

УДК 634.0.813.11:577.158

Т. С. СДЫКОВ, Н. Н. ШОРЫГИНА, А. Д. АЛЕКСЕЕВ, В. М. РЕЗНИКОВ,
А. Г. ЖУРАВЛЕВ, Б. В. ЛОПАТИН

*Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского АН СССР
Белорусский технологический институт им. С. М. Кирова*

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСИНТЕТИЧЕСКИХ ЛИГНИНОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ КОНИФЕРИЛОВОГО И *n*-КУМАРОВОГО СПИРТОВ, И ЛИГНИНОВ ТРОСТНИКА И ЕЛИ

Многочисленные эксперименты по нитробензольному окислению и этанолизу показали, что лигнины голосемянных (хвойные), двудольных покрытосемянных (лиственные) и однодольных покрытосемянных (травы и однолетние) растений значительно различаются по структуре. Если лигнин хвойных древесных пород построен в основном из производных гваяцилпропана, то лигнин лиственных наряду с этими элементами содержит значительное количество производных сирингилпропана. В состав лигнина однолетних входят производные гваяцил-, сирингил- и *n*-окси-фенилпропана. Указанные структурные различия связаны, очевидно, с характером биосинтеза каждого типа лигнина, в свою очередь, обусловленного филогенетическими и онтогенетическими особенностями, сложившимися в процессе эволюции растений. Эти структурные различия трех типов лигнина представляют и чисто химический интерес в том отношении, что различия в степени метоксилирования ароматических ядер структурных элементов лигнина могут в значительной мере определить степень конденсированности лигнинов. Так, можно полагать, что лигнин лиственной древесины будет менее конденсированным, поскольку в сирингилпропановых структурных звеньях в положениях 3 и 5 ароматического ядра содержатся метоксильные группы. Следовательно, эти элементарные структуры не способны к образованию в процессе роста макромолекул лигнина кумарановых структур, в которых имеются С—С-связи между С₅ ароматического кольца одного фенилпропанового звена и С₂ боковой цепи другого звена, а также дифенильных структур типа дегидродиванилина. Лигнин

Состав ДГП-1 и ДГП-2 в сопоставлении с

Препарат	С, %	Н, %	О, %	ОСН ₃ , %	Состав структурного звена C ₆ —C ₃
ДГП-1	65,10	6,23	28,67	16,81	C ₉ H _{7,88} O ₂ (H ₂ O) _{0,30} (ОСН ₃) ₁
ДГП-2	70,22	5,86	23,92	0	C ₉ H _{8,31} O ₂ (H ₂ O) _{0,30}
ДГП из кониферилового спирта [4]					C ₉ H _{7,14} O ₂ (H ₂ O) _{0,39} (ОСН ₃) ₁
ЛМР ели [8]	65,03	5,83	29,14	15,53	C ₉ H _{7,12} O ₂ (H ₂ O) _{0,40} (ОСН ₃) _{0,92}
ЛМР ели [9]	62,38	6,17	31,45	15,03	C ₉ H _{7,47} O ₂ (H ₂ O) _{0,74} (ОСН ₃) _{0,96}
ЛМР <i>Phragmites communis</i> [3]	61,01	6,23	32,76	17,59	C ₉ H _{7,15} O ₂ (H ₂ O) _{0,94} (ОСН ₃) _{1,11}

однолетних растений, напротив, казалось бы, должен быть наиболее конденсированным благодаря возможности образования С—С-связей как по 5-му, так и по 3-му положениям ароматического кольца его *n*-оксифенилпропановых структурных элементов. Лигнин хвойных по степени конденсированности, очевидно, должен занимать промежуточное положение между этими двумя типами лигнина. Выяснение предполагаемых различий является одной из задач настоящего исследования.

Благодаря циклу работ Фрейденберга и сотрудников [1] по исследованию биосинтеза лигнина из кониферилового спирта *in vitro* известны основные закономерности строения и образования лигнина хвойных. В то же время работ по биосинтезу лигнина из *n*-кумарового спирта [2] мало, и нерешенных вопросов пока еще много. В связи с этим представляло интерес исследование синтезированного *in vitro* из *n*-кумарового спирта дегидрополимера (ДГП-1) и сравнение его свойств со свойствами ДГП-2 из кониферилового спирта и исследованного нами ранее лигнина тростника *Phragmites communis* [3]. Нами был предпринят биосинтез *in vitro* ДГП раздельно из кониферилового и *n*-кумарового спиртов. Синтез был осуществлен по способу Фрейденберга [4], разработанному им для получения ДГП действием пероксидазы хрена в присутствии разбавленного раствора перекиси водорода при рН 5,5 (цитратный буфер). Дегидрирование происходило при комнатной температуре (20°), при непрерывном перемешивании и прикапывании из двух капельных воронок разбавленного раствора соответствующего производного коричневого спирта и 0,025%-ного раствора H₂O₂, в течение 6 сут. К концу биосинтеза выпадал осадок. Из кониферилового спирта получен ДГП с выходом 67,5%, из *n*-кумарового спирта — с выходом 70,1% в пересчете на количество взятого производного коричневого спирта.

Полученные нами биосинтетические лигнины внешне пред-

Таблица 1

некоторыми видами ЛМР

Мол. вес звена C_9	Состав исходного спирта	Потеря водорода при биосинтезе, моль/ C_9	Прирост H_2O , моль/ C_9
184,28	$C_9H_{10}O_2$ (OCH_3 заменен на H)	9-7,88=1,12	0,30
153,71	$C_9H_{10}O_2$	9-8,31=1,69	0,30
185	$C_9H_{10}O_2$ (OCH_3 заменен на H)	9-7,14=1,86	0,38
182,84	$C_9H_{10}O_2$ (OCH_3 заменен на H)	9,08-7,12=1,96	0,40
191,55	$C_9H_{10}O_2$ (OCH_3 заменен на H)	9,04-7,47=1,57	0,74
198,8	$C_9H_{10}O_2$ (OCH_3 заменен на H)	8,89-7,15=1,74	0,94

ставляли собой порошки белого цвета, подобные лигнинам Бьёркмана. Их состав приведен в табл. 1 в сопоставлении с некоторыми образцами лигнина, выделенными методами механического размола (ЛМР). Из сравнения состава ДГП-1, выделенного из кониферилового спирта, и состава ДГП-2, выделенного из *n*-кумарового спирта, полученных в одинаковых условиях по точному режиму Фрейденберга, следует, что убыль водорода при биохимическом синтезе в первом случае (1,12 атома на C_9) меньше, чем во втором (1,69 атома на C_9). Привес же воды в обоих случаях одинаков и составляет 0,3 моля. Если принять гипотезу о четырех принципах роста полимолекулы лигнина, выдвинутую Фрейденбергом [5] — 1) продолжающееся дегидрирование, 2) присоединение фенолов к хинонметидам, 3) полимеризация хинонметидов и 4) перегруппировка α -арильных эфиров, — то очевидно, что разницу в убыли водорода при синтезе ДГП из кониферилового и *n*-кумарового спиртов следует объяснять некоторым перераспределением интенсивности отдельных процессов. Следует также указать и на то, что ДГП-1, полученный Фрейденбергом, имеет больший привес воды (0,38 моля/ C_9), чем ДГП-1, полученный нами (0,3 моля/ C_9) (см. табл. 1).

Количество фенольных ОН-групп в ДГП-1 нашего приготовления на 0,05 моля/ C_9 ниже, чем для ЛМР ели, полученного в лаборатории химии лигнина Института органической

Таблица 2

Содержание фенольных ОН-групп в препаратах лигнина

Препарат	Метод хемосорбционный [6]	
	%	моль/ C_9
ДГП-1	2,20	0,24
ДГП-2	2,02	0,18
ЛМР ели	2,58	0,29
ЛМР <i>Phragmites communis</i>	3,25	0,38

химии Н. П. Михайловым. Для определения фенольных ОН-групп был использован хемосорбционный метод в варианте Энkvиста [6] (табл. 2). Для сравнительного определения степени законденсированности лигнина по С—С-связям нами в первую очередь использованы методы разложения металлическим натрием в жидком аммиаке и окисления нитробензолом в щелочной среде. По методу А. Ф. Семечкиной и Н. Н. Шорыгиной было проведено разложение металлическим натрием в жидком аммиаке четырех образцов лигнина: ДГП-1, ДГП-2, ЛМР ели и ЛМР тростника *Phragmites communis*. Выход растворимых фенолов после разложения лигнина металлическим натрием в жидком аммиаке (% от взятого препарата) был следующим:

ДГП-1	25
ДГП-2	15
ЛМР ели	20
ЛМР <i>Phragmites communis</i>	16,6

Результаты хроматографического разделения фенолов, полученных из указанных четырех образцов лигнина, приведены на рис. 1. Хроматограмма восходящая. На хроматограмме видно, что из всех лигнинов, кроме ДГП-2 (столбец Б), образуются:

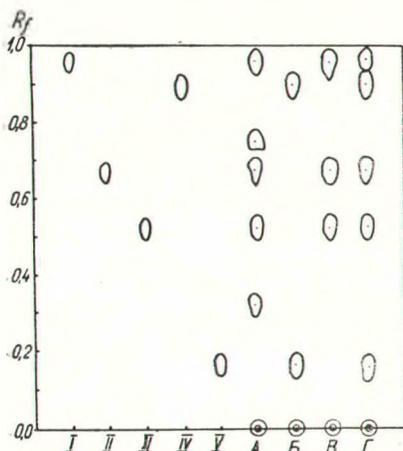


Рис. 1. Хроматограмма мономерных фенолов — продуктов разложения металлическим натрием в жидком аммиаке:

I — дигидроэвгенол; II — 1-(гваяцил)-пропанол-1; III — 1-(гваяцил)-пропанол-3; IV — 1-(4-оксифенил)-пропан; V — 1-(4-оксифенил)-пропанол-1. А — фенольная смесь, полученная из ДГП-1; Б — фенольная смесь, полученная из ДГП-2; В — фенольная смесь, полученная из ЛМР ели; Г — фенольная смесь, полученная из ЛМР тростника. Фиолетовое пятно (R_f 0,31) и розовое пятно (R_f 0,75) не идентифицированы.

на рис. 1. Хроматограмма восходящая. На хроматограмме видно, что из всех лигнинов, кроме ДГП-2 (столбец Б), образуются: дигидроэвгенол, 1-(гваяцил)-пропанол-1 и 1-(гваяцил)-пропанол-3. Из фенолов ДГП-2 идентифицированы только 1-(4-оксифенил)-пропан и 1-(4-оксифенил)-пропанол-1. Другие пятна не расшифрованы и не приведены. Обращает на себя внимание отличие хроматограммы ДГП-1 (столбец А) от хроматограммы фенолов, выделенных из ЛМР ели (столбец В). На хроматограмме ДГП-1 имеются два пятна, которые не были отмечены ни для одного из когда-либо исследованных нами лигнинов. Одно из этих пятен имеет R_f 0,75, окрашено диазотированным сульфаниламидом в розовый цвет, и второе — R_f 0,31 (фиолетовая окраска). Эти вещества пока

не идентифицированы. При нитробензольном окислении получены ароматические альдегиды с выходами: из ДГП-1 ванилина — 13,7%, из ДГП-2 *n*-оксибензальдегида — 10%, из ЛМР ели ванилина — 25% и из ЛМР тростника общий выход альдегидов составил 21,1%.

Таким образом, данные по расщеплению лигнина натрием в жидком аммиаке и окислению нитробензолом в щелочной среде позволяют предполагать, что большее содержание *n*-кумаровых структур в лигнине приводит к более высокой законденсированности его.

Следует отметить, что биосинтетические дегидрополимеры, полученные Фрейденбергом из различных предшественников, до сих пор почти не изучались с позиций высокомолекулярной химии.

Молекулярновесовое распределение (МВР) лигнинных препаратов находилось по гель-хроматограммам, полученным при элюировании образцов через калиброванную по МВ колонку с сефадексом G-75.

Из рис. 2, а видно, что ЛМР тростника обладает относительно широким унимодальным распределением по МВ, так же как и ЛМР ели (см. рис. 2, б), хотя и сдвинутым по сравнению с МВР последнего в сторону меньших МВ (максимум МВР лигнина ели соответствует 3000—4000, а лигнина тростника — 2000—3000).

В отличие от кривых МВР, характерных для природных лигнинов, кривые МВР биосинтетических лигнинов (рис. 3) имеют по два максимума (хотя у ДГП-2 второй

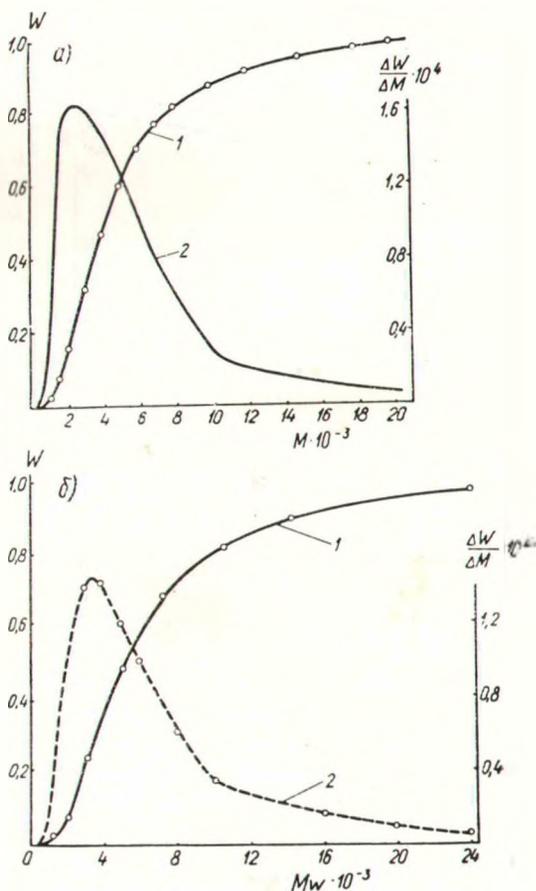


Рис. 2. Интегральные (1) и дифференциальные (2) кривые молекулярновесового распределения ЛМР тростника (а) и ели (б).

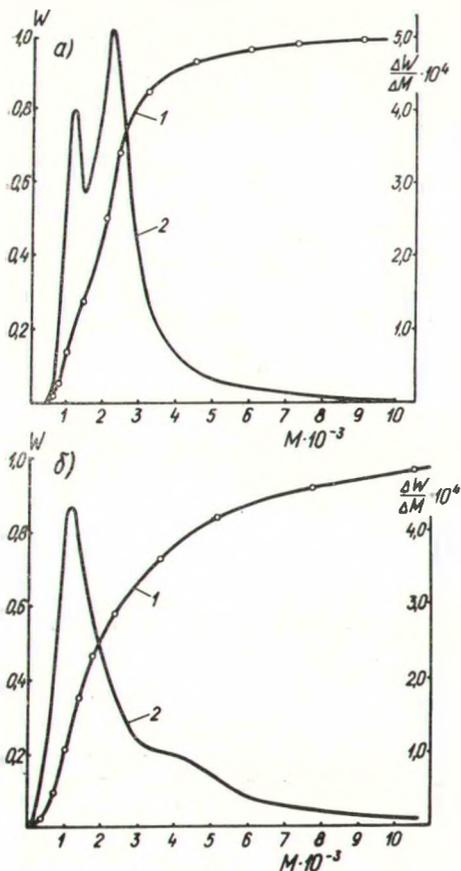


Рис. 3. Интегральные (1) и дифференциальные (2) кривые молекулярно-весавого распределения биосинтетических лигнинов ДГП-2 (а) и ДГП-1 (б).

максимум не выражен столь четко, как первый). Мульти-модальное распределение указывает на гетерофазный характер полимеризации. Первый пик с МВ 1100—1250 соответствует примерно семи фенолпропановым структурным единицам у обоих ДГП, а второй — 14 звеньям у ДГП-1 и 26 у ДГП-2. Поскольку условия получения препаратов были совершенно одинаковы, то это различие, вероятно, обусловлено природой исходного спирта.

Ни в коем случае не отвергая точку зрения Фрейденберга относительно образования лигнина, мы считаем, однако, целесообразным провести в дальнейшем более глубокое сравнительное изучение природных и биосинтетических лигнинов методами высокомолекулярной химии.

На данном этапе вопрос о причинах различия формы кривых МВР лигнинов механического размола и биосинтетических остается открытым.

Для подтверждения и дополнения химических данных исследованы ИК- и УФ-спектры полученных препаратов. Известно, что для ИК-спектров лигнина и его производных характерно наличие широких и часто перекрывающихся полос поглощения. В связи с этим интерпретация спектров часто затруднительна.

Измеренные на приборе UR-10 (прессовка с КВг) ИК-спектры всех четырех исследованных образцов (рис. 4) имеют определенное сходство. Это обусловлено тем, что в молекулах всех изученных препаратов имеются общие структурные элементы.

Основные отличительные особенности спектра ДГП-2 от спектров гваяциловых лигнинов заключаются в следующем: у ДГП-2

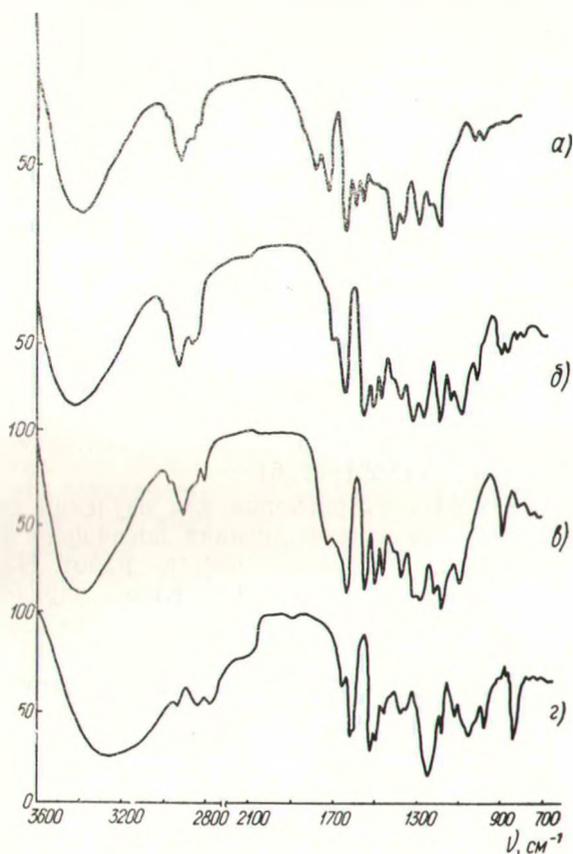


Рис. 4. ИК-спектры ЛМР ели (а), ДГП-1 (б), ЛМР тростника (в), ДГП-2 (г).

дублетна полоса 1600 см^{-1} , что характерно для лигнина однодольных. Существенные отличия спектра ДГП-2 наблюдаются и в области частот неплоских деформированных колебаний —СН— бензольного кольца (область $700\text{—}900\text{ см}^{-1}$), значения которых зависят от положения и числа заместителей в кольце. В спектре образца ДГП-2 в этой области наблюдается лишь одна интенсивная полоса 840 см^{-1} , что характерно для 1,4-дизамещенного бензольного кольца. С другой стороны, по мнению Болкера и Саммервилла [7], наличие полосы 835 см^{-1} , которая наблюдается в ИК-спектрах лигнина лиственных, указывает на 1,2,3,5-тетразамещение в кольце. Таким образом, вопрос о числе и положении заместителей в ароматической части молекулы ДГП-2

остаётся пока открытым. У двух других изученных лигнинов (ДГП-1 и ЛМР ели) в этой области спектра отмечены обычные для гваяциловых лигнинов полосы, характерные для 1,3,4-тризамещенного бензольного кольца.

Спектры исследованных лигнинов различаются и в области 1275 и 1220 см^{-1} , где лежат полосы поглощения, характерные для связей С-аром-О и ОН-групп.

Из сказанного следует, что основные отличия ИК-спектров ДГП-2 от ИК-спектров других образцов обусловлены различиями в замещении ароматических ядер, а также природой и количеством эфирных связей и ОН-групп.

УФ-спектры в соответствии с результатами исследований ИК-спектров показывают большее сходство строения ароматической части молекул ЛМР ели и ДГП-1, которое несколько отличается от строения ЛМР тростника и значительно больше от строения молекулы ДГП-2 (рис. 5).

Применению ЯМР-спектроскопии при изучении структуры и свойств различных препаратов лигнина посвящено в последнее десятилетие довольно большое количество работ. Нас особенно интересовало сравнительное количественное определение степени конденсированности исследуемых лигнинов по С—С-связям за счет С-атомов бензольного кольца.

Определение количества незамещенных протонов у бензольного кольца методом ЯМР является наиболее простым и, по-видимому, наиболее надежным методом оценки соотношения «конденсированных» и «неконденсированных» звеньев в макромолекулах лигнина. Если для ацелированных образцов лигнина,

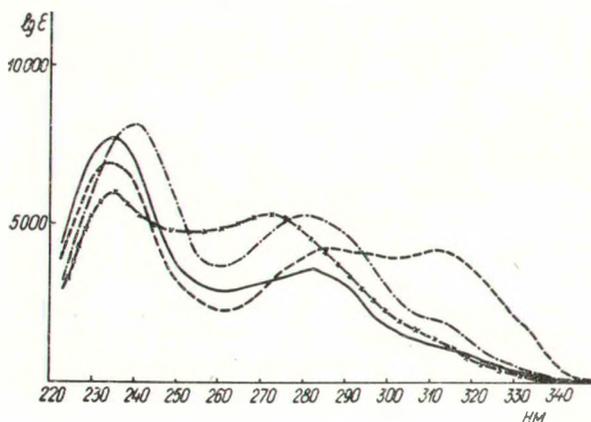


Рис. 5. УФ-спектры ЛМР ели (—), ДГП-1 (---), ДГП-2 (-х-х-), ЛМР тростника (---).

обычно используемых для ЯМР-спектроскопии, соотношение «конденсированных» и «неконденсированных» структур может быть искажено за счет α -бензилэфирных протонов, дающих сигналы именно в этой области поглощения, то для неацетилированных образцов результаты могут быть завышены лишь за счет α -винильных протонов, наличие которых в исследуемых препаратах незначительно. Основываясь на этом, мы работали с неацетилированными лигнинами.

Поскольку в спектрах не обнаружены сигналы ниже $\tau=2$ м. д., обусловленные наличием карбоксильных и альдегидных групп, границами первой зоны выбраны пределы между $\tau=2,8 \div 3,72$ м. д., где проявляются сигналы ароматических и α -винильных протонов. Для ЛМР ели, по данным Людвиг с сотрудниками [10, 11] и Ленца [12], интенсивность поглощения в этой области соответствует 2,5 ароматического протона/ C_9 (препарат ацетилирован).

ЛМР тростника имеет 2,26 незамещенного ароматического протона/ C_9 , что соответствует 74% конденсированных С—С-связей по ароматическому ядру.

ДГП-1 за вычетом α -винильных протонов имеет 2,43 ароматического протона, или $\sim 57\%$ конденсированных структур.

ДГП-2 более «законденсирован». У этого препарата имеется 3,23 незамещенного ароматического протона/ C_9 , или с учетом α -винильных протонов 71% углеродных атомов ароматических ядер связаны с соседними C_9 -структурами.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Freudenberg K., Neish A. C.* Constitution and Biosynthesis of Lignin. Berlin—Heidelberg—New York, 1968.
2. *Freudenberg K., Gehke G.* — Chem. Ber., **84**, 1951, 443.
3. *Шорыгина Н. Н., Сдыков Т. С., Кошетеров А. К.* — Химия природн. соед., 1965, 6, 424; *Шорыгина Н. Н., Сдыков Т. С.* — Химия природн. соед., 1966, 3, 210.
4. *Freudenberg K., Jones K.* — Chem. Ber., **96**, 1963, 1844.
5. *Freudenberg K.* Beiträge zur Biochemie und Physiologie von Naturstoffen. Jena, 1965, 167.
6. *Enkvist T., Holm B.* — Paperi ja Puu, **38**, 1956, 1, 8, 12.
7. *Bolker H. I., Sommerville N. G.* — Pulp Paper Mag. Canada, **64**, 1963, 4, T187.
8. *Freudenberg K., Sidhu G.* — Holzforschung, **15**, 1961, 33.
9. *Шорыгина Н. Н., Михайлов Н. П., Лопатин Б. В.* — Химия природн. соед., 1966, 1, 58.
10. *Ludwig C. H., Nist B. I., McCarthy I. L.* — J. Amer. Chem. Soc., **86**, 1964, 1196.
11. *Ludwig C. H., Nist B. I., McCarthy I. L.* — J. Amer. Chem. Soc., **86**, 1964, 1186.
12. *Lenz B. I.* — Tappi, **51**, 1968, 511.