

УДК 547.992.3

Study of Organosolv Lignins by Methods of FTIR and NMR Spectroscopy

**Alexander V. Levdansky^{*a},
Alexander A. Kondrasenko^a, Yuriy N. Malyar^a,
Vladimir A. Levdansky^a and Boris N. Kuznetsov^{a,b}**
*^aInstitute of Chemistry and Chemical Technology SB RAS
FRC "Krasnoyarsk Science Center SB RAS"
50/24 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russia
^bSiberian Federal University
79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041, Russia*

Received 21.12.2018, received in revised form 24.02.2019, accepted 16.04.2019

The analysis of the literature on the spectral methods of lignins study was carried out. The most suitable spectral methods for elucidating the structural features of soluble organosolv lignins were selected. The possibilities of FTIR, ¹H NMR, ¹³C NMR and 2D HSQC NMR methods were demonstrated on the example of studying the structure of ethanollignins obtained from fir and aspen wood. It was established that fir and aspen lignins are G type and GS type lignins, respectively. The HSQC spectra analysis demonstrated a presence of β-O-4', β-β', β-5' linkages in the ethanollignins. It was found that β-O-4' linkages in ethanollignins from fir and aspen were partially acylated with ethoxy groups in the α-position.

Keyword: organosolv lignins, structure, FTIR, ¹H NMR, ¹³C NMR, 2D NMR.

Citation: Levdansky A.V., Kondrasenko A.A., Malyar Yu.N., Levdansky V.A., Kuznetsov B.N. Study of organosolv lignins by methods of FTIR and NMR spectroscopy, J. Sib. Fed. Univ. Chem., 2019, 12(2), 201-220. DOI: 10.17516/1998-2836-0119.

© Siberian Federal University. All rights reserved

* Corresponding author E-mail address: alexsander.l@mail.ru

Изучение органосольвентных лигнинов методами ИК- и ЯМР-спектроскопии

А.В. Левданский^а, А.А. Кондрасенко^а,
Ю.Н. Маляр^а, В.А. Левданский^а, Б.Н. Кузнецов^{а,б}
^аИнститут химии и химической технологии СО РАН
ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН»
Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/24
^бСибирский федеральный университет
Россия, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79

Проведен анализ литературных источников, посвященных спектральным методам изучения лигнинов, который позволил выбрать наиболее подходящие из них для выяснения структурных особенностей растворимых органосольвентных лигнинов. Возможности методов ИК-спектроскопии, ¹H ЯМР, ¹³C ЯМР и 2D HSQC ЯМР продемонстрированы на примере изучения строения этаноллигнинов, выделенных из древесины пихты и осины. Установлено, что этаноллигнины пихты и осины относятся к лигнинам G и GS типов соответственно. Анализ HSQC ЯМР-спектров выявил наличие β-O-4', β-β', β-5'-связей в этаноллигнинах. Обнаружено, что β-O-4'-связи в этаноллигнинах пихты и осины частично ацилированы этоксильными группами в α-позиции.

Ключевые слова: органосольвентные лигнины, строение, ИКС, ¹H ЯМР, ¹³C ЯМР, 2D ЯМР.

Введение

Лигнин представляет собой нерегулярный разветвленный полимер, структурными звеньями которого являются фенилпропановые единицы (ФПЕ) различных типов (G, S, H) [1]. Кроме того, в пропановых цепях ФПЕ содержатся разные функциональные группы и присутствуют связи разного типа с другими структурными единицами. Вследствие этого лигнин имеет высокую степень химической неоднородности, что осложняет изучение его строения.

При исследовании строения лигнинов в настоящее время широко используются спектральные методы: ИК-, КР-, УФ-спектроскопия и ЯМР [2]. Главным их преимуществом является то, что они относятся к неразрушающим методам исследования.

Однако при выделении лигнин подвергается окислению, конденсации и иным химическим превращениям [1]. Кроме того, при выделении лигнина каким-либо растворителем (диоксаном, этанолом и т.д.) экстрагируются низкомолекулярные фракции лигнина, состав которых не соответствует всему набору функциональных групп и связей, присутствующих в полимере. Это обстоятельство необходимо учитывать при сопоставлении спектральных данных образцов лигнинов, выделенных различными методами из древесины.

В последние годы вырос интерес к исследованию лигнинов, выделенных из биомассы органическими растворителями (т.е. органосольвентных лигнинов). Органосольвентные методы

делигнификации имеют ряд преимуществ по сравнению с традиционными технологиями делигнификации [3–5]. Они обеспечивают утилизацию всех основных компонентов биомассы, исключают использование токсичных серо- и хлорсодержащих делигнифицирующих агентов, наносящих ущерб окружающей среде. Поскольку органосольвентные лигнины не содержат серы, это облегчает их каталитическую переработку в ценные химические продукты.

Целью данного обзора является анализ литературы по спектральным методам изучения лигнинов и иллюстрация возможностей применения методов ИКС и ЯМР для установления строения этаноллигнинов, выделенных из древесины пихты и осины.

Метод ИК-спектроскопии

ИК-спектроскопия с Фурье-преобразованием широко используется для определения структуры лигнина [6–12]. Это универсальный, высокопроизводительный метод, показывающий высокую чувствительность и селективность, который не требует большого количества исследуемого образца и много времени для его подготовки [13–15]. ИК-спектр образца лигнина дает общее представление о его химической структуре, о наличии функциональных групп (п-гидроксифенильных, гваяцильных и сирингильных единиц, метоксильных и карбонильных групп), а также о соотношении фенольных и алифатических гидроксильных групп [16–18]. ИК-Фурье-спектроскопия позволяет обнаружить структурные различия в лигнинах, выделенных различными методами.

В зависимости от природы растительной биомассы все препараты лигнина делятся на два типа: гваяцильные, или G-лигнины (характерны для древесины хвойных пород), и гваяцил-сирингильные, или GS-лигнины (характерны для древесины лиственных пород) [19]. Сравнение ИК-спектров этаноллигнинов, выделенных из древесины пихты и осины, указывает на существование определенных различий в их спектрах (рис. 1).

В ИК-спектре этаноллигнина пихты присутствуют полосы поглощения, характерные для хвойных лигнинов (G), а в спектре этаноллигнина осины – полосы поглощения, характерные для лигнинов лиственных пород (GS). В случае лигнина пихты наблюдаются полосы поглощения при 1514 и 1271 cm^{-1} . В спектре лигнина осины присутствуют полосы поглощения при 1594 и 1328 cm^{-1} (рис. 1). Кроме того, в спектре этаноллигнина пихты более высокую интенсивность имеет полоса при 1033 cm^{-1} , а в спектре этаноллигнина осины – полосы при 1423 и 1122 cm^{-1} . Эти спектральные различия объясняются разным соотношением гваяцильных и сирингиль-

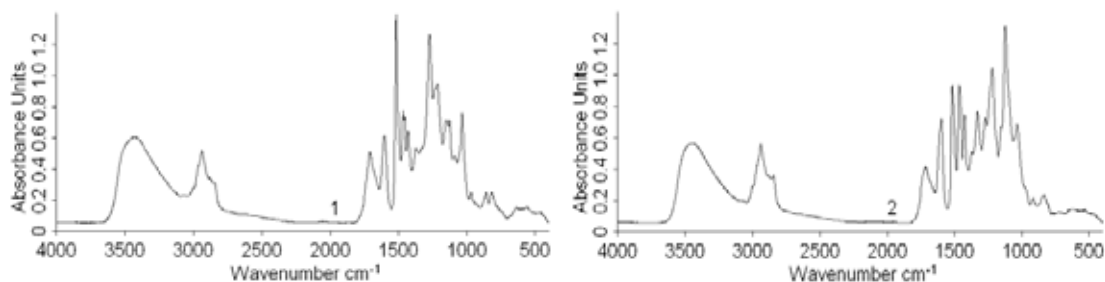


Рис. 1. ИК-спектры этаноллигнина пихты (1) и этаноллигнина осины (2)

Fig. 1. FTIR spectra of the ethanollignins from fir (1) and aspen (2)

ных структур в исследуемых образцах этаноллигнинов. В остальном их спектры довольно похожи, что свидетельствует о близком составе функциональных групп и связей, типичных для фенилпропановых структурных единиц лигнина. Из травянистых растений выделяют третий тип лигнинов – гидроксифенилгваяцилсирингильный, или GSH-лигнины [20].

Из-за сложной структуры лигнина только некоторые полосы в его ИК-спектрах могут быть соотнесены с помощью теории групп и интерпретация спектров лигнина в основном является эмпирической. Типичные полосы поглощения ИК-спектров лигнина и их отнесение к колебаниям определенных групп и связей приведены в работах [16, 19–21].

ИК-спектроскопию можно использовать и для количественной характеристики лигнинов по изменению интенсивностей полос поглощения. Для этого в качестве внутреннего стандарта используют полосы поглощения скелетных колебаний ароматических колец при 1510 и 1600 см⁻¹ [22]. Однако на интенсивность этих полос оказывают сильное влияние заместители, поэтому пригодность этого метода ограничивается сопоставлением только малоизмененных образцов однотипных лигнинов. Для получения более достоверных данных используют вводимый в образец лигнина внешний стандарт, дающий характерную интенсивную полосу поглощения. Для количественного анализа лигнинов также используют интегральные интенсивности полос поглощения, определяемые по площади соответствующих пиков.

Метод ЯМР-спектроскопии

Для исследования лигнинов также широко применяется ЯМР-спектроскопия в ее различных модификациях [23–26]. Этот метод является одним из наиболее универсальных и информативных спектральных методов и позволяет устанавливать уникальные структурные особенности лигнина. К достоинствам метода можно отнести возможность проведения достоверного количественного анализа функциональных групп [16]. Тем не менее применение данного метода для изучения лигнинов в ряде случаев затруднено вследствие их сложной структуры [27] и плохой растворимости некоторых препаратов для получения спектров высокого разрешения в дейтерированных растворителях. Помимо высокой стоимости оборудования ЯМР-спектроскопия на ядрах с малым естественным содержанием отличается невысокой чувствительностью, которую приходится компенсировать использованием больших концентраций образцов и увеличением длительности эксперимента [26].

¹H ЯМР-спектроскопия позволяет определять наличие и распределение разных типов структурных элементов лигнина, содержащих атомы водорода. Однако из-за многообразия видов связей между ФПЕ, влияния на химические сдвиги и константы спин-спиновой взаимоделирования (КССВ) конформационных эффектов или диастереоизомерии сигналы в спектрах ¹H ЯМР сильно перекрываются, что снижает информативность спектра [26]. Поэтому спектроскопия ¹H ЯМР-лигнинов основана на исследовании спектров модельных соединений и химически модифицированных препаратов. Это облегчает подбор растворителя и позволяет получать спектры с более четким разрешением. Так, для определения β–5', β–β', β–O–4' связанных структур лигнина, фенольных и карбонильных групп используют ¹H ЯМР-спектры ацелированных лигнинов и их модельных соединений. Подробное отнесение сигналов протонов в спектрах ацелированных лигнинов и модельных соединений описано в работах [16, 26, 28]. Известны также ¹H ЯМР-исследования ацелированных лигнинов в других растворителях,

например, для общего анализа функциональных групп использовали дейтеродиметилсульфоксид [29].

Прямая зависимость между интенсивностью сигналов в ^1H ЯМР-спектрах и числом протонов, способных давать сигнал, является основой полуколичественных исследований выделенных лигнинов. Метод может разделить оценить относительное содержание атомов водорода фенольных гидроксильных, спиртовых гидроксильных, альдегидных и карбоксильных групп, количество атомов водорода в ароматическом кольце и боковой цепи [26]. Образцы хвойных и лиственных лигнинов имеют заметные различия в степени конденсированности ароматических колец, фенольных и алифатических гидроксильных групп, а также в количестве алифатических протонов [28]. Для хвойных лигнинов характерно повышенное содержание атомов водорода ароматического кольца, а для лиственных – увеличение доли атомов водорода групп $\text{CH}=\text{CH}$, CHO , CH_2O , CH_3O в α -, β -, γ -положениях к ароматическому кольцу [26]. Точные количественные измерения лигнинов с помощью ^1H ЯМР невозможны из-за перекрывания уширенных сигналов и отсутствия ясности в данных относительно окружения протонов, присутствующих в лигнинах.

В качестве иллюстрации на рис. 2 приведены ^1H ЯМР-спектры этаноллигнинов пихты и осины.

Из общего вида ^1H -спектров можно установить наличие различных функциональных групп: альдегидных, гидроксильных (9.4–9.8 м.д.); ароматических колец (6.5–7.4 м.д.); метоксильных (3.6–4.0 м.д.); CH_2 , CH_3 алифатических углеводородных фрагментов, не содержащих атомов кислорода (0.8–1.6 м.д.). Значительная ширина и наложение пиков в ^1H спектрах не по-

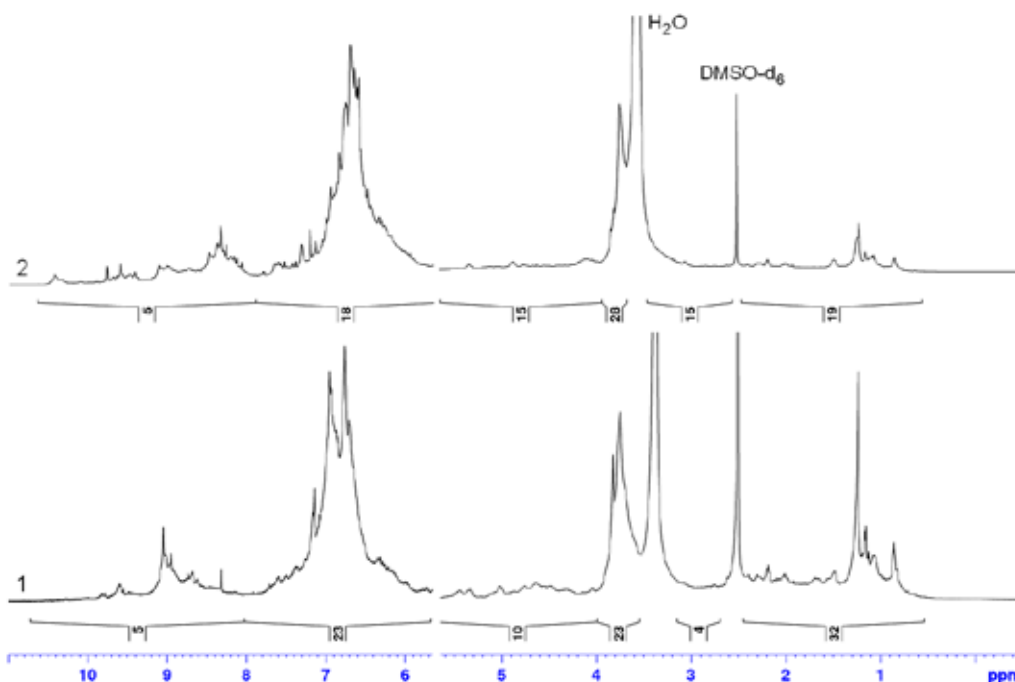


Рис. 2. ^1H ЯМР-спектры этаноллигнина пихты (1) и этаноллигнина осины (2)

Fig. 2. ^1H NMR spectra of the ethanollignins from fir (1) and aspen (2)

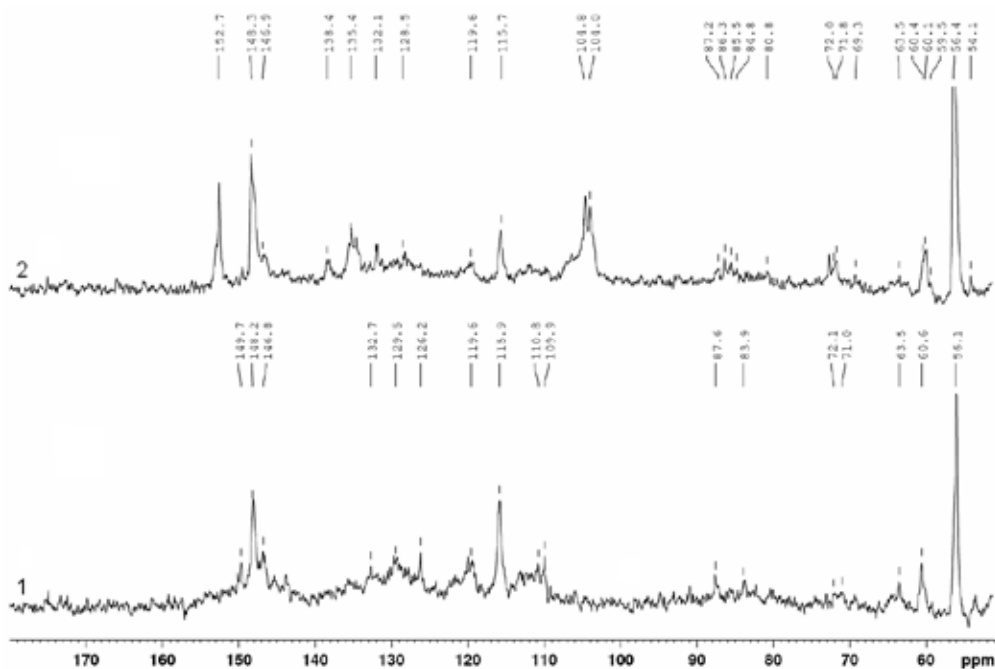
зволяет для многих из них произвести каких-либо информативных отнесений. Сведения о химических сдвигах ^1H были получены с использованием двухмерной методики HSQC.

^{13}C ЯМР-спектроскопия более эффективный и информативный метод исследования лигнина по сравнению с ^1H ЯМР. Вследствие высокого спектрального разрешения и широкого диапазона химических сдвигов в ^{13}C ЯМР-спектрах сигналы атомов углерода значительно меньше перекрываются, что облегчает их интерпретацию [1]. Тем не менее из-за низкого содержания ядер изотопа углерода ^{13}C в природе ^{13}C ЯМР-спектроскопия является менее чувствительным методом, чем ^1H ЯМР [28]. С использованием ^{13}C ЯМР-спектров можно идентифицировать фенилпропановые единицы, проводить функциональный анализ лигнинов, определять типы связей между структурными единицами, выполнять стереохимические исследования [16].

Интерпретация спектров ^{13}C ЯМР лигнинов и их модифицированных производных осуществляется на основе спектров соединений, моделирующих структурообразующие фрагменты и связи макромолекул лигнина. В спектрах лигнина можно выделить сигналы более 40 типов атомов углерода, которые по химическим сдвигам можно разделить на сегменты: карбонильных групп (200–160 м.д.); бензольных колец и двойных связей боковой цепи (160–100 м.д.); боковых цепей и метоксильных групп (100–10 м.д.) [16, 28]. Основное отличие ^{13}C ЯМР-спектров лиственных лигнинов от хвойных заключается в присутствии интенсивных сигналов в диапазоне 160–150 и 107–103 м.д., характерных для атомов C3, C5 и C2, C6 сирингильных ароматических колец. Обширные данные по детальному отнесению резонансных сигналов в спектрах ^{13}C ЯМР ацетилованных и неацетилованных лигнинов представлены в работах [1, 16, 26, 28, 30]. Для получения достоверных результатов в ^{13}C ЯМР-анализе сопоставление значений химического сдвига лигнинов и модельных соединений проводится между спектрами, записанными в одних и тех же условиях (растворитель, температура). В качестве растворителей обычно используют дейтерированные ДМСО, ацетон (или его смесь с водой), хлороформ. Следует отметить, что метод сопоставления химических сдвигов не всегда дает полностью удовлетворительные результаты, поскольку конкретный атом углерода в димерном модельном соединении может не проявлять такого же химического сдвига, который он показывает, находясь в полимере. Достоверность отнесения также ограничена доступностью подходящих для спектральных измерений модельных соединений и разрешением спектрометра. Из-за структурной неоднородности и стереохимической сложности лигнина многочисленные сигналы скрыты в плечах и часто не выявляются.

В ^{13}C ЯМР-спектрах этаноллигнинов древесины пихты и осины различимы области алифатических и ароматических групп (рис. 3). В спектрах можно выделить относительно узкие пики метоксильных групп (55–57 м.д.), сирингильных и гваяцильных СН-групп (102–107 м.д. и 115–118 м.д. соответственно), четвертичных атомов в ароматических фрагментах (140–156 м.д.). Заметным отличием образца этаноллигнина осины от лигнина пихты можно считать наличие группы пиков 102–107 м.д., отнесенных к C₂ и C₆ атомам сирингильных единиц, и появление второго интенсивного пика в области четвертичных ароматических атомов 140–156 м.д.

Применявшаяся для записи спектров ^{13}C методика не позволяет сделать надежных количественных оценок содержания отдельных групп. Анализа только химических сдвигов ^{13}C для отнесения большинства пиков к конкретным группам недостаточно, и основная часть информации была получена из спектров HSQC с DEPT редактированием.

Рис. 3. ^{13}C ЯМР-спектры этаноллигнина пихты (1) и этаноллигнина осины (2)Fig. 3. ^{13}C NMR spectra of the ethanollignins from fir (1) and aspen (2)

Из-за ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) при применении развязки от протонов и различий в скоростях релаксации ядер углерода в ^{13}C ЯМР-спектрах происходит искажение истинных количественных соотношений между интенсивностями сигналов [1]. Однако ^{13}C ЯМР-спектроскопия допускает получение надежных количественных результатов. Это достигается за счет использования релаксантов и регистрации спектров с применением режима прерываемой развязки, который позволяет получить корректное соотношение интенсивностей сигналов [26]. Кроме того, образец лигнина должен быть свободен от примесей (углеводов, экстрактов, продуктов деградации лигнина) и иметь максимальную концентрацию в исследуемом растворе для достижения оптимального соотношения сигнал/шум. Методом количественной ^{13}C ЯМР-спектроскопии возможно определение соотношения G:S:H, различных типов связей между структурными единицами (β -5', 5-5', β -O-4', β - β' , β -1', 4-O-5'), содержания метоксильных, карбоксильных, карбонильных, фенольных и алифатических гидроксильных групп, степени конденсированности [31–33]. Применение импульсных последовательностей с переносом намагниченности или J-модулированного спинового эха позволяет отдельно выделить подспектры первичных, вторичных, третичных и четвертичных атомов углерода [26]. Это облегчает отнесение сигналов и количественное определение этих групп. С помощью данных методик уточнено распределение атомов углерода ароматического кольца по различным типам связи. Показано, что лигнины лиственных пород древесины имеют более низкую степень конденсированности, чем лигнины хвойных.

Поскольку макромолекула лигнина имеет структурообразующий фрагмент – ФПЕ, то количественные результаты, полученные из спектра ЯМР, представляют в виде числа отдельных

структурных элементов в расчете на одну или сто ФПЕ (С9). Второй подход в количественной оценке основан на определении числа структурных элементов в расчете на одно или сто ароматических колец (С6) [1]. Однако эти подходы могут быть источником серьезных ошибок при анализе лигнинов, содержащих деградированные боковые цепи и фрагментированные ароматические кольца. По этой причине в количественном ^{13}C ЯМР-анализе таких лигнинов используются внутренние стандартные соединения, а результаты выражают в абсолютных единицах миллимолей на грамм образца [34].

Главный недостаток количественной ^{13}C ЯМР-спектроскопии заключается в необходимости использования трудоемких и длительных методик для получения воспроизводимых и достоверных данных.

2D ЯМР-спектроскопия

Современная двумерная (2D) ЯМР-спектроскопия дает исчерпывающую информацию о структуре макромолекул и является мощным инструментом для исследования лигнинов различного ботанического происхождения [1, 23, 24, 30, 35–37]. Двумерные спектры, в которых представлено более одного параметра ЯМР, часто позволяют решить проблемы, связанные с перекрыванием сигналов и отнесением спиновых мультиплетов. Из таких 2D ЯМР-спектров получают дополнительную информацию о корреляциях между химическим сдвигом и константами связи или корреляциях между химическими сдвигами магнитных ядер [38]. Основные преимущества двумерных экспериментов ЯМР по сравнению с одномерными методами – одновременное использование информации о химических сдвигах ^1H и ^{13}C в отнесении пиков, повышение чувствительности за счет регистрации по ^1H , использование широкого диапазона химических сдвигов ^{13}C для отнесения перекрывающихся пиков ^1H .

Современные методы 2D ЯМР-спектроскопии делают возможным выявление некоторых особенностей структуры лигнина без предварительного исследования модельных соединений. Однако при интерпретации большинства 2D ЯМР-спектров лигнина по-прежнему имеет решающее значение анализ обширной базы данных модельных соединений и результатов ранее проведенных ЯМР-исследований.

Для исследования структуры лигнина в основном используется несколько методик 2D ЯМР-экспериментов [1, 39]. Гомоядерная корреляционная спектроскопия COSY (Correlation spectroscopy) – простейшая разновидность 2D-спектроскопии ЯМР. Эта методика позволяет выявить геминальные и вицинальные спин-спиновые взаимодействия между протонами, что дает возможность произвести отнесение мультиплетов к определенным спиновым системам [40]. Обычно COSY-эксперименты находят свое применение при интерпретации сигналов атомов водорода боковых цепочек с целью получения информации о связях между звеньями макромолекул лигнина [36, 41, 42]. Для обнаружения всей спиновой системы применяется полная корреляционная спектроскопия TOCSY (Total correlated spectroscopy). Метод показывает корреляции протонов со всеми остальными протонами в пределах одной спиновой системы даже в том случае, если непосредственная спиновая связь между ними отсутствует ($KCCB=0$) [40]. Поэтому, имея один отнесенный сигнал, можно найти все сигналы протонов одной спиновой системы. Методика TOCSY также используется для выяснения структуры боковых цепей лигнина [42–47]. В случае типичной боковой цепи из трех углеродов методика TOCSY позволяет

наблюдать корреляции $\text{H}\alpha\text{-H}\beta\text{-H}\gamma_1\text{-H}\gamma_2$ [45]. Тем не менее широкому использованию COSY и TOCSY при исследованиях немодифицированных лигнинов мешает наличие перекрывающихся областей (3–4 м.д.) в 2D-спектрах. Мощной методикой определения строения углеродного скелета молекулы на основе информации о корреляциях непосредственно связанных ядер ^{13}C является эксперимент INADEQUATE (Incredible natural abundance double quantum transfer experiment). С помощью этого эксперимента проводится отнесение сигналов атомов углерода основных фенилпропановых мономеров и структурных фрагментов лигнина со связями $\beta\text{-O-}4'$, $\beta\text{-}\beta'$, $\beta\text{-}5'$, $\beta\text{-}1'$, а также возможна идентификация некоторых стереоизомеров, например $\beta\text{-O-}4'$ структур [1, 39, 48]. Однако чрезвычайно низкая чувствительность данного метода требует большого количества вещества и длительного времени эксперимента. По этим причинам 2D INADEQUATE редко используется на практике.

Наиболее содержательными и часто используемыми методиками 2D ЯМР являются гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ HSQC (Heteronuclear single quantum correlation) и гетероядерная многоквантовая корреляционная спектроскопия $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ HMQC (Heteronuclear multiple quantum correlation). Они дают возможность выявить факт наличия спин-спинового взаимодействия между протонами и ядрами углерода, напрямую связанными друг с другом [40]. Корреляционные данные, которые можно получить с помощью этих двух экспериментов, практически эквивалентны. Методы различаются тем, что HSQC не содержит гомоядерных протонных расщеплений, т.е. позволяет достичь более высокого разрешения по оси ядер углерода, а метод HMQC менее чувствителен к несовершенству эксперимента и дает сигналы несколько большей интенсивности. Использование таких экспериментов позволяет производить надежное отнесение сигналов атомов углерода в ^{13}C -спектре, если отнесены сигналы связанных с ними протонов в ^1H -спектре, и наоборот, если отнесены сигналы атомов углерода в ^{13}C -спектре, то можно отнести сигналы связанных с ними протонов в ^1H -спектре. В связи с этим методики HSQC- и HMQC-спектроскопии играют ключевую роль при исследовании структуры таких сложных полимеров, как лигнин. 2D-эксперименты данного типа применяются для определения основных мономерных единиц, структурных фрагментов и их стереоизомерных форм, ассоциированных с лигнином углеводов. В целом 2D HSQC/HMQC-спектр лигнина содержит три основные области, соответствующие корреляционным сигналам ароматических колец ($\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 160–90/8.0–6.0), боковых цепей ($\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 90–50/6.0–3.0) и насыщенных ациклических структур ($\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 50–10/3.0–1.0) [24, 30, 49–52]. Подробное отнесение $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ -пиков в HSQC/HMQC-спектрах лигнинов представлено в работах [30, 35, 49, 50, 52–55]. Ароматическая область спектра дает информацию о составе мономерных звеньев лигнина и позволяет идентифицировать гваяцильные (G), сирингильные (S), *p*-оксифенильные единицы (H), *p*-гидроксибензоаты (pBA), *p*-кумараты (pCA), ферулаты (FA), трицины (T) и т. д. Область сигналов атомов боковых цепочек дает информацию о связях между мономерными звеньями полимера. На основе этих данных были определены такие структуры, как β -арилловые эфиры ($\beta\text{-O-}4'$), фенилкумаран ($\beta\text{-}5'$, $\alpha\text{-O-}4'$), пинорезинол ($\beta\text{-}\beta'$, $\alpha\text{-O-}\gamma'$, $\gamma\text{-O-}\alpha'$), спиродиенон ($\beta\text{-}1'$, $\alpha\text{-O-}\alpha'$), тетрагидрофуран ($\beta\text{-}\beta'$, $\alpha\text{-O-}\alpha'$), бензодиоксан ($\beta\text{-O-}4'$, $\alpha\text{-O-}5'$). Благодаря уникальным и часто хорошо разрешенным корреляциям появилась возможность однозначной идентификации дибензодиоксицина ($5'\text{-}5''$, $\beta\text{-O-}4''$, $\alpha\text{-O-}4'$) [1, 39]. В этой области спектра также находятся различные сигналы ассоциированных угле-

водных остатков (δ_C/δ_H 110–60/6.0–3.0), с помощью которых определяют вид углевода и тип его связи с лигнином. Область сигналов насыщенных ациклических структур используют для определения фрагментов жирных кислот и высших спиртов, связанных с ФПЕ лигнина [56–58].

Широкое распространение в 2D ЯМР получили «гибридные» методики ^1H – ^{13}C HSQC-TOCSY и ^1H – ^{13}C HMQC-TOCSY, которые объединяют в себе особенности двух более простых двумерных экспериментов HSQC/HMQC и TOCSY [59]. Несмотря на меньшую чувствительность по сравнению с HMQC/HSQC, HSQC/HMQC-TOCSY обеспечивают достаточное обилие информации и четкую идентификацию спиновых систем [1, 39]. Данные методики показывают корреляции ядер углерода со всеми протонами и корреляции протонов со всеми ядрами углерода в пределах одной и той же спиновой системы. Как следствие, становится возможным быстрое отнесение сигналов протонов и атомов углерода боковых цепей лигнина. Так, для каждого из трех атомов углерода боковой цепи C_α , C_β и C_γ обнаруживаются все корреляции с четырьмя протонами H_α , H_β , H_{γ_1} , H_{γ_2} , а для каждого из протонов H_α , H_β , H_{γ_1} , H_{γ_2} – все корреляции с тремя атомами углерода C_α , C_β и C_γ [60].

В то же время, несмотря на огромную популярность методик HSQC/HMQC и HSQC/HMQC-TOCSY, их невозможно применить для отнесения сигналов четвертичных атомов углерода. Между тем таких атомов в молекулах органических соединений бывает довольно много. Отнести их на основании величин химических сдвигов можно далеко не всегда. Поэтому для этой цели чаще всего используется гетероядерная многосвязная корреляционная спектроскопия ^1H – ^{13}C HMBC (Heteronuclear multiple bond correlation), которая может выявлять спин-спиновые взаимодействия между протонами и ядрами углерода через 2–3 химические связи [40]. Это так называемые дальние корреляции. Их анализ способствует получению информации о скелете молекулы и является одним из наиболее мощных подходов к установлению структуры лигнина [1, 39, 60–62]. С помощью экспериментов HMBC определяют тип мономерных структурных единиц, участвующих в каждом виде химической связи, выявляют разнообразные структурные фрагменты лигнина, находят остатки жирных кислот. В частности, однозначно были установлены точки присоединения *p*-кумаратов (*p*CA), ферулатов (FA) и ацетатных групп к боковым цепям ФПЕ лигнина, достоверно идентифицированы α,β -диариловые эфиры ($\beta\text{-O-4}'$, $\alpha\text{-O-4}''$) и α -кето- β -ариловые эфиры ($\alpha=\text{O}$, $\beta\text{-O-4}'$) [1, 39, 49, 62].

Однако методика HMBC не лишена недостатков – она не позволяет различать между собой корреляции через 2 и 3 связи, более того, некоторые из этих корреляций могут вообще отсутствовать. Вдобавок к этой путанице в спектрах HMBC иногда обнаруживаются корреляции через 4 связи, которые вызваны изменениями величин КССВ через соответствующее количество связей.

Возможности методики HSQC иллюстрируются на примере изучения образцов этаноллигнинов пихты и осины.

Спектры 2D ^1H – ^{13}C HSQC образцов этаноллигнинов состоят из двух областей: алифатической кислородсодержащей (оксигенированной) (δ_C/δ_H 90–50/5.6–3.0) (рис. 4) и ароматической (δ_C/δ_H 150–100/8.0–5.5) (рис. 5). Алифатическая оксигенированная область в основном содержит корреляционные сигналы атомов боковых цепей, а ароматическая область – сигналы ароматических колец.

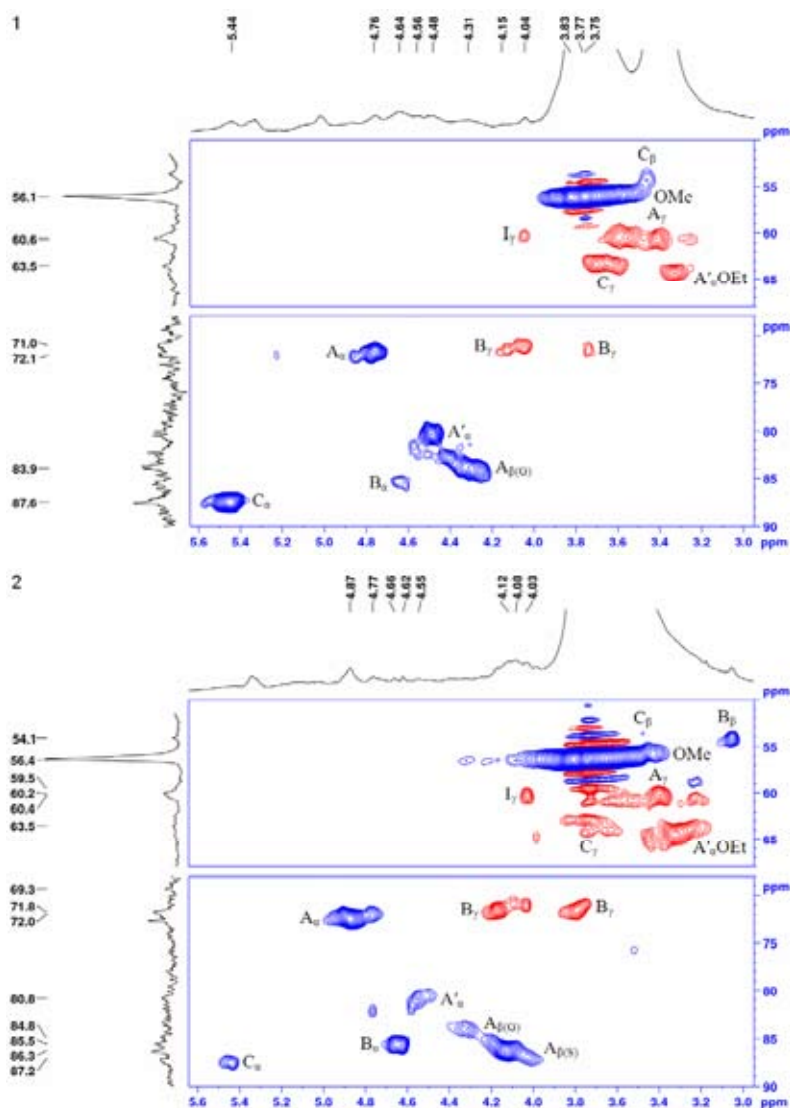


Рис. 4. Алифатическая оксигенированная область HSQC-спектров этанолигнина пихты (1) и этанолигнина осины (2). Отнесение сигналов дано в табл. 1, основные идентифицированные структурные единицы и фрагменты приведены на рис. 6

Fig. 4. Aliphatic oxygenated region in the HSQC spectra of the ethanollignins from fir (1) and aspen (2). See Table 1 for signal assignment and Fig. 6 for the main structures identified

Отнесение основных ^1H - ^{13}C корреляционных пиков в HSQC-спектрах этанолигнинов пихты и осины выполнено с использованием литературных данных [35, 51, 63–66] и приведено в табл. 1. Основные структурные единицы и фрагменты лигнинов представлены на рис. 6.

Сравнение области сигналов боковых цепей ^1H - ^{13}C HSQC-спектров этанолигнинов пихты и осины (рис. 4) показало, что в обоих образцах имеются корреляционные пики β -арильных эфиров, пинорезинольных и фенилкумарановых фрагментов (рис. 6). Эти фрагменты присутствуют во всех лигнинах и демонстрируют четкие и интенсивные характерные сигналы. Часть β -арильных эфиров этоксилирована в α -положении, поскольку в спектрах имеются сигналы ме-

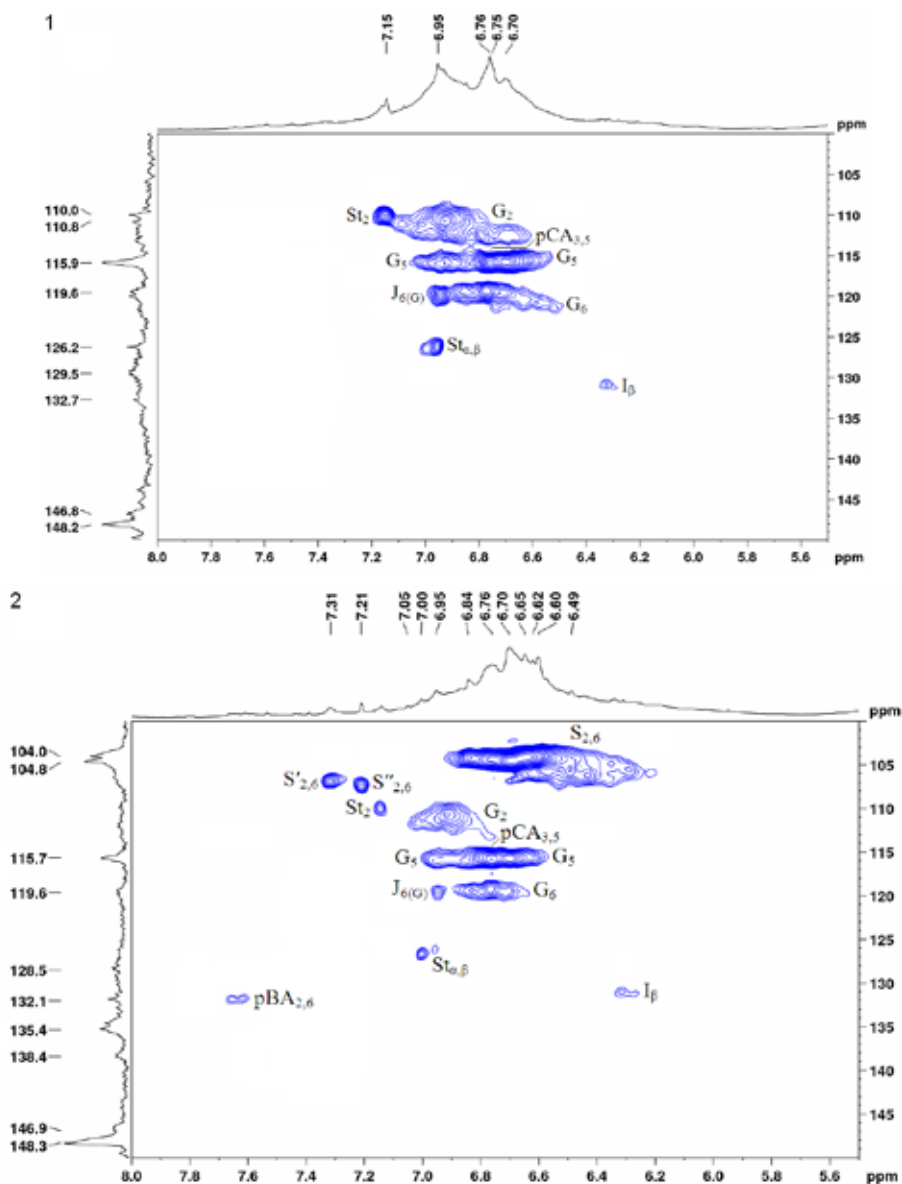


Рис. 5. Ароматическая область HSQC-спектров этанолигнина пихты (1) и этанолигнина осины (2). Отнесение сигналов дано в табл. 1, основные идентифицированные структурные единицы и фрагменты приведены на рис. 6

Fig. 5. Aromatic region in the HSQC spectra of the ethanollignins from fir (1) and aspen (2). See Table 1 for signal assignment and Fig. 6 for the main structures identified

тиленовой группы в α -этоксированных β -O-4'-связях (δ_C/δ_H 64.4 и 64.5/3.33) и α -положения α -ацелированных β -O-4'-связей (δ_C/δ_H 80.3 и 80.8.5/4.48 и 4.55). Это предположение также подтверждается присутствием корреляционных сигналов метильной группы при δ_C/δ_H 15.7/1.07 и 1.09 м.д. Образование α -этоксированных ($C_{\alpha}OEt$) β -арильных эфиров объясняется тем, что этанол, используемый в избытке для органосольвентной делигнификации, может выступать в качестве нуклеофила [67, 68].

Таблица 1. Отнесение ^1H - ^{13}C кросс-сигналов в HSQC-спектрах этаноллигнинов пихты и осиныTable 1. Assignments of the ^1H - ^{13}C cross signals in the HSQC spectra of ethanollignins from fir and aspen wood

Обозначение	$\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$, м.д. (лигнин пихты)	$\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$, м.д. (лигнин осины)	Отнесение
C_{β}	54.3/3.46	53.8/3.47	C_{β} - H_{β} в фенолкупрановых (β -5') фрагментах (С)
B_{β}		54.1/3.06	C_{β} - H_{β} в пинорезинольных (β - β') фрагментах (В)
ОМе	56.1/3.75	56.4/3.74	С-Н в метоксильных группах
I_{γ}	60.2/4.04	60.2/4.03	C_{γ} - H_{γ} в концевых группах циннамилного спирта (I)
A_{γ}	60.6/3.41 и 3.56	60.2/3.40-3.58	C_{γ} - H_{γ} в β -арил эфирных (β -О-4') фрагментах (А)
C_{γ}	63.5/3.70	63.5/3.74	C_{γ} - H_{γ} в фенолкупрановых (β -5') фрагментах (С)
$\text{A}'_{\alpha}\text{OEt}$	64.4/3.33	64.5/3.33	С-Н метиленовых групп в α -этоксированных ($\text{C}_{\alpha}\text{OEt}$) β -арил эфирных (β -О-4') фрагментах (А')
B_{γ}	71.1/3.73 и 4.04	71.6/3.79 и 4.18	C_{γ} - H_{γ} в пинорезинольных (β - β') фрагментах (В)
A_{α}	71.6/4.76	72.5/4.87	C_{α} - H_{α} β -арил эфирных (β -О-4') фрагментах (А)
A'_{α}	80.3/4.48	80.8/4.55	C_{α} - H_{α} в α -этоксированных ($\text{C}_{\alpha}\text{OEt}$) β -арил эфирных (β -О-4') фрагментах (А')
$\text{A}_{\beta(\text{G})}$	83.9/4.31	84.0/4.32	C_{β} - H_{β} в β -арил эфирных (β -О-4') фрагментах, связанных с G единицами (А)
B_{α}	85.4/4.64	85.5/4.64	C_{α} - H_{α} в пинорезинольных (β - β') фрагментах (В)
$\text{A}_{\beta(\text{S})}$		86.3/4.12	C_{β} - H_{β} в β -арил эфирных (β -О-4') фрагментах, связанных с S единицами (А)
C_{α}	87.6/5.44	87.5/5.44	C_{α} - H_{α} в фенолкупрановых (β -5') фрагментах (С)
$\text{S}_{2,6}$		104.3/6.66	$\text{C}_{2,6}$ - $\text{H}_{2,6}$ в этерифицированных сиригильных единицах (S)
$\text{S}'_{2,6}$		107.0/7.31	$\text{C}_{2,6}$ - $\text{H}_{2,6}$ в окисленных ($\text{C}_{\alpha}=\text{O}$) сиригильных единицах (S')
$\text{S}''_{2,6}$		107.3/7.21	$\text{C}_{2,6}$ - $\text{H}_{2,6}$ в окисленных ($\text{C}_{\alpha}\text{OOH}$) сиригильных единицах (S'')
St_2	110.0/7.15	110.0/7.15	C_2 - H_2 в стильбенах (St)
G_2	110.8/6.95	110.8/7.00	C_2 - H_2 в гваяцильных единицах (G)
G_5	115.7/6.72 и 6.95	115.7/6.72 и 6.95	C_5 - H_5 в гваяцильных единицах (G)
$\text{pCA}_{3,5}$	115.8/6.76	115.8/6.76	$\text{C}_{3,5}$ - $\text{H}_{3,5}$ в п-кумаратах (pCA)
G_6	119.2/6.77	119.2/6.76	C_6 - H_6 в гваяцильных единицах (G)
$\text{J}_{6(\text{G})}$	119.6/6.95	119.6/6.95	C_6 - H_6 в концевых группах циннамилного альдегида (J)
$\text{St}_{\alpha,\beta}$	126.2/6.97	126.6/7.02	$\text{C}_{\alpha,\beta}$ - $\text{H}_{\alpha,\beta}$ в стильбенах(St)
I_{β}	130.9/6.33	131.0/6.32	C_{β} - H_{β} в концевых группах циннамилного спирта (I)
$\text{pVA}_{2,6}$		132.1/7.63	$\text{C}_{2,6}$ - $\text{H}_{2,6}$ в п-гидроксibenзоатах (pVA)

Ароматическая область ^1H - ^{13}C HSQC-спектров этаноллигнинов пихты и осины (рис. 6) содержит характерные корреляционные пики гваяцильных единиц, п-кумаратов, концевых групп циннамилного спирта, концевых групп циннамилного альдегида и стильбенов. Известно, что лигнины лиственных пород древесины отличаются высоким содержанием сиригильных звеньев. В лигнине осины выявлены несколько различных типов сиригильных еди-

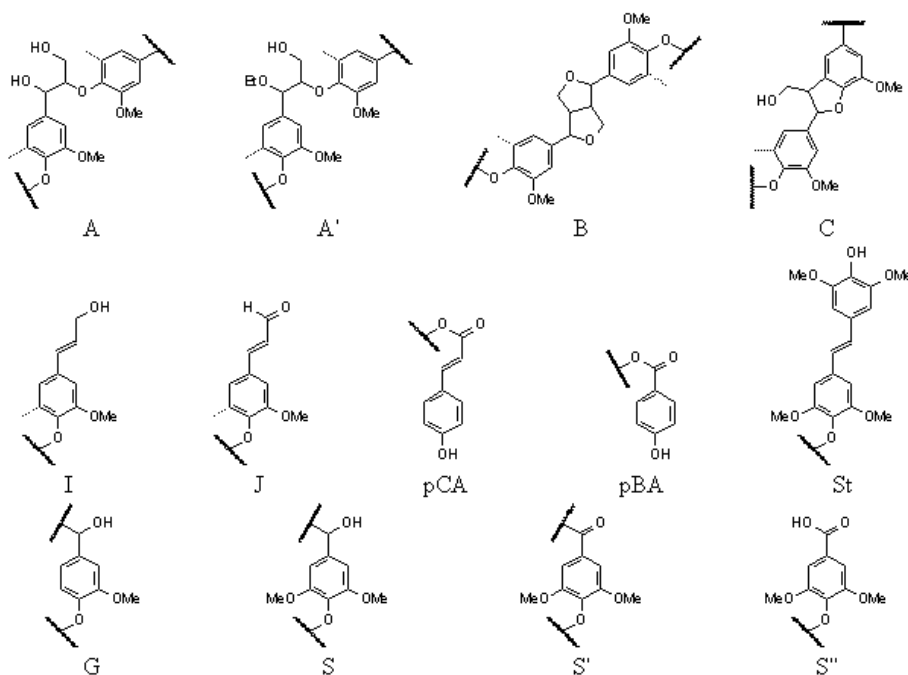


Рис. 6. Основные структурные единицы и фрагменты лигнинов: А – β -арилы эфиров, А' – α -этоксильрованные ($C_{\alpha}OEt$) β -арилы эфиров, В – пинорезинолы, С – фенолкупараны, I – концевые группы циннамильного спирта, J – концевые группы циннамильного альдегида, рСА – п-кумараты, рВА – п-гидроксibenзоаты, St – стилибены, G – гваяцильные единицы, S – сирингильные единицы, S' – окисленные ($C_{\alpha}=O$) сирингильные единицы, S'' – окисленные ($C_{\alpha}OOH$) сирингильные единицы

Fig. 6. Main structure units and fragments of lignins: A – β -aryl ethers, A' – α -ethoxylated ($C_{\alpha}OEt$) β -aryl ethers, B – pinosresinols, C – phenylcoumarans, I – cinnamyl alcohol end groups, J – cinnamyl aldehyde end groups, pCA – p-coumarates, pBA – p-hydroxybenzoates, St – stilbenes, G – guaiacyl units, S – syringyl units, S' – oxidized ($C_{\alpha}=O$) syringyl units, S'' – oxidized ($C_{\alpha}OOH$) syringyl units

ниц, отсутствующих в лигнине пихты, в частности обнаружены S-единицы (δ_C/δ_H 104.3/6.66), S-единицы с α -карбонильной группой (δ_C/δ_H 107.0/7.31) и S-единицы α -карбоксильной группой (δ_C/δ_H 107.3/7.21). Кроме того, следует отметить присутствие в структуре лигнина осины п-гидроксibenзоатов (δ_C/δ_H 132.1/7.63), что согласуется с результатами ряда других исследований [1, 24].

Заключение

Проведен анализ литературных данных по исследованию строения лигнинов методами ИК-спектроскопии, 1H ЯМР, ^{13}C ЯМР и 2D ЯМР (табл. 2). Возможности этих методов продемонстрированы на примере изучения этаноллигнинов пихты и осины. Сложная структура лигнинов затрудняет однозначную расшифровку всех полос в их ИК-спектрах. Однако метод ИКС позволяет идентифицировать полосы поглощения, отвечающие наиболее характерным колебаниям ФПЕ, и позволяет обнаружить структурные различия этаноллигнинов, выделенных из хвойной и лиственной древесины.

С помощью метода 1H ЯМР-спектроскопии определено наличие гидроксильных и альдегидных групп, ароматических колец, метоксильных, метиленовых и метильных групп, установ-

Таблица 2. Данные анализа литературы по исследованию строения лигнинов методами ИК- и ЯМР-спектроскопии

Table 2. Data of literature analysis on the study of lignin structure by FTIR and NMR spectroscopy

Метод	Для чего используется
ИКС	Дает общее представление о химической структуре лигнина, о наличии функциональных групп (G, S, H единиц, метоксильных и карбонильных групп), а также о соотношении фенольных и алифатических гидроксильных групп [16–18]
¹ H ЯМР	Позволяет определять наличие и распределение различных типов структурных элементов лигнина, содержащих атомы водорода (β -5', β - β' , β -O-4' связанных структур лигнина, фенольных и карбонильных групп) [16, 26, 28]. Метод способен полуколичественно оценить относительное содержание атомов водорода фенольных гидроксильных, спиртовых гидроксильных, альдегидных и карбоксильных групп, количество атомов водорода в ароматическом кольце и боковой цепи [26]
¹³ C ЯМР	С использованием ¹³ C ЯМР идентифицируют ФПЕ, проводят функциональный анализ лигнинов, определяют типы связей между структурными единицами, выполняют стереохимические исследования [16]. Методом количественной ¹³ C ЯМР-спектроскопии возможно определение соотношения G:S:H, различных типов связей между структурными единицами (β -5', 5-5', β -O-4', β - β' , β -1', 4-O-5'), содержания метоксильных, карбоксильных, карбонильных, фенольных и алифатических гидроксильных групп, степени конденсированности [31–33]
COSY	Находит свое применение при интерпретации сигналов атомов водорода боковых цепочек с целью получения информации о связях между звеньями макромолекул лигнина [36, 41, 42]
TOCSY	Используется для выяснения структуры боковых цепей лигнина [42–47]. В случае типичной боковой цепи из трех углеродов методика TOCSY позволяет наблюдать корреляции H α -H β -H γ_1 -H γ_2 [45]
INADEQUATE	С помощью INADEQUATE проводится отнесение сигналов атомов углерода основных фенилпропановых мономеров и структурных фрагментов лигнина со связями β -O-4', β - β' , β -5', β -1', а также возможна идентификация некоторых стереоизомеров, например β -O-4' структур [1, 39, 48]
¹ H- ¹³ C HSQC/ HMQC	Применяются для определения основных мономерных единиц (G, S, H, п-гидроксibenзоатов (pVA), п-кумаратов (pCA), ферулатов (FA), трицинов (T)), структурных фрагментов (β -арилов эфиров (β -O-4'), фенилкумарана (β -5', α -O-4'), пинорезинола (β - β' , α -O- γ' , γ -O- α'), спиродиенона (β -1', α -O- α'), тетрагидрофурана (β - β' , α -O- α'), бензодиоксана (β -O-4', α -O-5'), дибензодиоксицина (5'-5'', β -O-4'', α -O-4'')) и их стереоизомерных форм, связанных с лигнином углеводов, фрагментов жирных кислот и высших спиртов и т. д. [30, 35, 49, 50, 52–55]
¹ H- ¹³ C HSQC/ HMQC-TOCSY	Делают возможным быстрое отнесение сигналов протонов и атомов углерода боковых цепей лигнина. Так, для каждого из трех атомов углерода боковой цепи C α , C β и C γ обнаруживаются все корреляции с четырьмя протонами H α , H β , H γ_1 , H γ_2 , а для каждого из протонов H α , H β , H γ_1 , H γ_2 – все корреляции с тремя атомами углерода C α , C β и C γ [60]
¹ H- ¹³ C HMBC	С помощью HMBC определяют тип мономерных структурных единиц, участвующих в каждом виде химической связи, выявляют разнообразные структурные фрагменты лигнина, находят остатки жирных кислот. В частности, устанавливают точки присоединения п-кумаратов (pCA), ферулатов (FA) и ацетатных групп к боковым цепям ФПЕ лигнина, достоверно идентифицируют α , β -диариловые эфиры (β -O-4', α -O-4'') и α -кето- β -ариловые эфиры (α =O, β -O-4') [1, 39, 49, 62]

лены различия между хвойными и лиственными лигнинами. Метод ^{13}C ЯМР-спектроскопии позволил идентифицировать метоксильные группы, сингильные и гваяцильные метиновые группы, четвертичные атомы в ароматических фрагментах. Поскольку отнесение большинства сигналов в одномерных ^1H и ^{13}C ЯМР-спектрах лигнинов не представлялось возможным, для их интерпретации использовали методику HSQC. Методика 2D ЯМР оказалась наиболее информативной, позволила выявить различные структурные единицы и фрагменты макромолекул лигнина, провести сравнительный анализ строения хвойного и лиственного этаноллигнинов.

Благодарности

В работе использованы приборы Красноярского регионального центра коллективного пользования СО РАН.

Список литературы

1. Heitner C, Dimmel D.R., Schmidt J.A. Lignin and lignans: advances in chemistry. Boca Raton: CRC Press, 2010. 683 p.
2. Lupoi J.S., Singh S., Parthasarathi R., Simmons B.A., Henry R.J. Recent innovations in analytical methods for the qualitative and quantitative assessment of lignin. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2015. Vol. 49, P. 871–906.
3. Gong C., Goundalkar M.J., Bujanovic B.M., Amidon T.E. Evaluation of different sulfur-free delignification methods for hot-water extracted hardwood. *J. Wood Chem. Technol.* 2012. Vol. 32(2), P. 93–104.
4. Kangas H., Hakala T.K., Tamminen T., Määttänen M., Rovio S., Liitiä T., Poppius-Levlin K. Optimisation of acetic acid lignofibre organosolv process. *BioResources.* 2015. Vol. 10(2), P. 2699–2718.
5. Tekin K., Hao N., Karagoz S., Ragauskas A.J. Ethanol: A promising green solvent for the deconstruction of lignocelluloses. *ChemSusChem.* 2018. Vol. 11(20), P. 3559–3575.
6. El Mansouri N.-E., Salvadó J. Analytical methods for determining functional groups in various technical lignins. *Ind. Crops Prod.* 2007. Vol. 26(2), P. 116–124.
7. Awal A., Sain M. Spectroscopic studies and evaluation of thermorheological properties of softwood and hardwood lignin. *J. Appl. Polym. Sci.* 2011. Vol. 122(2), P. 956–963.
8. Liu L., Ye X.P., Womac A.R., Sokhansanj S. Variability of biomass chemical composition and rapid analysis using FT-NIR techniques. *Carbohydr. Polym.* 2010. Vol. 81(4), P. 820–829.
9. Nuopponen M., Vuorinen T., Jaemsae S., Viitaniemi P. Thermal modifications in softwood studied by FT-IR and UV resonance Raman spectroscopies. *J. Wood Chem. Technol.* 2004. Vol. 24(1), P. 13–26.
10. Nuopponen M.H., Wikberg H.I., Birch G.M., Jaaskelainen A.-S., Maunu S.L., Vuorinen T., et al. Characterization of 25 tropical hardwoods with Fourier transform infrared, ultraviolet resonance Raman, and ^{13}C NMR cross-polarization/magic-angle spinning spectroscopy. *J. Appl. Polym. Sci.* 2006. Vol. 102(1), P. 810–819.
11. Huang Y., Wang L., Chao Y., Nawawi D.S., Akiyama T., Yokoyama T., et al. Analysis of lignin aromatic structure in wood based on the IR spectrum. *J. Wood Chem. Technol.* 2012. Vol. 32(4), P. 294–303.

12. Sammons R.J., Harper D.P., Labbé N., Bozell J.J., Elder T., Rials T.G. Characterization of organosolv lignins using thermal and FT-IR spectroscopic analysis. *BioResources*. 2013. Vol. 8(2), P. 2752–2767.
13. Ghaffar S.H., Fan M. Structural analysis for lignin characteristics in biomass straw. *Biomass and Bioenergy*. 2013. Vol. 57, P. 264–279
14. Xu F., Yu J., Tesso T., Dowell F., Wang D. Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: a mini-review. *Appl. Energy*. 2013. Vol. 104, P. 801–809.
15. Burns D.A., Ciurczak E.W. Handbook of Near-Infrared analysis, Third edition. Boca Raton, London, New York: CRC Press, 2007. 834 p.
16. Lin S.Y., Dence C.W. Methods in lignin chemistry. Berlin: Springer-Verlag, 1992. 578 p.
17. Hortling B., Tarja T., Kentta E. Determination of carboxyl and non-conjugated carbonyl groups in dissolved and residual lignins by IR spectroscopy. *Holzforschung*. 1997. Vol. 51, P. 405–410.
18. Gilarranz M, Rodríguez F, Oliet M, García J, Alonso V. Phenolic OH group estimation by FTIR and UV spectroscopy. Application to organosolv lignins. *J. Wood Chem. Technol.* 2001. Vol. 21(4), P. 387–395.
19. Сарканен К.В., Людвиг К.Х. Лигнины (структура, свойства и реакции). М.: Лесная промышленность, 1975. 632 с. [Sarkanen K.V., Ludwig C.H. Lignins: occurrence, formation, structure and reactions. New York: Wiley-Interscience, 1971. 916 p. (in Russ.)].
20. Faix O. Classification of lignin from different botanical origins by FTIR spectroscopy. *Holzforschung*. 1991. Vol. 45, P. 21–27.
21. Collier W, Kalasinsky V, Schulz T. Infrared study of lignin: reexamination of aryl-alkyl ether C–O stretching peak assignment. *Holzforschung*. 1997. Vol. 46, P. 523–528.
22. Roeges N.P.G. A guide to the complete interpretation of infrared spectra of organic structures. Chichester: Wiley, 1994. 340 p.
23. Capanema E.A., Balakshin M.Y., Kadla J.F. A comprehensive approach for quantitative lignin characterization by NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 2004. Vol. 52(7), P. 1850–1860.
24. Zeng J., Helms G.L., Gao X., Chen S. Quantification of wheat straw lignin structure by comprehensive NMR analysis. *J. Agric. Food Chem.* 2013. Vol. 61(46), P. 10848–10857.
25. Pu Y., Cao S., Ragauskas A.J. Application of quantitative ³¹P NMR in biomass lignin and biofuel precursors characterization. *Energy Environ. Sci.* 2011. Vol. 4(9), P. 3154–3166.
26. Калабин Г.А., Каницкая Л.В., Кушнарев Д.Ф. Количественная спектроскопия ЯМР природного органического сырья и продуктов его переработки. М.: Химия, 2000. 408 с. [Kalabin G.A., Kanitskaya L.V., Kushnarev D.F. Quantitative NMR spectroscopy of natural organic raw materials and products of its processing. Moscow: Khimiya, 2000. 408 p. (in Russ.)].
27. Glasser W.G., Northey R.A., Schultz T.P. Lignin: Historical, Biological, and Materials Perspectives. Washington: American Chemical Society, 2000. 559 p.
28. Calvo-Flores F.G., Dobado J.A., Isac-García J., Martín-Martínez F. Lignin and Lignans as Renewable Raw Materials: Chemistry, Technology and Applications. Chichester: Wiley, 2015. 482 p.
29. Cybulska I., Grzegorz B., Rosentrater K., Julson J.L., Lei H. Comparative study of organosolv lignin extracted from prairie cordgrass, switchgrass and corn stover. *Biores. Technol.* 2012. Vol. 118. P. 30–36.

30. Wen J.-L., Sun S.-L., Xue B.-L., Sun R.-C. Recent advances in characterization of lignin polymer by solution-state nuclear magnetic resonance (NMR) methodology. *Materials*. 2013. Vol. 6(1), P. 359–391.
31. Holtman K.M., Chang H., Jameel H., Kadla J.F. Quantitative ^{13}C NMR characterization of milled wood lignins isolated by different milling techniques. *J. Wood Chem. Technol.* 2006. Vol. 26(1), P. 21–34.
32. Holtman K.M., Chang H., Kadla J.F. Solution-state nuclear magnetic resonance study of the similarities between milled wood lignin and cellulolytic enzyme lignin. *J. Agric. Food Chem.* 2004. Vol. 52(4), P. 720–726.
33. Santos R.B., Capanema E.A., Balakshin M.Yu., Chang H., Jameel H. Lignin structural variation in hardwood species. *J. Agric. Food Chem.* 2012. Vol. 60(19), P. 4923–4930.
34. Xia Z., Akim L., Argyropoulos D. Quantitative ^{13}C NMR analysis of lignins with internal standards. *J. Agric. Food Chem.* 2001. V. 49(8), P. 3573–3578.
35. You T.-T., Mao J.-Z., Yuan T.-Q., Wen J.-L., Xu F. Structural elucidation of the lignins from stems and foliage of *Arundo donax* Linn. *J. Agric. Food Chem.* 2013. Vol. 61(22), P. 5361–5370.
36. Белый В.А., Карманов А.П., Кочева Л.С. Исследование лигнина *Triticum sp.* и *Larix sibirica* методом двумерной ЯМР-спектроскопии. *Химия природных соединений*. 2015. Т. 51(5), С. 796–799. [Belyi V.A., Karmanov A.P., Kocheva L.S. 2D NMR spectroscopic study of lignin from *Triticum sp.* and *Larix sibirica*. *Chem. Nat. Compd.* 2015. Vol. 51(5), P. 929–923. (in Russ.)].
37. Sette M., Wechselberger R., Crestini C. Elucidation of lignin structure by quantitative 2D NMR. *Chem. Eur. J.* 2011. Vol. 17(34), P. 9529–9535.
38. Беккер Ю. Спектроскопия. М.: Техносфера, 2009. 528 с. [Böcker J. Spektroskopie. Würzburg: Vogel Business Media, 1997. 519 p. (in Russ.)].
39. Argyropoulos D.S. Advances in lignocellulosics characterization. Atlanta: TAPPI Press, 1999. 382 p.
40. Воловенко Ю.М., Карцев В.Г., Комаров И.В., Туров А.В., Хиля В.П. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса для химиков. М.: МБФНП, 2011. 704 с. [Volovenko Yu.M., Kartsev V.G., Komarov I.V., Turov A.V., Khilya V.P. Nuclear magnetic resonance spectroscopy. Moscow: ICSPF, 2011. 704 p. (in Russ.)].
41. Pinto P.C., Evtuguin D.V., Neto C.P., Silvestre A.J.D., Amado F.M.L. Behavior of *Eucalyptus globulus* lignin during kraft pulping. II. Analysis by NMR, ESI/MS, and GPC. *J. Wood Chem. Technol.* 2002. Vol. 2(2–3), P. 109–125.
42. Fukagawa N., Meshitsuka G., Ishizu A. A two-dimensional NMR study of birch milled wood lignin. *J. Wood Chem. Technol.* 1991. Vol. 11(3), P. 373–396.
43. Vivas N., Noniern M.-F., Pianet I., Vivas de Gaulejac N., Fouquet É. Structure of extracted lignins from oak heartwood. *C. R. Chimie*. 2006. Vol. 9(9), P. 1221–1233.
44. Kilpeläinen I., Sipilä J., Brunow G., Lundquist K., Ede R.M. Application of two-dimensional NMR spectroscopy to wood lignin structure determination and identification of some minor structural units of hard- and softwood lignins. *J. Agric. Food Chem.* 1994. Vol. 42(12), P. 2790–2794.
45. Ede R.M., Kilpeläinen I. Homo- and hetero-nuclear 2D NMR techniques: unambiguous structural probes for non-cyclic benzyl aryl ethers in soluble lignin samples. *Res. Chem. Intermed.* 1995. Vol. 21(3–5), P. 313–328.

46. Ede R.M., Ralph J. Assignment of 2D TOCSY spectra of lignins: the role of lignin model compounds. *Magn. Reson. Chem.* 1996. Vol. 34(4), P. 261–268.
47. Ede R.M., Brunow G. Application of two-dimensional homo- and heteronuclear correlation NMR spectroscopy to wood lignin structure determination. *J. Org. Chem.* 1992. Vol. 57(5), P. 1477–1480.
48. Bardet M., Robert D., Lundquist K., von Unge S. Distribution of *erythro* and *threo* forms of different types of β -O-4 structures in aspen lignin by ^{13}C NMR using the 2D INADEQUATE experiment. *Magn. Reson. Chem.* 1998. Vol. 36(8), P. 597–600.
49. Rencoret J., Ralph J., Marques G., Gutiérrez A., Martínez Á.T., del Río J.C. Structural characterization of lignin isolated from coconut (*Cocos nucifera*) coir fibers. *J. Agric. Food Chem.* 2013. Vol. 61(10), P. 2434–2445.
50. Wen J.-L., Xue B.-L., Xu F., Sun R.-C., Pinkert A. Unmasking the structural features and property of lignin from bamboo. *Ind. Crops Prod.* 2013. Vol. 42, P. 332–343.
51. Wen J.-L., Sun S.-L., Yuan T.-Q., Xu F., Sun R.-C. Structural elucidation of lignin polymers of *Eucalyptus* chips during organosolv pretreatment and extended delignification. *J. Agric. Food Chem.* 2013. Vol. 61(46), P. 11067–11075.
52. del Río J.C., Rencoret J., Marques G., Li J., Gellerstedt G., Jiménez-Barbero J., Martínez Á.T., Gutiérrez A. Structural characterization of the lignin from jute (*Corchorus capsularis*) fibers. *J. Agric. Food Chem.* 2009. V. 57(21), P. 10271–10281.
53. Rencoret J., Marques G., Gutiérrez A., Ibarra D., Li J., Gellerstedt G., Ignacio Santos J., Jiménez-Barbero J., Martínez Á.T., del Río J.C. Structural characterization of milled wood lignins from different eucalypt species. *Holzforschung.* 2008. Vol. 62(5), P. 514–526.
54. Rencoret J., Gutiérrez A., Nieto L., Jiménez-Barbero J., Faulds C.B., Kim H., Ralph J., Martínez Á.T., del Río J.C. Lignin composition and structure in young versus adult *Eucalyptus globulus* plants. *Plant Physiology.* 2011. Vol. 155(2), P. 667–682.
55. Yuan T.-Q., Sun S.-N., Xu F., Sun R.-C. Structural characterization of lignin from triploid of *Populus tomentosa* Carr. *J. Agric. Food Chem.* 2011. Vol. 59(12), P. 6605–6615.
56. Balakshin M.Yu., Capanema E.A., Chen C.-L., Gracz H.S. Elucidation of the structures of residual and dissolved pine kraft lignins using an HMQC NMR technique. *J. Agric. Food Chem.* 2003. Vol. 51(21), P. 6116–6127.
57. Белый В.А., Алексеев И.Н., Садыков Р.А. Изучение химической структуры лигнинов родиолы розовой (*Rhodiola rosea* L.) и серпухи венценосной (*Serratula coronata* L.) методом 2D ЯМР-спектроскопии. *Известия Коми НЦ УрО РАН.* 2012. (3). С. 20–27. [Belyi V.A., Alekseev I.N., Sadykov R.A. Studying of chemical structure of lignins of *Rhodiola rosea* L. and *Serratula coronata* L. by 2D NMR-spectroscopy. *J. Proceedings of the Komi SC Ural Division RAS.* 2012. (3), P. 20–27. (in Russ.)].
58. Crestini C., Lange H., Sette M., Argyropoulos D.S. On the structure of softwood kraft lignin. *Green Chem.* 2017. Vol. 19(17), P. 4104–4121.
59. Сильверстейн Р., Вебстер Ф., Кимл Д. Спектрометрическая идентификация органических соединений. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. 557 с. [Silverstein R.M., Webster F.X., Kiemle D.J. Spectrometric identification of organic compounds, 7th Edition. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2005. 550 p. (in Russ.)].

60. Zhang L., Gellerstedt G., Ralph J., Lu F. NMR studies on the occurrence of spirodienone structures in lignins. *J. Wood Chem. Technol.* 2006. Vol. 26(1), P. 65–79.
61. Fernández-Costas C., Gouveia S., Sanromán M.A., Moldes D. Structural characterization of Kraft lignins from different spent cooking liquors by 1D and 2D Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. *Biomass Bioenerg.* 2014. Vol. 63. P. 156–166.
62. del Río J.C., Lino A.G., Colodette J.L., Lima C.F., Gutiérrez A., Martínez A.T., Lu F., Ralph J., Rencoret J. Differences in the chemical structure of the lignins from sugarcane bagasse and straw. *Biomass Bioenerg.* 2015. Vol. 81. P. 322–338.
63. Bauer S., Sorek H., Mitchell V.D., Ibáñez A.B., Wemmer D.E. Characterization of *Miscanthus giganteus* lignin isolated by ethanol organosolv process under reflux condition. *J. Agric. Food Chem.* 2012. Vol. 60(33), P. 8203–8212.
64. Gao S., Zhao J., Wang X., Guo Y., Han Y., Zhou J. Lignin structure and solvent effects on the selective removal of condensed units and enrichment of S-type lignin. *Polymers.* 2018. Vol. 10(9), P. 967.
65. Wang X., Guo Y., Zhou J., Sun G. Structural changes of poplar wood lignin after supercritical pretreatment using carbon dioxide and ethanol–water as co-solvents. *RSC Adv.* 2017. (7), P. 8314–8322.
66. Wang B., Shen X.-J., Wen J.-L., Sun R.-C. A mild AlCl₃-catalyzed ethanol pretreatment and its effects on the structural changes of Eucalyptus wood lignin and the saccharification efficiency. *RSC Adv.* 2016. (6), P. 57986–57995.
67. Guo Y., Zhou J., Wen J., Sun G., Sun Y. Structural transformations of triploid of *Populus tomentosa* Carr. lignin during auto-catalyzed ethanol organosolv pretreatment. *Ind. Crop. Prod.* 2015. Vol. 76(15), P. 522–529.
68. Wen J.-L., Xue B.-L., Sun S.-L., Sun R.C. Quantitative structural characterization and thermal properties of birch lignins after auto-catalyzed organosolv pretreatment and enzymatic hydrolysis. *J. Chem. Technol Biotechnol.* 2013. Vol. 88(9), P. 1663–1671.