

УДК 543.632.538

## СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГИДРОКСИЛЬНЫХ ГРУПП ЛИГНИНА МЕТОДОМ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ

© С.Л. Шестаков\*, Д.С. Косяков, А.Ю. Кожевников, Н.В. Ульяновский, Ю.А. Попова

Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова,  
наб. Северной Двины, 17, Архангельск, 163002 (Россия),  
e-mail: laston85@mail.ru

Лигнин, как один из наиболее распространенных биополимеров, является потенциальным возобновляемым источником ценных ароматических соединений. В связи с этим весьма актуальна задача характеристики функционального состава препаратов лигнина и продуктов их химической модификации. Предметом изучения статьи является модификация методики определения гидроксильных групп различных типов в препаратах лигнина методом спектроскопии  $^{31}\text{P}$ -ЯМР. Нами предложено использование предварительной дериватизации лигнина фосфитилирующим агентом и запись спектра  $^{31}\text{P}$ -ЯМР в среде недеирированного растворителя с целью снижения стоимости анализа. Для сравнения произведена регистрация спектров  $^{31}\text{P}$ -ЯМР лигнина и его модельного соединения с использованием дейтерированного и недеирированного растворителя. Показано, что применение недеирированного растворителя не влияет на значения химических сдвигов спектров  $^{31}\text{P}$ -ЯМР и результаты количественной оценки содержания гидроксильных групп различного типа в макромолекуле лигнина. Эксперименты на модельном соединении лигнина подтверждают адекватность выбранного подхода. Проведена апробация предложенной методики на образце диоксанлигнина березы и выполнен количественный анализ содержания гидроксильных групп.

*Ключевые слова:* лигнины, ЯМР,  $^{31}\text{P}$ -ЯМР, функциональный анализ, фосфитилирование.

### Введение

Лигнин, являющийся одним из наиболее распространенных биополимеров в природе, привлекает все большее внимание как возобновляемый источник широкого круга ценных ароматических соединений, альтернативный ископаемым углеводородам. В связи с этим решение задач характеристики функционального состава препаратов лигнина различного происхождения и продуктов их химической модификации является весьма актуальным. В наибольшей степени это относится к наиболее реакционноспособным гидроксильным группам, присутствующим в лигнинах в алифатических заместителях, а также в виде фенольных структур *n*-оксифенильного, гваяцильного и сирингильного типов [1–4].

Для исследования лигнинов применяются различные методы, например УФ- и ИК-спектроскопия [5], газовая хромато-масс-спектрометрия [6–9], однако одним из наиболее информативных методов функционального анализа лигнинов является спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР). К достоинствам метода можно отнести высокую точность

и достоверность определения состава, а также то, что образец не разрушается при исследовании. Тем не менее применение данного метода для изучения лигнинов в ряде случаев затруднено вследствие их сложной структуры [1–4] и невозможности растворения некоторых препаратов в дейтерированных растворителях.

В литературе преимущественно рассматривается функциональный анализ лигнина методами спектроскопии  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР [6, 10–16]. Однако

---

Шестаков Семен Леонидович – научный сотрудник центра коллективного пользования научным оборудованием «Арктика», e-mail: laston85@mail.ru  
Косяков Дмитрий Сергеевич – директор центра коллективного пользования научным оборудованием «Арктика», e-mail: kosyakov@mail.ru  
Кожевников Александр Юрьевич – заместитель директора центра коллективного пользования научным оборудованием «Арктика», e-mail: akozhevnikov@mail.ru  
Ульяновский Николай Валерьевич – младший научный сотрудник центра коллективного пользования научным оборудованием «Арктика», e-mail: uluanovskii\_n@mail.ru  
Попова Юлия Александровна – студентка, e-mail: yuliya.popova01@mail.ru

\* Автор, с которым следует вести переписку.

спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР обладают довольно низкой информативностью вследствие быстрого протонного обмена между гидроксильными группами, что приводит к уширению сигналов ОН-групп в разных фрагментах полимера вплоть до слияния большей части сигналов. Спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР из-за низкого естественного содержания изотопа  $^{13}\text{C}$  требуют больших навесок образцов и длительного времени накопления сигнала.

Распространенным приемом, упрощающим анализ лигнинов методами спектроскопии ЯМР, является предварительная модификация высокомолекулярного соединения (ацетилирование, силилирование и т.д.), облегчающая растворение образцов и позволяющая дифференцированно определять гидроксильные группы различных типов.

В случае определения гидроксильных групп наиболее удачным следует признать метод, предложенный в работах [17–20] и предусматривающий фосфитилирование лигнина 2-хлор-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксофосфаном (рис. 1) с последующим получением ЯМР-спектров на ядрах  $^{31}\text{P}$ .

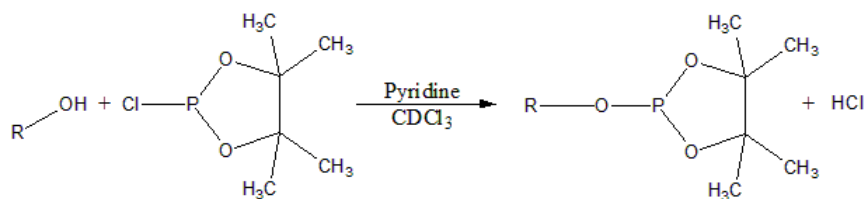


Рис. 1. Схема фосфитилирования гидроксильных групп лигнина

Описанный способ позволяет избавиться от быстрого протонного обмена между ОН-группами лигнина и увеличить информативность спектров ЯМР.

Для проведения реакции дериватизации и последующего анализа применяются дейтерированные растворители (смесь пиридина- $d_5$  и хлороформа- $d_1$ ). Это связано с тем, что большинство современных ЯМР-спектрометров имеют отдельный канал для регистрации сигнала ядер дейтерия, по интенсивности которого происходит настройка однородности магнитного поля спектрометра для получения максимального разрешения. Магнитное поле должно быть максимально однородным по объему образца для уменьшения ширины спектральных линий и соответственно повышения разрешения спектра. Настройка однородности производится с помощью набора шиммирующих катушек. Токи в катушках создают собственные магнитные поля, компенсирующие как градиенты внешнего магнитного поля, так и локальные неоднородности магнитного поля в образце, возникающие вследствие различий в магнитной восприимчивости разных компонентов образца. Токи в катушках подбираются таким образом, чтобы сигнал ядер дейтерия в образце имел локальный максимум по амплитуде.

Дейтерированные растворители кардинально отличаются от обычных по цене, особенно это касается пиридина- $d_5$ , стоимость которого может превышать цену недейтерированного аналога в 1000 и более раз [21]. Это обуславливает высокую себестоимость получения ЯМР-спектров лигнинов, что, наряду с большими капитальными затратами, сдерживает внедрение метода в практику рутинного анализа.

Нами высказано предположение, что отказ от применения пиридина- $d_5$  не должен привести к снижению качества спектров  $^{31}\text{P}$ -ЯМР. Сигнал дейтериевой стабилизации при этом можно регистрировать на ядрах D хлороформа- $d_1$ , являющегося одним из наиболее дешевых дейтерированных растворителей. Экспериментальная проверка данного предположения и совершенствование методики определения гидроксильных групп в лигнине являются целью настоящего исследования.

### Экспериментальная часть

**Объекты исследования.** Для подбора оптимальных условий пробоподготовки и параметров регистрации спектров ЯМР эксперименты проводились на мономерном модельном соединении гваяцильного структурного звена лигнина – ванилиновом спирте (4-гидрокси-3-метоксибензиловый спирт), молекула которого содержит как спиртовую, так и фенольную гидроксильные группы. Препарат ванилинового спирта приобретен у компании Sigma-Aldrich, имел чистоту более 98% и применялся без дополнительной очистки.

В качестве основного объекта исследования выбран препарат диоксанлигнина (ДЛ), полученный из древесины березы повислой (*Betula pendula*). Выбор лигнина лиственной древесины обусловлен тем, что, в отличие от хвойных пород, в ней присутствуют все возможные типы фенольных групп, что повышает достоверность сравнения спектров, зарегистрированных в разных условиях.

Для получения ДЛ использовали метод Пеппера [22]. На первом этапе проводили удаление экстрактивных веществ путем экстракции воздушно-сухих опилок ацетоном в аппарате Сокслета в течение 48 ч. Далее 50 г подготовленных опилок помещали в колбу с обратным холодильником и заливали 0,8 л 0,2 М раствора HCl в смеси 1,4-диоксана с водой (9 : 1). После 30-минутной пропитки при комнатной температуре полученную смесь кипятили на водяной бане с постоянной продувкой азотом в течение 4 ч. Полученный экстракт нейтрализовали гидрокарбонатом натрия до pH 7–8 и упаривали на роторном испарителе в вакууме до объема 0,1 л. Концентрат по каплям приливали в восьмикратный избыток воды при перемешивании с непрерывным током азота. После отстаивания отделяли осажденный лигнин центрифугированием, промывали водой, замораживали с помощью жидкого азота и подвергали лиофильной сушке. Выход диоксанлигнина составил 12% от массы абсолютно сухой древесины.

*Реагенты и материалы.* Пиридин-d<sub>5</sub>, 99,0% D, Deutero GmbH; Пиридин, 99,8%, Sigma-Aldrich; Хлороформ-d<sub>1</sub>, 99,8% D, Deutero GmbH; 2-хлор-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксофосфолан, 95%, Sigma-Aldrich; Трис-ацетилацетонат хрома(III), 99,99%, Sigma-Aldrich; Холестерин, 95%, Sigma-Aldrich;

*Процедура дериватизации.* Дериватизацию проводили в соответствии с методикой, изложенной в работах [17, 19]. Две навески лигнина по 30 мг, взятые с точностью 0,1 мг, растворяли в пробирках Эппендорфа в смесях 0,31 мл CDCl<sub>3</sub> с 0,5 мл пиридина или пиридина-d<sub>5</sub> соответственно. В обоих случаях хлороформ-d<sub>1</sub> вводился для настройки однородности магнитного поля спектрометра по опорному сигналу ядер дейтерия.

К каждому образцу добавляли 50 мкл фосфитилирующего агента, в качестве которого применялся 2-хлор-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксофосфолан. Агент добавлялся в избыточном количестве для получения в спектре его собственного сигнала. Затем к каждому образцу добавляли 100 мкл внутреннего стандарта (раствор холестерина с концентрацией около 0,12 М) и 100 мкл релаксанта (раствор трис-ацетилацетоната хрома(III) с концентрацией 5 мг/мл). Внутренний стандарт использовался для количественного определения гидроксильных групп лигнина, релаксанта применяли для уменьшения задержки между импульсами и сокращения времени эксперимента. Растворы обоих реагентов готовили с использованием вышеуказанных смесей растворителей и добавляли к соответствующим растворам исследуемых образцов.

После завершения реакции фосфитилирования (приблизительно 5 мин) образцы тщательно перемешивали с использованием вортекса и переносили в ампулы для ЯМР-спектрометра диаметром 5 мм. Объем образца равнялся 0,6 мл.

Подготовка образца ванилинового спирта велась аналогичным образом, но для сохранения требуемого избытка фосфитилирующего агента в смеси масса навески спирта была уменьшена до 6,56 мг.

*Регистрация спектров ЯМР.* Спектры <sup>31</sup>P-ЯМР регистрировали на спектрометре AVANCE III (Брукер, Германия), оснащенном сверхпроводящим магнитом Ascend 600, с рабочей частотой для протонов 600 МГц. Для регистрации применялась стандартная одноимпульсная последовательность (рис. 2).

Длительность импульса была равна 12 мкс (обусловлена параметрами настройки датчика), время регистрации – 1,1 с, время задержки между импульсами – 5 с. Ширина спектрального диапазона составила ~60 м.д, количество накоплений – 512, параметры эксперимента выбирались в соответствии с литературными данными [19]. Накопление спектров производилось при температуре 298 К. Калибровка спектров осуществлялась по сигналу ЯМР фосфитилирующего агента, который в смеси пиридин/хлороформ дает четкий синглет с химическим сдвигом 132,2 м.д. [19].

*Количественный анализ.* Расчет содержания гидроксильных групп проводили на основе данных об интегральной интенсивности сигналов <sup>31</sup>P-ЯМР с использованием внутреннего стандарта, интенсивность сигнала которого принимали за единицу. Интегрирование сигналов проводилось с использованием программного обеспечения спектрометра. Массовая доля гидроксильных групп определенного сорта определялась по формуле:

$$W = \frac{N_{ct} \cdot I \cdot \frac{M_{OH}}{N_A}}{m_{обр}} \cdot 100\%,$$

где  $N_{ct}$  – количество OH-групп холестерина в растворе;  $I$  – относительная интенсивность сигнала соответствующих гидроксильных групп в лигнине;  $M_{OH}$  – молярная масса OH-группы,  $m_{обр}$  – масса навески образца,  $N_A$  – число Авогадро.

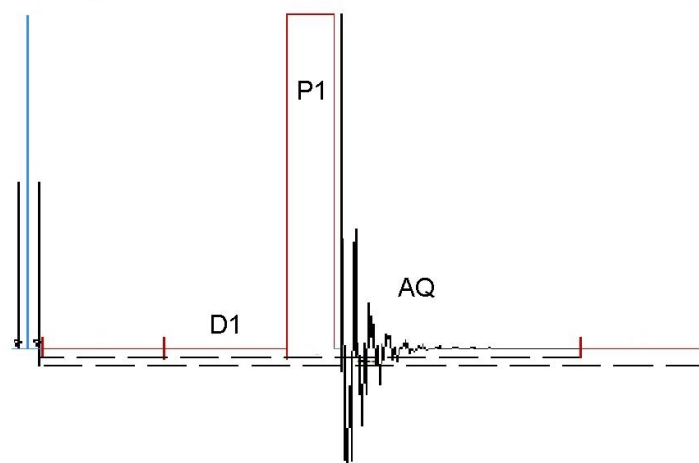


Рис. 2. Схема одноимпульсного эксперимента для регистрации спектров  $^{31}\text{P}$ -ЯМР. P1 – импульс, AQ – выборка данных, D1 – задержка между импульсами

### Результаты и обсуждение

*Определение гидроксильных групп в модельном соединении.* Спектр  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ванилинового спирта приведен на рисунке 3.

В области 132 м.д. наблюдается сигнал, соответствующий 2-хлор-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксофосфолану. Сигнал внутреннего стандарта (холестерина) проявляется в области ~145 м.д. Сигналы с химическими сдвигами ~140 м.д. и ~148,5 м.д. отвечают фенольной и спиртовой группам ванилинового спирта соответственно. Отнесение линий выполнялось в соответствии с [19].

Результаты расчетов, выполненных по схеме, описанной выше, и результаты теоретического расчета массовой доли ОН-групп в ванилиновом спирте приведены в таблице 1.

Поскольку экспериментальные результаты хорошо согласуются с расчетными данными, можно утверждать, что данная методика дает корректные результаты.

*Сравнение спектров в разных растворителях.* Сопоставленные спектры образцов, растворенных в дейтерированном и недеийтерированном пиридине, представлены на рисунке 4.

Обнаружено, что спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР образцов лигнина, растворенных в разных смесях растворителей, практически полностью идентичны. Таким образом, замена дейтерированного пиридина обычным не оказывает никакого влияния на вид спектра ЯМР.

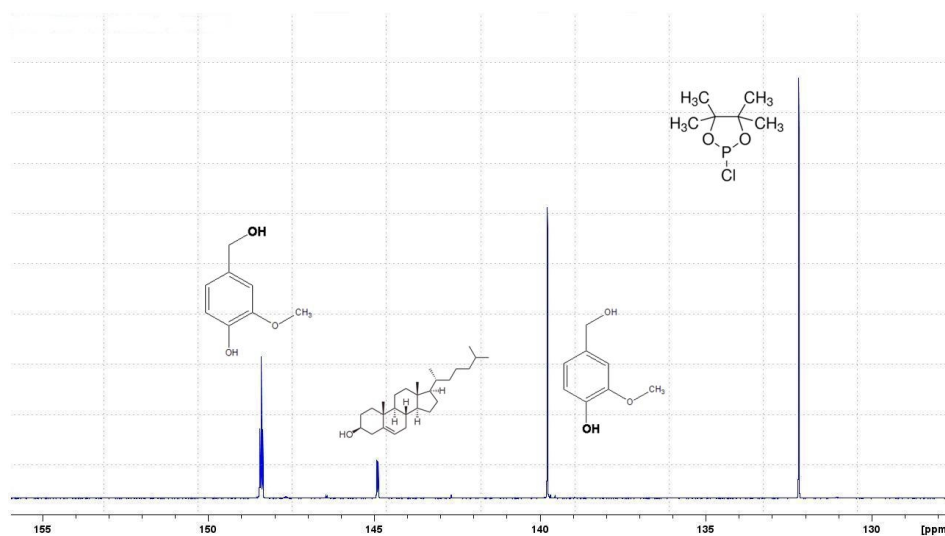


Рис. 3. Спектр  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ванилинового спирта, растворенного в смеси пиридин- $\text{d}_5$ /хлороформ- $\text{d}_1$

*Определение гидроксильных групп лигнина.* Спектр  $^{31}\text{P}$ -ЯМР лигнина, растворенного в смеси пиридина- $\text{d}_5$  и хлороформа- $\text{d}_1$ , представлен на рисунке 4а.

Помимо сигналов калибровки и стандарта, описанных выше, в области  $\sim 135$  м.д. наблюдается сигнал, соответствующий сигналу фосфитилированных карбоксильных групп лигнина. Группы сигналов в областях 138–140 м.д. и 142–143 м.д. отвечают фосфитилированным ОН-протонам гваяцильных и сирингильных групп соответственно. Сигналы в области 145–150 м.д. отвечают ОН-протонам алифатических групп лигнина. Отнесение спектральных линий производилось согласно [19].

Результаты количественного анализа, выполненного по схеме, описанной выше, приведены в таблице 2.

Таблица 1. Количественный анализ ОН-групп ванилинового спирта методом спектроскопии  $^{31}\text{P}$ -ЯМР

Функциональная группа	Пиридин- $\text{d}_5$		Обычный пиридин		Расчетная массовая доля, %
	Интегральная интенсивность	Массовая доля по данным ЯМР, %	Интегральная интенсивность	Массовая доля по данным ЯМР, %	
Фенольная ОН-группа	$3,52 \pm 0,05$	$10,61 \pm 0,17$	$3,81 \pm 0,05$	$11,26 \pm 0,2$	11
Спиртовая ОН-группа	$3,54 \pm 0,05$	$10,67 \pm 0,17$	$3,64 \pm 0,05$	$10,76 \pm 0,2$	11

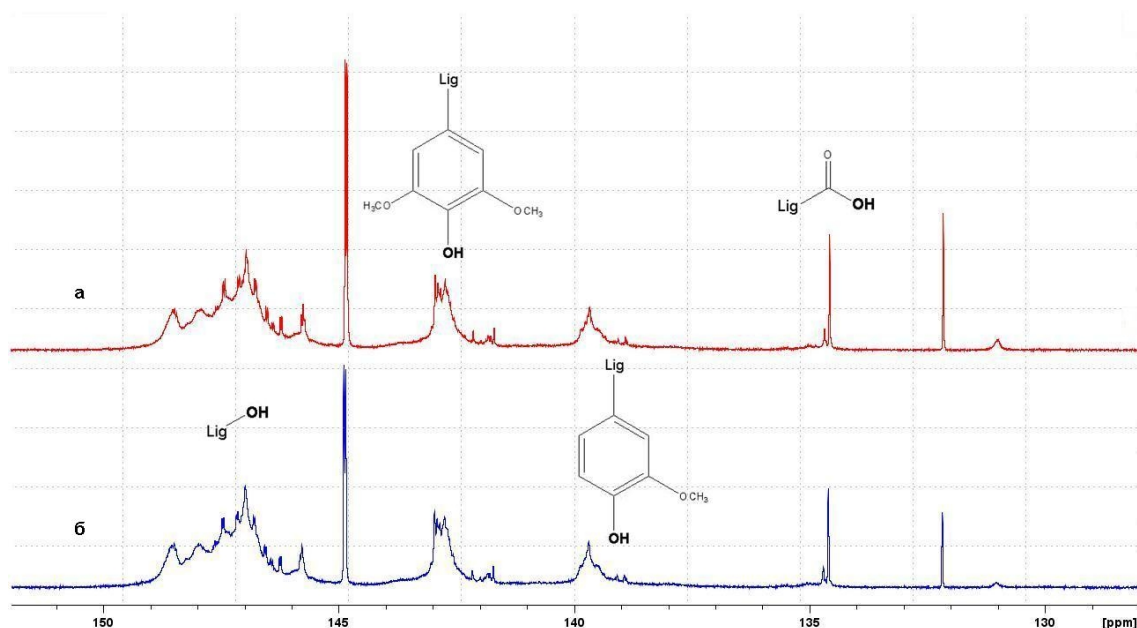


Рис. 4. Сопоставление спектров  $^{31}\text{P}$ -ЯМР лигнина березы, растворенных в смесях с использованием дейтерированного (а) и недейтерированного (б) пиридина

Таблица 2. Количественный анализ функционального состава лигнина березы с помощью спектроскопии  $^{31}\text{P}$ -ЯМР

Функциональная группа	Интегральная интенсивность	Массовая доля в лигнине, %
Алифатические ОН-группы	$7,6 \pm 0,05$	$5,12 \pm 0,2$
Сирингильные ОН-группы	$2,55 \pm 0,05$	$1,72 \pm 0,08$
Гваяцильные ОН-группы	$1,37 \pm 0,05$	$0,92 \pm 0,05$
Карбоксильные ОН-группы	$0,26 \pm 0,05$	$0,18 \pm 0,01$

### Заключение

Предложена модификация методики определения гидроксильных групп лигнинов методом спектроскопии  $^{31}\text{P}$ -ЯМР, основанная на использовании недейтерированного пиридина в качестве растворителя образцов. Показано, что получаемые результаты соответствуют теоретическим в экспериментах по модельным соединениям. Показана идентичность результатов анализа диоксанлигнина березы, полученных с применением в качестве растворителей пиридин- $\text{d}_5$ /хлороформ- $\text{d}_1$  и пиридин/хлороформ- $\text{d}_1$ . Показано, что применение недейтерированного пиридина в смеси растворителей не влияет на значения химических

сдвигов сигналов  $^{31}\text{P}$ -ЯМР и на результаты количественных оценок содержания гидроксильных групп различных типов в макромолекуле лигнина. Применение разработанной методики позволило существенно снизить затраты на анализ лигнинов методом ЯМР-спектроскопии на ядрах  $^{31}\text{P}$ .

### Список литературы

1. Фрейденберг К. К вопросу о химии и биогенезе лигнина // Химия и биохимия лигнина, целлюлозы и гемицеллюлоз. М., 1969. С. 3–14.
2. Сарканен К.В., Людвиг К.Х. Лигнины. М., 1975. 632 с.
3. Koshijima T., Watanabe T., Yaku F. Structure and properties of the lignin-carbohydrate complex polymer as an amphipathic substance // Lignin. Properties and materials. American Chemical Society, 1989. P. 11.
4. Боголицын К.Г., Лунин В.В. Физическая химия лигнина. Архангельск, 2009. 489 с.
5. Obst J.R. Guaiacyl and syringyl lignin composition in hardwood cell components // *Holzforschung*. 1982. Vol. 36. N 3. Pp. 143–152.
6. Evtuguin D.V., Pascoal Neto C., Silva A.M.S., Domingues P.M., Amado F.L., Robert D., Faix O. Comprehensive study on the chemical structure of dioxane lignin from plantation Eucalyptus globulus wood // *J. Agric. Food Chem.* 2001. Vol. 49. N 9. Pp. 4252–4261.
7. Evtuguin D.V., Domingues P., Amado F. L., Pascoal Neto C., Ferrer Correia A.J. Electrospray ionization mass spectrometry as a tool for lignins molecular weight and structural characterization // *Holzforschung*. 1999. Vol. 53. N 5. Pp. 525–528.
8. Martone P.T., Estevez J.M., Lu F., Ruel K., Denny M.W., Somerville C., Ralph J. Discovery of lignin in seaweed reveals convergent evolution of cell-wall architecture // *Current Biology*. 2009. Vol. 19. N 2. Pp. 169–175.
9. Evtuguin D.V., Amado F.L. Application of electrospray ionization mass spectrometry to the elucidation of the primary structure of lignin // *Macromol. Biosci.* 2003. Vol. 3. N 7. Pp. 339–343.
10. Ralph J., Landucci L.L. NMR of lignins // Lignin and lignans. Advanced in chemistry. CRC Press, 2010. P. 137.
11. Калабин Г.А., Каницкая Л.В., Кушнарев Д.Ф. Количественная спектроскопия ЯМР природного органического сырья и продуктов его переработки. М., 2000. 408 с.
12. Каницкая Л.В., Дейнеко И.П., Кушнарев Д.Ф., Клемпер А.В., Калабин Г.А. Количественная спектроскопия ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  лигнина // Химия древесины. 1989. № 6. С. 17–23.
13. Lundquist K.  $^1\text{H}$  NMR spectral studies of lignins // *Nordic Pulp and Paper Research Journal*. 1992. N1. Pp. 4–8.
14. Xia Z., Akim L.G., Argyropoulos D.S. Quantitative  $^{13}\text{C}$  NMR analysis of lignins with internal standards // *J. Agric. Food Chem.* 2001. Vol. 49. N 8. Pp. 3573–3578.
15. Kanitskaya L.V., Gorotov A.F., Khai D.T.T., Rokhin A.V. Quantitative  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. Chemical structure of kraft and nitrosated lignins // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2012. Vol. 38. N 7. Pp. 720–725.
16. Abreu H.S., Freire M.F. Methoxyl content determination of lignins by  $^1\text{H}$ -NMR // *An. Acad. Bras. Ci.*, 1995. Vol. 67. N 3. Pp. 379–382.
17. Granata A., Argyropoulos D.S. 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 // *J. Agric. Food Chem.* 1995. Vol. 43. N 6. Pp. 1538–1544.
18. Pu Y., Cao S., Ragauskas A.J. Application of quantitative  $^{31}\text{P}$  NMR in biomass lignin and biofuel precursors characterization // *Energy Environ. Sci.* 2011. Vol. 4. Pp. 3154–3166.
19. Fițigău I.F., Peter F., Boeriu C. G. Structural analysis of lignins from different sources // *International Journal of Chemical, Molecular, Nuclear, Materials and Metallurgical Engineering*. 2013. Vol. 7. N 4. Pp. 167–172.
20. Balakshin M., Capanema E. On the quantification of lignin hydroxyl groups with  $^{31}\text{P}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy // *Journal of Wood Chemistry and Technology*. 2015. Vol. 35. N 3. Pp. 220–237.
21. Каталог продукции компании Sigma-Aldrich. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/russian-federation.html>
22. Pepper J.M., Baylis P.E.T., Adler E. The isolation and properties of lignins obtained by the acidolysis of spruce and aspen woods in dioxane-water medium // *Can. J. Chem.* 1959. Vol. 37. N 8. Pp. 1241–1248.

*Поступило в редакцию 6 декабря 2016 г.*

*После переработки 28 декабря 2016 г.*

## Shestakov S.L. \*, Kosyakov D.S., Kozhevnikov A.Yu., Ulyanovskiy N.V., Popova Yu.A. THE ELABORATION OF NMR ANALYSIS OF DIFFERENT TYPES OF HYDROXYL GROUPS IN THE LIGNIN SAMPLES

Northern (Arctic) Federal University. M.V. Lomonosov, emb. Northern Dvina, 17, Arkhangelsk, 163002 (Russia),  
e-mail: laston85@mail.ru

Lignin is one of the most abundant biopolymers and a potential renewable source of valuable aromatic compounds. Concerning this, actual problem is functional composition characterization of the lignin samples and the products of their chemical processing. The subject of research is the modification of  $^{31}\text{P}$  NMR analysis of different types of hydroxyl groups in the lignin samples. We proposed the phosphorylation of lignin and the quantitative  $^{31}\text{P}$  NMR analysis using nondeuterated solvent in order to decrease the cost of experiment.  $^{31}\text{P}$  NMR spectra are registered using deuterated and nondeuterated solvents in order to compare them. It is obtained that the use of nondeuterated solvent in mixture doesn't influence on the chemical shifts of the  $^{31}\text{P}$  NMR spectra and the results of quantitative estimation of the content of different hydroxyl groups in lignin macromolecule. The experiments with lignin model compound confirm the adequacy of chosen approach. The method is approbated on the sample of dioxane lignin of birch and the quantitative analysis of hydroxyl groups content is implemented.

**Keywords:** lignins, NMR,  $^{31}\text{P}$ -NMR, functional analysis, phosphorylation.

### References

1. Freidenberg K. *Khimiia i biokhimiia lignina, tselliulozy i gemitselliuloz*. [Chemistry and biochemistry of lignin, cellulose and hemicelluloses]. Moscow, 1969, pp. 3–14. (in Russ.).
2. Sarkanen K.V., Liudvig K.Kh. *Ligniny*. [Lignins]. Moscow, 1975, 632 p. (in Russ.).
3. Koshijima T., Watanabe T., Yaku F. *Lignin. Properties and materials*. American Chemical Society, 1989, p. 11.
4. Bogolitsyn K.G., Lunin V.V. *Fizicheskaiia khimiia lignina*. [Physical chemistry of lignin]. Arkhangel'sk, 2009, 489 p. (in Russ.).
5. Obst J.R. *Holzforschung*, 1982, vol. 36, no. 3, pp. 143–152.
6. Evtuguin D.V., Pascoal Neto C., Silva A.M.S., Domingues P.M., Amado F.L., Robert D., Faix O. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, vol. 49, no. 9, pp. 4252–4261.
7. Evtuguin D.V., Domingues P., Amado F.L., Pascoal Neto C., Ferrer Correia A.J. *Holzforschung*, 1999, vol. 53, no. 5, pp. 525–528.
8. Martone P.T., Estevez J.M., Lu F., Ruel K., Denny M.W., Somerville C., Ralph J. *Current Biology*, 2009, vol. 19, no. 2, pp. 169–175.
9. Evtuguin D.V., Amado F.L. *Macromol. Biosci.*, 2003, vol. 3, no. 7, pp. 339–343.
10. Ralph J., Landucci L.L. *Lignin and lignans*. Advanced in chemistry. CRC Press, 2010, p. 137.
11. Kalabin G.A., Kanitskaia L.V., Kushnarev D.F. *Kolichestvennaia spektroskopiia IaMR prirodnogo organicheskogo syr'ia i produktov ego pererabotki*. [Quantitative NMR spectroscopy of natural organic raw materials and products of its processing]. Moscow, 2000, 408 p. (in Russ.).
12. Kanitskaia L.V., Deineko I.P., Kushnarev D.F., Klemper A.V., Kalabin G.A. *Khimiia drevesiny*, 1989, no. 6, pp. 17–23. (in Russ.).
13. Lundquist K. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 1992, no. 1, pp. 4–8.
14. Xia Z., Akim L.G., Argyropoulos D.S. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, vol. 49, no. 8, pp. 3573–3578.
15. Kanitskaya L.V., Gorotov A.F., Khai D.T.T., Rokhin A.V. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 2012, vol. 38, no. 7, pp. 720–725.
16. Abreu H.S., Freire M.F. *An. Acad. Bras. Ci.*, 1995, vol. 67, no. 3, pp. 379–382.
17. Granata A., Argyropoulos D.S. *J. Agric. Food Chem.*, 1995, vol. 43, no. 6, pp. 1538–1544.
18. Pu Y., Cao S., Ragauskas A.J. *Energy Environ. Sci.*, 2011, vol. 4, pp. 3154–3166.
19. Fițigău I.F., Peter F., Boeriu C. G. *International Journal of Chemical, Molecular, Nuclear, Materials and Metallurgical Engineering*, 2013, vol. 7, no. 4, pp. 167–172.
20. Balakshin M., Capanema E. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 2015, vol. 35, no. 3, pp. 220–237.
21. *Katalog produktii kompanii Sigma-Aldrich*. [Product catalog of Sigma-Aldrich]. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/russian-federation.html>
22. Pepper J.M., Baylis P.E.T., Adler E. *Can. J. Chem.*, 1959, vol. 37, no. 8, pp. 1241–1248.

Received December 6, 2016

Revised December 28, 2016

\* Corresponding author.

