ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, Серия А, 2000, том 42, № 6, с. 1042–1047

УДК 541.64:543.422.25:547.992.3

НЕОДНОРОДНОСТЬ ХИМИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ МАКРОМОЛЕКУЛ ЛИГНИНА РАЗЛИЧНЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР НА ЯДРАХ ^{1}H И ^{13}C [1]

© 2000 г. Л. В. Каницкая*, А. В. Рохин**, Д. Ф. Кушнарев**, Г. А. Калабин**

*Иркутский институт химии Сибирского отделения Российской академии наук
664033 Иркутск, ул. Фаворского, 1

**Иркутский государственный университет
664001 Иркутск, ул. К.Маркса, 1

Поступила в редакцию 07.07.99 г.
Принята в печать 13.09.99 г.

Методом спектроскопии ЯМР на ядрах ^{1}H и ^{13}C исследована химическая структура макромолекул диоксанлигнинов, выделенных из всего стебля (ДЗС), из внутренней части стебля (ДЛВ) и из коры хлопчатника (ДЛК). Установлено, что ДЗС и ДЛВ различаются только степенью конденсированности, количеством арил-арильных простых эфирных и сложноэфирных связей, тогда как химическое строение ДЛК, принципиально отличается от ДЗС и ДЛВ соотношением структурообразующих звеньев S и G, наличием большого количества пирокатехиновых структур, содержанием функциональных групп, связей и длиной боковых цепей.

Неоднородность химической структуры макромолекул лигнина различных растительных тканей древесины, клеток и даже слоев клеточной стенки в пределах одного вида растений в принципе доказана [1]. Например, известно, что в ядровой древесине лиственных пород содержится гораздо большее количество сирингильных звеньев по сравнению с соответствующей заболонной частью [2]. Исследование коры хвойных и лиственных пород показало, что лигнины коры хвойных пород являются типичными G-лигнинами с повышенным по сравнению с лигнином древесины содержанием H-звеньев. Лигнины коры лиственных пород, будучи GS-лигнинами, содержат по сравнению с древесиной больше G-звеньев [3].

Лигнин склереид из коры древесины осины имеет более низкое содержание групп OCH_3 и более высокое отношение фенольных групп OH к OCH_3 по сравнению с лигнином древесины. Отношение ванилина к сиреневому альдегиду в продуктах нитробензольного окисления лигнина коры составляет 1 : 3. Спектры ЯМР ^{1}H двух фракций лигнина коры указывают на более высокую степень его конденсации [4]. Исследование лигнинов коры японских хвойных (Pinus thunbergii, Abiesfirma, Griptomerica japonica) и лиственных (Fagus crenata, Magnolia abovata, Quercus crispula) пород методами нитробензольного окисления и этанолиза показало, что в продуктах деградации присутствуют такие же соединения, какие получают из макромолекулы лигнина древесины, но их количественное соотношение иное; в частности, в лигнине коры лиственных пород сирингильных звеньев меньше, чем гваяцильных по сравнению с лигнином соответствующей древесины [5].

Все исследования указывают на общее сходство строения макромолекул, выделенных из древесины и коры, и на незначительные различия соотношения структурных звеньев. Однако на основании результатов сравнительного исследования различных морфологических элементов древесины белого дуба (Quercus alba) выражено сомнение в отношении неоднородности состава лигнина лиственных пород [6].

[1] Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 97-04-96151).

Таблица 1. Распределение атомов водорода по функциональным группам и структурным фрагментам в диоксанлигнинах, выделенных из различных частей стебля хлопчатника

Фрагменты и группы	Значения q_x			Диапазон хим. сдвиг ^{1}H δ (м. д.) и отнесение сигналов
	ДЗС	ДЛВ	ДЛК	
$H_{C(O)OH}$	0.004	0.000	0.001	14.0–12.0 OH карбоксильных групп
$H_{C(O)H}$	0.006	0.005	–	9.7–9.0 H альдегидных групп
$H_{OH\ фен\ (1)}$	0.014	0.008	0.032	12.0–9.3 OH при C-4 G', H'
$H_{OH\ фен\ (2)}$	0.013	0.003	0.038	9.3–8.4 OH при C-4 S'; C-3/C-4 в П; C-3/C-5 в пирогаллоле
$H_{ар}$	0.229	0.164	0.161	8.4–6.3 водород ароматического кольца
$H_{O\text{-}ал}$	0.642	0.751	0.647	6.3- 2.9 CH-, CHO-, CH_2O-, CH_3O-группы в α-, β-, γ-положениях к ароматическому кольцу, CHO углеводов
$H_{\alpha,\beta,\gamma}$	0.056	0.069	0.120	2.9–0.3 CH-, CH_2-, CH_3-группы в α-, β-, γ-положениях к ароматическому кольцу
$H_{OH\ ал}$	0.052	–	–	Атомы водорода спиртовых групп OH

Известно, что всем методам анализа лигнина, основанным на химической деградации, свойствен общий недостаток: продукты деструкции образуются только из неконденсированных звеньев C_6–C_3, что приводит к неточному определению содержания звеньев H, G, S. Часть количественной информации (например, о связях между звеньями) по большей части труднодоступна из-за длительности процедур анализа. Следовательно, сделать вывод о сходстве или различии химического строения макромолекул лигнинов, выделенных из разных частей растения, только на основании имеющихся результатов химических методов анализа невозможно. Поэтому проведен сравнительный анализ химического строения диоксанлигнинов, выделенных из различных частей зрелого стебля хлопчатника: из всего стебля (**ДЗС**), из внутренней части стебля (**ДЛВ**) и из коры стебля (**ДЛК**) методом спектроскопии ЯМР ^{1}H и ЯМР ^{13}C.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Диоксанлигнины выделяли по методике Пеппера, но с предварительным промыванием растения горячей водой. Элементный состав лигнинов (мас. %): ДЗС C 56.94; H 6.40; ДЛВ C 56.95; H 6.07; N 0.10; ДЛК C 56.34; H 5.81; N 0.44.

Спектры ЯМР ^{1}H препаратов лигнина регистрировали на спектрометре VXR-500S фирмы "Varian" (рабочая частота 500 МГц) с релаксационной задержкой 4 с, импульс 90°. В качестве растворителя использовали гексаметилфосфортриамид (ГМФА-d_{18}).

Спектры ЯМР ^{13}C препаратов лигнина с шумовой развязкой от протонов, подспектры первичных и третичных, вторичных и четвертичных атомов углерода, полученные по методу спинового эха с мультиплетной расфазировкой, регистрировали после 10000 прохождений на спектрометре VXR-500S фирмы "Varian" (рабочая частота 125.5 МГц) с релаксационной задержкой 2.5 с, импульс 90° в растворе ДМСО-d_6. В качестве релаксанта использовали *трис*-ацетилацетонат хрома (0.02 моль/л).

Количественные расчеты по спектрам ЯМР производили согласно методике [7, 8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 и 2 представлено распределение атомов водорода по структурным фрагментам макромолекул лигнинов и количество атомов углерода структурных фрагментов и функциональных групп в расчете на одно ароматическое кольцо n_x, количество звеньев и связей в макромолекулах лигнинов – в табл. 3. В табл. 4 отражено содержание функциональных групп исследуемых лигнинов в мас. %. Как видно из табл. 1 и 2, ДЛВ отличается от ДЗС меньшим количеством фенольных групп OH, атомов углерода боковых цепей, связанных с атомом кислорода, в том числе сложноэфирных групп, спиртовых групп

Таблица 2. Количество основных функциональных групп и фрагментов n_x в диоксанлигнинах, выделенных из различных частей стебля хлопчатника, рассчитанное по спектрам ЯМР ^{13}C и ЯМР ^{1}H

Фрагменты и группы	Значения n_x			Диапазон хим. сдвигов ^{13}C δ (м. д.) и отнесение сигналов
	ДЗС	ДЛВ	ДЛК	
C=O	0.106	0.181	0.176	220–190 C=O кетонов
C(O)H	0.082	0.065	0.001	210–185 C=O альдегидов
C(O)OH	0.052	–	0.012	185–164 C(O)OH (ЯМР ^{1}H)
C(O)O–	0.365	0.078	0.207	185–164 C(O)O сложноэфирных связей
HC=CH	–	0.266	–	156–110 C фрагментов Ar–CH=CH–R
$C_{ар}$–O (1)	0.295	0.032	0.163	164–156 C-4 H, H'; C-2,4,6 A, A'; C-5/C-7 флаваноидов, катехинов
$C_{ар}$–O (2)	–	0.048	0.119	156–153 C-4 G, G' (α-C=O)
$C_{ар}$–O (3)	0.823	0.924	1.129	153–151 C-3,5S; C-3/C-5 G (4-O-5)
$C_{ар}$–O (4)	1.237	1.354	1.213	151–140 C-3,4 G, G' и П
$C_{ар}$–O (5)	0.450	0.455	0.350	138–134 C-4 S, S'; C-4 G (4-O-5)
$C_{ар}$–C (1)	1.823	1.350	0.905	140–123 C-1 S, S', G, G', П
$C_{ар}$–C (2)	0.179	–	–	119–114 C-1,3 A*
$C_{ар}$–C (3)	0.105	–	0.303	114–95 C-1,3 A'*
$CH_{ар}$ (1)	0.029	–	–	132–125 C-2,6 H, H';
$CH_{ар}$ (2)	0.240	0.320	0.297	125–117 C-6 G, G'; C-5,6 G, G' (α-C=O) C-6 П
$CH_{ар}$ (3)	0.481	0.387	0.604	117–114 C-5 G, G'; C-3,5 H, H'; C-2,5 П
$CH_{ар}$ (4)		0.387	0.192	114–108 C-2 G, G'
$CH_{ар}$ (5)	0.347	0.741	0.704	108–103 C-2,6 S, S'; C-2 G (4-O-5)
$CH_{ар}$ (6)	–	0.043	0.102	105–95 C-5 A, A'
$CHO_{алк}$ (1)	0.674	0.649	0.353	90–78 C_{α} в α-O-4; C_{β} в β-O-4
$CHO_{алк}$ (2)	0.643	0.686	0.446	78–64 $C_{\alpha,\beta}$ в β-O-4, α-O-4; C_{α}-OH; C_{β}-OH
$CH_2O_{алк}$	1.082	0.622	0.271	76–58 C_{γ} в CH_2–O–R, CH_2OH
CH_3O'	0.086	–	–	64–58 CH_3O– в Ar–OCH_3 в A
CH_3O	1.305	1.297	0.993	56–54 CH_3O– в Ar–OCH_3 в S, S'; G, G'
$CH_{\beta-\beta+\beta-5+\beta-1}$	0.163	0.173	0.066	54–52 C_{β} в β-β C_{β} в β-5
$C_{алк}$	0.312	0.749	1.103	45–5 CH, CH_2, CH_3 алифатические
$f_a = I_x/I_{общ}$	0.560	0.583	0.639	164–103 степень ароматичности лигнина

* См. работу [8].

CH_2OH, отсутствием групп COOH, а также меньшим количеством связей $C_{ар}$–C, определяющих степень конденсированности макромолекулы лигнина, но несколько большим количеством связей $C_{ар}$–O–$C_{ар}$. Количество структурообразующих звеньев S, G и т.д. в макромолекуле лигнина из внутренней части стебля то же, что и во всем стебле. Резонансных сигналов, относящихся к *п*-оксифенильным единицам в спектрах ЯМР ^{13}C ДЛВ не обнаружено (хим. сдвиги ^{13}C звеньев H: 164–162, 131, 125 м. д.). Макромолекула ДЛК существенно отличается от лигнинов ДЗС и ДЛВ хлопчатника. В спектрах ЯМР ^{13}C лигнина ДЛК в отличие от ДЗС и ДЛВ наблюдаются интенсивные резонансные сигналы в диапазоне 143–145 м. д. (рис. 1), которые могут принадлежать как атомам C-4 колец G в структурах со связями β–1 и 5–5, так и атомам C-3/C-4 пирокатехиновых структур (П) [9, 10]. Поскольку количество связей $C_{ар}$–C невелико, наиболее предпочтительным остается отнесение этих резонансных сигналов к звеньям П. На это указывает также очень большое количество фенольных групп OH и фрагментов $CH_{ар}$, имеющих резонанс в области 117–114 м. д. (C-2/C-5 структур П, замещенных по положению C-1 ароматического кольца) (рис. 1).

В ДЛК хлопчатника содержится до 28 звеньев П, 35 звеньев S, 25 звеньев G и 10 звеньев A. Звеньев H не обнаружено. Степень конденсированности макромолекулы ДЛК намного ниже, чем ДЗС ($13/C_{600}$ связей $C_{ар}$–C), почти в 2 раза меньше арилалкильных простых эфирных связей, но почти во столько же раз больше арил-арильных простых эфирных связей. Количество групп $OH_{фен}$. в 2–3 раза превышает таковое в ДЗС и ДЛВ.

Боковые цепи ДЛК окислены незначительно и отличаются от боковых цепей лигнина стебля небольшим количеством атомов углерода, связанных с атомом кислорода – $1.53/C_6$. Количество фрагментов $C_\gamma H_2$–OH составляет всего $0.27/C_6$. Суммарное количество пинорезинольных и фенилкумарановых структур в 3 раза ниже, чем в лигнинах из стебля хлопчатника.

Такие структурные характеристики ДЛК, как наличие пирокатехиновых структур, высокое содержание групп $OH_{фен}$, наличие структур A', приводят к заключению, что в препарате лигнина из коры хлопчатника присутствуют полифенольные соединения типа проантоцианидинов, хотя эти группы соединений легко растворяются в горячей воде и, таким образом, должны быть экстрагированы еще на стадии подготовки коры хлопчатника перед выделением лигнина. Присутствие флавоноидов, которые не экстрагируются

Таблица 3. Количество структурных фрагментов, связей и функциональных групп N_x в препаратах лигнинов, выделенных из различных частей стебля хлопчатника

Фрагменты, функциональные группы и связи	Значения N_x			Ошибка, отн. %
	ДЗС	ДЛВ	ДЛК	
S + S' (S')	45(4)	46	37	10.3
G + G'	41	39	25	12.0
H + H' + A + A' (A')	15(5)	16	10	20.0
П	–	–	28	20.0
$\Sigma C_{ар}$–O	281	281	297	10.3
$\Sigma CH_{ар}$	110	184	190	10.3
$C_{ар}$–O–C	104	125	118	14.0
$C_{ар}$–O–$C_{ал}$	67	65	35	20.0
$C_{ар}$–O–$C_{ар}$	18	30	42	20.0
$C_{ар}$–C	211	135	113	10.3
$\Sigma C_{бок. цепей}$	348	347	263	12.0
$C_{ар}$–OH	37	26	83	12.0
C_γ–OH	96	62	27	12.0
–OCH_3'	9	–	0	6.7
–OCH_3	131	130	99	6.7
C(O)OR	37	8	21	6.7
C(O)OH	5	–	1	6.7
C=O	11	18	18	6.7
C(O)H	8	7	–	6.7

Таблица 4. Содержание основных функциональных групп и примесей в препаратах лигнина из различных частей стебля хлопчатника

Функциональные группы	Содержание, мас. %		
	ДЗС	ДЛВ	ДЛК
C=O	1.31	2.34	2.46
C(O)H	1.05	0.87	0.01
C(O)OH	1.03	0.00	0.26
C(O)O–	7.09	1.58	4.55
CH_3O	19.03	18.56	15.39
$OH_{фен}$	2.94	1.13	6.91

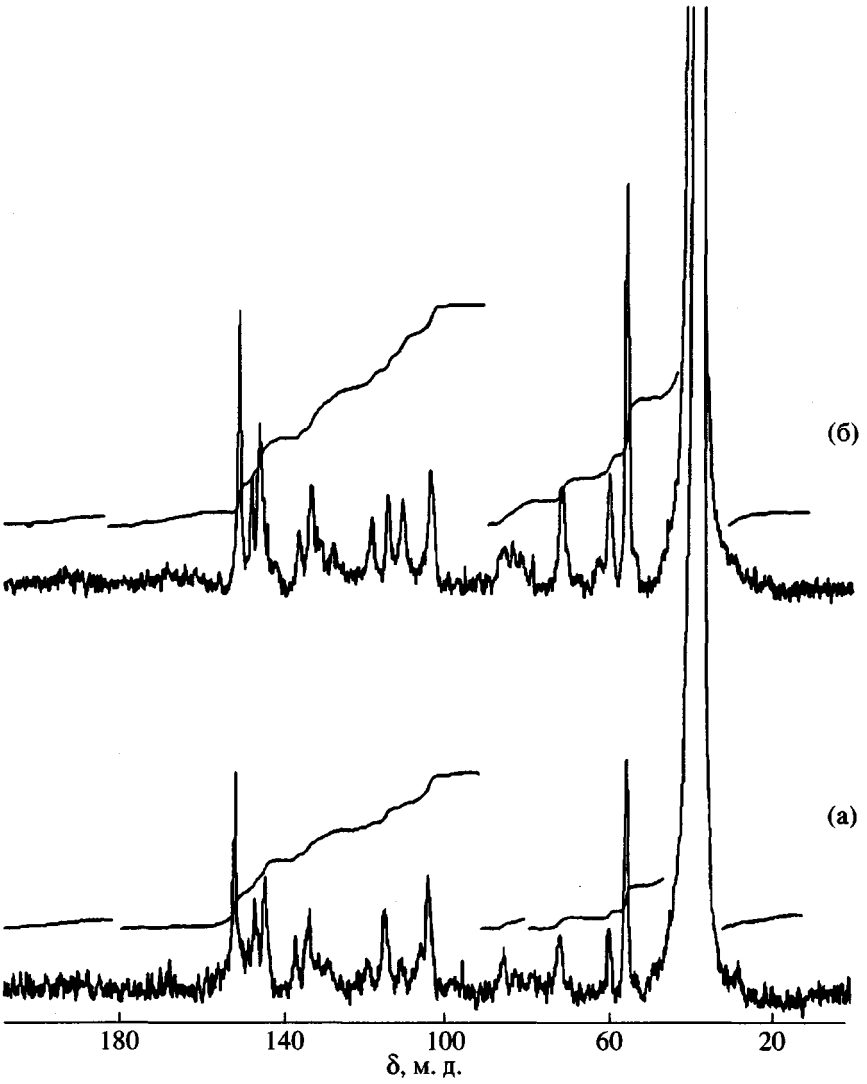

Рис. 1. Спектры ЯМР ^{13}C лигнинов из коры (*а*) и внутренней части стебля хлопчатника (*б*).

горячей водой, например флавонов, флаванонов, изофлавонов и т.д., повлекло бы за собой увеличение содержания групп C=O, а их количество в ДЛК соизмеримо с таковым для ДЗС и ДЛВ. Низкое количество связей $C_{ар}$–C в препарате ДЛК также не свидетельствует в пользу наличия флавоноидов, так как в этих соединениях на одно ароматическое кольцо приходится одна связь $C_{ар}$–C. Следовательно, структурные характеристики препарата ДЛК отражают химическое строение макромолекулы лигнина коры хлопчатника.

Итак, можно заключить, что макромолекулы диоксанлигнинов, выделенные из всего стебля и из внутренней части различаются только степенью конденсированности, количеством арил-арильных простых эфирных и сложноэфирных связей, тогда как химическое строение диоксанлигнина, выделенного из коры хлопчатника, принципиально иное и отличается и по соотношению структурообразующих звеньев S и G, и по наличию большого количества пирокатехиновых структур, короткой боковой цепью, большим количеством групп $OH_{фен}$. Кроме того, ДЛК содержит в 2 раза меньше арил-арильных простых эфирных связей и связей $C_{ар}$–C. В некоторой степени структура ДЛК похожа на структуру лигнина, полученного из части растения несвязанного с камбиальным слоем, т.е. на лигнин из оболочек семян хлопчатника [11].

Подводя итог исследованиям неоднородности лигнина методом спектроскопии ЯМР на ядрах ^{1}H, ^{13}C, можно с уверенностью говорить о высокой чувствительности и информативности этого метода к анализу тончайших закономерностей в изменении химической структуры макромолекул

лигнинов в зависимости от их ММ [12], метода выделения лигнина из древесной матрицы [8], стадии развития растения [11] или локализации лигнинов в различных частях растения. Можно не только констатировать структурную неоднородность макромолекул лигнина различного происхождения, но и количественно охарактеризовать различия в их структуре.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sarkanen K.V., Hergert H.L.* Lignins, Occurence, Formation, Structure and Reaction. Classification and Distribution. New York: Wiley, 1971.
2. *Parameswaran N., Faix O., Schweers W.* // Holzforschung. 1975. B. 29. № 1. S. 1.
3. *Anderson A., Erickson M., Fridt H., Miksche G.E.* // Holzforschung. 1973. B. 27. S. 189.
4. *Higuchi T., Ito Y., Shimada M., Kawamura I.* // Cell. Chem. Technol. 1967. V. 1. № 5. P. 585.
5. *Clermont L.P.* // Tappi. 1970. V. 53. № 1. P. 52.
6. *Obst J.R.* // Holzforschung. 1982. B. 36. № 3. S. 143.
7. *Рохин А.В., Каницкая Л.В., Калихман И.Д., Кушнарев Д.Ф., Бабкин В.А., Калабин Г.А.* // Химия древесины. 1992. № 1. С. 76.
8. *Каницкая Л.В., Рохин А.В., Кушнарев Д.Ф., Калабин Г.А.* // Высокомолек. соед. А. 1997. Т. 39. № 6. С. 965.
9. *Chen C.L., Robert D.* Methods in Enzymology. 1988. V. 161 (B). Ch. 15. P. 137.
10. *Kalinowsky H.O., Berger S., Braun S.* Carbon-13 NMR Spectroscopy. New York, 1988.
11. *Рохин А.В., Каницкая Л.В., Кушнарев Д.Ф., Калабин Г.А., Абдуазимов Х.А., Смирнова Л.С., Пулатов Б.Х.* // Химия природных соед. 1994. № 6. С. 798.
12. *Каницкая Л.В., Рохин А.В., Кушнарев Д.Ф., Калабин Г.А, Абдуазимов Х.А.* // Высокомолек. соед. А. 1999. Т. 41. № 5. С. 503.

Heterogeneous Chemical Structure of Lignins Isolated from Various Plant Tissues: ^{1}H and ^{13}C NMR Study

L. V. Kanitskaya*, A. V. Rokhin, D. F. Kushnarev**, and G. A. Kalabin****

**Institute of Organic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, ul. Favorskogo 1, Irkutsk, 664033 Russia*

***Irkutsk State University, ul. Karla Marksa 1, Irkutsk, 664001 Russia*

Abstract—The chemical structure of dioxane lignins isolated from the whole cotton plant stem (DLS), its inner part (DLIS), and the cotton plant bark (DLB) was studied by ^{1}H and ^{13}C NMR spectroscopy. It was demonstrated that DLS and DLIS are distinguished only by the degree of condensation and the number of aryl–aryl ether and ester bonds. On the contrary, the chemical structure of DLB is markedly different from that of DLS and DLIS by the ratio of the structure-forming units S and G, the presence of a great amount of pyrocatechol moieties, the content of functional groups, and the length of side chains.