около 300 мг лигнина высушивали в сушильном шкафу при температуре 105 °С до постоянной массы. Из высушенного лигнина отбирали около 50 мг в стеклянные бюксы, которые помещали в эксикаторы, содержащие насыщенные растворы солей для поддержания фиксированной относительной влажности воздуха (RH) внутри эксикаторов: Na_2HPO_4 (RH = 95 %), NaCl (RH = 75 %), NaBr (RH = 58 %), CaCl_2 (RH = 32 %), LiCl (RH = 11 %) [158]. Кроме указанных растворов, для создания относительной влажности воздуха, равной 100 %, использовалась дистиллированная вода, а в качестве абсолютно сухого образца (RH = 0 %) использовался лигнин, обезвоженный в сушильном шкафу.

Получение образцов гидратированного лигнина осуществлялось следующим методом: обезвоженные образцы помещались во все эксикаторы одновременно и сорбировали воду независимо друг от друга («параллельная» сорбция). Спектры ЯМР регистрировались для каждого образца по достижении постоянной массы (через несколько суток). Количество воды в гидратированном лигнине определяли весовым методом.

Таким образом, были подготовлены образцы лигнина, гидратированные при относительной влажности воздуха 0 %, 11 %, 32 %, 58 %, 75 %, 95 %, 59

100 %. Образцы гидратированного лигнина переносили в керамический ротор с внешним диаметром 3,2 мм для последующей регистрации спектров ЯМР твердого тела.

2.8.3 Параметры регистрации спектров ЯМР

Спектры ЯМР высокого разрешения регистрировали на импульсном ЯМР-спектрометре Bruker AVANCE III с рабочей частотой для протонов 600 МГц при температуре 298 К. Произведен подбор параметров эксперимента для оптимизации рабочего процесса. Оптимальные экспериментальные параметры приведены в таблицах 6 и 7.

Таблица 6. Параметры жидкостных экспериментов ЯМР

Параметр	³¹ P	¹ H- ¹³ C HSQC
Импульсная последовательность	zg	hsqcetgpsisp2
Число точек	32768	1024×256
Число сканов	128	36
Длительность импульса, мкс	12	10,5
Задержка, с	5	2
Ширина спектра, м.д.	60	11×215
Температура, К	298	298
Время регистрации спектра (ч:мин:сек)	0:13:8	5:23:9

Для регистрации одномерных спектров применялась одноимпульсная последовательность «zg» с 90° импульсом. В экспериментах ¹H-¹³C HSQC применялась импульсная программа «hsqcetgpsisp2» с использованием эхо/антиэхо-детектирования, градиентных адиабатических импульсов и усиления нечувствительных ядер за счет переноса поляризации. Такая последовательность считается более чувствительной и позволяет получать более простые спектры, в которых все контуры положительные [164]. Спектры HSQC были откалиброваны по сигналу растворителя (δ_C/δ_H 39,5/2,49 м.д.). Спектры ³¹P ЯМР калибровали по сигналу продукта реакции фосфитилирующего агента с водой (132,2 м.д.). Базовую линию корректировали вручную с использованием полиномиальной функции.

При записи спектров ^{13}C ЯМР твердого тела для улучшения разрешения и сокращения времени регистрации спектров использовались методики переноса поляризации с ядер ^1H на ядра ^{13}C и вращение образца под магическим углом (CP/MAS).

Таблица 7. Параметры твердотельных экспериментов ЯМР

Параметр	^1H	^{13}C
Длительность импульса, мкс	2,5	2000
Задержка, с	3	5
Ширина спектра, м.д.	20	300
Число сканов	4	4096
Частота MAS, кГц	12	12
Время регистрации спектра (ч:мин:сек)	0:0:12	5:43:29

2.8.4 Обработка и анализ спектров ^{31}P и HSQC ЯМР

Поскольку интенсивность сигнала ^{31}P ЯМР зависит от концентрации ядер, дающих конкретный сигнал, и известно количество добавленного стандарта, то становится возможным расчёт концентрации ядер, принадлежащих разным группам атомов [165-168].

Для расчета массовой доли ОН-групп различных типов в образце сначала определяли число ОН-групп в добавленном стандарте. Поскольку молекула стандарта, содержит всего одну ОН-группу, то количество ОН-групп будет соответствовать количеству молекул.

$$N_{cm} = \nu_{cm} N_A = \frac{m_{cm}}{M_{cm}} N_A, \quad (1)$$

где ν_{cm} – количество вещества стандарта, моль;

m_{cm} – масса стандарта, г;

M_{cm} – молярная масса стандарта, г/моль;

N_A – число Авогадро, моль $^{-1}$.

Число ОН-групп стандарта ($N_{ст}$) дает сигнал в области ~ 152 м.д. на спектре ^{31}P ЯМР, который принимают за единицу. Интенсивности остальных сигналов нормировали на сигнал стандарта, а затем рассчитывали массовую долю ОН-групп в структурных единицах образца.

$$W = \frac{N_{cm} I \frac{M_{OH}}{N_A}}{m_{обр}} \cdot 100\% , \quad (2)$$

где I – относительная интенсивность сигнала;
 M_{OH} – молярная масса ОН-группы, г/моль;
 $m_{обр}$ – масса образца, г.

Содержание основных типов связей в лигнине определяли полуколичественным методом, основанным на интегрировании соответствующих сигналов на спектрах HSQC. Отнесение сигналов на спектрах проводили путем сравнения экспериментальных химических сдвигов с литературными данными [24, 35, 59, 65]. Количество сигналов лигнина нормализовали, используя следующее допущение:

$$G + S + H = G_2 + S_{2,6}/2 + H_{2,6}/2 = 100 \text{ ФПЕ} \quad (3)$$

С помощью корреляций C_α – H_α оценивали относительное содержание таких структур, как фенилкумаран, резинол, дибензодиоксоцин, и корреляций C_β – H_β для оценки содержания фрагментов β -арильных эфиров.

2.8.5 Обработка и анализ спектров ЯМР твердого тела

Спектры твердотельного ЯМР обрабатывались с использованием стандартного программного обеспечения ЯМР-спектрометра Bruker TopSpin. Проводилась деконволюция спектров, т. е. для выбранных сигналов производился подбор химического сдвига, интенсивности, ширины и формы спектральной линии. Подбор производился таким образом, чтобы спектральная линия, рассчитанная программой, максимально совпадала с контуром зарегистрированного сигнала.

Пример деконволюции спектра ^{13}C ЯМР лигнина представлен на рисунке 17.

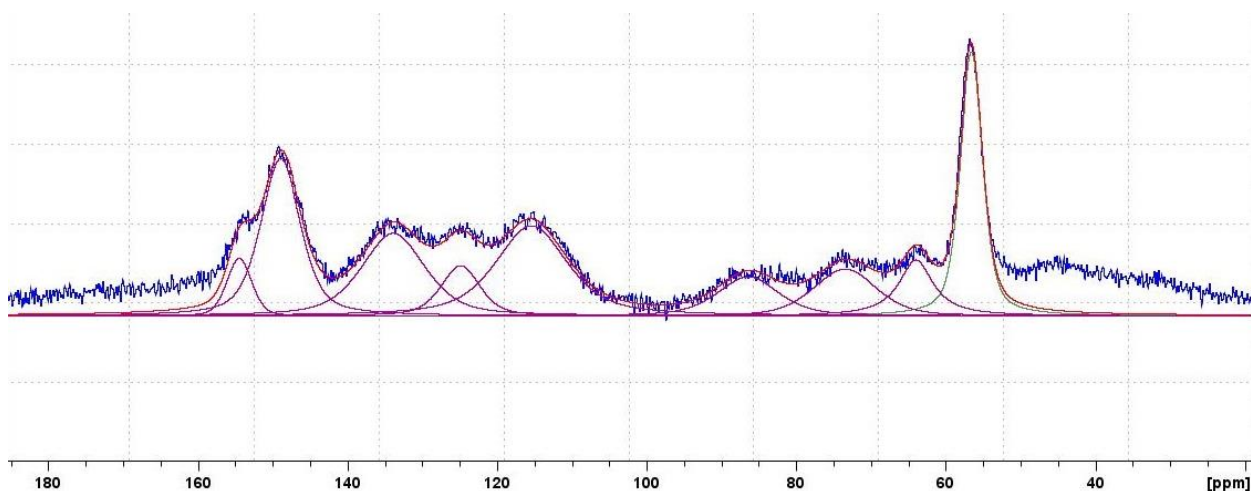


Рисунок 17 – Деконволюция спектра ^{13}C ЯМР образца лигнина берёзы

Деконволюция проводилась для каждого зарегистрированного спектра. Для дальнейших расчетов использовалась ширина сигналов, измеренная с использованием программного обеспечения спектрометра. Ширина сигнала ЯМР $\Delta\nu_{1/2}$ определяется временем поперечной релаксации T_2 и связана с ним соотношением:

$$\Delta\nu_{1/2} \sim \frac{1}{\pi T_2}, \quad (4)$$

где $\Delta\nu_{1/2}$ – ширина сигнала ЯМР, Гц;
 T_2 – время поперечной релаксации, с.

Что позволяет делать выводы об изменении подвижности тех или иных атомных группировок [121]. Для того, чтобы вычислить относительные доли от общего количества воды, сорбированные на каждый тип групп, относительные изменения ширины сигналов нормировались на наименьшее значение, результаты суммировались с получением общего числа весовых частей сорбированной воды. Затем определялась доля молекул воды, приходящихся на каждый тип групп [169-171].

3 СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПОДХОДА К АНАЛИЗУ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП ЛИГНИНА МЕТОДОМ ³¹P ЯМР СПЕКТРОСКОПИИ

Вторичная переработка лигнина базируется на использовании его свойств, обусловленных наличием различных функциональных групп. В связи с этим, знания о точном функциональном составе лигнина являются необходимыми для вовлечения его в процессы вторичной переработки [16].

Спектроскопия ³¹P ЯМР является наиболее распространённым методом анализа функционального состава лигнинов [139-141], подробно описанный в разделе 2.8. Применение дейтерированных растворителей для ЯМР анализа обусловлено необходимостью настройки однородности магнитного поля спектрометра для достижения максимального разрешения.

Дейтерированные растворители значительно отличаются от обычных растворителей по стоимости, особенно это касается дейтерированного пиридина, который является основным растворителем лигнина при анализе методом ³¹P ЯМР. Так, согласно каталогу продукции компании Sigma-Aldrich, 1 мл обычного пиридина стоит около 77 руб., а 1 мл его дейтерированного аналога – около 1900 руб. [172]. Это один из факторов, определяющих высокую стоимость получения спектров ЯМР, что сдерживает внедрение метода в практику рутинного анализа.

Нами предложено отказаться от применения дейтерированного пиридина в смеси растворителей в пользу обычного, предположив, что концентрации ядер дейтерия хлороформа-d₁ будет достаточно для регистрации сигнала дейтериевой стабилизации.

Одновременно с этим, для количественной ³¹P ЯМР спектроскопии требуются информативные спектры с высоким отношением сигнал/шум. Чтобы достичь этих требований необходимы либо высокие концентрации образца, либо длительное время регистрации спектра. В связи с этим,

представляется актуальной оптимизация параметров регистрации спектров ЯМР лигнинов на ядрах ^{31}P , что позволит увеличить производительность.

3.1 Определение гидроксильных групп в модельном соединении

Для выбора системы растворителей были проведены эксперименты на мономерном модельном соединении гваяцильного структурного звена лигнина – ванилиновом спирте (98 %, Sigma-Aldrich), молекула которого содержит как спиртовую, так и фенольную гидроксильные группы. Спектр ^{31}P ЯМР ванилинового спирта, растворенного в смеси пиридин- d_5 /хлороформ- d_1 , представлен на рисунке 18.

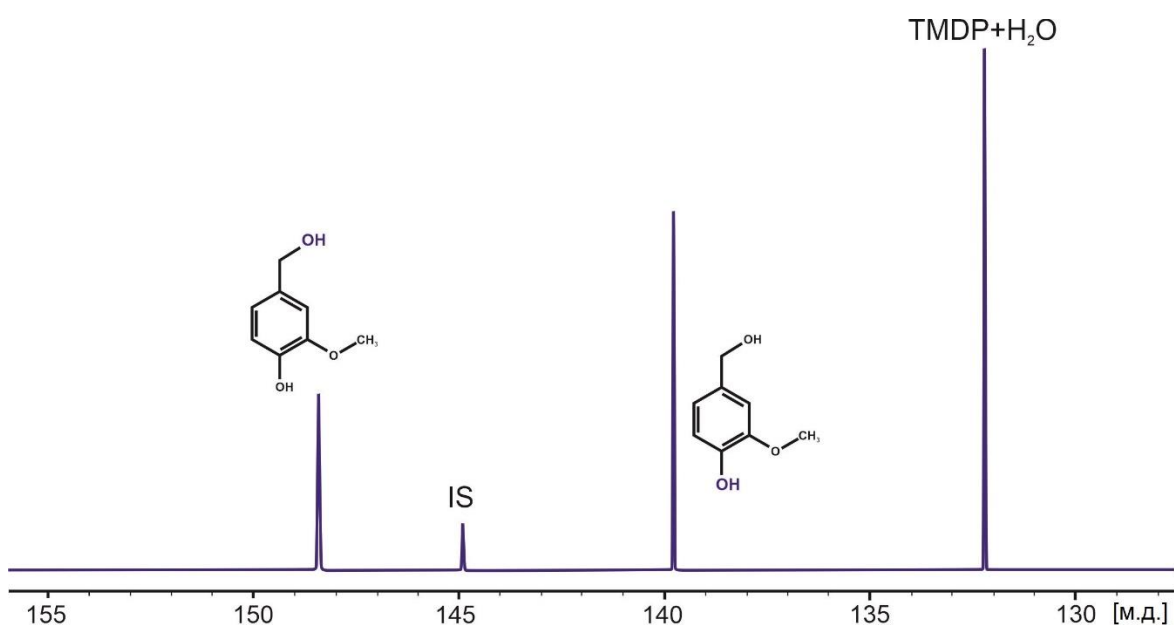


Рисунок 18 – Спектр ^{31}P ЯМР ванилинового спирта

Сигнал, соответствующий продукту реакции TMDP с водой, наблюдается в области 132,2 м.д. Сигнал при 145 м.д. соответствует внутреннему стандарту (холестерину). Сигнал в области ~140 м.д. соответствует фенольной OH-группе ванилинового спирта, а в области ~148,5 м.д. – спиртовой OH-группе.

Процедура расчета содержания гидроксильных групп описана в п. 2.7.4. Эксперименты проводились для образцов, растворенных в смесях пиридин- d_5 /хлороформ- d_1 и пиридин/хлороформ- d_1 в двух повторениях.

Также проведен теоретический расчет массовой доли ОН-групп каждого типа в ванилиновом спирте.

$$W = \frac{M_{ОН}}{M_{обр}} \cdot 100, \% \quad (5)$$

где $M_{ОН}$ – молярная масса ОН-группы, г/моль; $M_{обр}$ – молярная масса ванилинового спирта, г/моль.

Результаты расчетов представлены в таблице 8.

Таблица 8. Количественное определение ОН-групп ванилинового спирта методом спектроскопии ^{31}P ЯМР.

ОН-группа	Пиридин-d ₅		Пиридин-Н		Расчетная массовая доля, %
	Интегральная интенсивность	Массовая доля ¹ , %	Интегральная интенсивность	Массовая доля ¹ , %	
Фенольная	3,52±0,05	10,6±0,4	3,81±0,05	11,3±0,4	11,0
Спиртовая	3,54±0,05	10,7±0,4	3,64±0,05	10,8±0,4	11,0

¹ – по данным ЯМР

Согласованность экспериментальных данных с расчетными значениями позволяет утверждать, что предложенный подход дает корректные результаты и использование дейтерированного пиридина в смеси растворителей экономически неоправданно.

3.2 Определение гидроксильных групп лигнина

Препарат ДЛ берёзы (*Betula pendula*) использован в качестве реального объекта (рис. 19), поскольку лигнины лиственных пород содержат фенольные ОН-группы как гваяцильного, так и сирингильного типа, в отличие от лигнинов хвойных пород, что повышает достоверность сравнения спектров, зарегистрированных в разных условиях.

Назначение сигналов на спектрах выполнено по литературным данным [15, 142]. Результаты количественного анализа приведены в таблице 9.

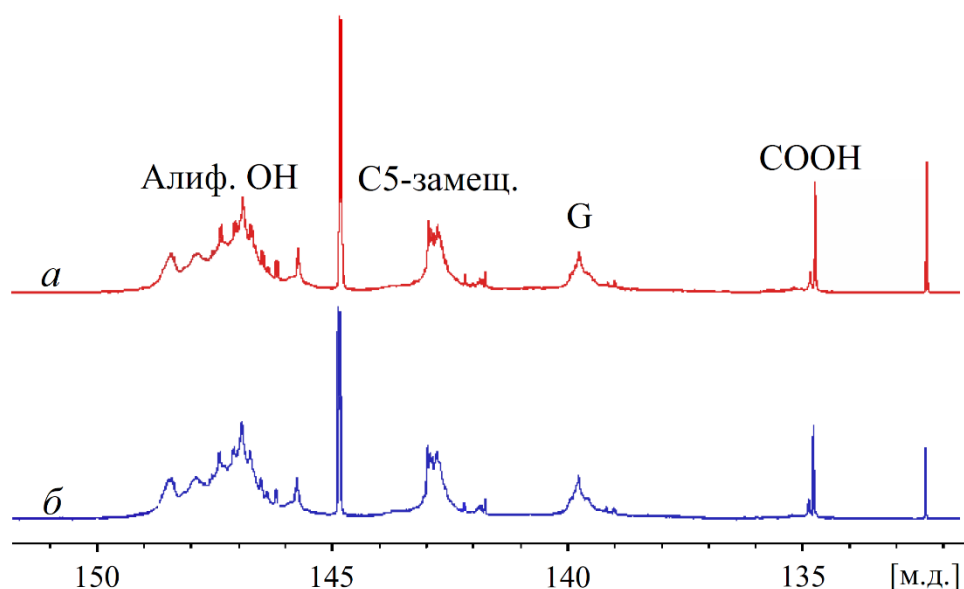


Рисунок 19 – ^{31}P ЯМР спектры ДЛ березы, растворенного в смесях с использованием дейтерированного (а) и недейтерированного пиридина (б)

Таблица 9. Количественный анализ функционального состава ДЛ березы методом ^{31}P ЯМР

Функциональная группа	Пиридин- d_5		Пиридин-Н	
	Интегральная интенсивность	Массовая доля, %	Интегральная интенсивность	Массовая доля, %
Алифатические ОН	$7,54 \pm 0,05$	$5,11 \pm 0,19$	$7,60 \pm 0,05$	$5,12 \pm 0,2$
С5-замещённые ОН	$2,67 \pm 0,05$	$1,81 \pm 0,10$	$2,55 \pm 0,05$	$1,72 \pm 0,08$
Гваяцильные ОН	$1,19 \pm 0,05$	$0,80 \pm 0,06$	$1,37 \pm 0,05$	$0,92 \pm 0,05$
Карбоксильные ОН	$0,29 \pm 0,05$	$0,19 \pm 0,01$	$0,26 \pm 0,05$	$0,18 \pm 0,01$

Таким образом, применение недейтерированного пиридина в смеси растворителей не влияет на значения химических сдвигов сигналов ^{31}P ЯМР спектров, а также на результаты количественных оценок содержания гидроксильных групп в образце. Применение модифицированной методики позволило снизить себестоимость анализа методом ^{31}P ЯМР-спектроскопии примерно в 25 раз.

3.4 Определение параметров регистрации спектров ^{31}P ЯМР

Экспериментальные параметры установлены эмпирически на основании имеющихся литературных данных [26, 34, 35]. Представленные в литературе

подходы к определению функционального состава лигнинов методом ^{31}P ЯМР предусматривают продолжительность регистрации одного спектра более 3 ч. В связи с этим поставлена задача по снижению продолжительности и подбору параметров эксперимента для оптимизации процесса.

На рисунке 20 представлены спектры ЯМР ^{31}P лигнина стеблей малины (*Rubus idaeus* L.), зарегистрированные для одинаковой массы образца (15 мг). Варьировали задержку между импульсами (от 25 до 5 с) и число накоплений (от 512 до 128).

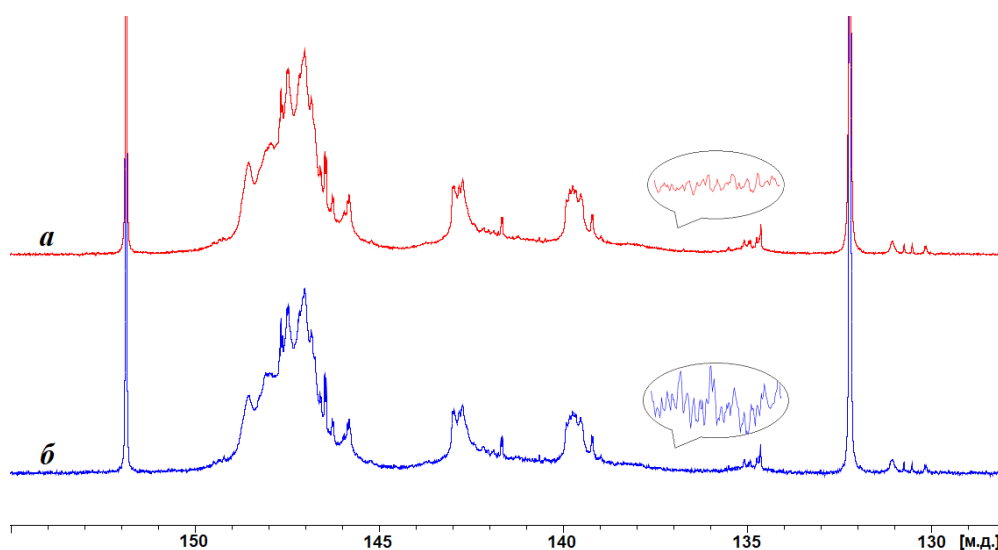


Рисунок 20 – Спектры ЯМР ^{31}P лигнина стеблей малины, зарегистрированные с различными параметрами: время задержки 25 с, число накоплений 512 (а); время задержки 5 с, число накоплений 128 (б)

Результаты эксперимента показывают, что уменьшение времени задержки практически не влияет на совокупность наблюдаемых сигналов спектра, что позволяет утверждать, что время задержки, равное 5 с, является достаточным для полной релаксации ядер после воздействия импульса и регистрации отклика. Дальнейшее снижение времени задержки между импульсами может привести к искажению вида спектра, поскольку время релаксации ядер фосфора составляет 4-10 с.

Также установлено, что отношение "сигнал/шум" лучше в спектре, записанном с большим числом накоплений и длительной задержкой, однако в

данном случае время проведения эксперимента существенно увеличивается (около 3,5 ч) по сравнению с экспериментом с короткой задержкой и меньшим числом накоплений (около 13 мин). Таким образом, определено, что целесообразнее использовать короткую задержку между импульсами и меньшее число накоплений, а качество спектра (отношение "сигнал/шум") улучшить путем увеличения массы образца.

На рисунке 21 представлены спектры ЯМР ^{31}P лигнина стеблей малины (*Rubus idaeus L.*), зарегистрированные в одинаковых условиях эксперимента (длительность импульса – 12 мкс; время регистрации спада свободной индукции – 1,13 с; задержка между импульсами – 5 с; число накоплений – 128), но с разной массой образца (варьировалась от 15 до 40 мг). Было установлено, что при массе образца, равной 40 мг, и числе накоплений, равном 128, отношение "сигнал/шум" достигает значений, получаемых в эксперименте с массой 15 мг и числом накоплений 512. В итоге в основной серии экспериментов было решено использовать массы образцов в 40 мг.

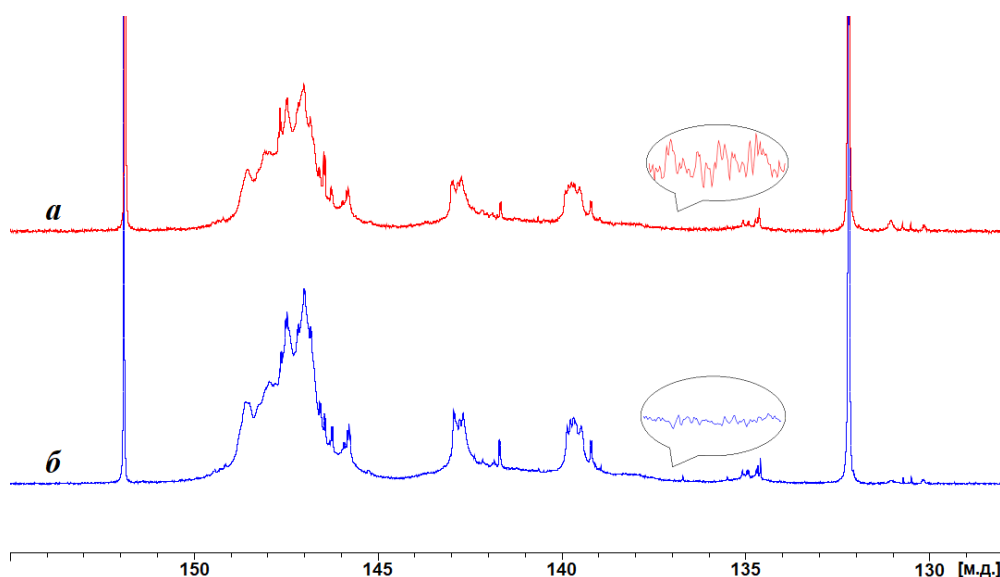


Рисунок 21 – Спектры ^{31}P ЯМР лигнина стеблей малины, зарегистрированные при различных массах образца: 15 мг (а) и 40 мг (б)

Оптимизация параметров регистрации спектров ^{31}P ЯМР позволила снизить продолжительность записи одного спектра с 3 ч 43 мин до 13 мин без потери качества результата, что подтверждается вычислением отношения

«сигнал/шум» в спектрах, зарегистрированных при разных параметрах. Результаты вычислений представлены в таблице 10.

Таблица 10. Отношение «сигнал/шум» в экспериментах

Масса образца, мг	Задержка, с	Отношение «сигнал/шум»
15	25	41
15	5	19
40	5	38

Измерения амплитуды сигнала и шума во всех спектрах проводились в диапазонах 134,82–134,44 м.д. для сигнала (соответствующего карбоксильным группам) и 134,0–133,0 м.д. для шума.

Таким образом, определены параметры регистрации спектров, которые использовались в основной серии опытов: длительность импульса 12 мкс; задержка между импульсами 5 с; число накоплений 128; масса образца лигнина 40 мг.

4 СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЛИГНИНОВ ДРЕВЕСНЫХ И НЕДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ

В качестве объектов исследования выбраны лигнины, выделенные из разных видов растений: хвойные породы, лиственные породы и травянистые растения. В качестве образцов хвойных пород выбраны представители семейства Сосновые (*Pinaceae*), так как эти виды достаточно изучены и имеют большой массив литературных данных. Представители лиственных пород разделены на 4 семейства: Березовые (*Betulaceae*), Буковые (*Fagaceae*), Ивовые (*Salicaceae*) и Розовые (*Rosaceae*). Это позволило выявить особенности структуры лигнина не только между разными видами, но и в пределах семейства, к которому принадлежит растение [173, 174]. В качестве представителей травянистых растений выбраны одни из наиболее распространённых луговых трав Архангельской области, для которых литературные данные о структуре лигнина практически отсутствуют.

4.1 Характеристика объектов исследования

Все образцы лигнинов выделены по методу Пеппера, так как диоксанлигнин считается препаратом, близко отражающим основные структурные особенности природного лигнина. Однако при интерпретации результатов структурного анализа необходимо учитывать деструкцию лигнина в ходе ацидолиза.

Для характеристики исследуемых образцов ДЛ получены данные о молекулярно-массовом распределении (среднемассовые M_w и среднечисловые M_n значения молекулярных масс, индекс полидисперсности M_w/M_n), а также данные о элементном составе (табл. 11).

Таблица 11. Характеристика исследуемых препаратов ДЛ

Семейство	Образец	Элементный состав, %			Молекулярно-массовые характеристики		
		С	Н	О	M _w , Да	M _n , Да	M _w /M _n
Сосновые	Ель	63,0±0,1	5,9±0,4	31,1±0,7	2900	1600	1,8
	Пихта	63,5±0,3	5,7±0,5	30,8±0,7	7000	2100	3,2
	Сосна	62,6±0,3	5,7±0,6	31,7±0,4	4400	1600	2,7
Берёзовые	Берёза	59,5±0,1	5,8±0,7	34,7±0,8	4900	2400	2,0
	Граб	59,3±0,9	5,7±0,4	35,0±0,9	5200	3000	1,7
	Ольха	60,1±0,3	5,9±0,7	34,0±0,8	5800	1800	3,2
Буковые	Дуб	58,4±0,4	6,1±0,3	35,5±0,3	5700	2100	2,7
	Бук	60,1±0,1	5,9±0,3	34,0±0,7	4100	1750	2,3
	Каштан	57,7±0,2	5,9±0,5	36,4±0,3	4400	1300	3,4
Ивовые	Ива	59,4±0,4	5,9±0,5	34,7±0,2	1300	910	1,4
	Тополь	59,8±0,5	5,9±0,6	34,3±0,5	1300	930	1,3
	Осина	54,4±0,0	5,7±0,9	39,9±0,9	1200	880	1,4
Розовые	Малина	58,6±0,1	5,9±0,7	35,5±0,7	5100	1900	2,7
	Рябина	57,9±0,2	5,9±0,2	36,2±1,1	4600	1800	2,5
	Яблоня	57,1±0,6	6,0±0,3	36,9±1,3	4300	1930	2,2
Зонтичные	Тмин	60,0±1,2	5,8±0,4	34,2±0,9	2900	1600	1,8
Кипрейные	Кипрей	58,4±0,9	5,5±0,5	36,1±0,9	3600	1800	2,0
Злаки	Ежа	58,9±0,4	5,5±0,1	35,6±0,8	2100	1300	1,6

Анализ данных элементного состава показал, что ДЛ хвойных пород обладают большим содержанием углерода в составе, но меньшим содержанием кислорода, по сравнению с остальными образцами. Пониженное содержание кислорода можно объяснить тем, что лигнины хвойных пород состоят в основном из гваяцилпропановых структурных единиц, имеющих одну метоксильную группу, тогда как в лигнинах лиственных и травянистых растений преобладает сингилпропановая структурная единица, имеющая две метоксильные группы. Кроме того, лигнины хвойных пород вероятнее всего более конденсированы, что отражается на значениях содержания углерода и более высоких молекулярных массах. У всех представителей семейства Ивовые отмечены низкие значения молекулярных масс. Это может быть объяснено тем, что при экстракции в заданных условиях выделяется более низкомолекулярная фракция лигнина.

4.2 Анализ функционального состава исследуемых лигнинов

Спектры ^{31}P ЯМР всех исследованных образцов представлены на рисунке 22.

Сигнал в области $\sim 132,2$ м.д. соответствует продукту реакции фосфитирующего агента с водой ($\text{TMDP} + \text{H}_2\text{O}$), по которому калибруется весь спектр. В области $\sim 152,0$ м.д. наблюдается сигнал, соответствующий гидроксильным группам внутреннего стандарта (IS). В диапазоне $\sim 133,8$ - $136,1$ м.д. наблюдаются сигналы карбоксильных ОН-групп лигнинов (COOH). В области $\sim 138,5$ - $136,8$ м.д. наблюдается сигнал *n*-оксифенильных групп (Н). Группы сигналов в областях химических сдвигов $\sim 138,5$ - $140,2$ м.д. и $\sim 140,2$ - $145,0$ м.д. соответствуют ОН-группам гваяцильных (G) и C5-замещенных структур (C5-замещ.) соответственно. В диапазоне $\sim 145,0$ - $151,0$ м.д. наблюдаются сигналы алифатических ОН-групп (Алиф. ОН). Сигнал в области $\sim 138,4$ - $138,8$ м.д. резонирует от ОН-групп структур пирокатехинового типа, а в области $\sim 136,1$ - $136,8$ м.д. – от структур флороглюцинового типа в составе флавоноидов.

Из спектров ^{31}P ЯМР ДЛ хвойных пород видно, что сигналы G-единиц имеют наибольшую интенсивность среди сигналов фенольных гидроксильных групп. Одновременно с этим, сигналы, соответствующие ОН-группам C5-замещённых структурных единиц, практически отсутствуют на спектрах, что подтверждает литературные данные.

Спектры ^{31}P ЯМР ДЛ, выделенных из древесных растений семейства Ивовые, показывают, что в них содержится значительное количество Н-единиц, в отличие от лигнинов других рассмотренных лиственных пород деревьев.

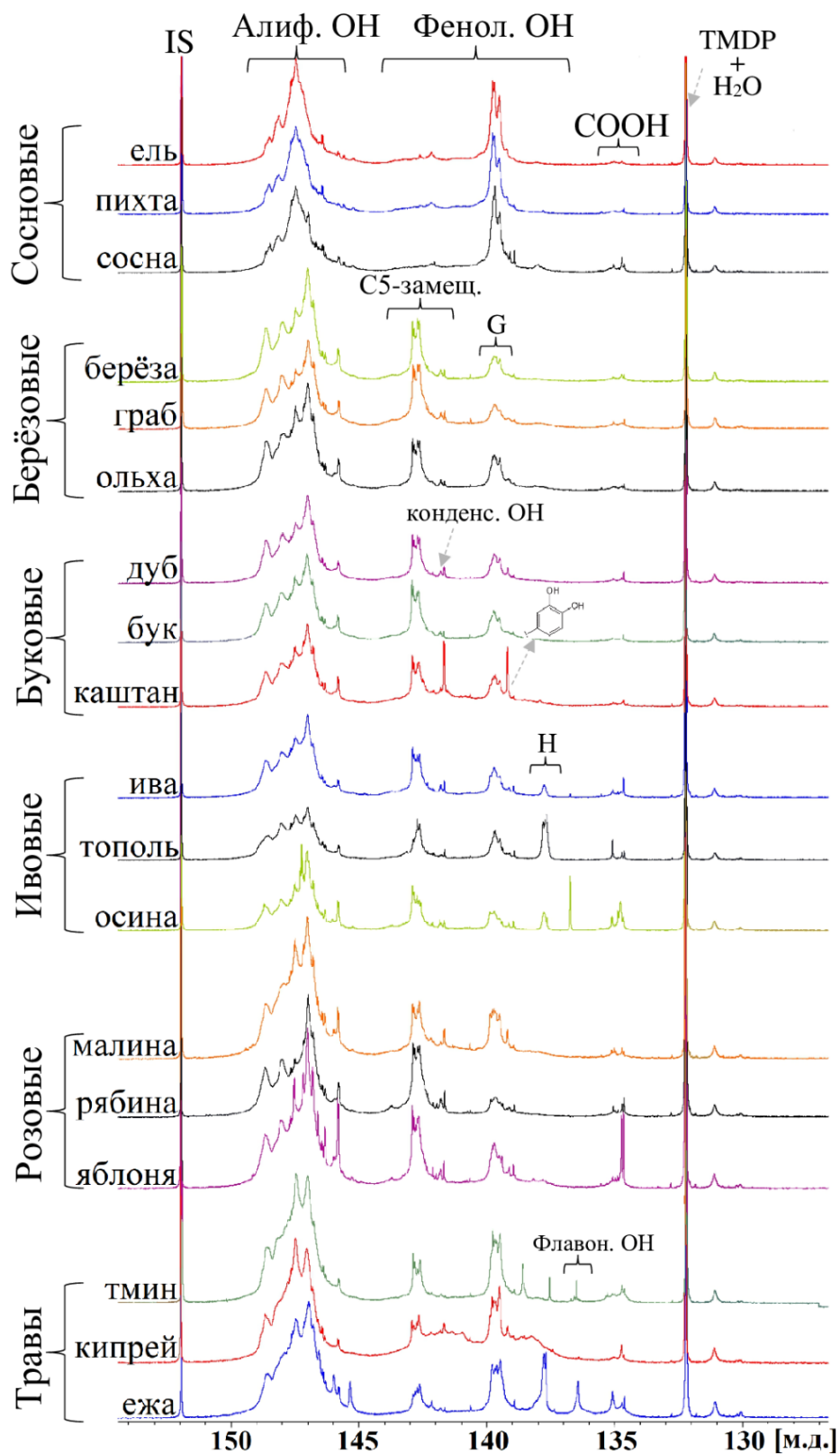


Рисунок 22 – Сравнительный анализ ^{31}P ЯМР спектров ДЛ

Для лигнинов, выделенных из древесных растений семейств Розовые и Буковые, характерно преобладание С5-замещенных структурных звеньев в

составе. Группы сигналов, соответствующие ОН-группам в гваяцилпропановых звеньях, менее выражены в спектрах по сравнению со спектрами лигнинов других лиственных пород деревьев. Интенсивности сигнала алифатических ОН-групп в области ~146 м.д. на спектрах семейств Берёзовые и Розовые увеличены по сравнению с аналогичными сигналами в спектрах остальных проанализированных образцов.

В отличие от лигнинов древесных растений, лигнины трав содержат значительное количество гидроксильных групп всех типов, характерных для лигнинов. Кроме того, на всех ^{31}P ЯМР спектрах лигнинов травянистых растений присутствует сигнал в области ~136,4 м.д., который не соответствует ни одной из распространенных ОН-групп лигнинов. Этот сигнал относится к ОН-группам флавоноидов, предположительно, ковалентно связанным со структурой лигнина.

Заключения по качественному анализу спектров ^{31}P ЯМР подтверждаются данными количественного анализа содержания функциональных групп различных типов в образцах. Результаты расчетов приведены в таблице 12.

Количественный анализ показал, что общее содержание гидроксильных групп, преобладает в ДЛ травянистых растений. Это объясняется значительным количеством Н-единиц в структуре, а также вкладом фрагментов флавоноидов. Содержание карбоксильных ОН-групп на уровне 0,2 ммоль/г в травянистых лигнинах говорит о том, что такие лигнины склонны к окислению и требуют более мягких условий извлечения.

Таблица 12. Содержание функциональных *ОН*-групп в исследованных ДЛ по данным ³¹P ЯМР спектроскопии

Семейство	Образец	Функциональные <i>ОН</i> -группы, ммоль/г							
		Алифатич.	C5-замещ.	G	H	COOH	Флавои.	Фенольные	Всего <i>ОН</i>
Сосновые	Ель	4,39±0,09	0,68±0,01	1,54±0,04	-	0,08±0,00	-	2,28±0,05	6,75±0,14
	Пихта	3,59±0,11	0,73±0,02	1,38±0,01	-	0,08±0,00	-	2,19±0,03	5,86±0,14
	Сосна	3,55±0,10	0,55±0,00	1,48±0,02	-	0,21±0,03	-	2,18±0,04	5,94±0,17
Берёзовые	Берёза	4,62±0,17	1,29±0,03	0,47±0,01	-	0,14±0,01	-	1,85±0,05	6,61±0,23
	Граб	3,89±0,18	1,64±0,01	0,52±0,01	-	0,17±0,01	-	2,34±0,03	6,40±0,22
	Ольха	4,75±0,23	1,21±0,04	0,68±0,02	-	0,13±0,00	-	2,03±0,06	6,91±0,29
Буковые	Дуб	3,91±0,12	1,26±0,01	0,58±0,01	-	0,12±0,01	-	1,92±0,02	5,94±0,15
	Бук	4,09±0,15	1,35±0,01	0,64±0,01	-	0,08±0,00	-	2,07±0,03	6,24±0,18
	Каштан	3,70±0,20	1,73±0,05	0,76±0,02	-	0,13±0,00	-	2,67±0,09	6,50±0,29
Ивовые	Ива	3,62±0,11	1,15±0,01	0,59±0,01	0,13±0,01	0,14±0,01	-	1,86±0,03	5,63±0,15
	Тополь	3,62±0,05	1,00±0,00	0,65±0,01	0,65±0,05	0,13±0,01	-	2,30±0,06	6,05±0,12
	Осина	3,88±0,09	1,12±0,00	0,46±0,01	0,18±0,01	0,37±0,05	-	1,76±0,02	6,01±0,16
Розовые	Малина	4,28±0,13	1,14±0,01	0,69±0,02	-	0,14±0,01	-	1,99±0,04	6,42±0,18
	Рябина	3,60±0,12	1,40±0,03	0,35±0,00	-	0,14±0,01	-	1,82±0,03	5,57±0,16
	Яблоня	4,15±0,13	1,19±0,01	0,65±0,02	-	0,23±0,03	-	2,00±0,05	6,38±0,21
Зонтичные	Тмин	4,34±0,21	0,80±0,02	0,96±0,04	0,10±0,01	0,20±0,03	0,05±0,00	1,91±0,07	6,45±0,30
Кипрейные	Кипрей	3,75±0,14	1,85±0,05	1,15±0,03	0,48±0,05	0,13±0,01	0,06±0,00	3,53±0,13	7,42±0,28
Злаки	Ежа	3,84±0,16	0,73±0,01	0,75±0,01	0,47±0,05	0,25±0,05	0,20±0,03	2,16±0,07	6,25±0,31

* - не обнаружено

4.3 Анализ основных типов связей в исследуемых лигнинах

Относительную оценку содержания основных типов связей в исследуемых препаратах ДЛ проводили путем объемного интегрирования соответствующих сигналов HSQC спектров лигнинов. Параметры экспериментов и принцип расчета описаны в п. 2.7.

На рисунке 23 представлен типичный HSQC ЯМР спектр ДЛ. В спектрах HSQC лигнинов обычно можно выделить четыре области: (1) область боковой цепи, (2) область алифатических оксигенированных структур, (3) область ароматических/ненасыщенных структур и (4) сигналы альдегидных групп.

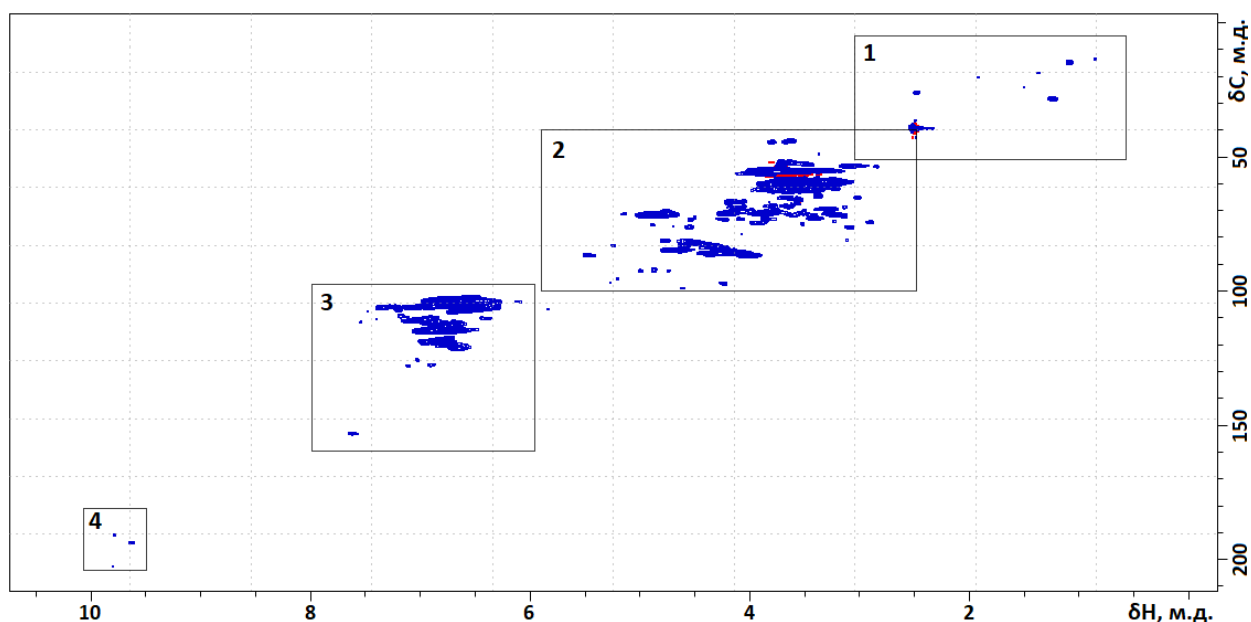


Рисунок 23 – HSQC ЯМР спектр ДЛ берёзы

Области алифатических ($\delta C/\delta H$ 100,0-40,0/6,0-2,5 м.д.) и ароматических ($\delta C/\delta H$ 160,0-105,0/8,0-6,0 м.д.) структур на спектрах HSQC наиболее интересны в изучении лигнина. Область алифатических оксигенированных структур дает важную информацию о связях между фенилпропановыми единицами, присутствующих в лигнине. Здесь наблюдаются сигналы метоксильных групп, β -ариловых эфиров, фенилкумарана, резинола и множества других фрагментов. Основные корреляции в области ароматических/ненасыщенных структур соответствуют бензольным кольцам

и ненасыщенным боковым цепям различных единиц лигнина. В этой области анализируют сигналы, соответствующие S-, G- и H-единицам лигнина.

Все HSQC спектры ДЛ имеют схожие контуры. На рисунке 24 представлен пример назначения сигналов на спектре ДЛ берёзы. Идентификацию кросс-пиков проводили в соответствии с литературными данными для основных типов связей [2, 27, 34, 35, 59, 175].

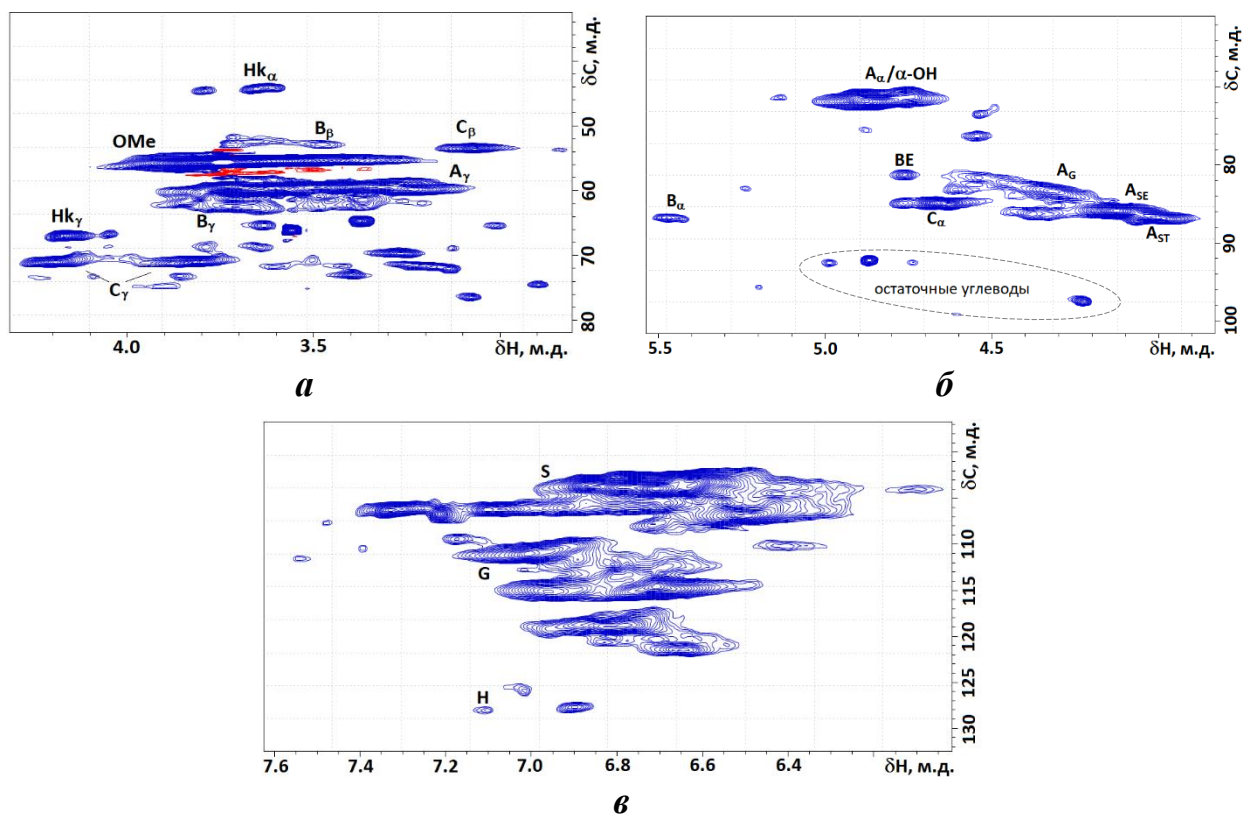


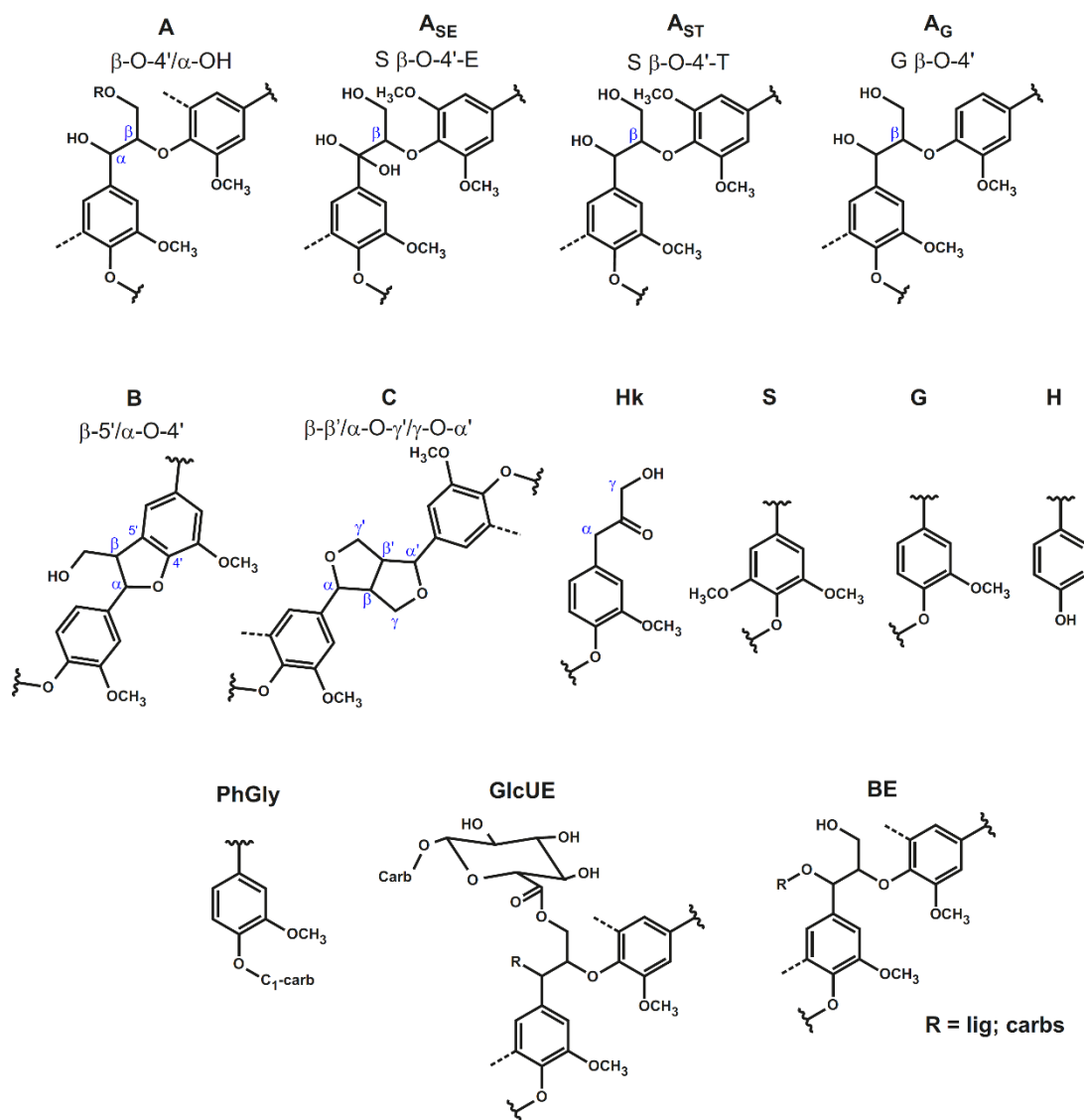
Рисунок 24 – Области алифатических оксигенированных (а, б) и ароматических (в) структур на спектре HSQC ДЛ берёзы

Выраженные сигналы метоксильных групп (OMe) и β -O-4' ариловых эфиров (A) указывают на то, что эти структуры являются доминирующими в этой области. Кроме того, отчетливо видны и другие типичные сигналы от боковых цепей структур фенолкумарана (B), резинола (C). Кроме того, в этой области наблюдаются сигналы структур β -оксикониферилового спирта, известных как кетоны Гибберта (Hк). Присутствие таких соединений указывает на частичную деградацию эфирных связей природного лигнина в процессе его извлечения, в частности β -O-4'-связей [63, 175].

Мощный сигнал, соответствующий $C_{2,6}$ - $H_{2,6}$ -корреляции S-единиц, наблюдается в ароматической области при $\delta C/\delta H$ 103,9/6,71 м.д. Сигналы G-единиц, соответствующие их корреляциям для атомов C_2 - H_2 , C_5 - H_5 и C_6 - H_6 , наблюдаются при $\delta C/\delta H$ 111,1/6,99, 114,6/6,71 и 118,8/6,78 м.д. соответственно. Сигналы от *n*-гидроксифенильных (H) звеньев выражены слабо. Структурные формулы основных фрагментов как области боковой цепи, так и ароматической области спектра изображены на рисунке 25.

Обнаружено, что все исследуемые препараты лигнинов содержат связи, характерные для лигноуглеводного комплекса. Отмечено присутствие фенилгликозидных связей (PhGly), сложных эфиров глюконовой кислоты (GlcUE) и бензиловых эфиров (BE).

Следует подчеркнуть, что фрагменты, отмеченные на рисунке 25, являются общими для всех исследуемых видов растений. Минорные фрагменты трицинового типа, *n*-кумаровой и феруловой кислот были обнаружены в структуре ДЛ травянистых растений. Рядом с сигналом $S_{2,6}$ несколько корреляций ^{13}C - 1H трицина были определены при $\delta C/\delta H$ 94,1/6,56 (T_8), $\delta C/\delta H$ 98,8/6,22 (T_6), $\delta C/\delta H$ 104,0/7,30 ($T_{2/6'}$) и $\delta C/\delta H$ 104,6/7,03 (T_3). Количественная оценка показала, что ДЛ ежи относительно богат трициновыми фрагментами (3,8 на 100 ФПЕ) по сравнению с ДЛ тмина и кипрея (~1 на 100 ФПЕ). Полученные результаты полностью согласуются с данными ^{31}P ЯМР спектроскопии. Как один из типов флавоноидов, трицин обычно встречается в большинстве злаковых культур, к которым относится Ежа, что и объясняет присутствие фрагментов трицина в структуре ДЛ ежи.



(A) β -ариловые эфиры; (B) фенолкумарановые структуры, образованные β -5'/ α -O-4'-связями; (C) структуры резинола, образованные β - β' / α -O- γ' / γ -O- α' -связями; (Hk) кетоны Гибберта; (S) сиригильная единица; (G) гваяцильная единица; (H) *n*-гидроксифенильная единица; (PhGly) фенолгликозидная связь; (GlcUE) сложные эфиры глюконовой кислоты; (BE) бензиловые эфиры

Рисунок 25 – Основные структурные фрагменты, присутствующие в ДЛ

Кросс-пик при $\delta C/\delta H$ 130,0/7,47 в спектрах HSQC травянистых растений был отнесен к положениям 2 и 6 бензольного кольца *n*-кумаровой кислоты (pCA). Сигнал pCA_{3,5} при 115,5/6,79 м.д. сильно перекрывался с сигналом G_{5,6}, поэтому для количественной оценки проводили интергирование сигнала pCA_{2,6}. Результаты показали, что исследуемые лигнины трав содержат от 1,8 до 5,5 на 100 ФПЕ структур *n*-кумаровой кислоты.

В таблице 13 представлены результаты количественного анализа основных типов связей, характерных для всех исследуемых препаратов лигнина. Анализ полученных данных показывает, что содержание основных мономерных звеньев (S-, G- и H-единиц), а также метоксильных групп в целом соответствует литературным данным. В то время как данные по количественному анализу β -O-4-связей сильно разнятся. Это связано с тем, что в литературе сигнал при $\delta C/\delta H$ 73,7-69,7/5,26-4,65 м.д. ошибочно приравнивают к общему содержанию всех β -O-4-связей, тогда как данный сигнал принадлежит только структурам β -ариловых эфиров со свободной гидроксильной группой в α -положении.

Так, препараты ДЛ семейства Сосновые состоят преимущественно из G-единиц с незначительным присутствием S- и H-единиц. Это подтверждается и количеством метоксильных групп (OMe) - ~ 95 %. Кроме того, содержание β -O-4-связей со свободными бензильными OH-группами (β -O-4/ α -OH) для семейства Сосновые наименьшее из всех рассмотренных препаратов.

Таблица 13. Количественная оценка различных структурных фрагментов ДЛ путем интегрирования ^{13}C - ^1H корреляционных пиков в спектрах HSQC ЯМР, на 100 ФПЕ

Фрагмент	Область интегрирования ($^{13}\text{C}/^1\text{H}$)	Препарат лигнина								
		Сосновые			Берёзовые			Буковые		
		Ель	Пихта	Сосна	Берёза	Граб	Ольха	Дуб	Бук	Каштан
S _{2,6}	109,0-99,3/7,67-5,65	3,6±0,1	4,6±0,2	4,5±0,1	71,9±1,8	75,8±2,1	62,9±1,3	67,5±1,5	65,0±2,0	62,4±2,2
G ₂	113,6-109,2/7,63-6,49	96,0±3,9	95,0±2,7	87,0±3,3	28,1±0,5	24,2±0,2	37,1±0,9	32,5±1,0	35,0±2,0	37,6±1,8
H _{2,6}	131,6-127,3/7,32-7,10	0,8±0,2	0,9±0,1	1,5±0,0	1,5±0,1	1,9±0,1	1,5±0,0	0,7±0,1	0,8±0,1	0,8±0,3
S/G		0,0	0,0	0,0	2,6±0,1	3,1±0,1	1,7±0,1	2,1±0,1	1,9±0,2	1,7±0,1
OMe	57,2-54,0/4,45-3,10	98,1±3,2	92,4±1,8	93,6±2,5	116,4±3,7	109,7±1,3	110,9±2,2	129,1±5,0	109,2±2,9	122,7±3,7
β-O-4/α-OH	73,7-69,7/5,26-4,65	16,6±0,6	13,9±0,5	12,2±1,0	28,4±0,3	33,6±0,7	36,4±0,5	33,3±0,9	24,3±0,5	33,8±0,2
S β-O-4 T	87,7-84,8/4,04-3,85	2,7±0,1	1,7±0,5	1,5±0,1	13,5±0,5	15,5±1,0	15,3±1,4	13,8±0,5	10,0±0,9	14,4±0,1
S β-O-4 E	88,1-84,8/4,28-4,06	1,4±0,4	1,2±0,1	1,1±0,1	6,8±0,2	8,0±0,5	8,0±0,2	7,8±0,8	5,7±0,5	7,6±0,1
G β-O-4 E+T	84,5-82,0/4,44-4,13	12,0±1,0	9,3±0,5	8,2±0,9	7,5±0,5	8,1±0,1	10,4±0,4	8,5±0,3	7,2±0,4	9,3±0,2
α-CO/β-O-4	84,5-82,0/5,36-5,06	0,1±0,0	0,2±0,1	0,2±0,2	0,8±0,1	1,4±0,0	1,2±0,1	1,3±0,0	0,9±0,1	1,2±0,0
β-β (резинол)	86,7-84,1/4,71-4,52	3,5±0,2	3,5±0,0	2,6±0,1	7,8±0,3	6,4±0,5	7,3±0,2	7,4±0,1	8,1±0,3	7,6±0,1
β-5 (фенилкумаран)	89,4-85,4/5,72-5,29	9,3±0,2	8,3±0,2	7,6±0,3	2,2±0,2	2,3±0,1	4,1±0,1	9,1±0,7	2,8±0,4	3,5±0,0
Hk	52,4-49,4/3,72-3,43	5,2±0,1	5,8±0,0	5,5±0,6	6,0±0,5	4,2±0,2	6,3±0,4	1,0±0,0	1,4±0,1	2,2±0,1
Ar-CH=CH-CHO	155,5-151,8/7,75-7,46	1,2±0,1	1,0±0,1	1,2±0,0	1,2±0,0	1,1±0,0	1,4±0,0	1,3±0,1	1,0±0,1	1,2±0,0
Ar-CHO	192,5-189,2/10,06-9,55	0,3±0,0	0,4±0,1	1,0±0,1	0,4±0,0	0,4±0,0	0,4±0,0	0,2±0,0	0,2±0,2	0,7±0,1
Ac	22,2-18,9/2,15-1,68	0,3±0,0	0,4±0,0	0,8±0,0	1,7±0,1	3,0±0,5	2,0±0,1	3,1±0,1	1,2±0,1	2,7±0,3
γ-эфиры	64,6-61,0/4,43-4,21	0,2±0,0	0,5±0,5	0,5±0,1	1,3±0,1	0,3±0,1	0,8±0,1	0,7±0,0	1,0±0,0	2,7±0,1
BE	84,1-79,9/5,04-4,64	6,0±0,9	6,0±0,7	4,7±0,5	4,6±0,3	5,4±0,1	6,2±0,5	5,8±0,2	5,9±0,9	0,8±0,1
GlcU эфиры	101,5-100,0/4,72-4,59	0,2±0,2	0,2±0,0	0,2±0,0	0,3±0,2	0,3±0,0	0,2±0,0	0,2±0,2	0,2±0,0	0,4±0,0
PhGly	104,7-99,5/5,23-4,80	0,9±0,1	1,1±0,0	1,1±0,1	1,4±0,0	1,7±0,3	1,6±0,1	1,3±0,1	1,4±0,1	1,4±0,0

Продолжение таблицы 13.

Фрагмент	Область интегрирования ($^{13}\text{C}/^1\text{H}$)	Препарат лигнина								
		Ивовые			Розовые			Травы		
		Ива	Тополь	Осина	Малина	Рябина	Яблоня	Тмин	Кипрей	Ежа
S _{2,6}	109,0-99,3/7,67-5,65	60,3±0,9	55,3±1,0	66,6±2,1	56,0±1,8	76,0±1,3	67,0±0,5	42,3±1,2	35,5±0,7	43,5±0,5
G ₂	113,6-109,2/7,63-6,49	39,7±0,5	44,7±0,7	33,4±0,2	44,0±1,8	24,0±0,6	31,9±1,0	56,6±1,8	63,4±2,2	53,3±0,9
H _{2,6}	131,6-127,3/7,32-7,10	0,7±0,1	1,7±0,2	0,8±0,1	1,0±0,2	0,6±0,0	2,1±0,1	2,4±0,2	2,3±0,1	6,4±0,2
S/G		1,5±0,0	1,2±0,0	2,0±0,1	1,3±0,1	3,2±0,1	2,1±0,1	0,7±0,0	0,6±0,0	0,8±0,0
OMe	57,2-54,0/4,45-3,10	109,3±3,1	104,5±2,2	105,3±0,5	89,3±2,9	121,0±3,2	111,9±0,4	92,1±0,5	77,3±0,1	92,1±0,7
β-O-4/α-OH	73,7-69,7/5,26-4,65	23,9±0,7	26,5±0,5	21,5±0,1	36,5±0,5	26,1±0,4	24,7±0,1	26,2±0,2	27,0±0,5	24,2±0,4
S β-O-4 T	87,7-84,8/4,04-3,85	9,6±0,2	7,7±0,1	9,3±0,2	14,9±0,6	12,0±0,5	10,4±0,2	9,4±0,1	9,0±0,1	7,9±0,1
S β-O-4 E	88,1-84,8/4,28-4,06	5,6±0,1	5,4±0,4	5,2±0,0	10,1±0,4	7,2±0,2	6,8±0,0	5,6±0,4	5,3±0,0	5,0±0,0
G β-O-4 E+T	84,5-82,0/4,44-4,13	7,1±0,0	8,8±0,1	8,4±0,9	12,3±1,3	5,2±0,1	6,4±0,1	9,4±0,3	9,6±0,1	7,3±0,1
α-CO/β-O-4	84,5-82,0/5,36-5,06	0,8±0,0	0,5±0,0	0,4±0,0	0,3±0,0	1,0±0,0	0,9±0,0	0,7±0,0	0,4±0,0	2,3±0,0
β-β (резинол)	86,7-84,1/4,71-4,52	7,5±0,2	4,1±0,1	6,7±0,1	8,5±0,6	7,1±0,1	6,9±0,7	8,1±0,1	6,9±0,2	3,6±0,1
β-5 (фенилкумаран)	89,4-85,4/5,72-5,29	3,2±0,1	3,7±0,0	2,2±0,0	4,5±0,1	1,2±0,0	2,5±0,1	5,9±0,2	6,4±0,1	4,8±0,2
Hk	52,4-49,4/3,72-3,43	6,6±0,5	4,8±0,2	2,1±0,0	3,4±0,1	0,9±0,0	6,3±0,2	5,1±0,1	4,4±0,0	4,2±0,0
Ar-CH=CH-CHO	155,5-151,8/7,75-7,46	1,1±0,0	1,2±0,1	1,2±0,1	1,1±0,0	1,0±0,0	1,3±0,0	1,2±0,0	0,8±0,0	0,5±0,0
Ar-CHO	192,5-189,2/10,06-9,55	0,9±0,1	0,6±0,0	0,6±0,0	0,3±0,0	0,6±0,0	0,6±0,0	0,3±0,0	0,3±0,0	0,4±0,0
Ac	22,2-18,9/2,15-1,68	0,8±0,0	0,6±0,1	2,4±0,3	2,5±0,1	1,6±0,1	3,7±0,1	1,0±0,1	1,4±0,1	1,5±0,1
γ-эфирь	64,6-61,0/4,43-4,21	1,2±0,0	6,6±0,4	3,1±0,0	0,5±0,5	1,0±0,0	1,3±0,0	1,9±0,1	1,6±0,1	5,9±0,3
BE	84,1-79,9/5,04-4,64	5,2±0,1	6,7±0,2	4,3±0,1	3,8±0,2	4,6±0,2	4,3±0,3	4,5±0,2	4,1±0,3	4,3±0,1
GlcU эфирь	101,5-100,0/4,72-4,59	0,1±0,0	0,3±0,0	0,1±0,0	0,3±0,2	0,1±0,1	0,1±0,0	0,4±0,2	0,5±0,0	0,5±0,1
PhGly	104,7-99,5/5,23-4,80	1,1±0,0	0,8±0,1	2,6±0,0	1,1±0,1	1,6±0,1	2,0±0,1	0,8±0,0	0,3±0,0	6,3±0,2

Присутствие во всех препаратах фрагментов кетонов Гибберта (Нк) указывает на то, что часть β -О-4-связей подверглась гидролитической деструкции в ходе ацидолиза. Количество структур Нк для большинства исследованных образцов составило порядка 4-6 на 100 ФПЕ, исключая лигнины представителей семейства Буковые (1-2 на 100 ФПЕ), что говорит о более устойчивой структуре лигнинов данного семейства.

Для всех препаратов ДЛ количество трео-изомеров β -ариловых эфиров S-типа (A_{ST}) вдвое больше, чем эритро-изомеров (A_{SE}), что объясняется стерическими особенностями.

Количество структур резинола (С) для ДЛ из хвойных пород втрое меньше, чем структур фенилкумарана (В), тогда как для ДЛ из лиственных пород наоборот, структур С втрое больше, чем структур В. Для ДЛ травянистых растений количество этих структур примерно одинаковое.

Наличие типов связей, характерных для лигноуглеводного комплекса отмечено у всех исследуемых препаратов ДЛ. Наибольшую долю связей лигнин-углевод составляют бензиловые эфиры (ВЕ), в которых остаток полисахарида связан с лигнином через α -положение. Количество бензилэфирных связей варьировалось в диапазоне 3,8-6,7 на 100 ФПЕ. Отмечены также следовые количества сложных эфиров глюкуроновой кислоты (GlcUE). Наибольшее содержание фенил-гликозидных связей (PhGly) отмечено для ДЛ ежи (6,3 на 100 ФПЕ). Присутствие некоторого количества остаточных связей лигнина с углеводами характерно для препаратов ДЛ, так как условия ацидолиза считаются относительно мягкими и полной деструкции лигноуглеводного комплекса не происходит.

Соотношение S- и G-единиц в лигнинах разных видов растений сильно варьируется, что влияет на реакционную способность. Как правило, лигнин с высоким соотношением S/G считается предпочтительным сырьем для максимизации выхода мономеров в процессах биоконверсии [176, 177], так как высокое содержание синрингильных структур снижает вероятность образования неактивных углерод-углеродных связей, приводящих к

нежелательной конденсации лигнина во время деполимеризации. Анализируя соотношение S/G единиц различных лигнинов (рис. 26), можно видеть, что большинство рассмотренных лигнинов лиственных пород являются потенциально приоритетными для последующей переработки в мономеры. В этом аспекте лигнины трав, а также хвойные породы являются менее перспективным сырьём.

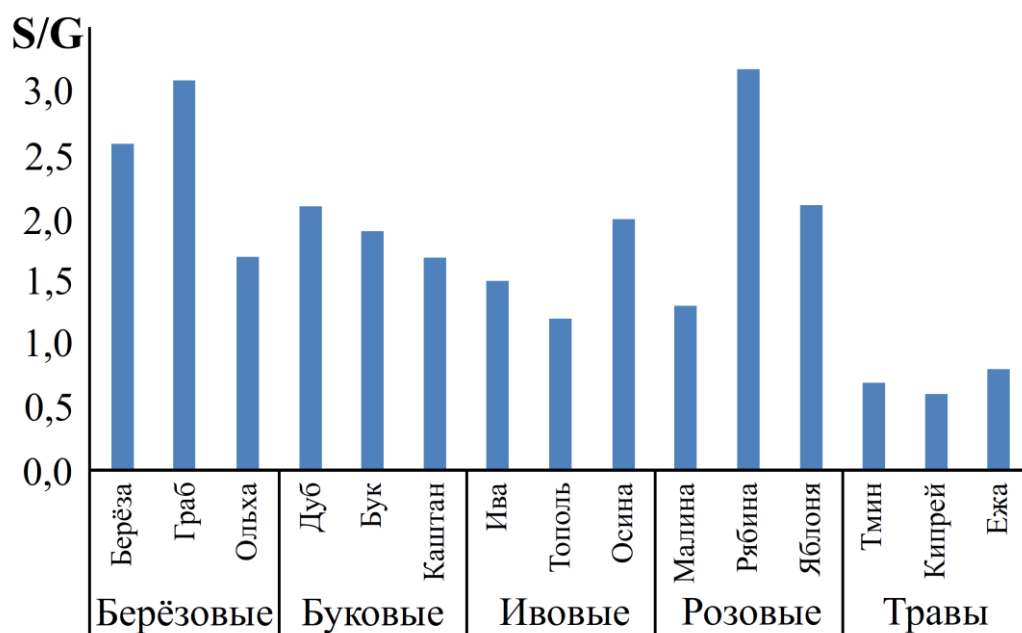


Рисунок 26 – Соотношение S- и G-единиц в исследуемых лигнинах

Таким образом, с помощью HSQC ЯМР спектроскопии составлен подробный структурный профиль для 18 препаратов диоксанлигнинов, выделенных из растений различного биологического происхождения. Отмечена структурная вариабельность лигнинов не только между разными видами, но и в зависимости от семейства, к которому принадлежит растение. Присутствие в структуре травянистых лигнинов фрагментов флавоноидов, *n*-кумаровой и феруловой кислот, а также коричневого альдегида подтверждает предположение о существовании иного биосинтетического пути лигнина.

Лигнины семейств Берёзовые и Буковые имеют в структуре наибольшее количество фрагментов β -арильных эфиров со свободной гидроксильной

группой в α -положении, что говорит о большей реакционной способности данных лигнинов. Соответственно, представители этих семейств будут являться приоритетным сырьём при разработке способов переработки лигнина.

4.4 Возможные пути валоризации лигнина в зависимости от его структурных особенностей

Разнообразие функциональных групп лигнина позволяет применять его в различных отраслях промышленности [178], включая производство полимерных пен, клеев, добавок в биоразлагаемые композиты, мембран и углеродных волокон, антиоксидантов, а также противомикробных агентов (рис. 27).



Рисунок 27 – Применение лигнина и материалов на основе лигнина

Полученный массив структурной информации позволяет проанализировать перспективные способы валоризации лигнина в вопросах комплексного использования всех компонентов биомассы.

Так, например, преобладание свободных алифатических ОН-групп в структуре лигнина благоприятствует гидротропным процессам биопереработки при производстве формованных материалов на основе лигнина [179]. Согласно полученным данным по функциональному составу исследуемых лигнинов, для такой стратегии наиболее подходящими породами древесины являются ель, берёза и ольха.

Высокая доля фенольных ОН-групп благоприятствует обработке циклическими карбонатами. Такой синтез позволяет получить ароматические полиолы в одну стадию для прямого производства пенополиуретанов [180]. Необходимыми характеристиками обладают травянистые растения, а также ель и каштан.

Низкомолекулярные травянистые лигнины с *n*-гидроксифенильными группами в структуре (кипрей, ежа) потенциально пригодны для получения фенолов. Удаление *n*-гидроксикоричного спирта и коричневого альдегида из структуры лигнина в условиях кислотного катализа позволит потенциально использовать такие модифицированные лигнины как антиоксиданты, углеродное волокно, наночастицы или сорбенты для очистки воды [181].

Соотношение S/G для лигнинов лиственных пород составило от 1,5 до 3,2 единиц, что говорит о том, что данные лигнины имеют высокий потенциал для последующей переработки в мономеры из-за меньшей склонности к конденсации.

В качестве объектов исследования в данной работе использован один из видов органосольвентных лигнинов – диоксанлигнин, поскольку органосольвентные процессы активно развиваются и при успешном совершенствовании существующих технологий биопереработки наряду с целлюлозой могут быть успешно коммерциализированы продукты на основе лигнина с минимальными рисками для окружающей среды.

Следует отметить, что органосольвентные лигнины обладают преимуществами перед техническими лигнинами благодаря своей

растворимости в органических растворителях, что является одним из требований для использования в химии полимеров. По сравнению с сульфатной и сульфитной делигнификацией органосольвентная делигнификация является более экологичным процессом из-за отсутствия вредных серосодержащих выбросов [182]. Кроме того, некоторые органосольвентные процессы позволяют отделить целлюлозу и гемицеллюлозы от лигнина, что оптимизирует переработку каждого из этих компонентов.

Доказательством целесообразности и необходимости модернизации биопереработки послужила пилотная демонстрация нового завода по переработке лигноцеллюлозы на основе древесины бука [183]. Полученными продуктами были растворимая целлюлоза, фенольные олигомеры и яблочная кислота. Другим положительным примером является исследование Пэрота [182]. Варка с использованием 70 % этанола показала высокий выход лигнина из черной ели при сохранении высокого выхода целлюлозы.

Органосольвентный лигнин обладает преимуществами небольших и однородных молекул, а также своей функциональностью. Такие лигнины предпочтительнее использовать в качестве клеев на основе поликарбоксилатного полиэфира по сравнению с лигнинами, полученными традиционными способами [184], что повышает стоимость конечного продукта.

Таким образом, состав исходного сырья для биопереработки напрямую зависит от заданных свойств конечных продуктов. Полное вовлечение всех компонентов биомассы в производственные циклы позволит уменьшить количество отходов и повысить экономическую эффективность.

5 ИЗУЧЕНИЕ СОРБЦИОННЫХ СВОЙСТВ ЛИГНИНОВ МЕТОДОМ ТВЕРДОТЕЛЬНОЙ ЯМР СПЕКТРОСКОПИИ

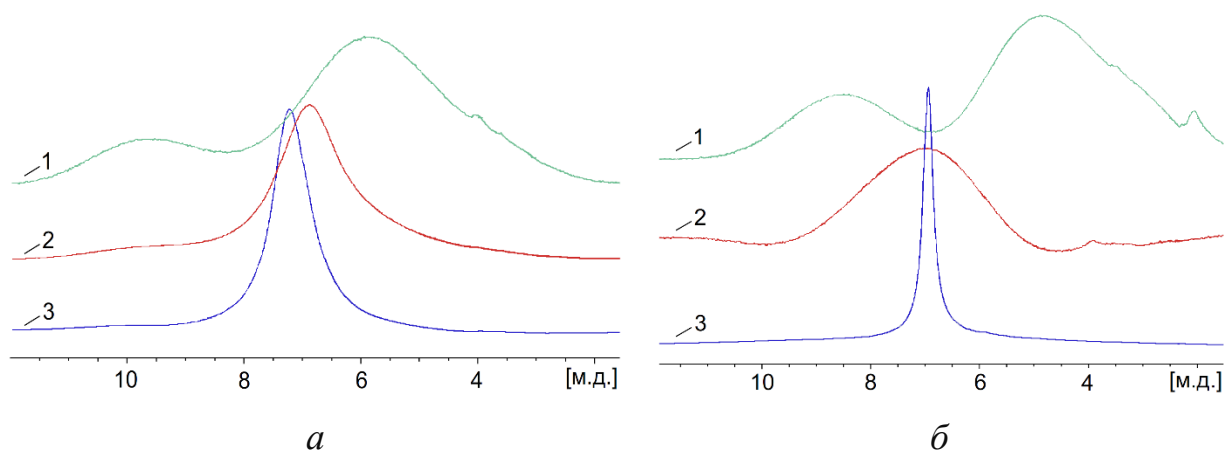
Одним из путей валоризации лигнина является использование его в качестве сорбента. Важным аспектом при изучении свойств лигнина и разработке методов его модификации является способность сорбировать и удерживать некоторое количество воды. Вода, диффундирующая в полимер, изменяет его физическое состояние, а при наличии связей, подвергающихся гидролизу, вызывает деструкцию полимерной цепи, что ухудшает свойства материала, определяемые его высокой молекулярной массой. Вода может вступать в реакцию с полимером и без разрыва полимерной цепи, однако свойства «нового» полимера, отличаются от свойств исходного. Использование современных методов ЯМР позволяет установить в ряде случаев существование нескольких форм воды в полимерах (свободная, связанная, незамерзающая и т. д.) [185].

Для оценки влияния особенностей строения лигнинов различных высших растений нами проведено исследование сорбционной емкости паров воды лигнинами березы повислой (*Bétula pendula*) и ели обыкновенной (*Picea abies*). Данные породы выбраны как наиболее типичные представители лиственных и хвойных пород древесины. Исследование проведено с применением твердотельной ЯМР-спектроскопии, согласно пункту 2.8.5 диссертационной работы.

5.1 Анализ методом ^1H ЯМР спектроскопии твердого тела

Процедура гидратации образцов и параметры экспериментов описаны в пунктах 2.8.2 и 2.8.3. Сорбционную ёмкость определяли весовым методом по разнице масс от абсолютно сухого образца.

Спектры ^1H ЯМР исследуемых образцов, выдержанных при относительных влажностях 100 %, 32 % и 11 %, представлены на рисунке 27.



Относительная влажность: 1 – 11 %; 2 – 32 %; 3 – 100 %

Рисунок 27 – Спектры ^1H ЯМР твердого тела образцов диоксанлигнина
ели (а) и березы (б)

Сигнал ^1H ЯМР представляет собой средневзвешенную сумму сигналов всех протонов образца. На спектре ^1H ЯМР можно наблюдать отдельные сигналы, отвечающие протонам в разном окружении. Такие сигналы наблюдаются при отсутствии протонного обмена или в случае медленного обмена. Быстрый обменный процесс наблюдается, если два различных положения поглощающего ядра нельзя обнаружить в спектре в результате того, что получается один слившийся (усредненный) сигнал.

В нашем случае, при высоком влагосодержании в образце мы наблюдаем быстрый протонный обмен, а в образцах с низким влагосодержанием – медленный.

При низких влагосодержаниях образца на спектрах ^1H ЯМР наблюдаются два широких сигнала (~ 5 м.д. и $\sim 8,5$ м.д.). Сигнал с химическим сдвигом ~ 5 м.д. предположительно отвечает большей части алифатических протонов образца. Так как данный сигнал близок по положению к сигналу воды (4,7 м.д.), вероятно, в образце при низких влагосодержаниях существуют изолированные области с почти свободными молекулами воды, сигнал протонов которых накладывается на сигнал протонов лигнина.

По мере роста влагосодержания образца два широких сигнала постепенно сливаются. Усредненный сигнал занимает промежуточное положение между сигналами связанной и почти свободной воды, следовательно, протоны свободной воды с увеличением влажности более интенсивно участвуют в протонном обмене. Усредненный сигнал является средневзвешенной суммой сигналов большинства протонов, что свидетельствует о том, что при влагонасыщении гидратируется весь объем образца, и большинство протонов участвует в обменных процессах.

Положение сигнала ^1H ЯМР определяется сорбционной емкостью полимера по отношению к сорбируемой воде из воздушной среды при заданной относительной влажности. Значения сорбционной емкости представлены в таблице 14.

Таблица 14. Сорбционная емкость образцов лигнина ели и березы по отношению к воде, сорбируемой из воздушной среды

Параметр	Ель				Береза			
	Относительная влажность, %				Относительная влажность, %			
	95	75	58	32	95	75	58	32
Масса образца, мг	50,5	50,7	50,9	50,1	50,1	49,7	48,6	50,2
Масса поглощенной воды, мг	4,81±0,18	2,12±0,10	1,75±0,12	0,96±0,06	9,80±0,46	2,67±0,18	1,46±0,06	0,28±0,01
Сорбционная ёмкость, мг/г	95,2±3,6	41,8±2,0	34,4±2,4	19,2±1,2	195,6±9,2	53,7±3,6	30,0±1,2	5,6±0,2

Таким образом, по данным таблицы можно сделать вывод, что диоксанлигнин берёзы (ДЛ-Б) способен сорбировать из газовой фазы около 20 % воды по массе, тогда как диоксанлигнин ели (ДЛ-Е) всего 9 %.

На рисунке 28 представлена графическая зависимость роста сорбционной ёмкости от влагосодержания образца для двух лигнинов, выделенных из разных пород древесины.

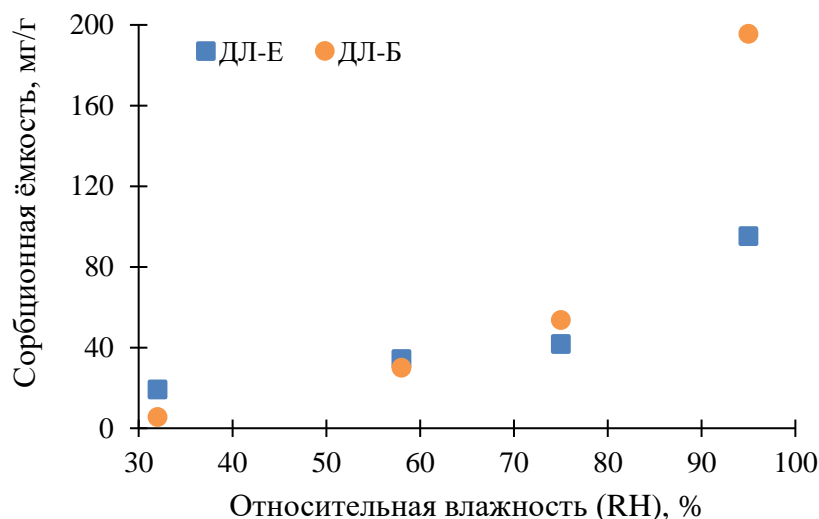


Рисунок 28 – График зависимости сорбционной ёмкости лигнинов от относительной влажности

При низких влагосодержаниях значения сорбционной ёмкости ДЛ-Б и ДЛ-Е почти одинаковы. Но по достижении относительной влажности 75 %, ДЛ-Б начинает сорбировать до 2 раз больше влаги, чем лигнин ели.

5.2 Анализ методом ^{13}C ЯМР спектроскопии твердого тела

Для получения количественного распределения молекул воды по сорбционным центрам в нерастворенном лигнине необходимо знать его функциональный состав. Функциональный анализ исследуемых образцов проводился в растворенном состоянии с помощью спектроскопии ЯМР на ядрах ^{31}P . Содержание метоксильных групп установлено с помощью HSQC ЯМР. Интерпретация спектров и результаты расчетов описаны в разделе 4.

Для наглядности и удобства дальнейших расчетов, результаты анализа функционального состава были выражены в процентах и представлены в таблице 15.

Таблица 15. Массовые доли функциональных групп в образцах диоксанлигнина ели и берёзы, %

Образец	Функциональные ОН-группы				ОМе
	Алиф.	С5-замещ.	G	СООН	
ДЛ-Е	7,46±0,15	1,16±0,02	2,62±0,07	0,14±0,01	12,6±0,4
ДЛ-Б	7,85±0,29	2,19±0,05	0,79±0,02	0,23±0,01	19,3±0,6

Спектры ^{13}C ЯМР образцов, подготовленных методом параллельной сорбции для всех заданных влагосодержаний, представлены на рисунке 29 для ДЛ-Е и на рисунке 30 для ДЛ-Б.

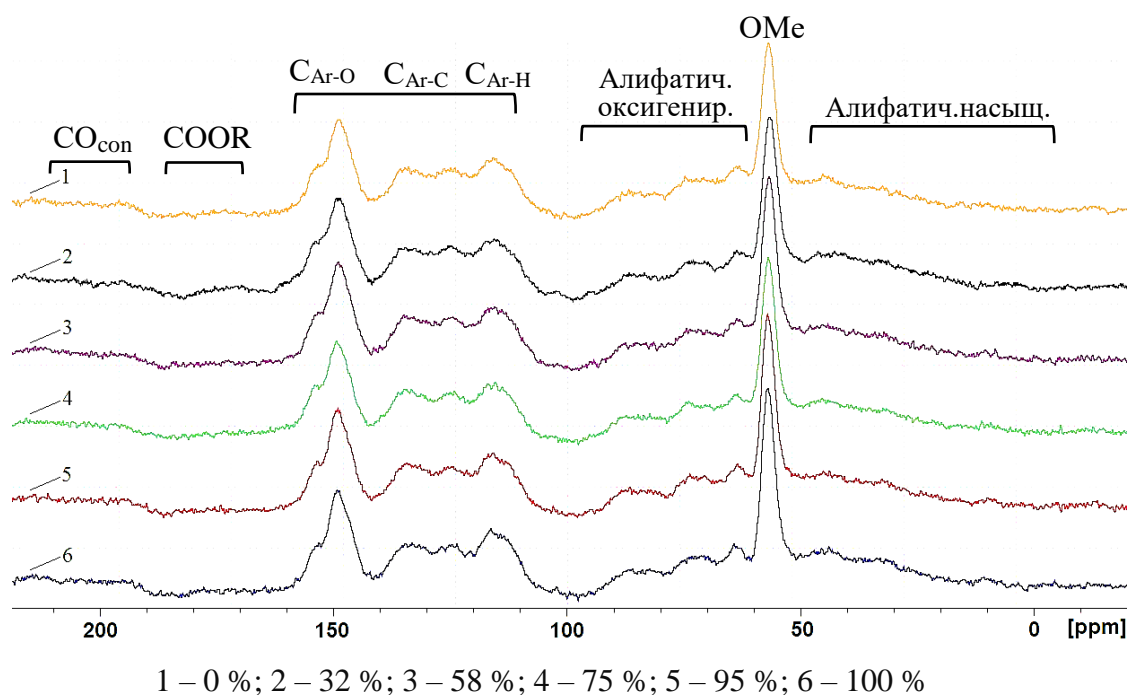
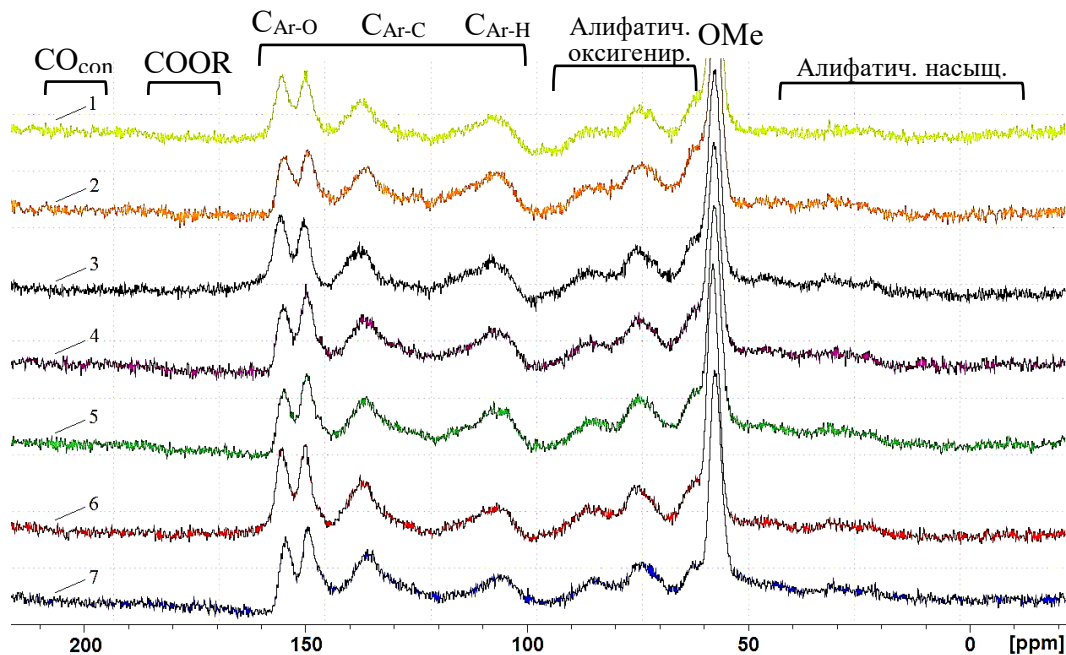


Рисунок 29 – Спектры ^{13}C ЯМР твердого тела образцов ДЛ-Е, выдержанных при заданной RH



1 – 0 %; 2 – 11 %; 3 – 32 %; 4 – 58 %; 5 – 75 %; 6 – 95 %; 7 – 100 %

Рисунок 30 – Спектры ^{13}C ЯМР твердого тела образцов ДЛ-Б, выдержанных при заданной RH

Отнесение резонансных сигналов атомов углерода к различным фрагментам макромолекулы лигнина проводили на основании спектров ^{13}C ЯМР, зарегистрированных для соответствующих растворенных препаратов, экспериментальные значения химических сдвигов сравнивали с литературными данными [26, 133].

Отмечено, что при изменении влажности образцов, положение сигналов на спектрах практически не изменяется, но меняется ширина сигналов. С ростом влагосодержания ширина большинства сигналов уменьшается, что свидетельствует об увеличении подвижности группировки атомов, отвечающих данному сигналу [121].

На рисунке 31 представлены зависимости ширины линий некоторых сигналов ^{13}C ЯМР от влагосодержания для препарата ДЛ-Б.

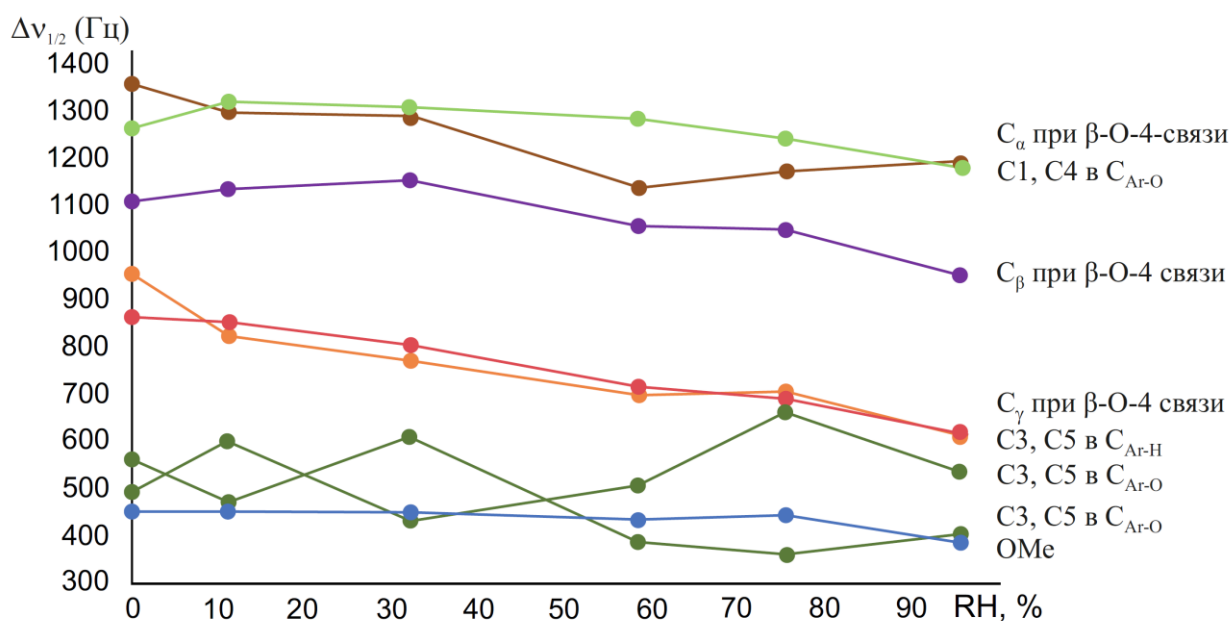


Рисунок 31 – Зависимость ширины линий в спектрах ^{13}C ЯМР диоксанлигнина берёзы от влагосодержания (RH)

Ширина сигналов, соответствующих атомам углерода C_α , C_β и C_γ при β -O-4 связи (62,2 м.д., 74,5 м.д. и 85,5 м.д. соответственно), в целом уменьшается с ростом влагосодержания, что говорит об увеличении подвижности пропановых цепей лигнина. Наибольшее изменение подвижности происходит с атомами C_γ , что объясняется связанными с ними ОН-группами, которые легко гидратируются.

Сигналы, соответствующие атомам углерода в различных положениях ароматических колец (115,5 м.д., 136,7 м.д., 150,0 м.д. и 155,5 м.д.), также сужаются при увеличении влагосодержания образца, что свидетельствует об увеличении подвижности бензольных колец как целого.

Сигнал, соответствующий метоксильным группам лигнина (58,0 м.д.), практически не изменяется по ширине с ростом влагосодержания, при этом данный сигнал имеет наименьшую ширину из всех рассмотренных сигналов, следовательно, метоксильные группы имеют наибольшую подвижность, что согласуется с данными о структуре лигнина. Отсутствие влияния влагосодержания на подвижность метоксильных групп может быть связано с

образованием водородных связей между гидратными оболочками метоксильных групп и бензильными ОН-группами. Таким образом, метоксильные группы лучше других сорбируют на себе воду и гидратируются в первую очередь.

На рисунке 32 представлены зависимости ширины линий некоторых сигналов ^{13}C ЯМР от влагосодержания для препарата ДЛ-Е.

Хвойные породы древесины отличаются более простой структурой лигнина по сравнению с лиственными, следовательно, сорбционных центров в таких лигнинах меньше и сорбция протекает менее интенсивно.

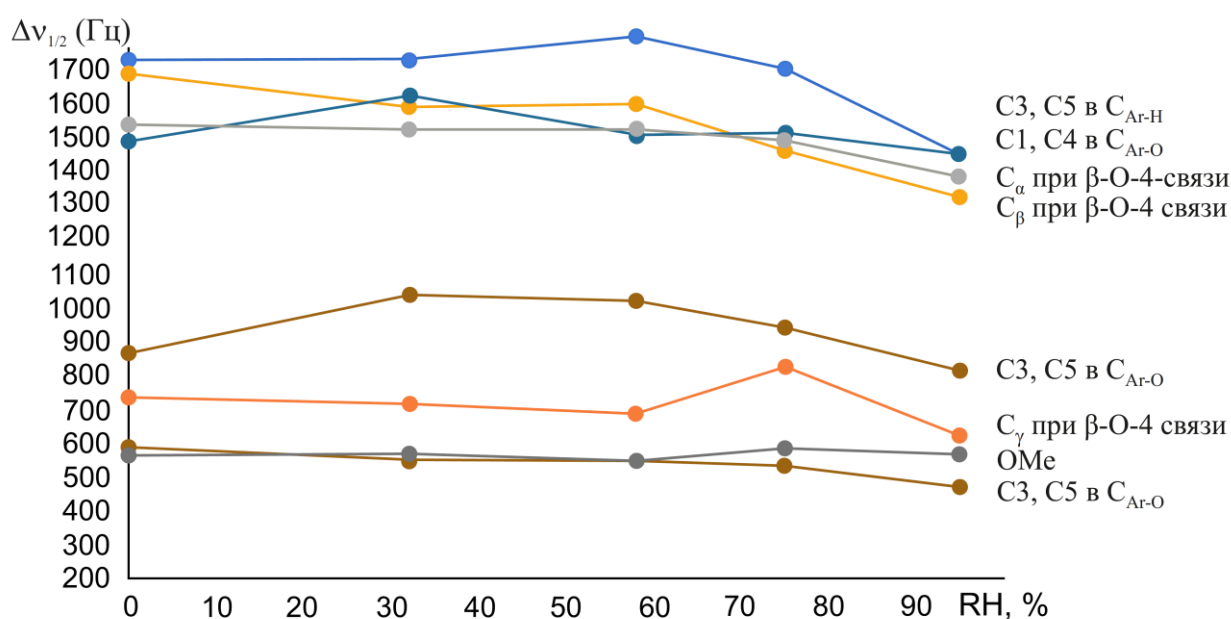


Рисунок 32 – Зависимость ширины линий в спектрах ^{13}C ЯМР диоксанлигнина ели от влагосодержания (RH)

Подвижность атомов углерода бензольных колец практически не изменяется при влагонасыщении. Можно предположить, что из-за меньшего количества метоксильных групп, атомы углерода бензольных колец почти не участвуют в протонном обмене, что косвенно подтверждается большой шириной сигнала (~1,5 кГц). Кроме того, уменьшение подвижности атомов бензольных колец можно объяснить стерическими затруднениями при образовании сетки водородных связей внутри полимера.

В таблице 16 приведены относительные изменения ширины сигналов при изменении влажности среды от 0 % до 100 %.

Таблица 16. Ширина линий $\Delta\nu_{1/2}$ (Гц) в спектрах ^{13}C ЯМР ДЛ-Б и ДЛ-Е с различным влагосодержанием (RH)

δ , м.д.	Группы	Ширина линии, Гц				Кратность изменения ширины	
		RH = 0 %		RH = 100 %		ДЛ-Б	ДЛ-Е
		ДЛ-Б	ДЛ-Е	ДЛ-Б	ДЛ-Е		
58,0	OMe	452	580	420	468	1,08	1,24
62,2	C $_{\gamma}$ при β -O-4 связи	866	733	681	473	1,27	1,55
74,5	C $_{\alpha}$ при β -O-4 связи	1264	1531	1392	1358	0,91	1,13
85,5	C $_{\beta}$ при β -O-4 связи	1108	1685	912	1315	1,21	1,28
115,5	C3, C5 в C $_{\text{Ar-H}}$	956	1725	578	1607	1,65	1,07
136,7	C1, C4 в C $_{\text{Ar-O}}$	1158	1487	1200	1516	1,13	1,34
150,0	C3, C5 в C $_{\text{Ar-O}}$	498	867	506	887	0,98	0,98
155,5	C3, C5 в C $_{\text{Ar-O}}$	561	560	380	278	1,48	2,01

На основании относительных изменений ширины выбранных сигналов можно сделать вывод, что фрагменты образца гидратированы неравномерно, и некоторые группы сорбируют воду более активно, чем другие. Для получения, в первом приближении, картины распределения воды в образце можно рассмотреть только те сигналы, ширина которых уменьшается с ростом влагосодержания образца (кратность изменения ширины $\geq 1,00$).

Предположив, что вся сорбированная вода аккумулируется вокруг указанных фрагментов, можно вычислить приблизительные доли от общего количества воды, приходящиеся на каждый тип групп. Принцип расчета описан в п. 2.7.5. Результаты расчетов представлены в таблице 17.

Таблица 17. Массовая доля воды, сорбированная на разных фрагментах макромолекулы лигнина

δ , м.д.	Группы	Кратность изменения ширины		Массовая доля воды, %	
		ДЛ-Б	ДЛ-Е	ДЛ-Б	ДЛ-Е
58,0	ОМе	1,08	1,24	13,7±0,4	12,9±0,2
62,2	C _γ при β-O-4 связи	1,27	1,55	16,3±0,4	16,1±0,4
74,5	C _α при β-O-4 связи	0,91	1,13	–	11,7±0,3
85,5	C _β при β-O-4 связи	1,21	1,28	15,5±0,3	13,3±0,3
115,5	C3, C5 в C _{Ar-H}	1,65	1,07	21,1±0,5	11,1±0,4
136,7	C1, C4 в C _{Ar-O}	1,13	1,34	14,5±0,4	13,9±0,2
155,5	C3, C5 в C _{Ar-O}	1,48	2,01	18,9±0,8	21,0±1,0

Таким образом, по результатам расчетов для ДЛ-Б, около 68 % всей сорбированной воды приходится на ароматическую часть и около 32 % на алифатическую. Согласно данным спектроскопии ³¹P ЯМР (табл. 12), количества C5-замещенных и G структурных единиц в образце соотносятся как 2,77:1, следовательно, на долю C5-замещенных и гваяцильных групп приходится ~48 % и ~20 % сорбированной воды соответственно. Тогда как для ДЛ-Е около 59 % всей сорбированной воды приходится на ароматическую часть лигнина и 41 % на алифатическую.

В целом лигнин березы сорбирует пары воды более активно. Это может быть объяснено тем, что молекула лигнина березы, по сравнению с молекулой лигнина ели, содержит почти в 2 раза больше ОН-групп сиригильного типа, которые являются минорными для лигнина ели.

Анализируя графики зависимостей ширины линий в спектрах ¹³C ЯМР (рис. 31 и 32), можно заключить, что при влагонасыщении молекулы лигнина березы претерпевают почти аналогичные изменения, как молекулы лигнина ели. При влагонасыщении подвижность пропановых цепей и бензольных колец увеличивается в обоих образцах. Метоксильные группы имеют наибольшую подвижность из всех рассмотренных фрагментов, при этом влагосодержание на подвижность данных групп влияет слабо, что может быть

связано с образованием водородных связей между гидратными оболочками метоксильных групп и бензильными ОН-группами на первых стадиях влагонасыщения.

ВЫВОДЫ

В результате проведенных экспериментов установлено следующее:

1. Впервые применён метод твердотельной ЯМР-спектроскопии к изучению сорбционных свойств лигнинов. Проведен количественный анализ распределения молекул воды по центрам гидратации в макромолекулах лигнина березы и ели. Определено, что для лигнина березы 68 % всей сорбированной воды приходится на ароматическую часть и 32 % на алифатическую. Для лигнина ели 59 % всей сорбированной воды приходится на ароматическую часть лигнина и 41 % на алифатическую.

2. Усовершенствован подход к определению гидроксильных групп лигнина методом ^{31}P ЯМР спектроскопии. Продолжительность регистрации спектра снижена в 17 раз, а себестоимость одного анализа примерно в 25 раз по сравнению со стандартным протоколом.

3. Исследованы структурные характеристики 18 препаратов диоксанлигнина, выделенных из хвойных пород, лиственных пород и травянистых растений. Выявлены конкретные различия и сходства в структурах как между индивидуальными породами, так и между семействами. В частности:

3.1. Для лигнинов семейств Розовые и Буковые, характерно преобладание С5-замещенных структурных звеньев в их составе. Общее содержание гидроксильных групп, в частности фенольных, преобладает в ДЛ травянистых растений. Соотношение структур резинола и фенилкумарана составило 1:3 для ДЛ хвойных пород и 3:1 для ДЛ лиственных пород.

3.2. Присутствие во всех препаратах фрагментов кетонов Гибберта (Нк) указало на то, что часть β -О-4-связей подверглась гидролитической деструкции в ходе ацидолиза. Для большинства исследованных образцов количество Нк было примерно на одном уровне (4-6 на 100 ФПЕ), но для

представителей семейства Буковые это значение составило 1-2 на 100 ФПЕ, что говорит о более устойчивой структуре лигнинов данного семейства.

3.3. Обнаружено, что все исследуемые препараты лигнинов содержат остаточные углеводы, связанные со структурой. Установлено присутствие фенилгликозидных связей, сложных эфиров глюкуроновой кислоты и бензиловых эфиров. Наибольшую долю связей лигнин-углевод составили бензиловые эфиры (3,8-6,7 на 100 ФПЕ). Присутствие некоторого количества остаточных связей лигнина с углеводами характерно для препаратов ДЛ, так как условия ацидолиза считаются относительно мягкими и полной деструкции лигноуглеводного комплекса не происходит.

4. На основании структурного и функционально-группового анализа исследованных лигнинов предложены возможные пути их дальнейшей переработки. Показано, что стратегии переработки лигнинов должны учитывать структурные особенности лигнинов.

СОКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

В данной диссертационной работе использованы следующие сокращения:

1D – одномерный

2D – двумерный

CEL – целлюлолитический ферментный лигнин

COSY – корреляционная спектроскопия

CP – кросс-поляризация

ESI-MS – масс-спектрометрия с ионизацией электроспреем

G – гваяцильные единицы

H – *n*-гидроксифенильные единицы

HMBC – гетероядерная многосвязная корреляционная спектроскопия

HSQC – гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия

IS – внутренний стандарт

MALDI-MS – матричная активированная лазерная десорбция/ионизация

MAS – вращение под магическим углом

M_n – среднечисловое значение молекулярной массы

M_w – среднемассовое значение молекулярной массы

MWEL – ферментный лигнин измельченной древесины

NOESY – спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера

OMe – метоксильные группы

PR – фосфитилирующий агент

RH – относительная влажность воздуха

S – сирингильные единицы

TMDP – 2-хлор-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксафосфолан

TOCSY – полная корреляционная спектроскопия

а.с.в. – абсолютно сухое вещество

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГХ-МС – газовая хромато-масс-спектрометрия
ГЦ – гемицеллюлозы
ДЛ – диоксанлигнин
ДЛ-Б – диоксанлигнин берёзы
ДЛ-Е – диоксанлигнин ели
ДМСО – диметилсульфоксид
ЖХ-МС – жидкостная хромато-масс-спектрометрия
ИК – инфракрасный
ЛМР – лигнин механического размола (MWL)
ос.ч. – особо чистый
СП – степень полимеризации
УФ – ультрафиолетовый
ФПЕ – фенилпропановая единица
х.ч. – химически-чистый
ЦБП – целлюлозно-бумажная промышленность
ч. – чистый
ч.д.а. – чистый для анализа
ЯМР – ядерный магнитный резонанс

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Rubin, E.M. Genomics of cellulosic biofuels / E.M. Rubin // *Nature*. – 2008. – Vol. 454. – No. 7206. – P. 841-845.
2. Tarasov, D. Lignin–carbohydrate complexes: properties, applications, analyses, and methods of extraction: a review / D. Tarasov, M. Leitch, P. Fatehi // *Biotechnology for biofuels*. – 2018. – Vol. 11. – No. 1. – P. 1-28
3. Азаров, В.И. Химия древесины и синтетических полимеров: Учебник для вузов [Текст] / В.И. Азаров, А.В. Буров, А.В. Оболенская. – СПб.: СПбЛТА. – 1999. – 628 с.
4. Börjesson, M. Crystalline nanocellulose – preparation, modification, and properties / M. Börjesson, G. Westman // In: Poletto M., Ornaghi Jr H. (ed.) *Cellulose-fundamental aspects and current trends*. – Croatia: InTech. – 2015. – P. 159-191.
5. Klemm, D. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material / D. Klemm, B. Heublein, H.P. Fink, A. Bohn // *Angewandte chemie international edition*. – 2005. – Vol. 44. – No. 22. – P. 3358-3393.
6. Zhu, H. Wood-derived materials for green electronics, biological devices, and energy applications / H. Zhu, W. Luo, P.N. Ciesielski, Z. Fang et al. // *Chemical reviews*. – 2016. – Vol. 116. – No 16. – P. 9305-9374.
7. Ragauskas, A.J. Lignin valorization: improving lignin processing in the biorefinery / A.J. Ragauskas, G.T. Beckham, M.J. Bidy, M. Chandra et al. // *Science*. – 2014. – Vol. 344. – Art. No. 1246843.
8. Maki-Arvela, P. Synthesis of sugars by hydrolysis of hemicelluloses-a review / P. Maki-Arvela, T. Salmi, B. Holmbom et al. // *Chemical reviews*. – 2011. – Vol. 111. – No. 9. – P. 5638-5666.
9. Никитин, В.М. Химия древесины и целлюлозы [Текст] / В.М. Никитин, А.В. Оболенская, В.П. Щеголев – М.: Лесная промышленность. – 1978. – 368 с.

10. Um, B.H. Acid hydrolysis of hemicellulose in green liquor pre-pulping extract of mixed northern hardwoods / B.H. Um, G.P. van Walsum // *Applied biochemistry and biotechnology*. – 2009. – Vol. 153. – No. 1. – P. 127-138.
11. Chandel, A.K. Bioconversion of pentose sugars into ethanol: a review and future directions / A.K. Chandel, G. Chandrasekhar, K. Radhika et al. // *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*. – 2011. – Vol. 6. – No. 1. – P. 8-20.
12. Boerjan, W. Lignin biosynthesis / W. Boerjan, J. Ralph, M. Baucher // *Annual review of plant biology*. – 2003. – Vol. 54. – No. 1. – P. 519-546.
13. Weng, J.K. The origin and evolution of lignin biosynthesis / J.K. Weng, C. Chapple // *New Phytologist*. – 2010. – Vol. 187. – No. 2. – P. 273-285.
14. Vanholme, R. Lignin biosynthesis and structure / R. Vanholme, B. Demedts, K. Morreel, J. Ralph, W. Boerjan // *Plant physiology*. – 2010. – Vol. 153. – No. 3. – P. 895-905.
15. Fițiḡău, I.F. Structural analysis of lignins from different sources / I.F. Fițiḡău, F. Peter, C.G. Boeriu // *International journal of chemical, molecular, nuclear, materials and metallurgical engineering*. – 2013. – Vol. 7. – No. 4 – P. 167-172.
16. Боголицын, К.Г. Физическая химия лигнина [Текст] / К.Г. Боголицын, В.В. Лунин, Д.С. Косяков; под ред. К.Г. Боголицына, В.В. Лунина – М.: Академкнига. – 2010. – 492 с.
17. FAOSTAT database: Food and Agriculture Organization of the United Nations [Электронный ресурс], 2016 – 2022. – Режим доступа: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/FO>, свободный (дата обращения: 29.03.2022). – Загл. с экрана.
18. Yuan, T.Q. Role of lignin in a biorefinery: separation characterization and valorization / T.Q. Yuan, F. Xu, R.C. Sun // *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. – 2013. – Vol. 88. – No. 3. – P. 346-352.
19. Smolarski, N. High-value opportunities for lignin: unlocking its potential / N. Smolarski // *Frost & Sullivan*. – 2012. – Vol. 1. – P. 1-15.

20. Ralph, J. Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl-propanoids / J. Ralph, K. Lundquist, G. Brunow et al. // *Phytochemistry reviews*. – 2004. – Vol. 3. – No. 1. – P. 29-60.
21. Freudenberg, K. Constitution and biosynthesis of lignin / K. Freudenberg, A.C. Neish. – New York: Springer Verlag. – 1968. – 120 p.
22. Sarkanen, K.V. Lignins: Occurrence, formation, structure and reactions / K.V. Sarkanen, C.H. Ludwig. – New-York: Wiley-Interscience. – 1971. – 916 p.
23. Brunow, G. Lignin / G. Brunow, K. Lundquist, G. Gellerstedt // In: Sjöström E., Alén R. (ed.) *Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping and Papermaking*. – Berlin: Springer-Verlag. – 1999. – P. 77-124.
24. Heitner, C. Lignin and lignans: advances in chemistry / C. Heitner, D.R. Dimmel, J.A. Schmidt. – Boca Raton, Florida, USA: CRC Press. – 2010. – 683 p.
25. Ralph, J. Lignification: are lignins biosynthesized via simple combinatorial chemistry or via proteinaceous control and template replication / J. Ralph, G. Brunow, P.J. Harris et al. // *Recent advances in polyphenol research*. – 2009. – Vol. 1. – P. 36-66.
26. Balakshin, M.Yu. On the quantification of lignin hydroxyl groups with ³¹P and ¹³C NMR spectroscopy / M.Yu. Balakshin, E.A. Capanema // *Journal of wood chemistry and technology*. – 2015. – Vol. 35. – No. 3. – P. 220-237.
27. Crestini, C. Structural analysis of wheat straw lignin by quantitative ³¹P and 2D NMR spectroscopy. The occurrence of ester bonds and α-O-4 substructures / C. Crestini, D.S. Argyropoulos // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 1997. – Vol. 45. – No. 4. – P. 1212-1219.
28. Грушников, О.П. Достижения и проблемы химии лигнина [Текст] / О.П. Грушников, В.В. Елкин. – М.: Наука. – 1973. – 296 с.

29. Фенгел, Д. Древесина (химия, ультраструктура, реакции) [Текст] / Д. Фенгел, Г. Вегенер. Пер. с англ. под ред. А.А. Леоновича. – М.: Лесная промышленность. – 1988. – 512 с.
30. Далимова, Г. Н. Лигнины травянистых растений / Г.Н. Далимова, Х.А. Абдуазимов // Химия природных соединений. – 1994. – №. 2. – С. 160-177.
31. Capanema, E.A. Quantitative characterization of a hardwood milled wood lignin by Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy / E.A. Capanema, M.Yu. Balakshin, J.F. Kadla // Journal of agricultural and food chemistry. – 2005. – Vol. 53. – No. 25. – P. 9639-9649.
32. Фрейденберг, К. К вопросу о химии и биогенезе лигнина. В кн.: Химия и биохимия лигнина, целлюлозы и гемицеллюлоз / К. Фрейденберг. – М.: Лесная промышленность. – 1969. – С. 3-14.
33. Ralph, J. Lignin structure and its engineering / J. Ralph, C. Lapierre, W. Boerjan // Current opinion in biotechnology. – 2019. – Vol. 56. – P. 240-249.
34. Balakshin, M. Spruce milled wood lignin: linear, branched or cross-linked? / M. Balakshin, E.A. Capanema, X. Zhu et al. // Green Chemistry. – 2020. – Vol. 22. – No. 13. – P. 3985-4001.
35. Balakshin, M.Yu. MWL fraction with a high concentration of lignin-carbohydrate linkages: Isolation and 2D NMR spectroscopic analysis / M.Yu. Balakshin, E.A. Capanema, H. Chang // Holzforschung. – 2007. – Vol. 61. – No. 1. – P. 1-7.
36. El Mansouri, N.E. Analytical methods for determining functional groups in various technical lignins / N.E. El Mansouri, J. Salvado // Industrial crops and products. – 2007. – Vol. 26. – No. 2. – P. 116-124.
37. Ralph, J. Lignification: Are lignins biosynthesized via simple combinatorial chemistry or via proteinaceous control and template replication? / J. Ralph, G. Brunow, P.J Harris et al. // In: F. Daayf, V. Lattanzio (ed.) Recent Advances

- in Polyphenol Research. – Oxford, UK: Wiley-Blackwell Publishing. – 2008. – P. 36-66.
38. Adler, E. Action of mineral acid on lignin and model substances of guaiacylglycerol- β -aryl ether type / E. Adler, M.J. Pepper, E. Eriksoo // *Industrial & Engineering Chemistry*. – 1957. – Vol. 49. – No. 9. – P. 1391-1392.
39. Rolando, C. Thioacidolysis / C. Rolando, B. Monties, C. Lapierre // In: S.Y. Lin, C.W. Dence (ed.) *Methods in lignin chemistry*. – Berlin: Springer-Verlag. – 1992. – P. 334-349.
40. Berlin, A. Industrial lignins: analysis, properties, and applications / A. Berlin, M. Balakshin // In: V.K. Gupta, M.G. Tuohy, C.P. Kubicek et al. (ed.) *Bioenergy research: advances and applications*. – Oxford, UK: Elsevier. – 2014. – P. 315-336.
41. Kim, H. Solution-state 2D NMR of ball-milled plant cell wall gels in DMSO- d_6 /pyridine- d_5 / H. Kim, J. Ralph // *Organic & biomolecular chemistry*. – 2010. – Vol. 8. – No. 3. – P. 576-591.
42. Mansfield, S.D. Whole plant cell wall characterization using solution-state 2D NMR / S.D. Mansfield, H. Kim, F. Lu, J. Ralph // *Nature protocols*. – 2012. – Vol. 7. – No. 9. – P. 1579-1589.
43. Freudenberg, K. Observation on lignin / K. Freudenberg, C.L. Chen, J.M. Harkin et al. // *Chemical Communications*. – 1965. – No. 11. – P. 224-225.
44. Glasser, W.G. Lignin: historical, biological, and materials perspectives / W.G. Glasser, A.R. Northey, T.P. Schultz. – Washington, DC: American Chemical Society. – 1999. – 559 p.
45. Pew, J.C. New structures from the dehydrogenation of model compounds related to lignin / J.C. Pew, W.J. Connors // *Nature*. – 1967. – Vol. 215. – No. 5101. – P. 623-625.
46. Adler, E. Phenylcoumaran elements in spruce lignin / E. Adler, S. Delin, K. Lundquist // *Acta Chemica Scandinavica*. – 1959. – Vol. 13. – No. 10. – P. 2149-2150.

47. Pew, J.C. Nitrobenzene oxidation of lignin model compounds, spruce wood and spruce «native lignin» / J.C. Pew // Journal of the American Chemical Society. – 1955. – Vol. 77. – No. 10. – P. 2831-2833.
48. Rencoret, J. Isolation and structural characterization of the milled-wood lignin from *Paulownia fortunei* wood / J. Rencoret, G. Marques, A. Gutierrez et al. // Industrial Crops and Products. – 2009. – Vol. 30. – No. 1. – P. 137-143.
49. Nanayakkara, B. Understanding the degree of condensation of phenolic and etherified C-9 units of *in situ* lignins / B. Nanayakkara, M. Manley-Harris, I.D. Suckling // Journal of agricultural and food chemistry. – 2011. – Vol. 59. – No. 23. – P. 12514-12519.
50. Yu Z. Effect of lignin chemistry on the enzymatic hydrolysis of woody biomass / Z. Yu, K.S. Gwak, T. Treasure et al. // ChemSusChem. – 2014. – Vol. 7. – No. 7. – P. 1942-1950.
51. Karhunen, P. Dibenzodioxocins; a novel type of linkage in softwood lignins / P. Karhunen, P. Rummakko, G. Brunow et al. // Tetrahedron Letters. – 1995. – Vol. 36. – No. 1. – P. 169-170.
52. Lewis, N.G. Lignin and lignan biosynthesis: distinctions and reconciliations / N.G. Lewis, S. Sarkanen (ed.) – Washington, DC: American Chemical Society. – 1998. – 436 p.
53. Kukkola, E.M. The dibenzodioxocin lignin substructure is abundant in the inner part of the secondary wall in Norway spruce and silver birch xylem / E.M. Kukkola, S. Koutaniemi, E. Pöllänen et al. // Planta. – 2004. – Vol. 218. – No. 3. – P. 497-500.
54. Lundquist, K. Low-molecular weight lignin hydrolysis products / K. Lundquist // Applied Polymer Symposium. – 1976. – Vol. 28. – P. 1393-1407.
55. Lapiere, C. Application of new methods for the investigation of lignin structure / C. Lapiere // In: H.G. Jung, D.R. Buxton, R.D. Hatfield, J. Ralph (ed.) Forage Cell Wall Structure and Digestibility – Madison, WI: American Society of Agronomy Inc. – 1993. – P. 133-163.

56. Habu, N. The role of the diarylpropane structure as a minor constituent in spruce lignin / N. Habu, Y. Matsumoto, A. Ishizu, J. Nakano // *Holzforschung*. – 1990. – Vol. 44. – P. 67-71.
57. Zhang, L. NMR observation of a new lignin structure, a spiro-dienone / L. Zhang, G. Gellerstedt // *Chemical Communications*. – 2001. – Vol. 24. – P. 2744-2745.
58. Zhang, L. NMR studies on the occurrence of spirodienone structures in lignins / L. Zhang, G. Gellerstedt, J. Ralph, F. Lu // *Journal of wood chemistry and technology*. – 2006. – Vol. 26. – No. 1. – P. 65-79.
59. Del Río, J.C. Structural characterization of wheat straw lignin as revealed by analytical pyrolysis, 2D-NMR, and reductive cleavage methods / J.C. Del Río, J. Rencoret, P. Princen et al. // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2012. – Vol. 60. – No. 23. – P. 5922-5935.
60. Lan, W. Tricin, a flavonoid monomer in monocot lignification / W. Lan, F. Lu, M. Regner et al. // *Plant Physiology*. – 2015. – Vol. 167. – No. 4. – P. 1284-1295.
61. Lan, W. Tricin-lignins: occurrence and quantitation of tricin in relation to phylogeny / W. Lan, J. Rencoret, J. Ralph et al. // *The Plant Journal*. – 2016. – Vol. 88. – No. 6. – P. 1046-1057.
62. Brauns, F.E. *Chemistry of lignin* / F.E. Brauns. – New York: Academic Press Inc. – 1952. – 808 p.
63. Faleva, A.V. Structural characteristics of different softwood lignins according to 1D and 2D NMR spectroscopy / A.V. Faleva, A.Y. Kozhevnikov, S.A. Pokryshkin et al. // *Journal of Wood Chemistry and Technology*. – 2020. – Vol. 40. – No. 3. – P. 178-189.
64. Lawoko, M. Structural differences between the lignin– carbohydrate complexes present in wood and in chemical pulps / M. Lawoko, G. Henriksson, G. Gellerstedt // *Biomacromolecules*. – 2005. – Vol. 6. – No. 6. – P. 3467-3473.
65. Balakshin, M.Y. A fraction of MWL with high concentration of lignin-carbohydrate linkages: isolation and analysis with 2D NMR spectroscopic

- techniques / M.Y. Balakshin, E.A. Capanema, H. Chang // *Holzforschung*. – 2007. – Vol. 61. – P. 1-7.
66. Balakshin, M. Isolation and analysis of lignin–carbohydrate complexes preparations with traditional and advanced methods: a review / M. Balakshin, E. Capanema, A. Berlin // *Studies in natural products chemistry*. – 2014. – Vol. 42. – P. 83-115.
67. Capanema, E.A. Chemical properties in CAD-deficient pine and their effect on pulping / E.A. Capanema, M.Y. Balakshin, M.L. Heerman et al. // *13th Proc. ISWPC*. – 2005. – Vol. 13. – P. 173-180.
68. Balakshin, M.Y. Elucidation of the structures of residual and dissolved pine kraft lignins using an HMQC NMR technique / M.Y. Balakshin, E.A. Capanema, C.L. Chen et al. // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2003. – Vol. 51. – No. 21. – P. 6116-6127.
69. Trogen, M. Cellulose-lignin composite fibres as precursors for carbon fibres. Part 1–Manufacturing and properties of precursor fibres / M. Trogen, N.D. Le, D. Sawada et al. // *Carbohydrate polymers*. – 2021. – Vol. 252. – Art. No. 117133.
70. НИКИТИН, В.М. Лигнин [Текст] / В.М. НИКИТИН. – Л: Гослесбумиздат. – 1961. – 314 с.
71. Monteil-Rivera, F. Isolation and characterization of herbaceous lignins for applications in biomaterials / F. Monteli-Rivera, M. Phuong, M. Ye, A. Halasz, J. Hawari // *Industrial Crops and Products*. – 2013. – Vol. 41. – P. 356-364.
72. Закис, Г.Ф. Функциональный анализ лигнинов и их производных / Г.Ф. Закис. – Рига: Зинатне. – 1987. – 230 с.
73. Chen, C.L. New carbonyl compounds from the alkaline ferricyanide dehydrogenation of *p*-cresol / C.L. Chen, W.J. Connors // *The Journal of Organic Chemistry*. – 1974. – Vol. 39. – No. 26. – P. 3877-3880.

74. Gierer, J. Chemistry of delignification. Pt. 2: Reactions of lignins during bleaching / J. Gierer // *Wood Science & Technology*. – 1986. – Vol. 20. – No. 1. – P. 1-33.
75. Мартон, Д. Лигнины. Реакции при щелочной варке / Д. Мартон; под ред. К.В. Сарканена и К.Х. Людвиг; пер. с англ. – М.: Лесная промышленность. – 1975. – С. 441-496.
76. Лей, И.З. Лигнины. Выделение лигнинов и исследование их строения / И.З. Лей, К.В. Сарканен; под ред. К.В. Сарканена и К.Х. Людвиг; пер. с англ. – М.: Лесная промышленность. – 1975. – С. 79-147.
77. Lin, S.Y. Methods in lignin chemistry / S.Y. Lin, C.W. Dence. – Berlin: Springer Verlag. – 1995. – 578 p.
78. Chang, H. Comparative studies on cellulolytic enzyme lignin and milled wood lignin of sweetgum and spruce / H. Chang, E.B. Cowling, W. Brown // *Holzforschung*. – 1975. – Vol. 29. – No. 5. – P. 153-159.
79. Lai, Y.Z. Estimation of phenolic hydroxyl groups in wood by a periodate oxidation method / Y.Z. Lai, X.P. Guo, W. Situ // *Journal of wood chemistry and technology*. – 1990. – Vol. 10. – No. 3. – P. 365-377.
80. Argyropoulos, D.S. Quantitative phosphorus-31 NMR analysis of lignins, a new tool for the lignin chemist / D.S. Argyropoulos // *Journal of wood chemistry and technology*. – 1994. – Vol. 14. – No. 1. – P. 45-63.
81. Beckham, G.T. Lignin valorization: Emerging approaches / G.T. Beckham (ed.). – London, UK: The Royal Society of Chemistry. – 2018. – 527 p.
82. Шорыгина, Н.Н. Реакционная способность лигнина / Н.Н. Шорыгина, В.М. Резников, В.В. Елкин. – М.: Наука. – 1976. – 376 с.
83. Чупка, Э.И. Влияние внутренней структуры лигнина на некоторые его свойства / Э.И. Чупка, А.В. Оболенская, В.М. Никитин // *Химия древесины*. – 1970. – No. 5. – С. 53-58.

84. Azadi, P. Liquid fuels, hydrogen and chemicals from lignin: A critical review / P. Azadi, O.R. Inderwildi, R. Farnood et al. // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2013. – Vol. 21. – P. 506-523.
85. Dizhbite, T. Lignin – a useful bioresource for the production of sorption-active materials / T. Dizhbite, G. Zakis, A. Kizima, E. Lazareva, G. Rossinskaya // *Bioresource technology*. – 1999. – Vol. 67. No. 3. – P. 221-228.
86. Demirbas, A. Adsorption of lead and cadmium ions in aqueous solutions onto modified lignin from alkali glycerol delignification / A. Demirbas // *Journal of hazardous materials*. – 2004. – Vol. 109. – No. 1-3. – P. 221-226.
87. Christensen, G.N. The sorption of water vapor by the constituents of wood. The swelling of lignin / G.N. Christensen, K.E. Kelsey // *Australian journal of applied science*. – 1958. – Vol. 9. – No. 3. – P. 265-282.
88. McKnight, T.S. The distribution of pore-sizes in wood-pulp fibers and paper / T.S. McKnight, R.H. Marchessault, S.G. Mason // *Pulp and Paper Mag. Canada*. – 1958. – Vol. 59. – No. 2. – P. 81-88.
89. Kleinert, T.N. Alkaline pulping studies VI. Discussion of results and of the principles of rapid delignification / T.N. Kleinert, L.M. Marraccini // *Tappi*. – 1965. – Vol. 48. – No. 8. – P. 447-451.
90. Wedekind, E. Sorptive power of lignin / E. Wedekind, G. Garee // *Angewandte Chem*. – 1928. – Vol. 41. – P.107-116.
91. Wedekind, E. Colloidal nature of liginic acid / E. Wedekind, G. Garee // *Kolloid-Z*. – 1928. – Vol. 44. – P. 202-210.
92. Carrott, P.J.M. Lignin – from natural adsorbent to activated carbon: a review / P.J.M. Carrott, M.R. Carrott // *Bioresource technology*. – 2007. – Vol. 98. – No. 12. – P. 2301-2312.
93. Ульяновский, Н.В. Хромато-масс-спектрометрическая идентификация продуктов трансформации 1,1-диметилгидразина в торфяной почве / Н.В. Ульяновский, С.А. Покрышкин, Д.С. Косяков, А.Ю. Кожевников,

- А.Д. Ивахнов, К.Г. Боголицын // Химия растительного сырья. – 2012. – № 3. – С. 181-187.
94. Кожевников, А.Ю. Модификация сульфатного лигнина периодатом натрия с целью получения сорбента 1,1-диметилгидразина / А.Ю. Кожевников, С.Л. Ульяновская, М.П. Семушина // Журнал прикладной химии. – 2017. – Вып. 90. – №. 4. – С. 416-422.
95. Pearl, I.A. The chemistry of lignin / I.A. Pearl (ed.). – New York: M.Dekker. – 1967. – 339 p.
96. Fengel, D. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions / D. Fengel, G. Wegener (ed.). – Berlin: Walter de Gruyter. – 1989. – 613 p.
97. Brauns, F.E. Native Lignin I. Its Isolation and Methylation / Brauns, F.E. // Journal of the American Chemical Society. – 1939. – Vol. 61. – No. 8. – P. 2120-2127.
98. Björkman, A. Studies on finely divided wood. Part 1. Extraction of lignin with neutral solvents / A. Björkman // Svensk papperstidning. – 1956. – Vol. 59. – No. 13. – P. 477-485.
99. Pepper, J.M. The isolation and properties of lignins obtained by the acidolysis of spruce and aspen woods in dioxane-water medium / J.M. Pepper, P.E.T. Baylis, E. Adler // Canadian Journal of Chemistry. – 1959. – Vol. 37. – No. 8. – P. 1241-1248.
100. Obst, J.R. Isolation of lignin / J.R. Obst, T.K. Kirk // Methods in enzymology. – 1988. – Vol. 161. – P. 3-12.
101. Guerra, A. Isolation and characterization of lignins from *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden and *Eucalyptus globulus* Labill. by enzymatic mild acidolysis (EMAL) / A. Guerra, L.A. Lucia, D.S. Argyropoulos // Holzforstung. – 2008. – Vol. 62. – No. 1. – P. 24-30.
102. Capanema, E. How well do MWL and CEL preparations represent the whole hardwood lignin? / E. Capanema, M. Balakshin, R. Katahira et al. // Journal of Wood Chemistry and Technology. – 2015. – Vol. 35. – No. 1. – P. 17-26.

103. Jiang, B. Comparison of the structural characteristics of cellulolytic enzyme lignin preparations isolated from wheat straw stem and leaf / B. Jiang, T.Y. Cao, F. Gu et al. // ACS Sustainable Chemistry & Engineering. – 2017. – Vol. 5. – No. 1. – P. 342-349.
104. Belyy, V.A. Comparative study of chemical and topological structure of macromolecules of lignins of birch (*Betula verrucosa*) and apple (*Malus domestica*) wood / V.A. Belyy, A.P. Karmanov, L.S. Kocheva et al. // International Journal of Biological Macromolecules. – 2019. – Vol. 128. – P. 40-48.
105. Карманов, А.П. Исследование физико-химических свойств лигнинов из древесины сосны и акации / А.П. Карманов, К.Г. Боголицын, Л.С. Кочева и др. // Лесной журнал. – 2013. – № 5. – С. 93-102.
106. Belesov, A.V. Characterization of ionic liquid lignins isolated from spruce wood with 1-butyl-3-methylimidazolium acetate and methyl sulfate and their binary mixtures with DMSO / A.V. Belesov, A.V. Ladesov, D.S. Kosyakov et al. // Molecules. – 2020. – Vol. 25. – No. 11. – Art. No. 2479.
107. Lapierre, C. Thioacidolysis of lignin: comparison with acidolysis / C. Lapierre, B. Monties, C. Rolando, L.D. Chirale // Journal of wood chemistry and technology. – 1985. – Vol. 5. – No. 2. – P. 277-292.
108. Pew, J.C. Nitrobenzene oxidation of lignin model compounds, spruce wood and spruce «native lignin» / J.C. Pew // Journal of the American Chemical Society. – 1955. – Vol. 77. – No. 10. – P. 2831-2833.
109. Lu, F. Derivatization followed by reductive cleavage (DFRC method), a new method for lignin analysis: protocol for analysis of DFRC monomers / F. Lu, J. Ralph // Journal of agricultural and food chemistry. – 1997. – Vol. 45. – No. 7. – P. 2590-2592.
110. Lu, Y. Structural characterization of lignin and its degradation products with spectroscopic methods / Y. Lu, Y.C. Lu, H.Q. Hu et al. // Journal of Spectroscopy. – 2017. – Vol. 2017. – Art. No. 8951658.

111. Lupoi, J.S. Recent innovations in analytical methods for the qualitative and quantitative assessment of lignin / J.S. Lupoi, S. Singh, R. Parthasarathi et al. // *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. – 2015. – Vol. 49. – P. 871-906.
112. Ponomarenko, J. Antioxidant activity of various lignins and lignin-related phenylpropanoid units with high and low molecular weight / J. Ponomarenko, M. Lauberts, T. Dizhbite // *Holzforschung*. – 2015. – Vol. 69. – No. 6. – P. 795-805.
113. Stauffer, M.T. Applications of Molecular Spectroscopy to Current Research in the Chemical and Biological Sciences / M.T. Stauffer (ed.). – Croatia: InTech. – 2016. – 428 p.
114. Отто, М. Современные методы аналитической химии: в 2-х т. Т.1 / М. Отто; пер. с нем. А.В. Гармаш. – М.: Техносфера. – 2003. – 416 с.
115. Santos, P.S.B. Composition and structure of organosolv lignins from four eucalypt species / P.S.B. Santos, P.H.G. Cademartori, R. Prado et al. // *Wood Science and Technology*. – 2014. – Vol. 48. – No. 4. – P. 873-885.
116. Letourneau, D.R. Mass spectrometry-based methods for the advanced characterization and structural analysis of lignin: A review / D.R. Letourneau, D.A. Volmer // *Mass spectrometry reviews*. – 2021. – P. 1-45.
117. Kosyakov, D.S. Optimization of sample preparation conditions in the study of lignin by MALDI mass spectrometry / D.S. Kosyakov, N.V. Ul'yanovskii, E.A. Sorokina, N.S. Gorbova // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2014. – Vol. 69. – P. 1344-1350.
118. Reale, S. Mass spectrometry in the biosynthetic and structural investigation of lignins / S. Reale, A. Di Tullio, N. Spreti, F. De Angelis // *Mass spectrometry reviews*. – 2004. – Vol. 23. – No. 2. – P. 87-126.
119. Evtuguin, D.V. Application of electrospray ionization mass spectrometry to the elucidation of the primary structure of lignin / D.V. Evtuguin, F.M.L. Amado // *Macromolecular Bioscience*. – 2003. – Vol. 3. – P. 339-343.

120. Metzger, J.O. Matrix-assisted laser desorption mass spectrometry of lignins / J.O. Metzger, C. Bicke, O. Faix et al. // *Angewandte Chemie International Edition in English*. – 1992. – Vol. 31. – No. 6. – P. 762-764.
121. Блюмих Б. Основы ЯМР: для ученых и инженеров [Текст] / Б. Блюмих; пер.с англ. П.А. Беякова; под ред. В.П. Ананникова. – М: Техносфера. – 2011. – 252 с.
122. Bloch, F. Nuclear induction / F. Bloch // *Physical review*. – 1946. – Vol. 70. – No. 7-8. – P. 460-474.
123. Purcell, E.M. Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid / E.M. Purcell, H.C. Torrey, R.V. Pound // *Physical review*. – 1946. – Vol. 69. – No. 1-2. – P. 37-38.
124. Нифантьев, И.Э. Практический курс спектроскопии ядерного магнитного резонанса [Текст] / И.Э. Нифантьев, П.В. Ивченко. – М.: МГУ им. Ломоносова. – 2006. – 200 с.
125. Ralph, S. NMR database of lignin and cell wall model compounds / S. Ralph, J. Ralph, L. Landucci. – Madison, WI: US Forest Products Laboratory. – 2009. – 506 p.
126. Gottlieb, H.E. NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities / H.E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman // *The Journal of organic chemistry*. – 1997. – Vol. 62. – No. 21. – P. 7512-7515
127. Ludwig, C.H. Lignin. XIII. The high resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy of protons in acetylated lignins / C.H. Ludwig, B.J. Nist, J.L. McCarthy // *Journal of the American Chemical Society*. – 1964. – Vol. 86. – P. 1196-1202.
128. Lundquist, K. NMR studies of lignins: Investigation of spruce lignin by ^1H NMR spectroscopy / K. Lundquist // *Acta Chemica Scandinavica*. – 1980. – Vol. 34. – P. 21-26.

129. Mainka, H. Lignin—an alternative precursor for sustainable and cost-effective automotive carbon fiber / H. Mainka, O. Täger, E. Körner et al. // *Journal of Materials Research and Technology*. – 2015. – Vol. 4. – No. 3. – P. 283-296.
130. Snyder, J. Fractionation and proof of structure of natural products / J. Snyder, R. Breuning, F. Derguini et al. // *Natural Products of Woody Plants*. – Springer, Berlin, Heidelberg, 1989. – P. 27-124.
131. Ernst, R.R. Nuclear magnetic double resonance with an incoherent radio-frequency field / R.R Ernst // *The Journal of Chemical Physics*. – 1966. – Vol. 45. – No. 10. – P. 3845-3861.
132. Chen, C.L. Characterization of lignin by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy / C.L. Chen, D. Robert // *Methods in enzymology*. – 1988. – Vol. 161. – P. 137-174.
133. Cao, S. Chemical transformations of *Populus trichocarpa* during dilute acid pretreatment / S. Cao, Y. Pu, M. Studer et al. // *Rsc Advances*. – 2012. – Vol. 2. – No. 29. – P. 10925-10936.
134. Pan, D. Comparative studies on chemical composition of wood components in recent and ancient woods of *Bischofia polycarpa* / D. Pan, D.S. Tai, C.L. Chen, D. Robert // *International journal of the biology, chemistry, physics and technology of wood*. – 1990. – Vol. 44. – No. 1. – P. 7-16.
135. Hawkes, G.E. A comparison of solution and solid state ^{13}C NMR spectra of lignins and lignin model compounds / G.E. Hawkes, C.Z. Smith, J.H. Utley, R.R. Vargas // *International journal of the biology, chemistry, physics and technology of wood*. – 1993. – Vol. 47. – No. 4. – P. 302-312.
136. Nimz, H.H. Carbon-13 NMR spectra of lignins. 8. Structural differences between lignins of hardwoods, softwoods, grasses and compression wood / H.H. Nimz, D. Robert, O. Faiz et al. // *Holzforschung*. – 1981. – Vol. 35. – P. 16-26.

137. Xia, Z. Quantitative ^{13}C NMR analysis of lignins with internal standards / Z. Xia, L.G. Akim, D.S. Argyropoulos // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2001. – Vol. 49. – No. 8. – P. 3573-3578.
138. Lindon, J.C. *Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry* / J.C. Lindon, G.E. Tranter, D. Koppenaal ed. – Academic Press. – 2016. – 3584 p.
139. Granata, A. 2-Chloro-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaphospholane, a reagent for the accurate determination of the uncondensed and condensed phenolic moieties in lignins / A. Granata, D.S. Argyropoulos // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 1995. – Vol. 43. – No. 6. – P. 1538-1544.
140. Pu, Y. Application of quantitative ^{31}P NMR in biomass lignin and biofuel precursors characterization / Y. Pu, S. Cao, A.J. Ragauskas // *Energy & Environmental Science*. – 2011. – Vol. 4. – No. 9. – P. 3154-3166.
141. Argyropoulos, D.S. Quantitative phosphorus-31 NMR analysis of six soluble lignins / D.S. Argyropoulos // *Journal of wood chemistry and technology*. – 1994. – Vol. 14. – No. 1. – P. 65-82.
142. Meng, X. Determination of hydroxyl groups in biorefinery resources via quantitative ^{31}P NMR spectroscopy / X. Meng, C. Crestini, H. Ben et al. // *Nature Protocols*. – 2019. – Vol. 14. – No. 9. – P. 2627-2647.
143. Lu, Y. Structural Characterization of Lignin and Its Degradation Products with Spectroscopic Methods / Y. Lu, Y.-C. Lu, H.-Q. Hu et al. // *Hindawi Journal of Spectroscopy*. – 2017. – Vol. 2017. – P. 1-15.
144. Kilpeläinen, I. Application of Two-Dimensional NMR Spectroscopy to Wood Lignin Structure Determination and Identification of Some Minor Structural Units of Hardand Softwood Lignins / I. Kilpeläinen, J. Sipilä, G. Brunow, K. Lundquist, R.M. Ede // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1994. – Vol. 42. – No. 12. – P. 2790-2794.
145. Fukagawa N., Meshitsuka G., Ishizu A. A two-dimensional NMR study of birch milled wood lignin // *Journal of wood chemistry and technology*. – 1991. – Vol. 11. – No. 3. – P. 373-396.

146. Ede, R.M. Application of two-dimensional homo-and heteronuclear correlation NMR spectroscopy to wood lignin structure determination / R.M. Ede, G. Brunow // *The Journal of Organic Chemistry*. – 1992. – Vol. 57. – No. 5. – P. 1477-1480.
147. Lu, F. Lignin: biosynthesis, functions and economic significance / F. Lu, F. Yue (ed.). – New York: Nova Science Publishers. – 2019. – 316 p.
148. Terrett, O.M. Molecular architecture of softwood revealed by solid-state NMR / O.M. Terrett, J.J. Lyczakowski, L. Yu et al. // *Nature communications*. – 2019. – Vol. 10. – No. 1. – P. 1-11.
149. Evstigneyev, E.I. Solid-State ^{13}C CP/MAS NMR for Alkyl-O-Aryl bond determination in lignin preparations / E.I. Evstigneyev, A.S. Mazur, A.V. Kalugina et al. // *Journal of Wood Chemistry and Technology*. – 2018. – Vol. 38. – No. 2. – P. 137-148.
150. Lequin, S. Adsorption equilibria of water vapor on cork / S. Lequin, D. Chassange, T. Karbowski et al. // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2010. – Vol. 58. – No. 6. – P. 3438-3445.
151. Zhao, W. Solid-state NMR of plant and fungal cell walls: a critical review / W. Zhao, L.D. Fernando, A. Kirui et al. // *Solid state nuclear magnetic resonance*. – 2020. – Vol. 107. – Art. No. 101660.
152. Лундин, А.Г. Ядерный магнитный резонанс в конденсированных средах / А.Г. Лундин, В.Е. Зорин // *Успехи физических наук*. – 2007. – Вып. 177. – № 10. – С. 1107-1132.
153. Эндрю, Э.Р. Ядерный магнитный резонанс / Э.Р. Эндрю; пер. с англ. Н. Померанцева, Е. Скубура. – М.: Изд-во иностр. лит. – 1957. – 300 с.
154. Andrew, E.R. Nuclear magnetic resonance spectra from a crystal rotated at high speed / E.R. Andrew, A. Bradbury, R.G. Eades // *Nature*. – 1958. – Vol. 182. – No. 4650. – P. 1659-1659.
155. Lowe, I.J. Free induction decays of rotating solids / I.J. Lowe // *Physical Review Letters*. – 1959. – Vol. 2. – No. 7. – P. 285-287.

156. Гюнтер, Х. Введение в курс спектроскопии ЯМР [Текст] / Х. Гюнтер. – М.: Мир. – 1984. – 478 с.
157. Metz, G. Towards quantitative cp-mas nmr / G. Metz, M. Ziliox, S.O. Smith // Solid State Nuclear Magnetic Resonance. – 1996. – Vol. 7. – No. 3. – P.-155-160.
158. Шестаков, С.Л. Роль структуры в динамике протонного переноса через полимерные катионообменные мембраны: дис. ... канд. физ.-мат.. наук / Шестаков Семен Леонидович. – Долгопрудный. – 2010. – 141 с.
159. Плантиум: открытый онлайн атлас-определитель растений и лишайников России и сопредельных стран [Электронный ресурс], 2007-2022. – Режим доступа: <http://www.plantarium.ru>, свободный (дата обращения: 21.04.2022). – Загл. с экрана
160. Быструшкин, А.Г. О жизненной форме малины обыкновенной (*Rubus idaeus L.*) / А.Г. Быструшкин // Вестник Челябинского государственного университета. – 2005. – Вып. 12. – №. 1. – С. 52-55.
161. Оболенская, А.В. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы / А.В. Оболенская, З.П. Ельницкая, А.А. Леонович. – М.: Экология. – 1991. – 320 с.
162. ASTM E1758-01 «Standard Method for the Determination of Carbohydrates by HPLC». – 2020. – 5 p.
163. Шестаков, С.Л. Совершенствование методики определения гидроксильных групп лигнина методом ЯМР-спектроскопии / С.Л. Шестаков, Д.С. Косяков, Ю.А. Попова и др. // Химия растительного сырья. – 2017. – № 2. – С. 81-88.
164. Дероум, Э. Современные методы ЯМР для химических исследований / Э. Дероум. - М.: Мир. – 1992. – 401 с.
165. Попова, Ю.А. Сравнительный анализ лигнинов различных растительных форм с применением спектроскопии ³¹P-ЯМР / Ю.А. Попова,

- С.Л. Шестаков, А.Ю. Кожевников и др. // Химия растительного сырья. – 2019. – №4. – С. 57-64.
166. Popova, Y.A. Comprehensive analysis of the chemical structure of lignin from raspberry stalks (*Rubus idaeus* L.) / Y.A. Popova, S.L. Shestakov, A.V. Belesov, I.I. Pikovskoi, A.Y. Kozhevnikov // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – Vol. 164. – P. 3814-3822.
167. Шестаков, С.Л. Применение методов спектроскопии ЯМР к анализу гидроксильных групп лигнинов / С.Л. Шестаков, Д.С. Косяков, А.Ю. Кожевников, Н.В. Ульяновский, Ю.А. Попова // Материалы VII Международной конференции «Физикохимия растительных полимеров». – 2017. – Вып. 7. – С. 252-254.
168. Shestakov S.L. The application of nuclear magnetic resonance spectroscopy to the calculation of lignin structure formulas / S.L. Shestakov, Yu.A. Popova, A.Yu. Kozhevnikov// Proceedings 18th International school-conference «Magnetic resonance and its applications. Spinus» – 2021. – Vol. 18. – P. 257-259.
169. Shestakov S.L. The study of water sorption with hydrolysis lignin by solid-state NMR spectroscopy / S.L. Shestakov, Yu.A. Popova, A.Yu. Kozhevnikov, D.S. Kosyakov, S.A. Sypalov // Eurasian Chemico-Technological Journal. – 2019. – Vol. 21. – P. 325-331.
170. Popova, Yu.A. Application of solid-state NMR to the study of water sorption with hydrolysis lignin / Yu.A. Popova, S.L. Shestakov, A.Yu. Kozhevnikov, D.S. Kosyakov, A.V. Faleva // Magnetic Resonance and its Applications. Proceedings 16th International School-Conference – 2019. – Vol. 16. – P. 230-233.
171. Попова, Ю.А. Применение твердотельной ЯМР-спектроскопии к изучению сорбции воды диоксанлигнином березы / Ю.А. Попова, С.Л. Шестаков, А.Ю. Кожевников // Материалы VIII Международной

- конференции «Физикохимия растительных полимеров». – 2019. – Вып. 8. – С. 264-268.
172. Каталог продукции компании Sigma-Aldrich [Электронный ресурс], – Режим доступа: <https://www.sigmaaldrich.com/russian-federation.html>
173. Popova, Yu.A. Comparative Analysis of Lignins of Various Plant Forms by ³¹P NMR Spectroscopy / Yu.A. Popova, S.L. Shestakov, A.Yu. Kozhevnikov, D.S. Kosyakov, S.A. Sypalov // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2021. – Vol. 46. – No. 7. – P. 1337-1342.
174. Попова, Ю.А. Функциональный состав и некоторые структурные особенности лигнинов лиственных пород древесины семейств берёзовые (Betulaceae) и буковые (Fagaceae) / Ю.А. Попова, С.Л. Шестаков, А.Ю. Кожевников // Материалы IX Международной конференции «Физикохимия растительных полимеров». – 2021. – Вып. 9. – С. 175-178.
175. Constant, S. New insights into the structure and composition of technical lignins: a comparative characterisation study / S. Constant, H.L. Wienk, A.E. Frissen et al. // Green Chemistry. – 2016. – Vol. 18. – No. 9. – P. 2651-2665.
176. Paone, E. The rise of lignin biorefinery / E. Paone, T. Tabanelli, F. Mauriello // Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry. – 2020. – Vol. 24. – P. 1-6.
177. Shuai, L. Selective C–C bond cleavage of methylene-linked lignin models and kraft lignin / L. Shuai, J. Sitison, S. Sadula et al. // Acs Catalysis. – 2018. – Vol. 8. – No. 7. – P. 6507-6512.
178. Jędrzejczak, P. The role of lignin and lignin-based materials in sustainable construction – a comprehensive review / P. Jędrzejczak, M.N. Collins, T. Jesionowski et al. // International Journal of Biological Macromolecules. – 2021. – Vol. 187. – P. 624-650.

179. Gabov, K. Characterization of lignin extracted from birch wood by a modified hydrotropic process / K. Gabov, R.J. Gosseling, A.I. Smeds et al. // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2014. – Vol. 62. – No. 44. – P. 10759-10767.
180. Duval, A. Scalable single-step synthesis of lignin-based liquid polyols with ethylene carbonate for polyurethane foams / A. Duval, D. Vidal, L. Averous et al. // *Materials Today Chemistry*. – 2022. – Vol. 24. - Art. No. 100793.
181. Paulsen Thoresen, P. Characterization of Organosolv Birch Lignins: Toward Application-Specific Lignin Production / P. Paulsen Thoresen, H. Lange, C. Crestini et al. // *ACS omega*. – 2021. – Vol. 6. – No. 6. – P. 4374-4385.
182. Parot, M. High purity softwood lignin obtained by an eco-friendly organosolv process / M. Parot, D. Rodrigue, T. Stevanovic // *Bioresource Technology Reports*. – 2022. – Vol. 17. – Art. No. 100880.
183. Nitzsche, R. Platform and fine chemicals from woody biomass: Demonstration and assessment of a novel biorefinery / R. Nitzsche, A. Gröngröft, J. Köchermann et al. // *Biomass Conversion and Biorefinery*. – 2021. – Vol. 11. – No. 6. – P. 2369-2385.
184. Gendron, J. Characterization of different types of lignin and their potential use in green adhesives / J. Gendron, I. Stambouli, C. Bruel et al. // *Industrial Crops and Products*. – 2022. – Vol. 182. – Art. No. 114893.
185. Роуленд, С. Вода в полимерах / С. Роуленд, И. Кунц, Ф. Стиллинджер; под ред. С. Роуланда; Пер. с англ. А.И. Иорданского, В.С Лившица; под ред. Г.Е. Заикова. – М.: Мир. – 1984. – 555 с.