

Ligniini ja sen analytiikka

Jatta Lehtinen

Kandidaatintutkielma

2018

Kemian tutkinto-ohjelma

Oulun yliopisto

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO.....	3
2. LIGNIINI.....	4
2.1. Ligniinin koostumus ja rakenne.....	4
2.2. Ligniinin erotus eri prosesseilla	6
2.2.1. Kraft-prosessi	8
2.2.2. Organosolv-prosessi	9
2.2.3. Klason-prosessi	10
2.2.4. Björkman- ja entsyymihydrolyysi-prosessi	10
3. LIGNIININ ANALYSOINTI	12
3.1. FT-IR-spektroskopia ligniinin analytiikassa	12
3.2. NMR-spektroskopia ligniinin analytiikassa	15
3.3. HPLC ligniinin analytiikassa	20
3.4. Py-GC-MS ligniinin analytiikassa.....	22
4. YHTEENVETO.....	25
5. KIRJALLISUUSVIITTEET	26

1. JOHDANTO

Ligniini on luonnon polymeeri, jota esiintyy kaikkien maalla kasvavien kasvien soluseinissä. Puiden lisäksi näihin kuuluvat kaikki ruohokasvit sekä ruokakasvit. Ligniini lisää kasvin mekaanista vahvuutta ja mahdollistaa kasvien selviämisen maan päällä ja suurimpien puiden kasvamisen jopa 100 metriä korkeiksi.^{1,2} Ligniini osallistuu myös kasvin veden kuljetukseen ja auttaa suojaamaan sitä taudeilta ja loisilta.³ Ligniini on selluloosan jälkeen maailman toiseksi yleisin orgaaninen luonnonpolymeeri.⁴

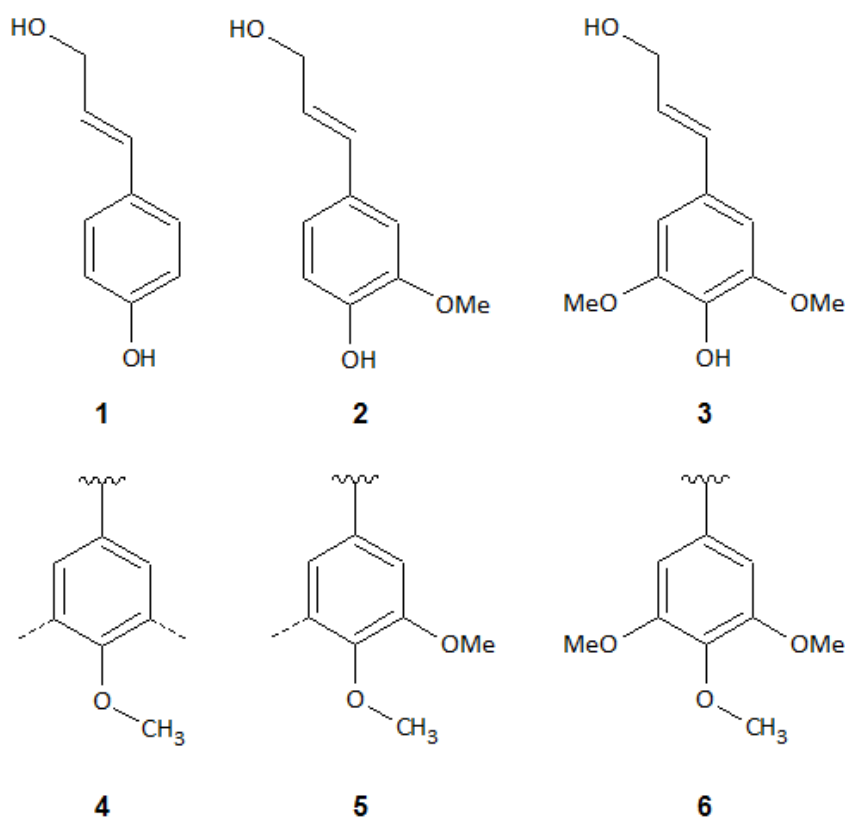
Ligniinin määrä vaihtelee kasvien välillä. Suurin osuus ligniiniä on havupuissa, joissa sitä on noin 30 % puun kuivapainosta. Sekä lehtipuissa että ruohokasveissa ligniinin osuus on noin 17-25 %.⁴ Koska ligniinin osuus kasveissa on niin suuri, selluloosaa hyödyntävien teollisuudenalojen, kuten paperiteollisuuden, sivutuotteena syntyy runsaat määrät ligniiniä. Ligniini erotetaan selluloosasta monimutkaisilla kemiallisilla prosesseilla, jotta niiden väliset kemialliset sidokset saadaan hajotettua. Suurin osa sivutuotteena syntyvästä ligniinistä poltetaan energian tuottamiseksi ja vain 1-2 % hyödynnetään arvokkaiden kemikaalien kuten vanilliinin valmistukseen.¹ Ligniini on myös mahdollinen raaka-aine lääketeollisuudelle.⁵ Ligniinin kaupallinen hyödyntäminen vaatii kuitenkin sen analytiikan laajaa tuntemusta.⁶

Ligniinin analysointi on haastavaa sen monimutkaisen ja epäsäännöllisen rakenteen takia. Analysointiin on käytetty useita eri menetelmiä, joilla kaikilla on omat etunsa ja haasteensa.⁷ Tässä tutkielmassa käsitellään IR- ja NMR-spektroskopian sekä Py-GC-MS:n ja HPLC:n käyttöä ligniinin analytiikassa. Lisäksi käsitellään, miten niitä voidaan käyttää ligniinin rakenteen ja koostumuksen sekä ligniinin erotuksen aiheuttamien rakenteellisten muutosten selvittämiseen.

2. LIGNIINI

2.1. Ligniinin koostumus ja rakenne

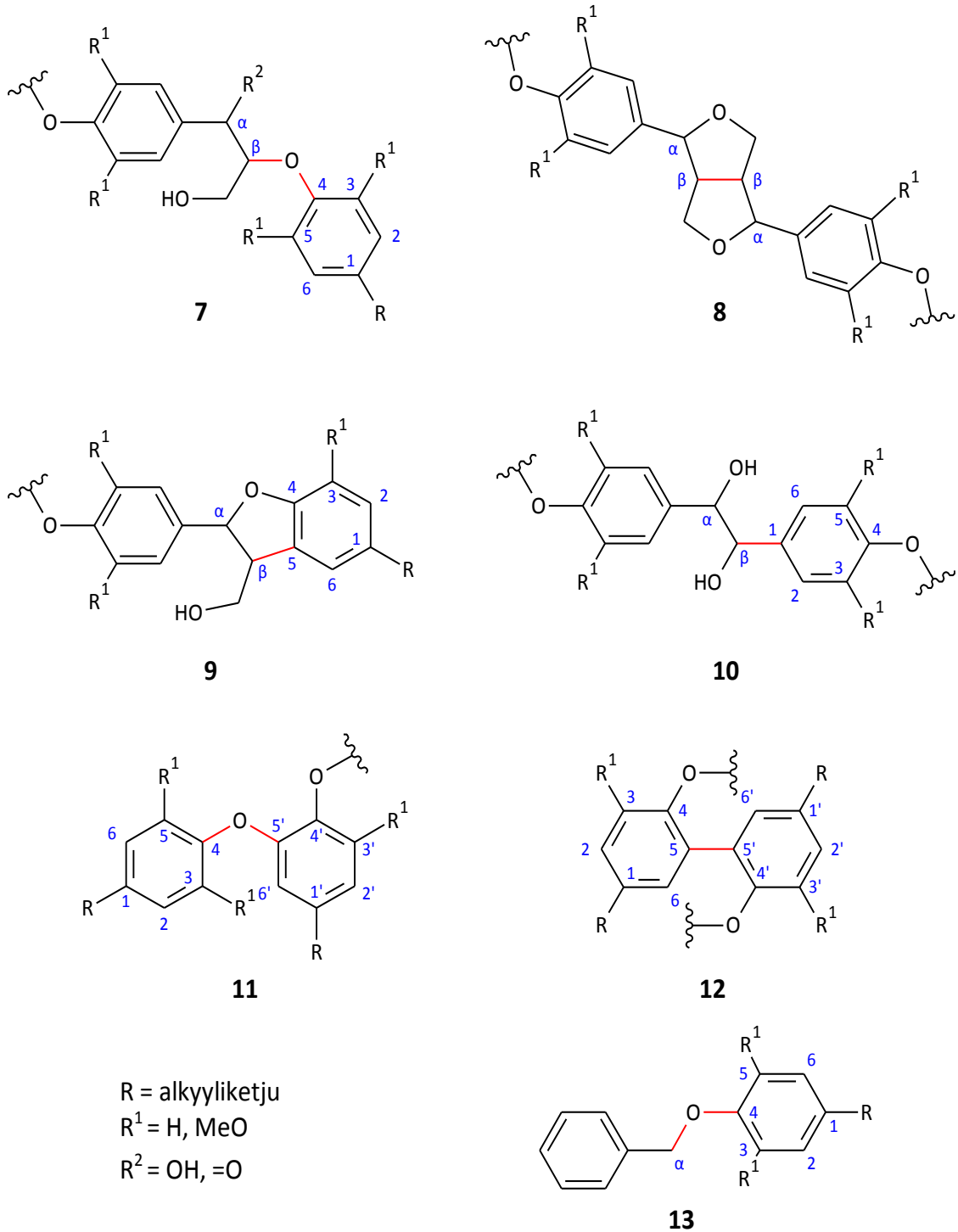
Ligniini on kolmiulotteinen fenolinen polymeeri, joka koostuu pääosin kolmesta monomeeristä: *p*-kumaryylialkoholista (**1**), koniferyylialkoholista (**2**) ja sinapyylialkoholista (**3**). Toisistaan ne eroavat aromaattisessa renkaassa olevien metoksiyhmien määrässä; *p*-kumaryylialkoholissa metoksiyhyiä ei ole, koniferyylialkoholissa on yksi kolmannessa ja sinapyylialkoholissa kaksi kolmannessa ja viidennessä hiilessä. Polymeroituneen ligniinin yksiköitä kutsutaan *p*-hydroksifenyyli- (H) (**4**), guajasyyli- (G) (**5**) ja syringyyliryhmiksi (S) (**6**) (Kuva 1).⁸



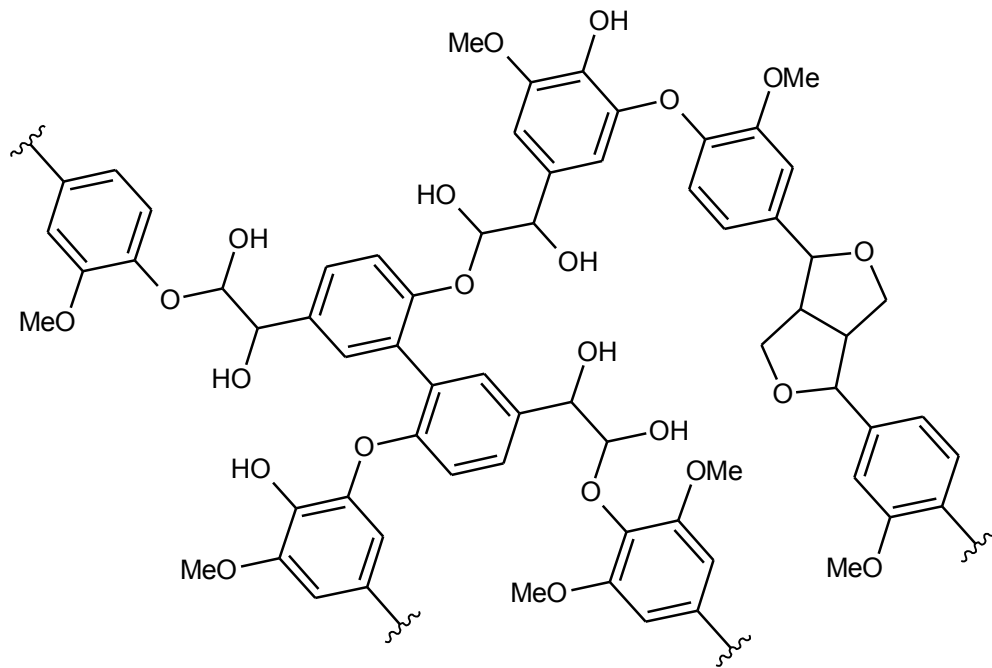
Kuva 1 *p*-kumaryylialkoholin (**1**), koniferyylialkoholin (**2**), sinapyylialkoholin (**3**), *p*-hydroksifenyyli-ryhmän (**4**), guajasyyli-ryhmän (**5**) ja syringyyliryhmän (**6**) rakenteet.⁸

Monomeerit liittyvät toisiinsa joko eetteri- tai hiili-hiili-sidoksilla. Mahdollisia sidoksia on löydetty yli 20.⁹ Yleisimmät sidokset ovat β -O-4- (**7**), β - β - (**8**), β -5- (**9**), β -1- (**10**), 4-O-5'- (**11**), 5-5'- (**12**) ja α -O-4-sidos (**13**) (Kuva 2). Ligniinin polymeroituminen tapahtuu satunnaisesti eikä yksiköissä tai niiden välisissä sidoksissa esiinny säännöllisyyttä. Kuva 3

on esitetty, miltä pieni osa ligniinistä voisi näyttää. Epäsäännöllisyyden takia ligniinin rakennetta määritetään yleensä eri yksikköjen keskinäisen suhteen ja yksikköjen välisten sidosten esiintymisen perusteella.^{8,10-12} Eristetyn ligniinin rakenne sekä koostumus riippuvat sen lähteestä ja erotusmenetelmästä.



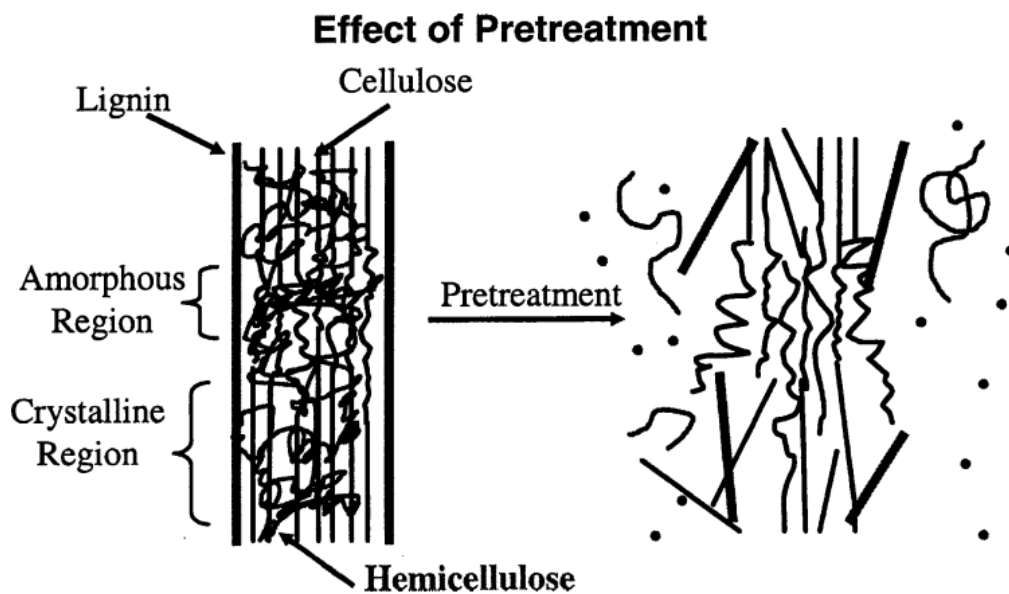
Kuva 2 Yleisimmät ligniinin yksikköjen väliset sidokset (punaisella). β -O-4- (**7**), β - β - (**8**), β -5- (**9**), β -1- (**10**), 4-O-5'- (**11**), 5-5'- (**12**) ja α -O-4-sidos (**13**).^{8,10-12}



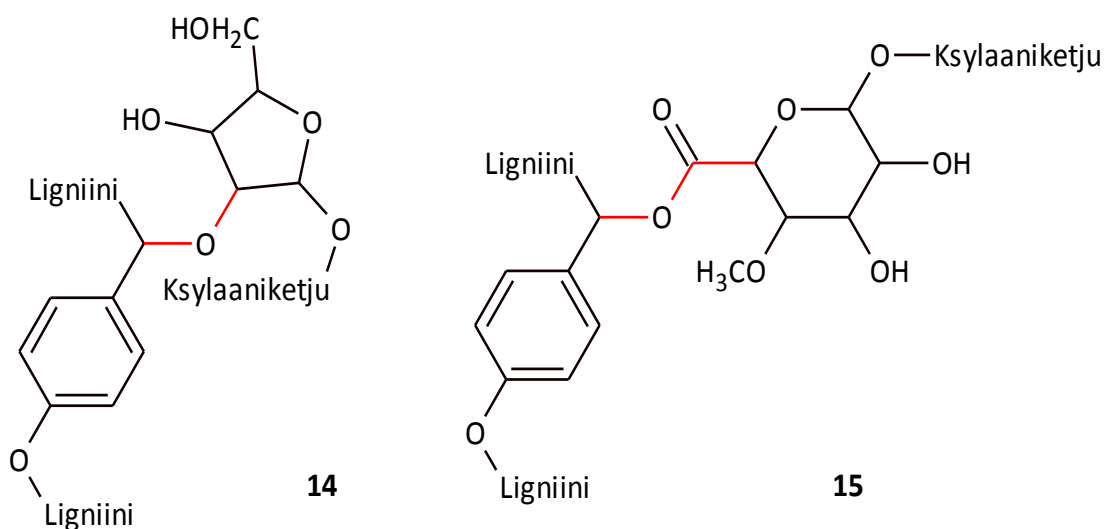
Kuva 3 Esimerkki, miltä pieni osa ligniiniä voisi näyttää.

2.2. Ligniinin erotus eri prosesseilla

Valtaosa ligniinistä esiintyy kasvin sekundaariseinämässä, jossa ligniini on sitoutunut soluseinien selluloosaan ja hemiselluloosaan kovalenttisilla sidoksilla. Erotusprosesseissa tavoitteena on hajottaa nämä ligniinin ja hiilihydraattien väliset sidokset (Kuva 4).¹³ Sidosten tarkkaa rakennetta ja määrää on vaikea arvioida, mutta ligniiniä sitovat selluloosaan ja hemiselluloosaan todennäköisesti joko eetteri- tai esteriryhmät. Kuva 5 on esitetty esimerkit ligniinin sitoutumisesta hemiselluloosaan sekä eetteri- että esterisidoksella.¹⁴



Kuva 4 Ligniinin sitoutuminen selluloosaan ja hemiselluloosaan ja erotuksen vaikutus niiden muodostamaan rakenteeseen.¹³



Kuva 5 Ligniinin sitoutuminen hemiselluloosaan eetteri- (**14**) ja esterisidoksella (**15**).¹⁴

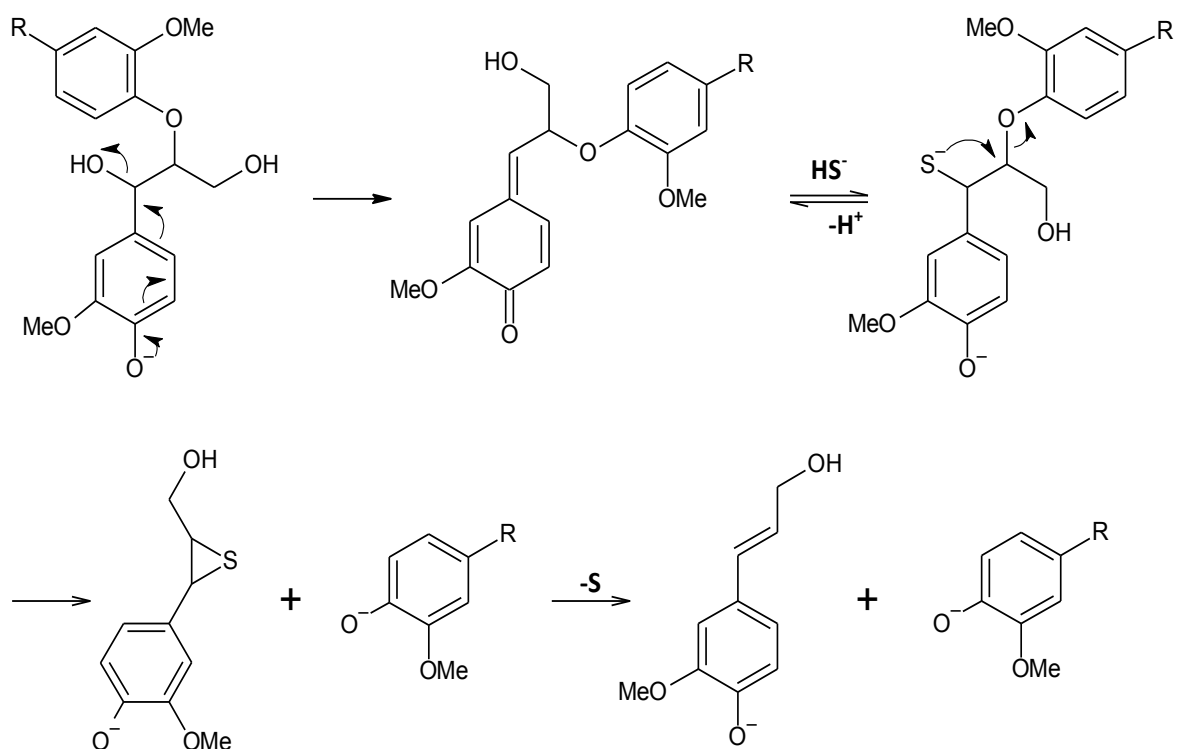
Ligniinin erotukseen kasveista on kehitetty useita menetelmiä. Osaa näistä menetelmistä käytetään teollisuudessa lignoselluloosan käsittelyssä. Näissä prosesseissa tavoitteena on erottaa selluloosa ligniinistä hyödyntämistä varten. Muut menetelmät on kehitetty laboratoriokäyttöön, jolloin tavoitteena on erottaa ligniiniä analyyseja varten. Ligniinin ja hiilihydraattien välisten kovalenttisten sidosten takia erotetun ligniinin sekaan

jää lähes poikkeuksetta hiilihydraatteja epäpuhtauksina. Koska menetelmiä on todella useita, tähän tutkielmaan on valittu viisi erotusmenetelmää, joiden vaikutuksia ligniinin analysointiin on tarkasteltu. Nämä erotusmenetelmät ovat Kraft-, organosolv-, Björkman-, Klason- ja entsyymihydrolyysiprosessit. Näistä Kraft- ja organosolv-prosessit on tarkoitettu ensisijaisesti selluloosan erotukseen, kun taas Björkman- ja Klason-prosessit on kehitetty ligniinin keräystä varten. Kaikissa prosesseissa voi esiintyä variaatiota, mutta niiden pääperiaatteet on kerrottu alla.

2.2.1. Kraft-prosessi

Kraft-prosessi on kaikista yleisimmin käytetty kaupallinen prosessi selluloosan erottamiseen ligniinistä ja siksi parhaiten tunnettu. Kraft-prosessissa höyrykäsiteltyjä puulastuja keitetään 1-3 tuntia korkeassa lämpötilassa emäksisissä olosuhteissa.¹⁵ Käytetty lämpötila on yleensä 150-170 °C. Näissä olosuhteissa ligniinin sisäiset ja sen ja selluloosan väliset sidokset hajoavat useilla kilpailevilla reaktioilla. Reagensseina käytetään NaOH ja Na₂S, joista saadaan reaktioihin tarvittavia OH⁻ ja HS⁻-ioneja. Jotta erotus tapahtuisi, reagenssit tulee imeyttää hyvin soluseiniin.¹⁴

Monomeerien välisistä sidoksista eetterisidokset ovat helpompia hajottaa kuin hiilihiili-sidokset, minkä vuoksi prosessissa hajoaa lähinnä niitä. Koska β-O-4 sidos on ligniinissä yleisin, se on useimmin hajoava sidos. Kuva 6 on esitetty reaktion kulku β-O-4-sidoksen hajoamiselle Kraft-prosessissa.^{4,14} Koska Kraft-prosessissa käytetään rikkiyhdisteitä, saadun ligniinin seassa on aina mukana rikkiä, mikä antaa sille hyödyntämisen näkökulmasta ei-toivottuja ominaisuuksia.¹⁶



Kuva 6 Reaktiion kulku β -O-4-sidoksen hajoamiselle Kraft-prosessissa^{4,14}

2.2.2. Organosolv-prosessi

Ligniiniä voidaan erottaa käyttämällä myös orgaanisia liuottimia. Tästä tulee nimitys organosolv-ligniini. Käytetyt liuottimet ovat usein alkoholeja tai karboksyylihappoja, mutta muitakin liuottimia erotukseen on käytetty. Etanoli on liuottimista ehkä yleisin edullisuutensa vuoksi, mutta myös metanoli, muurahaishappo sekä etikkahappo ovat yleisesti käytettyjä. Orgaanisia liuottimia käytetään, jotta ligniini liukenee paremmin kuin vesiliuoksissa, mutta liuotin saattaa myös osallistua reaktioihin. Organosolv-ligniinit liukenevat hyvin orgaanisiin liuottimiin mutta veteen eivät ollenkaan. Organosolv-ligniinejä pidetään yleisesti puhtaimpina ja laadukkaimpina kemiallisesti erotetuista ligniineistä.¹⁷

Organosolv kattaa monia erilaisia prosesseja, joita yhdistää orgaanisten liuotinten käyttö. Reaktiot voivat tapahtua happamissa tai emäksisissä olosuhteissa, eri lämpötiloissa ja käytetyt reagenssit voivat vaihdella. Happamissa olosuhteissa α -O-4-sidoksen hajoaminen on vallitseva reaktio, kun taas neutraaleissa ja emäksisissä olosuhteissa reaktiivisin sidos on β -O-4-sidos. Rikkiyhdisteiden käyttö ei ole organosolv-

erotuksissa välttämätöntä, mikä erottaa ne Kraft-prosessista. Organosolv-prosessit eivät ole yleisesti kaupallisessa käytössä mutta niiden käyttöä tutkitaan ja kehitetään.^{4,8}

2.2.3. Klason-prosessi

Yksi laboratoriokäyttöön kehitetyistä menetelmistä on Klason- eli rikkihappomenetelmä. Se kehitettiin erityisesti ligniinipitoisuuden selvittämiseksi puuperäisestä lignoselluloosasta. Muista kasveista peräisin olevalle ligniinin määrälle menetelmä antaa liian suuren tuloksen. Menetelmää alettiin myöhemmin käyttää ligniinin tuottamiseen laboratoriomittakaavassa. Vahvassa rikkihapossa hiilihydraatit hajoavat liukoiksi sokereiksi, kun taas ligniini säilyy liukenemattomana polymeerina.⁴

Menetelmää voidaan soveltaa tapauskohtaisesti mutta menetelmän pääpiirteet ovat seuraavat. Klason-ligniini valmistetaan sekoittamalla kuivattu puuhake väkevään rikkihappoon. Hapon vahvuus voidaan valita käytetyn puulajin tai erotuksen tavoitteen mukaan. Eri puulajeille hapon väkevyys parhaan saannon saavuttamiseksi on eri mutta yleensä noin 65-75%. Väkevässä hapossa ligniini käy läpi useita reaktioita, mikä aiheuttaa useita muutoksia ligniinin rakenteeseen. Seoksen annetaan seistä 48 tuntia huoneenlämmössä, minkä jälkeen ligniini erotetaan seoksesta suodattamalla ja pestään rikkihaposta vedellä. Loppu rikkihappo ja jäljelle jääneet hiilihydraatit voidaan poistaa esimerkiksi lämmittämällä raakatuotetta, johon on lisätty laimeaa suolahappoa, höyryhauteessa. Tuote pestään epäpuhtauksista vedellä ja kuivataan.^{18,19}

2.2.4. Björkman- ja entsyymihydrolyysi-prosessi

Björkman-menetelmän tarkoituksena on saada ligniini erotettua ilman, että sen rakenteeseen tulee suuria muutoksia. Kun halutaan saada tietoa ligniinistä, joka esiintyy kasveissa, analysoidaan usein Björkman-ligniiniä sen suhteellisen vähäisten muutosten takia. Tämän erotustavan heikkous on sen antama huono saanto. Saantoprosentti on korkeintaan 50 %, minkä takia sen kyvystä edustaa kasveissa esiintyvää ligniiniä ei voida olla varmoja.^{4,8}

Kuivattua puujauhetta hajotetaan värinäkuulamylyssä esimerkiksi 30 päivää. Nesteenä mylyssä käytetään tavallisesti tolueenia. Hajotettua massaa uutetaan 9:1 dioksaani-vesi-

liuksella, jolla ligniinistä erotetaan epäpuhtauksia. Saatu ligniini voi vaatia vielä puhdistusta hiilihydraateista ja muista epäpuhtauksista. Esimerkiksi etanoli-bentseeniliuksella voidaan uuttaa pois rasvoja.²⁰

Entsyymihydrolyysissä ligniini erotetaan käyttäen entsyymejä, jotka hajottavat selluloosaa ja hemiselluloosaa pienemmiksi molekyyleiksi. Käytettyjä entsyymejä kutsutaan sellulaaseiksi ja niitä tarvitaan kolmea tyyppiä: eksoglukanaaseja, endoglukanaaseja ja β -glukasidaaseja. Näitä entsyymejä voidaan tuottaa sienien tai bakteerien avulla. Entsyymihydrolyysikäsittely tehdään noin 50 °C lämpötilassa puskuriliuksessa, jonka pH on noin 5. Sellulaaseja voidaan käyttää myös parantamaan kuulamyyllyllä erotetun ligniinin saantoa ja puhtautta. Entsyymit poistavat suuren osan polysakkarideista ennen dioksaani-vesi-uuttoa.⁸

3. LIGNIININ ANALYSOINTI

Ligniinin analysointi on hyvin haastavaa sen suuren koon, epäsäännöllisyyden ja erotuksen takia. Erotetuista ligniineistä tehdyt analyysit eivät anna ligniinistä täysin todenmukaista kuvaa prosesseissa tapahtuvien modifikaatioiden ja usein myös rajallisen saannin takia.²⁰ Lisäksi ligniinin seassa usein esiintyvät epäpuhtaudet, kuten hiilihydraatit, vaikuttavat analyysiin. Tässä tutkielmassa keskitytään kunkin tekniikan käyttökelpoisuuteen ligniinin koostumuksen, rakenteen ja puhtauden selvityksessä. Lisäksi verrataan eri tavalla erotettujen ligniinien välisiä eroavaisuuksia käytetyillä tekniikoilla.

3.1. FT-IR-spektroskopia ligniinin analytiikassa

Infrapunaspektroskopia on nopea ja yksinkertainen tapa saada tietoa yhdisteiden rakenteesta ja puhtaudesta.²¹ IR-spektroskopiassa ligniiniä tutkitaan erityisesti tunnistamalla spektrissä havaittuja funktionaalisten ryhmien karakterisia signaaleja. Ligniinin IR-spektrit mitataan usein kiinteistä KBr-pelleteistä, jotta liuottimet eivät aiheuttaisi omia signaaleja spektriin.⁴ Mittauksessa käytetty säteilyn aaltolukualue on yleensä $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$.

Spektreissä tiettyjen funktionaalisten ryhmien, esimerkiksi OH, NH, CH₃, C=O ja C₆H₅, absorptioalueet ovat aina samoja molekyylistä riippumatta, mikä tekee niistä helposti tunnistettavia. Taulukko 1 on esitetty joidenkin ligniinissä esiintyvien funktionaalisten ryhmien tyyppisiä absorptiotaajuuksia.²² Absorptiosignaalin tarkka taajuus antaa lisätietoa funktionaalisen ryhmän lähiympäristöstä. Näiden perusteella voidaan tunnistaa eri yksiköitä aromaattisten renkaiden värähtelyistä ja myös saada tietoa yksikköjen välisistä sidoksista funktionaalisten ryhmien esiintymisen perusteella.^{1,23} Kuitenkin, O-H, C-H ja C=O venytystä ja aromaattisen renkaan värähtelyä 1510 cm^{-1} lukuun ottamatta, lähes kaikki absorptiovyöt ovat monimutkaisia sillä ne muodostuvat useiden eri värähdysten absorptioista.²⁰

Taulukko 1 Eräiden funktionaalisten ryhmien tyypillisiä absorptiotaajuuksia.²²

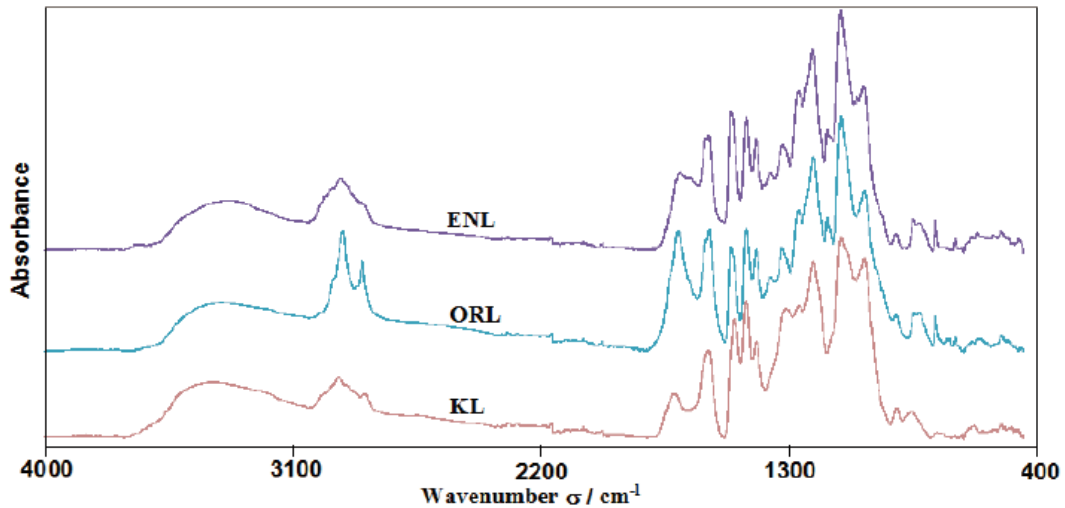
Funktionaalinen ryhmä	Värähtely	Absorptiotaajuus (cm⁻¹)
Metyyli		
Metyyli	CH venytys	2970-2850
Metoksi	CH venytys	2835-2815
	CH ₃ asymmetrinen taivutus	1470-1440
	CH ₃ symmetrinen taivutus	1390-1370
Metyleeni		
Alkaani	CH venytys	2940-2920 ja 2860-2850
Alkeeni	CH venytys	3090-3070 ja 3020-2980
	CH ₂ taivutus	1470-1450
Aromaattiset ryhmät		
	CH venytys	3100-3000
	Aromaattisen renkaan venymä	1630-1430
	CH taivutus ulos tasosta	900-650
	Renkaan taivutus	580-420
Alkoholit		
	OH venytys	3350-3250
Primäärinen	OH venytys	3640-3630
Sekundäärinen	OH venytys	3630-3620
Fenolit		
	OH taivutus ulos tasosta	720-600
	C-OH taivutus	450-375
Eetterit		
Alkyyli-arylieetteri	C-O-C venytys	1280-1220
Dialkyylieetteri	C-O-C venytys	1140-1110
Esterit		
	C=O venytys	1765-1720
	C-O-C asymmetrinen venytys	1290-1180
	O-C-O taivutus	645-575
Ketoni		
Ei-konjugoitunut	C=O venytys	1725-1705
Konjugoitunut	C=O venytys	1700-1650
Amidit		
Primäärinen	NH ₂ venytys	3540-3520 ja 3400-3380
	C=O venytys	1650-1610
Sekundäärinen	N-H venytys	3440-3420
	C=O venytys	1680-1640

Kraft-ligniininille tyypilliset IR-absorptiosignaalit on esitetty Taulukko 2.^{10,23} Ligniinin koostumusta yksikköjen osalta voidaan määrittää IR-spektrin avulla, sillä G- ja S-yksiköiden aromaattisen renkaan värähtelyt eroavat toisistaan selkeästi (Taulukko 2). Aromaattisen C-H-sidoksen taivutusvärähtely H-yksiköille on sama kuin S-yksiköille.²⁰ G-yksiköille tyypillisen aromaattisen renkaan värähtelyn lisäksi CH₃- ja CH₂-ryhmien epäsymmetrisen C-H taivutusvärähtelyn ja aromaattisen renkaan värähtelyn signaali muodostavat yhdessä ligniinille karakterisen tripletin (1515 cm⁻¹, 1464-1462 cm⁻¹ ja 1427-1421 cm⁻¹), joka on helppo erottaa hyvin puhdistetun ligniinin IR-spektristä.^{23,24}

Taulukko 2 Kraft-ligniininille tyypilliset absorptiosignaalit IR-spektrissä.^{10,23}

Värähtely	Absorptiotaajuus (cm ⁻¹)
OH venytys	3425
CH venytys	2920
Konjugoitumaton C=O venytys	1725-1714
Konjugoitunut C=O venytys	1655
C=O venytys ja aromaattisen renkaan venytys (S)	1609-1594
Aromaattisen renkaan venytys (G)	1515-1504
Epäsymmetrinen C-H taivutus (-CH ₃ , -CH ₂ -)	1464-1462
Aromaattisen renkaan värähtely	1427-1421
Aromaattisen renkaan laajenemisvärähtely (S)	1330-1329
Aromaattisen renkaan laajenemisvärähtely (G)	1270
C-C, C-O, C=O venytys (G)	1225-1216
Aromaattinen C-H taivutus tasossa (S)	1125-1114
Aromaattinen C-H taivutus tasossa (G)	1033-1030
Aromaattinen C-H taivutus ulos tasosta (G)	929-913
Aromaattinen C-H taivutus ulos tasosta (S, H)	834-833

Ligniinin IR-spektreissä voi nähdä joitain eroavaisuuksia riippuen sen lähteestä ja erotusmenetelmästä. Erot syntyvät kussakin näytteessä olevien funktionaalisten ryhmien määrän mukaan, mikä vaikuttaa spektrin monimutkaisuuteen. Mitä enemmän rakenteita tietyllä aallonpituusalueella on, sitä enemmän piikkejä alueella nähdään. Esimerkiksi Kuva 7 organosolv-ligniinin spektrissä välillä 3000-2800 cm⁻¹ erottuu kaksi selkeää piikkiä, joita taas klason- ja entsyymihydrolyysiligniinin spektreissä ei nähdä. Tästä voidaan päätellä, että organosolv-ligniinissä esiintyy enemmän metyleeni- ja metoksiryhmiä kun klason- ja entsyymihydrolyysiligniinissä.²⁵



Kuva 7 IR-spektrit Klason- (KL), organosolv- (ORL) ja entsyymihydrolyysiligniiniinille (ENL)²⁵

Mikäli mitattu ligniininäyte sisältää polysakkarideja tai proteiineja epäpuhtauksina, ne voidaan erottaa IR-spektristä. Polysakkarideille tyypillisiä signaaleja ovat esimerkiksi C-OH venytysvärähtely alkoholeille $1030\text{--}1170\text{ cm}^{-1}$ ja alifaattisen C-H-sidoksen symmetrinen taivutusvärähtely 1370 cm^{-1} . Erityisesti signaalit 1115 cm^{-1} ja 1029 cm^{-1} ovat karakterisia selluloosalle.²¹ Proteiinit voidaan tunnistaa amidien C=O venytysvärähtelyistä taajuuksilla $1655\text{--}1658\text{ cm}^{-1}$ ja 1516 cm^{-1} . Myös muita epäpuhtauksia voidaan tunnistaa spektreistä. Esimerkiksi keittoliipeään valkaisun aikana sivutuotteena muodostuva kalsiumoksalaatti aiheuttaa vahvat signaalit taajuuksilla 1616 cm^{-1} , 1316 cm^{-1} , 778 cm^{-1} ja 661 cm^{-1} .²³

3.2. NMR-spektroskopia ligniinin analytiikassa

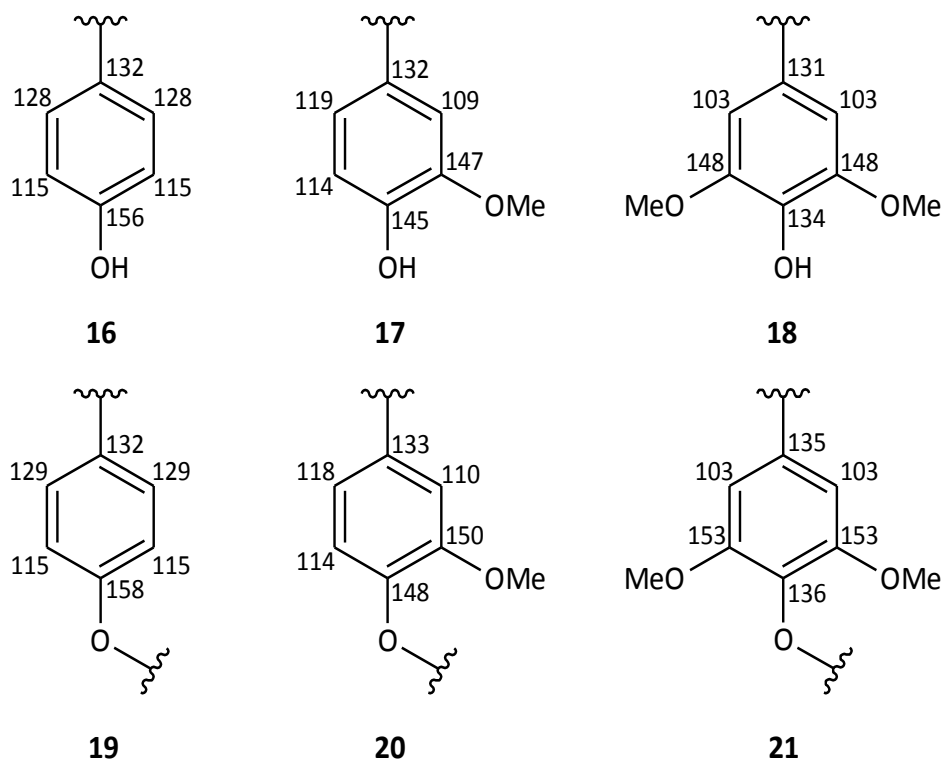
Ydinmagneettinen resonanssi eli NMR (nuclear magnetic resonance) on erityisen hyvä tekniikka ligniinin polymeerirakenteen tutkimiseen. Sillä voidaan saada hyvä kuva sekä ligniinin monomeereistä että yksikköjen välisistä sidoksista. Tekniikan suurin heikkous on signaalien suuri määrä ja päällekkäisyys, mikä haittaa NMR-spektrien käyttöä ligniinin kvantitatiivisessa analysoinnissa.¹ NMR-laitteisto on lisäksi hyvin kallis ja siksi sen käyttö ei ole aina mahdollista.⁷ Ligniinin analysointiin on käytetty protoni-, hiili ja fosfori-NMR-spektroskopiaa ja 2D-NMR-tekniikoita. Tässä tutkielmassa tarkastellaan lähinnä ^{13}C NMR käyttöä ja lopuksi esitellään lyhyesti ligniinin HSQC-spektrejä (heteronuclear single quantum coherence).

Aiemmin ligniinin analysointiin käytettiin ^1H NMR-spektroskopiaa, jolla saatiin kvalitatiivista tietoa ligniinin rakenteesta. Spektristä on kuitenkin vaikea erottaa selkeitä signaaleja ligniinin protonien useiden eri kemiallisten siirtymien ja rakenteiden epäsäännöllisyyden takia. Laitteistojen kehityksen myötä ^{13}C NMR-spektroskopian käyttö yleistyi sen monien etujen ansiosta. Hiilispektrin laajempi kemiallisten signaalien alue (~240 ppm) mahdollistaa paremman resoluution kuin protonispektrin (~12 ppm) ja vähentää signaalien päällekkäisyyttä. Hiilispektreissä ei myöskään esiinny kytkentöjä kuten protonispektreissä, mikä yksinkertaistaa spektrejä. ^{13}C NMR-spektroskopian heikkous ovat NMR aktiivisen ^{13}C -isotoopin pienestä osuudesta johtuva huono herkkyys, minkä takia mittausajat ovat pitkiä. Hiilispektrejä voidaan mitata sekä liuoksista että kiinteistä näytteistä. Liuoksista mitattujen spektrien resoluutio on parempi mutta liukoinen ligniini ei aina anna kuvaa kasveissa esiintyvistä ligniineistä.⁸

^{13}C NMR-spektroskopiaa voidaan käyttää ligniinin yksiköiden ja rakenteiden tunnistukseen tiettyjen funktionaalisten ryhmien signaalien perusteella, kuten IR-spektroskopiassakin. Esimerkiksi aromaattisten hiilien siirtymät esiintyvät yleensä välillä 100-160 ppm ja metoksiryhmän 50-70 ppm.^{22,26} Ligniinin alifaattiset signaalit sijoittuvat siirtymille 20-90 ppm.²⁷ Näiden lisäksi ketoni- ja aldehydiryhmien karbonyylihiilien siirtymät ovat yleensä 190-200 ppm ja esteriryhmien 166-182 ppm.²⁸ NMR-spektroskopialla rakenteiden tunnistaminen on kuitenkin helpompaa kuin IR-spektroskopialla.

Hiilispektristä on mahdollista erottaa ligniinin eri yksiköiden sekä niiden välisten sidosten aiheuttamia signaaleja. Ligniinin yksiköiden aromaattisten hiilten kemiallinen siirtymä riippuu niiden lähiympäristöstä molekyylissä, varsinkin niihin liittyneistä atomeista. Aromaattiselle $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-O}$ -hiilelle se on yleensä välillä 140-165 ppm, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-C}$ -hiilelle 125-140 ppm ja $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$ -hiilelle 100-125 ppm. Tarkemmat siirtymät eri hiilille on esitetty Kuva 8. Ligniinin metoksiryhmien hiilen signaali on tyypillisesti välillä 54-58 ppm. Yksiköiden välisten sidosten esiintymistä voidaan havaita niiden hiilignaaleista tietyillä spektrin alueilla. Taulukko 3 Kuusen Björkman-ligniinistä mitattuja ^{13}C NMR-spektrin signaaleja yksiköiden välisten sidosten hiilille.²⁸ on esitetty signaaleja, jotka kertovat näiden sidosten esiintymisestä. Signaalit on mitattu kuusesta erotetusta Björkman-

ligniinistä. Tarkempaa tietoa rakenteista saadaan kuitenkin 2D-spektreistä, joita käsitellään myöhemmin.^{25,27,28}



Kuva 8 ^{13}C NMR-signaalit (ppm) fenolisille (**16-18**) ja eetteröityneille (**19-21**) ligniinin yksiköille²⁷

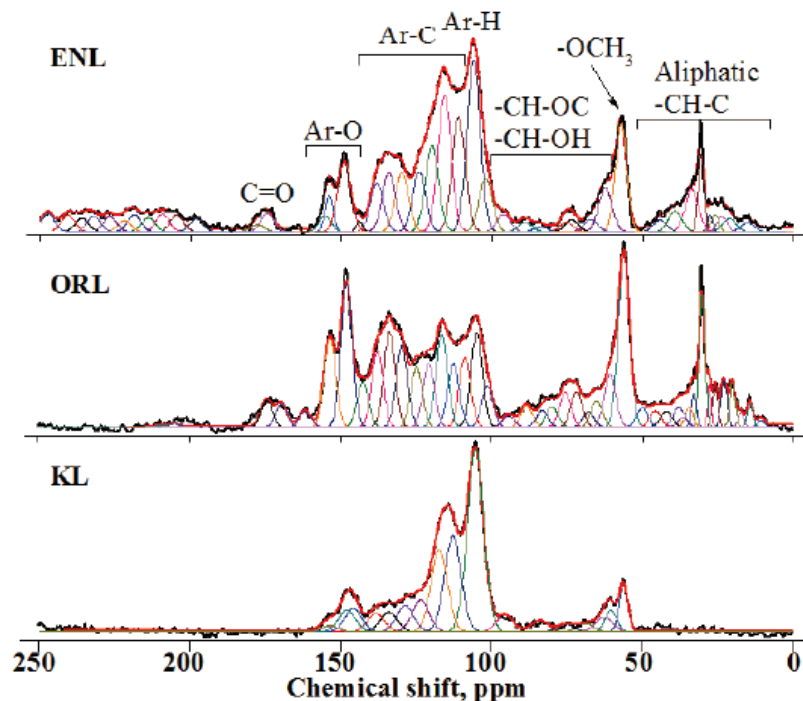
Taulukko 3 Kuusen Björkman-ligniinistä mitattuja ^{13}C NMR-spektrin signaaleja yksiköiden välisten sidosten hiilille.²⁸ Signaali tulee tummennuksella merkitystä hiili-atomista.

Hiili	Signaali (ppm)
β -O-4, α -O-4	90-77
β -5, 5-5'	145,5-141
β - β , β -5	54-53
β -1	58-54
4-O-5'	155-151
C-OH (prim)	65-58
C-OH (sek)	77-65

Mitattujen signaalien vahvuudet johtuvat rakenteiden määrästä näyteligniinissä. Signaalien integraalien perusteella voidaan joissain tapauksissa päätellä rakenteiden suhteellisia osuuksia ligniinissä. Määrittäminen on usein käyttökelpoisempi Björkman-ligniinille

kuin kemiallisilla erotusmenetelmillä erotetuille ligniineille niiden käsittelyssä tapahtuvien rakenteen muutosten takia. Joistain signaaleista tehdyt arviot voivat olla hyvinkin virheellisiä. Esimerkiksi β - β - ja β -5-sidosten C_β -signaalista (53-54 ppm) päätelty suhteellinen osuus voi olla jopa nelinkertainen todellisuuteen verrattuna, vaikka Björkman-ligniininille tehty arvio olisi tarkka. Tällöin määrittäminen voidaan tehdä C_α -signaalista (84-86 ppm).⁶

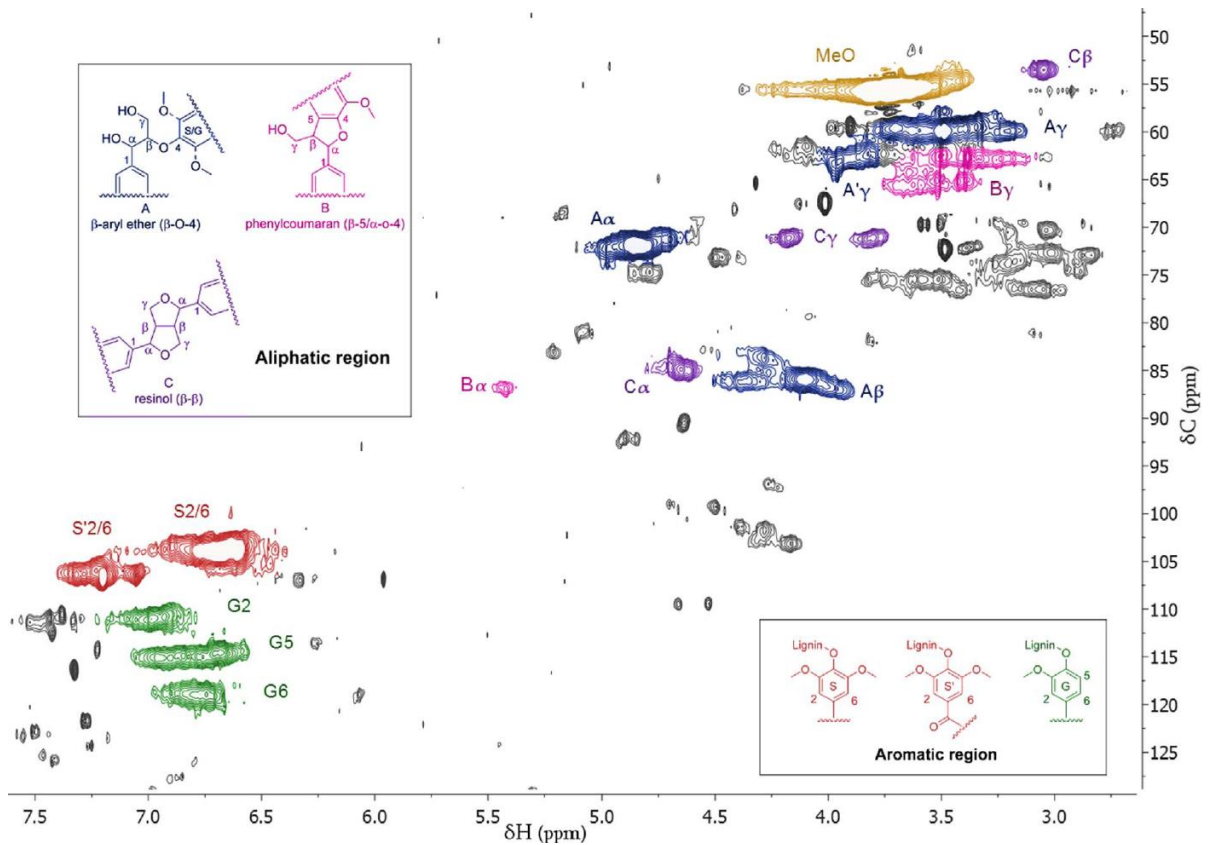
Mitatut spektrit eri ligniineille voivat erota toisistaan hyvinkin paljon, koska eri ligniineissä esiintyy eri määriä tiettyjä rakenteita. Esimerkiksi Klason-ligniinin spektrissä esiintyy paljon aromaattisia hiiliä, kun taas metoksi- ja muiden alifaattisten hiilten osuus on pieni verrattuna muihin ligniineihin. Kraft-, organosolv- ja entsyymihydrolyysiligniinin spektrit muistuttavat enemmän toisiaan mutta pieniä eroavaisuuksia voidaan nähdä eri signaalien vahvuudessa. Kuva 9 on esitetty entsyymihydrolyysi-, organosolv- ja Klason-ligniinin ¹³C NMR-spektrit.^{25,27} Mikäli ligniinin seassa on selluloosaa, se voidaan erottaa ¹³C NMR-spektristä. Selluloosalle tyypillisiä signaaleja ovat dupletti siirtymällä 73 ppm, vahva signaali 105 ppm sekä piikit 85 ppm ja 89 ppm.²⁷



Kuva 9 ¹³C NMR-spektrit Klason- (KL), organosolv- (ORL) ja entsyymihydrolyysiligniininille (ENL)²⁵

¹³C NMR-spektroskopiaa voidaan käyttää kvantitatiiviseen analyysiin tietyin rajoituksin. Mittauksen kvantitatiivisuuteen vaikuttavat käytetty laitteisto ja ligniini mutta eniten itse rakenne, jonka määrää halutaan selvittää. Vaikka määrittämisen tarkkuus riippuu käytetystä ligniinistä, tietyt rakenteet on helpompi määrittää kvantitatiivisesti kuin toiset. Hyvin tarkasti voidaan selvittää määrät muun muassa metoksiyhmille, alifaattisille ja aromaattisille OH-ryhmille, aromaattisille vetyatomeille sekä S- ja G-ryhmille ja näiden välinen suhde. Melko tarkasti voidaan määrittää esimerkiksi primääriset ja sekundääriset OH-ryhmät, β-O-4-sidokset, esteriryhmät, etoksiyhmät ja H-ryhmät, jos kyseessä on heinäkasvinäyte. Semi-kvantitatiivisesti määritettäviä rakenteita ovat β-β- ja β-5-sidokset ja H-ryhmät puuperäisistä näytteistä.

Yksiulotteiset NMR-spektrit eivät aina anna riittävän yksityiskohtaista tietoa ligniinin rakenteesta signaalien päällekkäisyyden takia. Tämän takia yleensä käytetään kaksiulotteisia HSQC-spektrejä, joissa yhdistyy ¹H-spektrin herkkyys ja ¹³C-spektrin korkea resoluutio.¹² HSQC-spektreissä aromaattisten hiili-protoniparien piikit sijoittuvat alueelle 100-135/5,5-8,5 ja sivuketjujen alueelle 50-90/2,5-6,0 ppm.¹⁰ Kuva 10 on esitetty HSQC-spektri koivusta erotetulle Björkman-ligniiniinille. Kuvaan on merkitty metoksiyhmistä, S- ja G-yksiköistä ja β-O-4-, β-β- ja β-5-sidoksista syntyvät signaalit. Kaksiulotteisesta spektristä kunkin yksittäisen hiili-vety-parin tunnistaminen on mahdollista näille rakenteille.



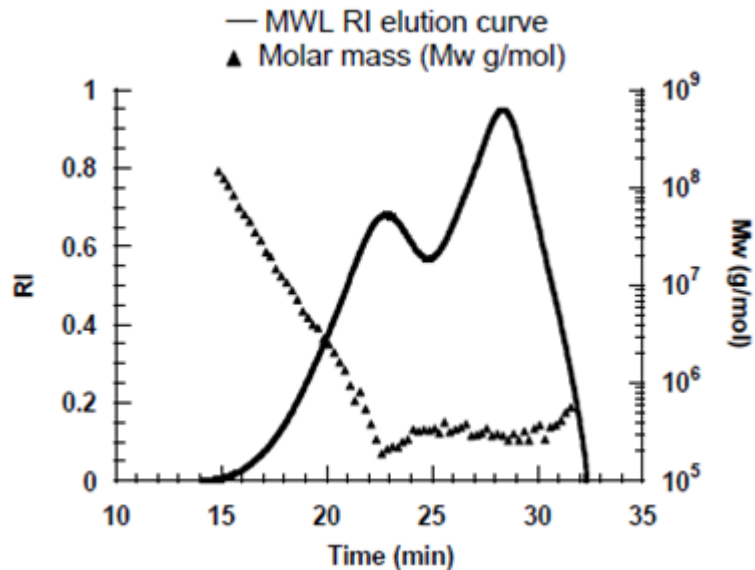
Kuva 10 HSQC-spektri koivun Björkman-ligniininille mitattuna dimetyylisulfoksidiliuoksesta.¹¹

3.3. HPLC ligniinin analytiikassa

Korkean erotuskyvyn nestekromatografian eli HPLC:n (high-performance liquid chromatography) yleisin laji ligniinin analytiikassa on kokoerottelukromatografia. Se antaa tietoa ligniinin molekyylien koosta ja kokojakaumasta. Monet polymeerin ominaisuudet liittyvätkin juuri sen molekyyli-massajakaumaan.²⁹ Useimmin näytteistä mitataan polymeerin molekyyli-massan massakeskiarvo M_w ja numerokeskiarvo M_n . Näiden suhde M_w/M_n eli dispersiivisyys D kertoo, kuinka molekyylien massat ovat jakautuneet. Tämä on hyvä tapa selvittää ligniinin komponenttikokoa etenkin erotuksen jälkeen, mikä kertoo erotusprosessin vaikutuksista ligniiniin.

Mittauksessa käytettävä kolonni ja olosuhteet tulee valita kyseiselle näytteelle sopiviksi. Liikkuvana faasina käytetään usein 0,1 M natriumhydroksidiliuosta, sillä se sopii kaikille erotetuille ligniineille, mutta monet kolonnit eivät kestä tarvittavan korkeaa emäksisyyttä.^{4,6} Toinen yleinen eluentti on dimetyyli-formamidi. Näytteen sekaan voidaan

myös lisätä molekyylien kulkuun vaikuttavia aineita. Yksi tällainen aine on litiumbromidi.^{30,31} Detektorina voidaan käyttää esimerkiksi UV- tai taitekerroindetektoria.¹⁵ Kuva 11 on esitetty kromatogrammi Björkman-ligniiniille. Liikkuvana faasina on käytetty dimetyyliformamidia ja detektorina taitekerroindetektoria. Kuvasta nähdään myös kuinka erottuvien ligniinimolekyylien molekyylimassat pienenevät ajan funktiona.³¹



Kuva 11 Kokoerottelukromatogrammi Björkman-ligniiniille. Taitekerroin (RI) ja M_w eri ajan hetkinä.³¹

Kokoerottelukromatografiaa käyttämällä voidaan selvittää eri tavalla käsiteltyjen ligniinien molekyylimassajakaumat ja verrata niitä toisiinsa. Tällä tavalla voidaan selvittää eri erotusmenetelmien tai eri alkuperän vaikutusta ligniiniin. Kokoerottelukromatografian tuloksiin tulee kuitenkin suhtautua varauksella, sillä eri mittausolosuhteet vaikuttavat ligniinin kulkuun kolonnissa, mikä taas vaikuttaa saatuihin tuloksiin. Jotta tulokset olisivat vertailukelpoisia, ne tulee mitata samoissa olosuhteissa.³¹ Erotetun ligniinin molekyylimassajakauma kertoo, miten ligniini pilkkoutuu erotuksen aikana. Taulukko 4 on esitetty viiden erilaisen ligniinin keskimääräiset molekyylit koot mitattuna samoissa olosuhteissa. Havaitaan, että esimerkiksi Kraft-prosessilla erotetun ligniinin molekyylit ovat suurempia havupuille kuin lehtipuille.⁶

Taulukko 4 Eri tavoilla erotettujen ligniinien massakeskiarvo M_w , numerokeskiarvo M_n ja dispersiivisyys D .⁶

Ligniini	M_w (g/mol)	M_n (g/mol)	D
Kraft havupuu	4000-7000	1000-1400	4-5
Kraft lehtipuu	1700	700	2,4
Organosolv havupuu	3400	900	3,8
Organosolv lehtipuu	2000-2100	750-850	2,6
Björkman havupuu	3700	1100	3,3

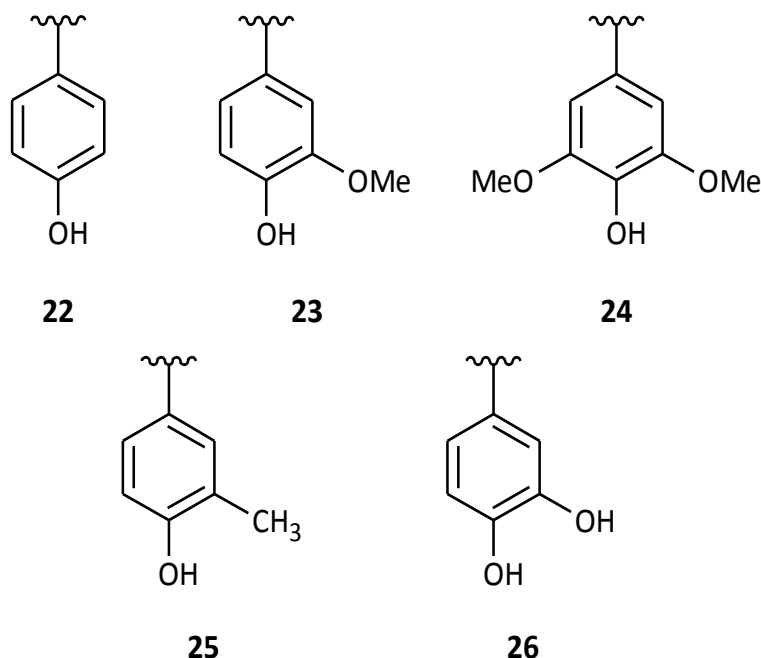
Nestekromatografian käytön suurin haaste on ligniininäytteen liuotus. Näyte tulisi saada liuotettua täysin ilman, että näytteessä tapahtuu modifikaatioita. Modifioitunut näyte voi antaa virheellisen kuvan näytteen alkuperäisestä koostumuksesta mukaan lukien molekyylien kokojakauma. Ongelman ratkaisemiseksi ligniininäytettä voidaan yrittää liuottaa useampaan eri liuottimeen ja analysoida erikseen. Liukenematonta ligniiniä voidaan liuottaa joko poolisempaan tai poolittomampaan liuottimeen, jolloin suurempi osa saadaan liuotettua.¹⁵

3.4. Py-GC-MS ligniinin analytiikassa

Pyrolyysin aikana ligniininäytettä kuumennetaan hapettomissa olosuhteissa, jolloin ligniini hajoaa useiksi pienemmiksi molekyyleiksi. Syntyneet molekyylit erotetaan toisistaan kaasukromatografialla, jonka resoluutio on nestekromatografiaa parempi.⁷ Pyrolyysissä syntyneiden molekyylien molekyylimassat mitataan massaspektrometrillä. Tarkat massat helpottavat molekyylien rakenteiden tunnistusta. Tunnistamalla syntyneitä molekyyli-ioneja saadaan tietoa näytteen alkuperäisestä rakenteesta ja koostumuksesta.

Pyrolyysissä syntyvät fenyylipropanoidit edustavat alkuperäisen näytteen monomeerejä. Tunnistamalla kyseisten yhdisteiden aromaattiseen renkaaseen liittyneiden metoksiryhmien määrä saadaan suoraan näytteen monomeerien määrien välinen suhde. Pyrolyysissä syntyneitä molekyylejä voidaan luokitella joko aromaattisen renkaan tai alkyyliketjun funktionaalisten ryhmien mukaan. Aromaattisen renkaan mukaan luokiteltujen molekyylien mahdollisia tyyppisiä ovat esimerkiksi fenoli- (**22**), guajakoli- (**23**), syringoli- (**24**), kresoli- (**25**) ja katekolityypiset (**26**) (Kuva 12). Kresoli- ja

katekolityypin molekyylit syntyvät metoksiyhmän modifioituessa korkeissa lämpötiloissa. Alkyyliketjun mahdollisia funktionaalisia ryhmiä ovat esimerkiksi aldehydiryhmä, α -hiilen ketoni ja kaksoissidokset. Alkyyliketju voi myös puuttua kokonaan tai koostua vain metyyli-ryhmästä.^{10,11}

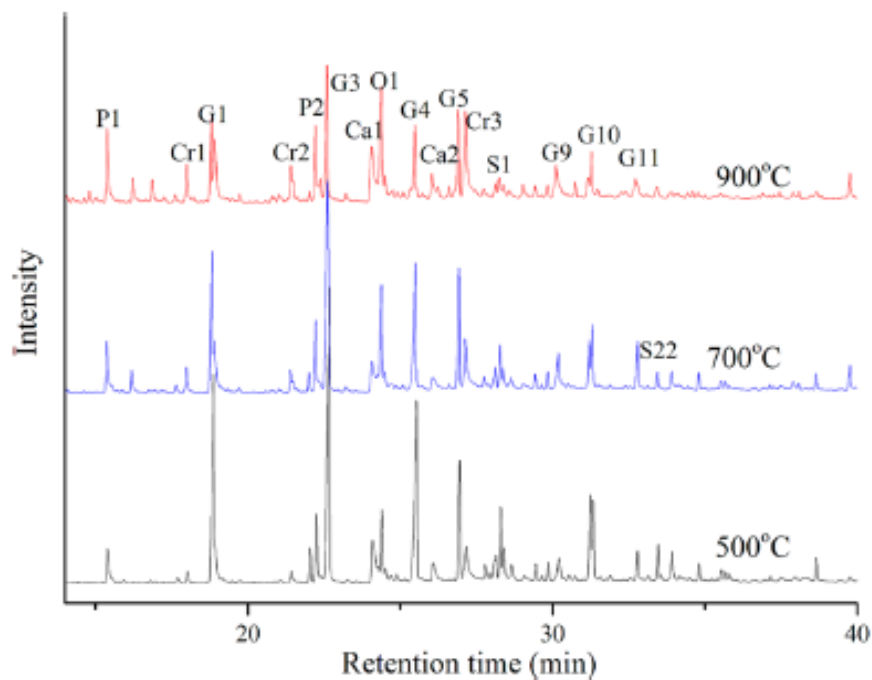


Kuva 12 Fenoli- (**22**), guajakoli-(**23**), syringoli- (**24**), kresoli-(**25**), katekolityypin (**26**)
molekyylit

Käytetty pyrolyysilämpötila vaikuttaa syntyvien molekyyliden määrään ja rakenteeseen. Alle 500 °C lämpötiloissa hajoaa pääasiassa yksikköjen välisiä sidoksia ja joitain sivuketjuja. Yksikköjen välisistä sidoksista β -O-4-sidos on heikoin ja sen heikoin yksittäinen sidos on β -O-sidos. β -5- ja α -O-4-sidoksille vastaavasti heikoin sidos on α -O-sidos. Kun tutkitaan lämpötilan funktiona molekyylejä, joilla on samoja funktionaalisia ryhmiä alkyyliketjussa, niiden määrien käyrät ovat muodoltaan saman kaltaiset. Parhaiten ne muistuttavat toisiaan, kun pyrolyysilämpötilat ovat pieniä, jolloin metoksiyhmien irtoaminen tai modifioituminen on vähäisempää.

Aromaattisen renkaan metoksiyhmät alkavat irrota ja modifioitua, kun lämpötila nousee yli 500 °C. Korkeammassa lämpötiloissa syntyy vähemmän guajasyyli- ja syringyyli-ryhmien johdannaisia ja vastaavasti enemmän muita molekyylejä.^{10,11} Kuva 13

on esitetty kromatogrammit Kraft-ligniiniin, kun pyrolyysilämpötila on 500, 700 tai 900 °C. Osaan piikeistä on merkitty, minkä tyyppistä molekyyliä piikki edustaa (fenoli (P), guajakoli (G), syringoli (S), kresoli (Cr), katekoli- (Ca) ja muut (O)). Kuvasta nähdään hyvin, miten lämpötilan nosto vaikuttaa syntyvien molekyylien määrään. Korkeammissa lämpötiloissa syntyy useampia erilaisia molekyyliä, jotka ovat kooltaan pienempiä. Silloin kromatogrammissa esiintyy enemmän piikkejä pienemmällä intensiteeteillä.¹⁰



Kuva 13 Kromatogrammi Kraft-ligniiniin lämpötiloissa 500 °C, 700 °C ja 900 °C.¹⁰

Py-GC-MS on tekniikkana ligniinin analysoinnissa hyödyllisimmillään, kun halutaan saada selville, millaisista yksiköistä ligniininäyte koostuu. Pyrolyysin aikana voi syntyä useita kymmeniä yhdistettä, joita kaikkia ei voida tunnistaa, mutta ligniininäytteen monomeerikoostumus voidaan arvioida melko tarkasti. Näyte kuitenkin tuhoutuu hajotuksessa. Lämpötilan on oltava riittävän korkea, jotta ligniini hajoaa riittävän pieniksi molekyyliksi. Toisaalta liian korkea pyrolyysilämpötila voi vääristää tuloksia.

4. YHTEENVETO

Ligniini on suuri ja epäsäännöllinen polymeeri ja siksi haastava tutkimuskohde. Monimutkaisuuden vuoksi ligniinistä saadaan normaalisti selville vain sen monomeerien ja niiden välisten sidosten määrien suhteet ja molekyylipainojakauma. Ligniinin molekyylien suuri koko vaikeuttaa analysointia käytettäessä menetelmiä, jotka vaativat liukoista näytettä, kuten nestekromatografiaa. Ligniinin lähde sekä käytetty erotusmenetelmä vaikuttavat erotetun ligniinin koostumukseen sekä sen sisältämiin epäpuhtauksiin.

Ligniinin analytiikassa mikään analyysitekniikoista ei riitä yksinään antamaan ligniinistä tarvittavan tarkkaa kuvaa, mutta yhdessä ne toimivat työkaluina ligniinin tutkimuksessa. IR-spektroskopian käytön etuja ligniinin analysoinnissa ovat sen nopeus ja hyvä herkkyys. Siitä voidaan päätellä nopeasti sekä ligniininäytteen koostumusta, että sen sisältämiä epäpuhtauksia. Nopeutensa takia se sopii hyvin rutiinityöskentelyyn mutta saatu tieto ei ole niin tarkkaa kuin muilla tekniikoilla. NMR-spektroskopia on erityisen hyvä tekniikka ligniinin tarkan rakenteen tutkimiseen. Spektrien tulkinta on kuitenkin työlästä signaalien suuren määrän takia. Monomeerikoostumusta tutkittaessa edullisempi kaasukromatografia on myös hyvä tekniikka, vaikka näyte tuhoutuukin analyysin aikana.

Ligniini on lupaava uusiutuva raaka-aine, jota on saatavilla suuria määriä ja, joka pystyy tulevaisuudessa korvaamaan öljypohjaisia raaka-aineita useilla teollisuuden aloilla. Niin kestävän kehityksen kuin taloudellisuuden kannalta ligniinin mahdollisuuksien tutkiminen on tärkeää. Analytiikan kehitys ja tuntemus ovat avainasemassa uusille innovaatioille ligniinin hyödyntämiseen.

5. KIRJALLISUUSVIITTEET

1. Lu, F. *Lignin: Structural Analysis, Applications in Biomaterials and Ecological Significance*; Nova Science Publishers, Inc: New York, **2014**.
2. Fengel, D.; Wegener, G. *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*; Walter de Gruyter: Berlin; New York, **1989**.
3. Kiyota, E.; Mazzafera, P.; Sawaya, A. C. H. F. Analysis of soluble lignin in sugarcane by ultrahigh performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry with a do-it-yourself oligomer database. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 7015-7020.
4. *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*, VCH cop: Weinheim, **1997**.
5. Derkacheva, O. Y. Estimation of Aromatic Structure Contents in Hardwood Lignins from IR Absorption Spectra. *J. Appl. Spectrosc.* **2013**, 1-7.
6. Balakshin, M. Y. Comprehensive structural analysis of biorefinery lignins with a quantitative ¹³C NMR approach. *RSC Advances* **2015**, *5*, 87187-87199.
7. 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. Sus. Energ. Rev.* **2015**, *49*, 871-906.
8. Lu, F.; Ralph, J. teoksessa: *Lignin: Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels*, Elsevier cop: Amsterdam, **2010**; 169-207.
9. Karmanov, A. P.; Ishankhodzhaeva, M. M.; Derkacheva, O. Y. Experimental and quantum chemical study of biosynthetic lignin models dehydropolymers. *Russ. Chem. Bull.* **2017**, *66*, 643-647.
10. Hu, J.; Shen, D.; Xiao, R.; Wu, S.; Zhang, H. Free-Radical Analysis on Thermochemical Transformation of Lignin to Phenolic Compounds. *Energ. Fuel.* **2013**, *27*, 285-293.

11. Aarum, I.; Devle, H.; Ekeberg, D.; Horn, S. J.; Stenstrøm, Y. The effect of flash pyrolysis temperature on compositional variability of pyrolyzates from birch lignin. *J. Anal. Appl. Pyrol.* **2017**, *127*, 211-222.
12. Sette, M.; Wechselberger, R.; Crestini, C. Elucidation of lignin structure by quantitative 2D NMR. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 9529-9535.
13. Mosier, N. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* **2005**, *96*, 673-686.
14. Fardim, P.; Fardim, P. *Papermaking science and technology. Book 6, Chemical pulping. Part 1, Fibre chemistry and technology*; Finnish Paper Engineers' Association: Paperi ja puu: Helsinki, **2011**.
15. Crestini, C. On the structure of softwood kraft lignin. *Green Chem.* **2017**, *19*, 4104-4121.
16. Lagerquist, L.; Pranovich, A.; Smeds, A.; von Schoultz, S.; Vähäsalo, L.; Rahkila, J.; Kilpeläinen, I.; Tamminen, T.; Willför, S.; Eklund, P. Structural characterization of birch lignin isolated from a pressurized hot water extraction and mild alkali pulped biorefinery process. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *111*, 306-316.
17. Laurichesse, S.; Avérous, L. Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers. *Prog. Polym. Sci.* **2014**, *39*, 1266-1290.
18. Pearl, I. A. *The chemistry of lignin*; Marcel Dekker: New York (N.Y.), **1967**.
19. Bunzel, M. Chemical characterization of Klason lignin preparations from plant-based foods. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 12506-12513.
20. Huang, Y.; Wang, L.; Chao, Y.; Nawawi, D. S.; Akiyama, T.; Yokoyama, T.; Matsumoto, Y. Analysis of lignin aromatic structure in wood based on the IR spectrum. *J. Wood Chem. Technol.* **2012**, *32*, 294-303.

21. Santos, J. I.; Martn-Sampedro, R.; Fillat; Oliva, J. M.; Negro, M. J.; Ballesteros, M.; Eugenio, M. E.; Ibarra, D. Evaluating lignin-rich residues from biochemical ethanol production of wheat straw and olive tree pruning by FTIR and 2D NMR. *Int. J. Polym. Sci.* **2015**, *2015*.
22. Lambert, J. B.; Lambert, J. B.; Shurvell, H. F.; Lightner, D. A.; Cooks, R. G. *Organic structural spectroscopy*; Prentice-Hall: Upper Saddle River (N.J.), **1998**.
23. Ibarra, D.; Río, J. C. d.; Gutiérrez, A.; Rodríguez, I. M.; Romero, J.; Martínez, M. J.; Martínez, Á T. Isolation of high-purity residual lignins from eucalypt paper pulps by cellulase and proteinase treatments followed by solvent extraction. *Enzyme. Microb. Tech.* **2004**, *35*, 173-181.
24. Del Río, J. C. Composition of non-woody plant lignins and cinnamic acids by Py-GC/MS, Py/TMAH and FT-IR. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2007**, *79*, 39-46.
25. Yang, H.; Appari, S.; Kudo, S.; Hayashi, J.; Kumagai, S.; Norinaga, K. Chemical structures and primary pyrolysis characteristics of lignins obtained from different preparation methods. *Nihon Enerugi Gakk.* **2014**, *93*, 986-994.
26. Williams, D. H.; Fleming, I. *Spectroscopic methods in organic chemistry*; McGraw-Hill: London, **1995**.
27. Fox, S. C.; McDonald, A. G. Chemical and thermal characterization of three industrial lignins and their corresponding lignin esters. *BioResour.* **2010**, *5*, 990-1009.
28. Summerskiy, I.; Pranovich, A.; Holmbom, B.; Willför, S. Lignin and Other Aromatic Substances Released from Spruce Wood During Pressurized Hot-Water Extraction, Part 2: Structural Characterization. *J. Wood Chem. Technol.* **2015**, *35*, 398-411.
29. Weston, A.; Brown, P. R. *HPLC and CE: principles and practice*; Academic Press: San Diego (Calif.), **1997**.

30. Beno, E.; Gora, R.; Hutta, M. Characterization of Klason lignin samples isolated from beech and aspen using microbore column size-exclusion chromatography. *J. Sep. Sci.* **2018**, *41*, *16*, 3195-3203.
31. Cathala, B.; Saake, B.; Faix, O.; Monties, B. Association behaviour of lignins and lignin model compounds studied by multidetector size-exclusion chromatography. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1020*, 229-239.