

مطالعه ساختار شیمیایی لیگنین از راه انحلال چوب در حلال

یونی ۱- بوتیل-۳-متیل ایمیدازولیوم کلرید

علی عبدالخانی*، سیداحمد میرشکرایی^۲، یحیی همزه^۱، سحاب حجازی^۱، آرزو نوری^۳

مجله علوم و تکنولوژی پلیمر،

سال بیست و چهارم، شماره ۴،

صفحه ۲۸۹-۲۷۹، ۱۳۹۰

ISSN: 1016-3255

۱- تهران، دانشگاه تهران، دانشکده منابع طبیعی کرج، گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، صندوق پستی ۳۱۵۸۵

۲- تهران، دانشگاه پیام نور، دانشکده علوم، صندوق پستی ۴۶۹۷-۱۹۳۹۵

۳- تهران، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، صندوق پستی ۱۱۵-۱۴۹۶۵

دریافت: ۸۹/۱۱/۲۴، پذیرش: ۹۰/۷/۲۶

چکیده

در این مطالعه، لیگنین توده چوب باقی مانده پس از استخراج لیگنین چوب آسیاب شده (MWL) با استفاده از حلال یونی ۱- بوتیل-۳-متیل ایمیدازولیوم کلرید حل شد. ساختار شیمیایی لیگنین MWL صنوبر (*Populus deltoides*) به همراه لیگنین توده باقی مانده با استفاده از روش‌های مختلف رنگ‌نگاری و طیف‌سنجی NMR تک‌بعدی و دو بعدی بررسی شد. بررسی ساختار لیگنین MWL با روش‌های گفته شده نشان داد، لیگنین چوب صنوبر *P. deltoides* از نظر ساختاری دارای واحدهای ۴- (۳- هیدروکسی-۱- پروپنیل)-۲- متوکسی فنول (لیگنین گویاسیل) بیشتری نسبت به ۴- (۳- هیدروکسی-۱- پروپنیل)-۶،۲- دی‌متوکسی فنول (لیگنین سیرنجیل) است. همچنین، لیگنین علاوه بر واحدهای گویاسیل و سیرنجیل از مقدار اندکی واحدهای پارا هیدروکسی بنزیل الکل تشکیل شده است. لیگنین باقی مانده در چوب پس از استخراج لیگنین به طور عمده از ساختارهای متراکم تشکیل شده است که در اغلب موارد به کربوهیدرات‌ها کمپلکس شده است. نسبت ساختارهای تشکیل دهنده لیگنین در چوب حل شده با حلال یونی با نسبت آنها در لیگنین استخراج شده با دیوکسان یکسان است. تحلیل HSQC ناحیه آنومری چوب حل شده نشان داد، ترکیب قندی قندهای کمپلکس شده با لیگنین شامل سلولوز، زایلان، مانان و آرابینان است. ناحیه زنجیر جانبی ساختار لیگنین شامل ساختارهای موجود شامل واحدهای β -O-4، فنیل کوماران، رزینول و اسپایرودی‌انون است.

واژه‌های کلیدی

لیگنین چوب آسیاب شده،

جداسازی، رنگ‌نگاری،

پلیمر طبیعی،

حلال یونی

* مسئول مکاتبات، پیام‌نگار:
abdolkhani@ut.ac.ir

مقدمه

لیگنین کوپلیمری ناهمگن از واحدهای فنیل پروپان است که به وسیله پیوندهای اتری و کربن - کربن به یکدیگر متصل شده است. این ماده به گیاه استحکام مکانیکی می‌دهد. هم‌چنین، سبب سهولت انتقال آب و مواد مغذی و حفاظت گیاه در برابر ریزموجودات می‌شود [۱]. به همین دلیل، بررسی کامل ساختار لیگنین از لحاظ زیستی اهمیت فراوانی دارد. افزون بر این، به منظور تولید فراورده‌های متعدد از چوب هم‌چون کاغذ، سوخت زیستی و مشتقات سلولوزی، لیگنین باید از چوب حذف شود. در نتیجه، ساختار شیمیایی لیگنین برای بهینه‌سازی فرایندها و شناخت واکنش‌های درگیر در حذف آن اهمیت بسیار زیادی دارد.

برای دهه‌های متمادی، پژوهشگران تلاش‌های زیادی برای جداسازی لیگنین بدون تغییر ساختار آن در اثر استخراج انجام دادند. اما، پلیمر شدن مونولیگنول‌ها در درون دیواره سلولی و در اطراف ژل پلی‌ساکاریدی رخ دهد که سبب اتصال مولکولی و احتمالاً پیوندهای محکم بین لیگنین و قندها می‌شود [۲،۳]. بنابراین، جداسازی کمی کل لیگنین عملاً ناممکن است. به دلیل امکان‌ناپذیری استخراج کل لیگنین، لیگنین چوب آسیاب شده (milled wood lignin, MWL) برای مدت‌های مدیدی به عنوان لیگنین نمایانگر لیگنین موجود در چوب شناخته می‌شد.

لیگنین چوب آسیاب شده (MWL) پس از آسیاب کردن و تخریب ساختار بلوری سلولوز دیواره سلولی به وسیله حلال آلی دیوکسان از چوب استخراج می‌شود [۴،۵]. در اثر آسیاب کردن، حلال‌ها به درون دیواره سلولی نفوذ و سبب استخراج بخش‌هایی از لیگنین با وزن مولکولی کم با بازده کمتر از ۵۰ درصد مقدار کل لیگنین می‌شوند [۶]. بنابراین، لیگنین استخراج شده MWL نمایانگر بخشی از ساختار لیگنین موجود در چوب و به طور دقیق‌تر لیگنینی است که به وسیله حلال دیوکسان از چوب قابل استخراج است.

تلاش‌های متعددی برای استخراج لیگنین باقی‌مانده در چوب پس از استخراج لیگنین MWL انجام شده است که به طور عمده شامل آب‌کافت آنزیمی چوب باقی‌مانده و استخراج متوالی با حلال دیوکسان است. اما روش‌های انجام شده بر اساس آب‌کافت آنزیمی و دیوکسان نیز بخش اندکی از لیگنین را استخراج می‌کند و در اغلب موارد سبب آلوده شدن لیگنین به ناخالصی پروتئینی می‌شود که این مسئله تحلیل ساختار لیگنین را پیچیده می‌کند. بنابراین، نتایج منتشر شده در باره ساختار لیگنین به مقدار زیادی بر اساس زیست‌سنتز، تحلیل طیف‌نگاری و مطالعات تخریبی MWL استوار شده است [۷]. به تازگی روشی برای انحلال کامل چوب آسیاب شده در ترکیب

دی‌متیل سولفوکسید و متیل ایمیدازول پس از استیل‌دار کردن آن ارایه شده است [۸]. اما این روش به آسیاب کردن شدید چوب به مدت زمان طولانی نیازمند است که سبب تخریب ساختار پلیمری چوب می‌شود. از حلال‌های یونی نیز برای مطالعات و تهیه فراورده‌های مختلف از چوب استفاده شده است [۹-۱۳]. حلال‌های یونی نمک‌های مذابی هستند که فشار بخار آنها در دمای محیط در حد صفر است و به دلیل دمای جوش زیاد امکان بازیابی کامل آنها در فرایندهای مختلف امکان‌پذیر است. از این رو، حلال‌های یونی به عنوان حلال‌های سازگار با طبیعت معرفی شده‌اند [۱۴].

از آن جا که حلال‌های آلی متداول فقط می‌توانند بخشی از ساختار لیگنین را استخراج کنند، به نظر می‌رسد انحلال کل توده در حلال یونی روشی مناسب برای بررسی ساختار لیگنین باقی‌مانده و در نهایت کل ساختار لیگنین در چوب باشد. در پژوهش حاضر، سعی شده است تا ساختار لیگنین و لیگنین باقی‌مانده در چوب پس از استخراج MWL از راه انحلال توده باقی‌مانده در حلال یونی با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی و رنگ‌نگاری مطالعه شود.

تجربی

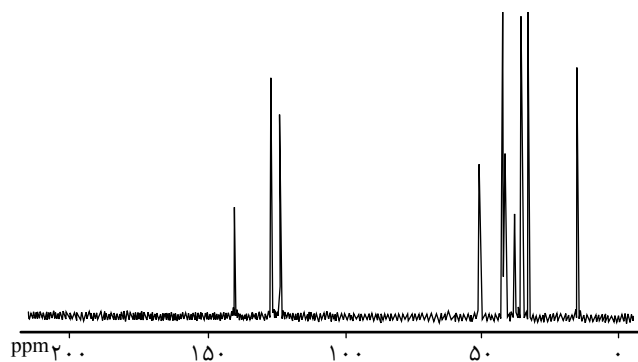
مواد

به منظور جداسازی و تهیه لیگنین از چوب صنوبر *Populus deltoides* با سن تقریبی ۱۵ سال، به دلیل داشتن رشد سریع در میان گونه‌های صنوبر، اهمیت آن در فرایندهای کاغذسازی و مناسب بودن رشد این گونه در ایران، استفاده شده است.

دستگاه‌ها و روش‌ها

تهیه و خالص‌سازی لیگنین MWL

MWL بر اساس روش ارایه شده توسط Lawther و همکاران جداسازی شد [۱۵]. ابتدا چوب صنوبر به وسیله آسیاب معمولی خرد و با الک با اندازه منافذ ۲۰ مش غربال شد. سپس، ذرات ۲۰ مش به وسیله استون به مدت ۴۸ h استخراج شد. پس از ۴۸ h آرد چوب به وسیله آب سرد به مدت ۱۰ min در دستگاه تولید صوت (sonifier) عمل‌آوری شد. آرد چوب عاری از مواد استخراجی به وسیله آسیاب تویبی چرخشی به مدت یک هفته در یک مخزن ۵ L به همراه گلوله‌هایی از جنس آلومینا آسیاب شد. سپس، چوب آسیاب شده به منظور یک‌دست شدن ذرات به مدت ۱ h در آسیاب مرکز‌گریز به وسیله ۴۰ گلوله ۳ mm آسیاب شد. چوب آسیاب شده با محلول دیوکسان: آب



شکل ۲- طیف ^{13}C NMR حلال ۱-N- بوتیل-۳-متیل ایمیدازولیوم کلرید.

هم زده شد. پس از یک شبانه روز چند قطره انیدرید استیک اضافه و اجازه داده شد تا محلول به مدت یک شبانه روز دیگر هم زده شود. پیش از اضافه کردن انیدرید استیک محلول به رنگ قهوه‌ای روشن بود که با افزودن انیدرید استیک محلول به رنگ قهوه‌ای تیره تغییر کرد و تقریباً چوب پس از اتمام واکنش به طور کامل وارد فاز محلول شد.

استخراج لیگنین از چوب حل شده

برای جداسازی لیگنین از چوب حل شده، محلول چوب به مقدار ۱ L محلول دیوکسان: آب (۹۶:۴ V/V) اضافه و به مدت ۶ h در دمای محیط هم زده شد. با اضافه شدن محلول چوب بخشی از آن ته نشین و مقداری از آن حل شد. پس از صاف کردن بخش‌های نامحلول، حلال با کمک خلاء در دمای 40°C درجه تبخیر و محلول غلیظ شده به اتر اضافه شد تا لیگنین ته نشین شود. لیگنین ته نشین شده با کمک اتر شست و شو و با خشک‌کن انجمادی خشک شد.

استیل‌دار کردن

نمونه‌های لیگنین ابتدا در ۱-متیل ایمیدازول حل و سپس به محلول چند قطره انیدرید استیک اضافه شد. پس از ۱ h، واکنش با اضافه کردن متانول و آب متوقف و تمام حلال‌ها در فشار ۰/۶۵ mbar تبخیر شد [۱۶].

رنگ‌نگاری Py-GC/MS

پیرولیز لیگنین به منظور تعیین ناخالصی‌ها و نسبت واحدهای سیرنجیل به گویاسیل انجام شد. پیرولیز به وسیله دستگاه پیرولیز Curie-point flash متصل به رنگ‌نگار گازی (GC/MS) ساخت شرکت Agilent مدل 6890 و ستون DB-5 ($30\text{m} \times 0.25\text{mm}$) انجام شد. کوره از 40°C تا 300°C با سرعت $30^\circ\text{C}/\text{min}$ گرم شد. از گاز هلیوم به عنوان فاز حامل استفاده شد. محصولات در طیف‌سنج جرمی نسبت به مخزن اطلاعاتی Wiley و NIST شناسایی شدند.

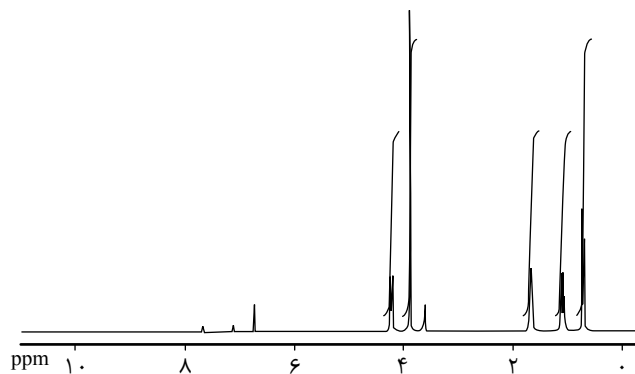
(۹۶:۴، ۱۰ mL/g) طی ۳ مرحله ۲۴ h (۷۲ h) استخراج شد. لیگنین خام از بخش محلول پس از تفکیک به وسیله نیروی مرکزگریز (۸۰۰۰ rpm) و تغلیظ، به وسیله خشک‌کن انجمادی جداسازی شد. برای خالص‌سازی لیگنین MWL، لیگنین خام در مقدار ۱۰ mL استیک اسید ۹۰ درصد حل و در ۴۰۰ mL آب ته نشین شد. لیگنین ته نشین شده پس از خشک کردن به وسیله خشک‌کن انجمادی، در مقدار ۲۰ mL حلال دی‌کلرواتان: اتانول (۲:۱ V/V) حل و در دی‌اتیل اتر ته نشین شد تا لیگنین خالص به دست آید. لیگنین خالص در خشک‌کن انجمادی خشک شد.

تهیه حلال ۱-N-بوتیل-۳-متیل ایمیدازولیوم کلرید (BmimCl)

تهیه مایع یونی بر اساس روش Huddleston [۹]، با اندکی اصلاح انجام شد. مقدار ۰/۲۵ mol از ۱-کلر بوتان و ۱-متیل ایمیدازول (d 6) در بالن ته گرد قرار داده شد. پس از متصل کردن بالن به چگالنده، مجموعه به مدت ۳ روز در دمای 70°C با هم‌زن مغناطیسی هم زده شد تا محلول دوفاز شد. فاز بالایی شامل ترکیبات واکنش نداده از محلول خارج و با کمک اتیل استات استخراج شد. عملیات استخراج ۳ مرتبه تکرار شد و پس از مرحله‌نهایی بقیه اتیل استات به وسیله خلاء و دمای 70°C از محلول تبخیر شد. ۱-N-بوتیل-۳-متیل ایمیدازولیوم کلرید محلولی زرد رنگ است که بسته به مقدار آب موجود در دمای محیط بلوری می‌شود. طیف‌های ^1H NMR و ^{13}C NMR ۱-N-بوتیل-۳-متیل ایمیدازولیوم کلرید به ترتیب در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است.

عمل آوری با حلال یونی

مقدار ۰/۵ g آردچوب باقی‌مانده با ۱۰ g محلول BmimCl و ۳ mL از DMSO-d₆ مخلوط و با سرعت ۸۰۰ rpm به مدت یک شبانه روز



شکل ۱- طیف ^1H NMR حلال ۱-N- بوتیل-۳-متیل ایمیدازولیوم کلرید.

زیر انجام گرفت: پهنای پالس ۹۰ درجه، زمان پویش (جمع آوری داده) ۱/۴ s، دوره تأخیر ۴ s و تعداد ۲۰۰۰ پویش. نمونه‌های عادی و استیل دار شده آنها بررسی شدند.

طیف‌سنجی NMR دو بعدی HSQC

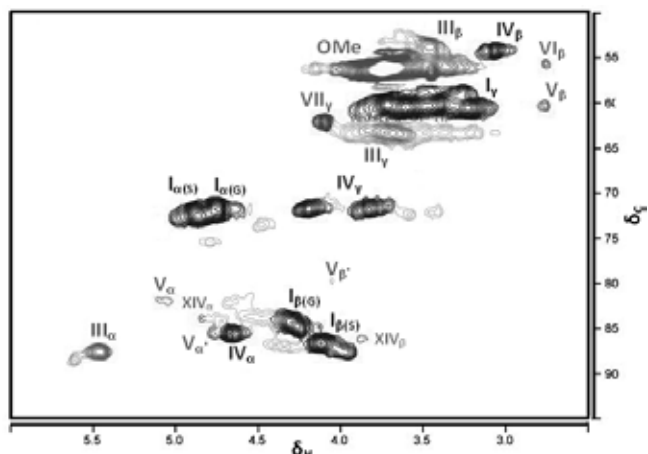
HSQC به وسیله دستگاه طیف‌سنج MERCURY 400 مجهز به کائوچو Z ثبت شد. از DMSO-d₆ به عنوان حلال استفاده شد. محلول

طیف‌سنجی ¹³C NMR

از طیف‌سنجی ¹³C NMR برای بررسی اولیه کیفی ساختار لیگنین استخراج شده از چوب حل شده استفاده شد. آزمون ¹³C NMR لیگنین‌ها به وسیله دستگاه طیف‌سنج رزونانس مغناطیسی هسته 400MHz ساخت BRUKER انجام شد. در هر مورد مقداری از نمونه حل شده با مقداری از دی‌متیل سولفوکسید (DMSO-d₆) مخلوط و آزمون با لوله‌های آزمون ۵ mm انجام شد. عملیات پویش در شرایط دوره‌ای

جدول ۱- ترکیب مونومری شناسایی شده به وسیله طیف‌سنجی جرمی لیگنین چوب آسیاب شده پس از پیرولیز.

شماره	ترکیب	نسبی فراوانی (%)	منشا	شماره	ترکیب	نسبی فراوانی (%)	منشا
۱	4-Hydroxybenzaldehyde	۰/۸	H	۳۶	trans-Coniferyl alcohol	۴/۳	G
۲	Phenol	۱/۵	H	۳۷	trans-Coniferaldehyde	۴/۷	G
۴	Methylphenol	۱/۲	H	۱۰	Syringol	۸/۱	S
۶	Dimethylphenol	۱/۴	H	۱۳	4-Methylsyringol	۴/۲	S
۳	Guaiacol	۹	G	۱۸	4-Ethylsyringol	۱	S
۵	4-Methylguaiacol	۷	G	۲۱	4-Vinylsyringol	۴/۲	S
۷	4-Ethylguaiacol	۱/۵	G	۲۳	4-Allylsyringol	۱/۱	S
۸	4-Vinylguaiacol	۸/۳	G	۲۶	cis-Propenylsyringol	۰/۹	S
۹	Eugenol	۱/۵	G	۲۷	Propine-syringol	۰/۶	S
۱۱	cis-Isoeugenol	۱/۳	G	۲۸	Propine-syringol	۰/۷	S
۱۲	trans-Isoeugenol	۴/۹	G	۲۹	trans-Propenylsyringol	۳/۲	S
۱۴	Vanillin	۴/۷	G	۳۱	Syringaldehyde	۴/۲	S
۱۵	Propine-guaiacol	۱/۵	G	۳۳	Homosyringaldehyde	۱	S
۱۶	Propine-guaiacol	۱/۴	G	۳۴	Syringic acid methyl ester	۰/۵	S
۱۷	Homovanillin	۱/۵	G	۳۵	Acetosyringone	۲/۲	S
۱۹	Vanillic acid methyl ester	۰/۵	G	۳۸	Syringylacetone	۰/۵	S
۲۰	Acetoguaiacone	۲/۶	G	۳۹	Propiosyringone	۰/۴	S
۲۲	Guaiacyl-acetone	۱	G	۴۰	Syringyl vinyl ketone	۱	S
۲۴	Propiovanillone	۰/۴	G	۴۱	Dihydrosinapyl alcohol	۰/۳	S
۲۵	Guaiacyl vinyl ketone	۲/۲	G	۴۲	cis-Sinapyl alcohol	۰/۳	S
۳۰	Dihydroconiferyl alcohol	۰/۲	G	۴۳	trans-Sinapyl alcohol	۱/۵	S
۳۲	cis-Coniferyl alcohol	۰/۸	G	۴۴	trans-Sinapaldehyde	۴	S

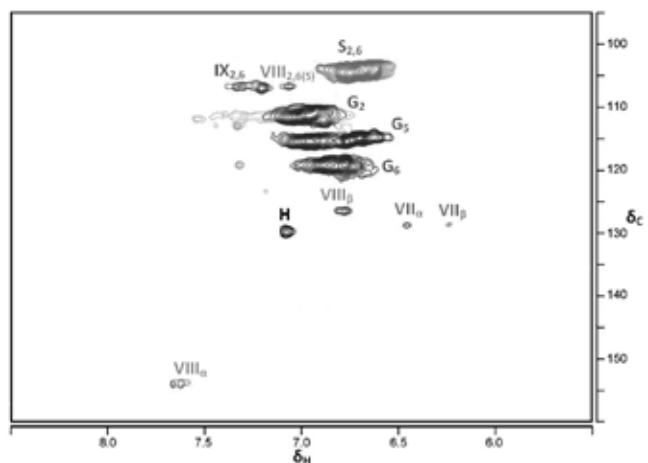


شکل ۴- طیف HSQC ناحیه زنجیر جانبی لیگنین MWL.

S را بیشتر از حد واقعی نشان می‌دهد که این مسئله به دلیل درصد کمتر این واحدها در لیگنین است [۱۸]. بیشتر بودن مقدار واحدهای گویاسیل در گونه *P. deltooides* برخلاف سایر گونه‌های پهن برگ مانند اکالیپتوس که در آن واحدهای سیرنجیل بیشتر هستند [۱۹]، یک عامل بازدارنده برای انجام پخت‌های قلیایی است، زیرا ساختارهای گویاسیل پتانسیل بیشتری را برای واکنش‌های تراکمی، به دلیل آزاد بودن موقعیت ۳ یا ۵ حلقه بنزیلی دارند [۲۰]. بنابراین به طور نظری، ساختارهای G مقاومت بیشتری را در برابر شرایط قلیایی پخت نشان می‌دهند. تعیین درصد تراکم لیگنین عامل مهمی برای تعیین کارایی پخت چوب *P. deltooides* است.

آزمون ^{13}C - ^1H HSQC

NMR دوبعدی روشی قوی برای بررسی ساختار لیگنین است که به وسیله آن می‌توان اطلاعاتی درباره ساختار و پیوندهای



شکل ۵- طیف HSQC ناحیه آروماتیک لیگنین MWL.

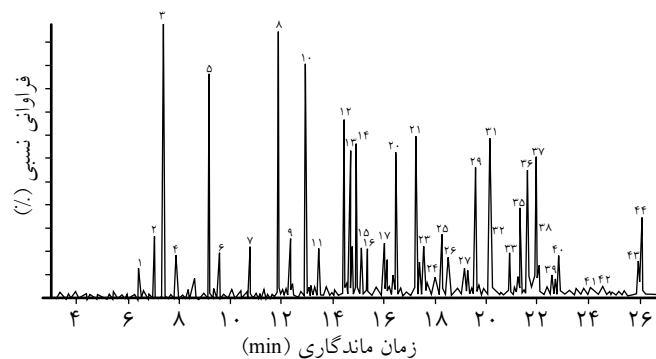
۲۰ درصد لیگنین در لوله‌های آزمون ۵ mm قرار داده شد و آزمون انجام شد.

پهنای طیف برای ابعاد پروتون و کربن به ترتیب ۵۰۰۰ و ۱۳۲۰۰ Hz در نظر گرفته شد. برای پروتون تعداد ۲۰۴۸ پوش با تأخیر ۵ s انجام شد. مقدار J_{CH}^1 در حد ۱۴۰ Hz قرار داده شد. تأخیر تکامل جفت شدن J، ۵ میکروثانیه در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

آزمون پیرولیز- رنگ‌نگاری گازی- طیف سنجی جرمی

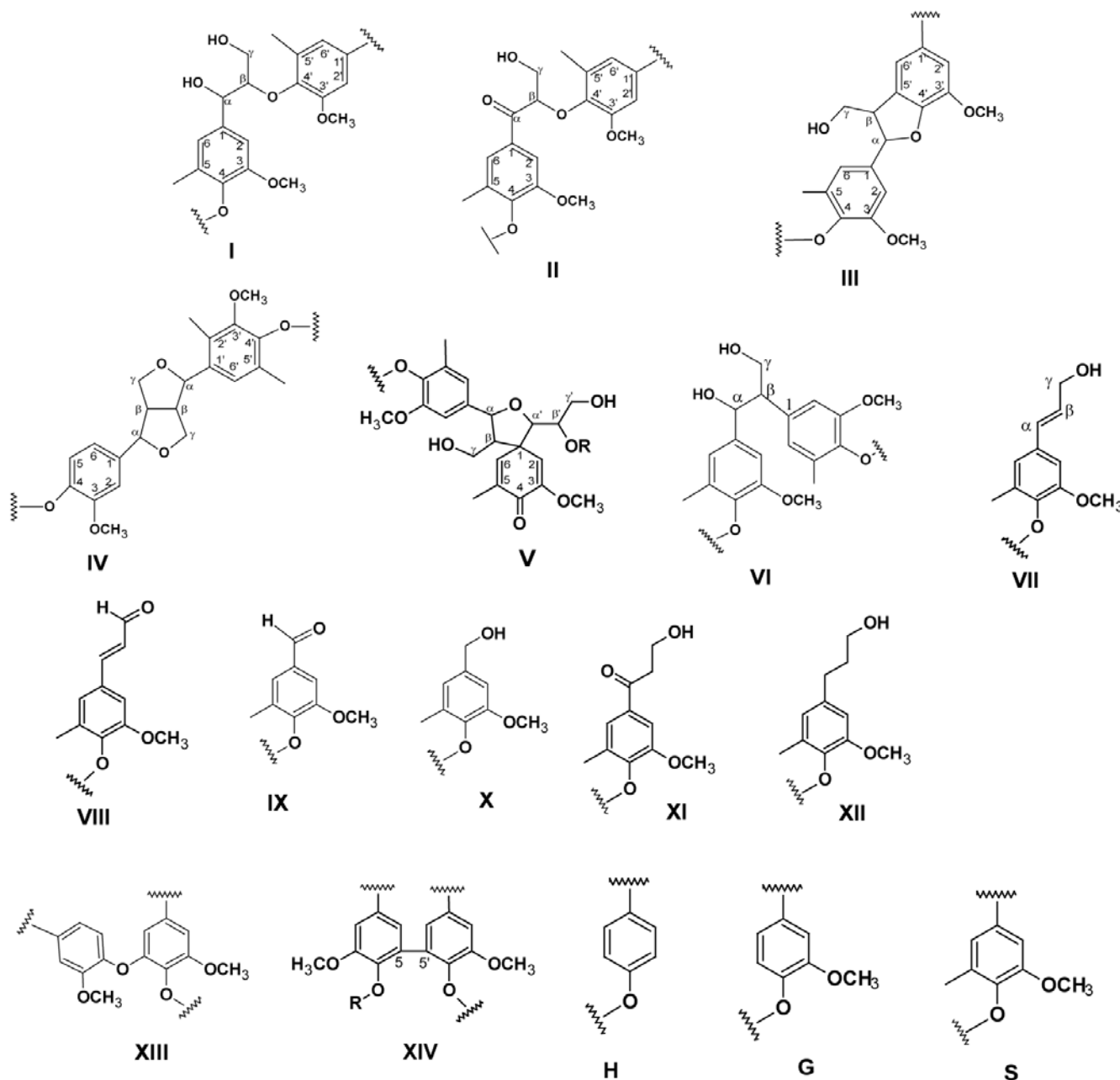
Py-Gc/MS روشی سریع برای بررسی ساختار لیگنین است. از این روش به مقدار زیادی برای تعیین نسبت S/G در پهن‌برگان استفاده شده است [۱۷]. رنگ‌نگار لیگنین چوب آسیاب شده *P. deltooides* در شکل ۳ نشان داده شده است. ساختارهای شناسایی شده ناشی از لیگنین به همراه فراوانی نسبی مولی آنها در جدول ۱ نشان داده شده است. در میان این ترکیبات فنول‌های گویاکول و سیرنجول مشتق شده از واحدهای گویاسیل و سیرنجیل شناسایی شده‌اند. تنها مقدار اندکی از فنول‌های مشتق شده از پاراهیدروکسی سینامیل در میان ترکیبات شناسایی شدند. بیشترین ترکیبات شناسایی شده شامل گویاکول (۳)، ۴-متیل گویاکول (۵)، ۴-وینیل گویاکول (۸) و سیرنجول (۱۰) هستند. برخلاف سایر پهن‌برگان آزمون نشان می‌دهد که واحدهای مشتق شده از گویاسیل به مقدار قابل ملاحظه‌ای از واحدهای سیرنجیل بیشتر هستند. نسبت H:G:S در لیگنین گونه *P. deltooides* در حدود ۴۰:۵۹:۵ است. نسبت S/G ناشی از ترکیبات لیگنینی در حدود ۰/۶۷ است. این مقدار تقریباً ۱/۱ برابر مقدار به دست آمده از نتایج NMR است. پژوهش‌های Sarkanen و همکاران نشان داده است، نتایج به دست آمده از روش‌های تخریبی مقدار واحدهای



شکل ۳- پیروگرام اجزای ساختاری لیگنین چوب آسیاب شده.

بین مولکولی لیگنین به دست آورد. در سال‌های اخیر، ساختارهایی مانند دی‌بنزودی‌اکسوسین و اسپایرودی‌انون‌ها با کمک این روش در لیگنین شناسایی شده‌اند [۲۱، ۲۲]. طیف HSQC لیگنین *P. deltoideis* ارتباط اتم‌های ^{13}C - ^1H سه ناحیه آلیفاتیک، زنجیر جانبی و آروماتیک را به طور مجزا نشان می‌دهد. ناحیه آلیفاتیک (بدون اکسیژن) بجز در متیل استات‌ها در لیگنین استیل‌دار شده اطلاعات ساختاری دیگری را نشان نمی‌دهد. ($\delta_{\text{C}}-\delta_{\text{H}}$ ۲۱/۲/۲-۲/۳ و ۲۱/۱/۸-۲/۱ ppm) ناحیه مربوط به زنجیر جانبی ($\delta_{\text{C}}-\delta_{\text{H}}$ ۵۰-۹۵/۲/۵-۶ ppm) و آروماتیکی

نشان داده شده است. ساختارها و اتصالات شناسایی شده مربوط به این شکل‌ها در جدول ۲ آمده است. فرمول شیمیایی ساختارهای شناسایی شده در طرح ۱ نشان داده شده است. ناحیه مربوط به زنجیر جانبی طیف (شکل ۴) اطلاعات مفیدی در باره اتصالات بین مولکولی صنوبر *P. deltoideis* ارائه می‌دهد. در این شکل علامت غالب طیف مربوط به اتصالات β -O-4 است (ساختار I). ارتباط اتم‌های C_{α} - H_{α} مربوط به اتصالات β -O-4 اتر را در ۷۱، ۶/۴، ۷۴ و ۴/۴، ۸۶ و ۷۲ ppm $\delta_{\text{C}}-\delta_{\text{H}}$



طرح ۱- ساختارهای بررسی شده در لیگنین.

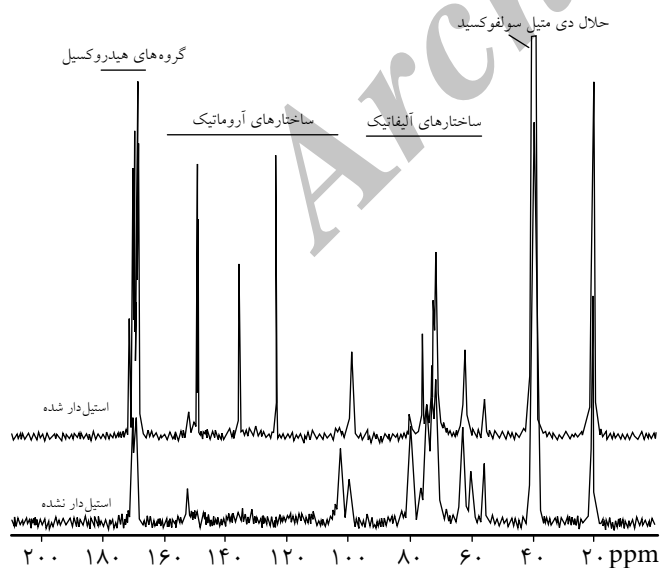
جدول ۲- ارزیابی جا به جایی شیمیایی HSQC مربوط به ساختارهای مختلف لیگنین صنوبر *P. deltoids*

اتصال پیوند	جابه جایی شیمیایی $\delta_C - \delta_H$ (ppm)	ساختار
$C_\beta - H_\beta$ in phenylcoumaran substructures (III)	۵۳/۷-۳/۴	III β
$C_\beta - H_\beta$ in resinol substructures (IV)	۵۴/۱-۳	IV β
$C_\beta - H_\beta$ in β -1' substructures (VI)	۵۵/۶-۲/۷	VI β
C-H in methoxyls	۵۶/۲-۳/۷	-OMe
$C_\gamma H_\gamma$ in β -O-4' substructures (I)	۶۰/۱-۳:۳/۷	I γ
$C_\beta - H_\beta$ in spirodienone substructures (V)	۶۰/۳-۲/۷	V β
$C_\gamma - H_\gamma$ in cinnamyl (sinapyl/coniferyl) alcohol end-groups (VII)	۶۱/۹-۴	VII γ
$C_\gamma - H_\gamma$ in phenylcoumaran substructures (III)	۶۳/۲-۳/۷	III γ
$C_\alpha - H_\alpha$ in β -O-4' linked to a G unit (I)	۷۱/۶-۴/۷	I α (G)
$C_\gamma - H_\gamma$ in resinol substructures (IV)	۷۱/۷-۳/۸:۴/۱	IV γ
$C_\alpha - H_\alpha$ in β -O-4' linked to a S unit (I)	۷۲/۴-۴/۸	I α (S)
$C_{\beta'} - H_{\beta'}$ in spirodienone substructures (V)	۷۹/۸-۴/۱	V β'
$C_\alpha H_\alpha$ in spirodienone substructures (V)	۸۱/۷-۵	V α
$C_\alpha - H_\alpha$ in 5-5' (dibenzodioxocin) substructures (XIV)	۸۳/۶-۴/۸	XIV α
$C_\beta - H_\beta$ in β -O-4' linked to a G unit (I)	۸۴/۱-۴/۲	I β (G)
$C_\alpha - H_\alpha$ in resinol substructures (IV)	۸۵/۵-۴/۶	IV α
$C_\beta - H_\beta$ in 5-5' (dibenzodioxocin) substructures (XIV)	۸۵/۹-۳/۸	XIV β
$C_\alpha H_{\alpha'}$ in spirodienone substructures (V)	۸۶/۶-۴/۳	V α'
$C_\beta - H_\beta$ in β -O-4' linked to a S unit (I)	۸۶/۴-۴/۱	I β (S)
$C_\alpha - H_\alpha$ in phenylcoumaran substructures (III)	۸۷/۴-۵/۴	III α
$C_{2,6} - H_{2,6}$ in etherified syringyl units (S)	۱۰۴/۷-۶/۷	S2,6
$C_{2,6} - H_{2,6}$ in sinapaldehyde end-groups (VIII)	۱۰۶/۸-۷	VIII2,6(S)
$C_{2,6} - H_{2,6}$ in oxidized ($C\alpha=O$) phenolic syringyl units (IX)	۱۰۷-۷/۳:۷/۱	IX2,6
$C_2 - H_2$ in guaiacyl units (G)	۱۱۱-۶/۷	G2
$C_5 - H_5$ in guaiacyl units (G)	۱۱۵/۴-۶/۷:۶/۹	G5
$C_6 - H_6$ in guaiacyl units (G)	۱۱۹/۵-۶/۷	G6
$C_\beta - H_\beta$ in cinnamyl aldehyde end-groups (VIII)	۱۲۶/۷-۶/۷	VIII β
$C_\beta - H_\beta$ in cinnamyl alcohol end-groups (VII)	۱۲۹-۶/۲	VII β
$C_\alpha - H_\alpha$ in cinnamyl alcohol end-groups (VII)	۱۲۹-۶/۴	VII α
$C_\alpha - H_\alpha$ in cinnamyl aldehyde end-groups (VIII)	۱۵۳/۸-۷/۶	VIII α

الکل (گروه‌های انتهایی) (VII) با ارتباط‌های α و β مشاهده شده در $129/6.23$ و $6/6.45$ و 129 و سینامیل آلدئید با ارتباط $1538/7.63$ و $7/6.77$ و 126 برای موقعیت α و β است.

بررسی لیگنین باقی مانده

به کمک روش‌های موجود برای جداسازی لیگنین از چوب فقط می‌توان بخشی از لیگنین را استخراج کرد. روش‌هایی برای جداسازی لیگنین باقی مانده پس از استخراج MWL پیشنهاد شده است که شامل عمل‌آوری مجدد آنزیمی و به کارگیری حلال‌های یونی است. در پژوهش حاضر، لیگنین موجود در توده چوب باقی مانده پس از استخراج لیگنین MWL با استفاده از انحلال در حلال یونی جداسازی شد. لیگنین جداسازی شده از توده حل شده در حلال یونی دارای مقدار کمی لیگنین و حاوی مقدار قابل توجهی ناخالصی از جنس کربوهیدرات است. طیف ^{13}C NMR ساختار جداسازی شده دارای علامت‌های ضعیفی در ناحیه آروماتیک ($160-102$ ppm) است. این امر نشان می‌دهد، لیگنین موجود در چوب باقی مانده عمدتاً به شکل کمپلکس شده با کربوهیدرات‌هاست (LCC) و حداقل با روش به کار گرفته شده در این پژوهش قابل جداسازی نیست (شکل ۶). به همین دلیل در ادامه سعی شد تا پس از حل کردن چوب، ساختار لیگنین در چوب حل شده با استفاده از روش آزمون NMR دوبعدی تحلیل شود.



شکل ۶- طیف ^{13}C NMR لیگنین استیل دار شده و نشده استخراجی از چوب باقی مانده حل شده در حلال یونی.

به ترتیب برای ساختارهای G و S می‌توان مشاهده کرد. به همین ترتیب، ارتباطات $C_{\beta}-H_{\beta}$ برای پیوندهای متصل به G در $84.1/4.28$ و $\delta_C-\delta_H$ برای واحدهای متصل به S در $86/4.11$ مشاهده می‌شود. در $C_{\gamma}-H_{\gamma}$ در واحدهای $\beta-O-4$ در $1/3.72, 3.40$ و 60 ppm مشاهده می‌شود.

افزون بر $\beta-O-4$ سایر واحدهای موجود در لیگنین نیز با این روش شناسایی شدند. علامت واحدهای رزینولی ($\beta-\beta'/\alpha-O-\gamma'/\gamma-O-\alpha$) (ساختار IV) در طیف قابل مشاهده هستند. علامت‌های α و β و دوگانه γ این ساختارها به ترتیب در $54.1/85.5, 3.06/4.67$ و $7/3.83$ و 71 ppm دیده می‌شوند. علامت‌های α و β واحدهای فنیل کوماران (اتصالات $\beta-5', \alpha-O-4'$) در $87.4/5.47$ و 53 و 53 ppm هم چنین علامت‌های γ آن در $2/3.72$ و 63 ظاهر می‌شوند.

علامت کوچک ساختار اسپایرودی انون (V) ($\beta-1\alpha-O-\alpha$) برای موقعیت α و β در $81.7/5.90$ و $3/2.75$ و 60 دیده می‌شود. علامت β ساختارهای $\beta-1$ (VI) در 55 و $6/2.76$ ppm مشاهده می‌شود. در لیگنین‌های تهیه شده از *P. deltoidea* ساختارهای دی‌بنزودی‌اکسوسین ($(XIV)(5-5', \alpha-O-4', \beta-O-4'')$) در $83.6/4.83$ و 88 و $85/3$ نیز دیده می‌شوند. واحدهای $5-5'$ یکی از ساختارهای مهم لیگنین سوزنی برگان است [۲۳] که به عنوان یک نقطه انشعاب در لیگنین عمل می‌کند و به ندرت در لیگنین پهن برگان دیده می‌شود [۲۴]. در نهایت، علامت‌های مربوط به $C_{\gamma}-H_{\gamma}$ در $9/4.90$ و 61 ppm مربوط به سینامیل الکل (VII) نیز در طیف HSQC صنوبر *P. deltoidea* مشاهده می‌شود.

علامت‌های مهم ناحیه آروماتیکی طیف HSQC لیگنین تهیه شده به طور عمده به حلقه‌های بنزیلی واحدهای مختلف مربوط می‌شود (شکل ۵). در این شکل، علامت‌های مربوط به سیرنجیل و گویاسیل به خوبی ملاحظه می‌شود. لیگنین سیرنجیل علامت غالب را برای $C_{2,6}-H_{2,6}$ در $7/6.69$ و 104 نشان می‌دهد، در حالی که واحدهای گویاسیل ارتباط‌های مختلفی برای C_2-H_2 در $6/6.99$ و 116 ، C_5-H_5 در $4/6.94, 6.72$ و 115 و $5/6.77$ و 119 نشان می‌دهد. علامت‌های دوگانه C_3-H_3 نشان دهنده وجود ناهمگنی احتمالی در موقعیت C_3 حلقه است که می‌تواند ناشی از برخی واحدهای فنولی و اتری این ساختارها باشد.

علامت‌های مربوط به $C_{2,6}-H_{2,6}$ واحدهای سیرنجیل اکسید شده در موقعیت α (XIX) در جابه‌جایی $106.8/7.32$ ، 119 و $107/7$ مشاهده می‌شوند. علامت ضعیف واحدهای پاراهیدروکسی بنزیل (H) در جابه‌جایی 2 و $130/7$ ppm طیف HSQC لیگنین‌های تهیه شده مشاهده می‌شود. سایر علامت‌های تحلیل شده شامل واحدهای سینامیل

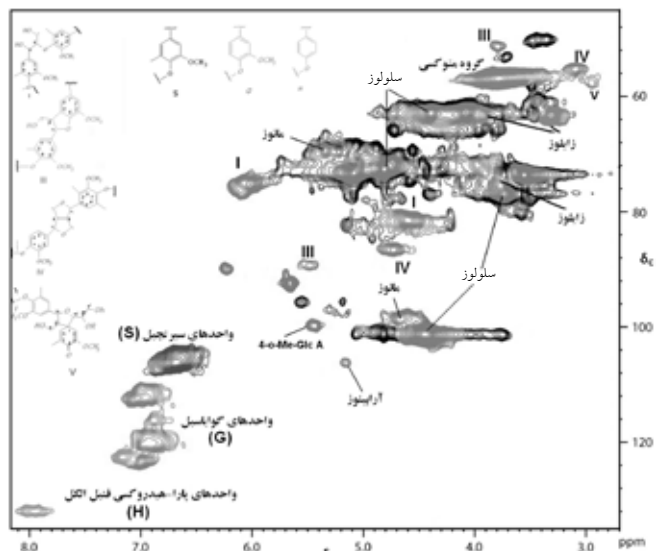
مشخص شده است، ساختارهای موجود شامل واحدهای β -O-4، فنیل کوماران، رزینول و اسپایرودی انون است. در ناحیه آروماتیک بخش‌هایی از لیگنین گویاسیل و سیرنجیل مشاهده می‌شود. شکل دوگانه لیگنین گویاسیل نشان‌دهنده ناهمگنی این لیگنین در C_4 که به دلیل اتری بودن برخی از ساختارها و فنولی بودن بخش دیگر است. ساختارهای متراکم در لیگنین باقی‌مانده چوب صنوبر *P. deltoideis* به خوبی دیده می‌شوند. این امر نشان می‌دهد، لیگنین باقی‌مانده عمدتاً از بخش لایه میانی سلول چوبی ناشی می‌شود که دارای درصد تراکم بیشتری است. تحلیل بیشتر این نوع عمل‌آوری به پژوهش‌های بیشتری نیازمند است. همان‌طور که در شکل ۸ مشاهده می‌شود، بخش اعظم ساختارهای حل شده (بخش‌های تیره) هنوز شناسایی نشده و نیازمند بررسی‌های بیشتر است.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد، استفاده از حلال‌های یونی به منظور انحلال ساختار چوب می‌تواند روش مناسبی برای مطالعه پلیمرهای چوب باشد. استفاده از حلال BmimCl در شرایط به کار رفته در این پژوهش دارای کارایی مناسبی در انحلال نمونه‌های با مقدار لیگنین کم است. ترکیب روش به کار گرفته شده به همراه روش طیف‌سنجی NMR دوبعدی HSQC در شناسایی ساختارهای قندی به همراه لیگنین بسیار مفید است. حلال دیوکسان قابلیت انحلال ساختارهای لیگنینی با وزن مولکولی زیاد را ندارد. مطالعات مختلف با روش‌های رنگ‌نگاری و طیف‌سنجی نشان داد، لیگنین صنوبر *P. deltoideis* برخلاف بیشتر پهن برگان به طور عمده از واحدهای گویاسیل تشکیل شده و لیگنین باقی‌مانده در توده چوب از ساختارهای متراکم تشکیل شده که با کربوهیدرات‌ها کمپلکس شده است.

مراجع

- Sederoff R.D., MacKay J., Ralph J., and Hatfield R., Unexpected Variation in Lignin, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2**, 145-152, 1999.
- Ikeda T., Holtman K., Kadla J., Chang H., and Jameel H., Studies on the Effect of Ball Milling on Lignin Structure Using a Modified DFRC Method., *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 129-135. 2002.
- Sakagami H., Zhou L., Hashimoto K., Hasegawa H., Satoh K., Kitajima M., Oizumi H., Oizumi T., Maeda Y., Osawa K., Yamamoto M., and Utsumi K., Activation Mechanism of Macrophages by Lignin Fractions, *J. Pharmacol. Sci.*, **109**, 196-208, 2009.
- Fengel D., Ideas on the Ultrastructural Organization of the Cell



شکل ۷- طیف HSQC آرد چوب صنوبر *P. deltoideis* باقی‌مانده از استخراج لیگنین.

بررسی ساختار چوب حل شده

شکل ۷ طیف ^{13}C - 1H HSQC چوب حل شده در کمپلکس [DMSO- d_6]:[C4mimCl] را نشان می‌دهد. تحلیل بخش‌های مختلف طیف روی شکل و با استفاده از جدول ۲ انجام شده است. نتایج نشان می‌دهد، ساختار چوب باقی‌مانده به طور عمده حاوی ترکیبات ناشی از قندهای چوب است که با ساختارهای ناشی از لیگنین در بخش‌های مختلف کمپلکس شده‌اند. این طیف نشان می‌دهد، ساختار لیگنین از واحدهای گویاسیل و سیرنجیل و مقدار اندکی واحدهای پاراهیدروکسی بنزیل الکل تشکیل شده است. به نظر می‌رسد، نسبت به دست آمده با لیگنین استخراج شده به وسیله دیوکسان نیز در این نوع لیگنین صادق است. همان‌طور که گفته شد، نسبت عمده ترکیب باقی‌مانده در چوب پس از استخراج لیگنین شامل پلی‌ساکاریدهاست. تحلیل ناحیه آنومری ۶-۵۰/۳-۹۰- δ_c - δ_H نشان می‌دهد، ترکیب قندی شامل سلولوز، زایلان، مانان و آرابینان است. ناحیه زنجیر جانبی ساختار لیگنین، همان‌طور که در شکل نیز

- Wall Components, *J. Polym. Sci. C*, **36**, 383-392, 1971.
5. Bjorkman A., Studies on Finely Divided Wood, Part I. Extraction of Lignin with Neutral Solvents, *Svensk Papperstidn*, **59**, 477-485, 1956.
 6. Hon D.N.S. and Glasser W.G., Effect of Mechanical Action on Wood and Fiber Components, *Tappi J.*, **62**, 107-110, 1979.
 7. Lai Y.Z. and Guo X.P., Variation of the Phenolic Hydroxyl Group Content in Wood Lignins, *Wood Sci. Technol.*, **25**, 467-472, 1991.
 8. Holtman K., Chang H.M., and Kadla J., Solution State Nuclear Magnetic Resonance Study of the Similarities between Milled Wood Lignin and Cellulolytic Enzyme Lignin, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 720-726, 2004.
 9. Lu F. and Ralph J., Non-degradative Dissolution and Acetylation of Plant Cell Walls: High-Resolution Solution State NMR, *Plant J.*, **35**, 535-544, 2003.
 10. Huddleston J., Reichert M.W., Willauer H.D., and Rogers G., Characterization and Comparison of Hydrophilic and Hydrophobic Room Temperature Ionic Liquids Incorporating the Imidazolium Cation, *Green Chem.*, **3**, 156-164, 2001.
 11. Fukaya Y., Hayashi K., Wada M., and Ohno H., Cellulose Dissolution with Polar Ionic Liquids under Mild Conditions: Required Factors for Anions, *Green Chem.*, **10**, 44-46, 2008.
 12. Cuissinat C., Navard P., and Heinze T., Swelling and Dissolution of Cellulose. Part IV: Free Floating Cotton and Wood Fibres in Ionic Liquids, *Carbohydr. Polym.*, **4**, 590-596, 2008.
 13. El Seoud O.A., Koschella A., Fidale L.C., Dorn S., and Heinze T., Applications of Ionic Liquids in Carbohydrate Chemistry: A Window of Opportunities, *Biomacromolecules*, **9**, 2629-2647, 2007.
 14. Swatloski R.P., Spear S.K., Holbrey J.D., and Rogers R.D., Dissolution of Cellulose with Ionic Liquids, *J. Am. Chem. Soc.*, **18**, 4974-4975, 2002.
 15. Welton T., Room-Temperature Ionic Liquids. Solvents for Synthesis and Catalysis., *Chem. Rev.*, **8**, 2071-2083, 1999.
 16. Lu F. and Ralph J., Non-degradative Dissolution and Acetylation of Ball-milled Plant Cell Walls: High-resolution Solution-state NMR, *Plant J.*, **35**, 535-544, 2003.
 17. Lawther J.M., Sun R.C., and Banks W.B., Isolation and Characterization of Organosolv Lignin under Alkaline Condition from Wheat Straw., *Int. J. Polym. Anal. Charact.*, **3**, 159-175, 1997.
 18. Del Rio J.C., Gutierrez A., Rodriguez I.M., Ibarra D., and Martinez A.T., Composition of Non-woody Plant Lignins and Cinnamic acids by Py-GC/MS, Py/TMAH and FT-IR, *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, **79**, 39-46, 2007.
 19. Sarkanen K.V., Chang H.M., and Allan G.G., Species Variation in Lignins. 2. Conifer Lignins, *Tappi J.*, **50**, 583-587, 1967.
 20. Rencoret J., Gutierrez A., and del Rio J.C., Lipid and Lignin Composition of Woods from Different Eucalypt Species, *Holzforchung*, **61**, 165-174, 2007.
 21. Zhang L. and Gellerstedt G., NMR Observation of a New Lignin Structure, a Spiro-Dienone, *Chem. Commun.*, **24**, 2744-2745, 2001.
 22. Karhunen P., Rummakko P., Sipila J., Brunow G., and Kilpelinen I., Dibenzodioxocins A Novel Type of Linkage in Softwood Lignins., *Tetrahed. Lett.*, **36**, 169-170, 1995.
 23. Ralph J., Lundquist K., Brunow G., Lu F., Kim H., Schatz P., Marita J., Hatfield R., Ralph S., Christensen J., and Boerjan W., Lignins: Natural Polymers from Oxidative Coupling of 4-Hydroxyphenylpropanoids, *Phytochemistry*, **3**, 29-60, 2004.
 24. Ikeda T., Holtman K., Kadla J.F., Chang H.M., and Jameel H., Studies on the Effect of Ball Milling on Lignin Structure Using a Modified DFRC Method, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 129-135, 2002.