

# Qualifizierung von Abbauprodukten in den Ablaugen der Zellstoffindustrie

vom Fachbereich C (Mathematik und Naturwissenschaften)  
der Bergischen Universität Wuppertal  
genehmigte Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
-Doktor der Naturwissenschaften-  
(Dr. rer. nat.)



vorgelegt von  
**Ilka König**  
(geb. Lehmann)  
(M.Sc.)  
aus Düsseldorf

Wuppertal, März 2016

Die Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20160803-112241-4

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20160803-112241-4>]

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit  
von Juli 2011 bis März 2016

auf Anregung von

**Herrn Prof. Dr. Hans-Willi Kling**

im Arbeitskreis

Kommunikation und Management chemischer Prozesse in der Industrie  
der Bergischen Universität Wuppertal

Die in dieser Arbeit beschriebene Arbeit wurde von der Fachagentur Nachwachsende  
Rohstoffe e.V. (FNR) finanziell gefördert.



Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V.





Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig im Arbeitskreis Kommunikation und Management chemischer Prozesse in der Industrie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Hans-Willi Kling durchgeführt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Wuppertal, 10. März 2016

---

Ilka König



## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans-Willi Kling für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die interessante Themenstellung sowie die Diskussionen und Ratschläge während der Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt zudem der Fachagentur für nachwachsende Rohstoffe (FNR), deren finanzielle Unterstützung diese Arbeit ermöglicht hat.

Der Firma Sappi Alfeld GmbH und der Zellstoff- und Papierfabrik Rosenthal GmbH danke ich für das zur Verfügung stellen der untersuchten Ablaugen.

Dem Arbeitskreis „Anorganische Chemie“ von Herrn Prof. Dr. Fabian Mohr danke ich für die Synthese einiger Modellsubstanzen.

Der Arbeitsgruppe „Chemische Mikrobiologie“ der Bergischen Universität danke ich für das Autoklavieren der Nährmedien und Glasgeräte.

Frau Sabrina Laun danke ich für ihre ausgiebige Unterstützung während der letzten Jahre sowie die teils länger andauernden Diskussionen, die einen großen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben.

Bei Frau Ann-Kathrin Galle bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und ihre Hilfestellung bei jeglichen Fragen.

Frau Andrea Ekat und Herrn Felix Hattwig danke ich für die Unterstützung bei technischen Problemen und EDV-Fragestellungen.

Bei Frau Dr. Victoria Hyzak, Frau Dr. Sonja Krieger und Frau Ina Ebersbach bedanke ich mich für die Diskussionen und die Unterstützung bei der Arbeit mit dem HPLC-MS-Gerät.

Frau Stephanie Seidel danke ich für die Hilfe bei allen Fragen zur Synthese der Modellsubstanzen sowie für die gute Zusammenarbeit.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Stefan Hellhake, Herrn Eduard Koslowsky sowie Frau Marie-Luise Dudek, für ihre praktische Unterstützung im Labor.

Ebenso danke ich Herrn Jernej Erpe, Herrn Michael Kuligowski, Herrn Yashar Sarkadeh und Frau Miriam Leermann für die sehr gute Zusammenarbeit und ihre Beiträge zu dieser Arbeit in Form von Abschlussarbeiten und Forschungspraktika.

Bei Herrn Dr. Tim Malolepszy bedanke ich mich für die Einarbeitung in das Themengebiet.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises „Kommunikation und Management chemischer Prozesse in der Industrie“ danke ich für das außerordentlich gute Arbeitsklima.

Schlussendlich danke ich meiner Familie und Marcel, deren Unterstützung für mich von unschätzbarem Wert ist.

## Abstract

Due to the shortage of fossil fuels the use of lignin as a renewable resource is of great global importance.

In this work two representative spent liquors from the two dominant processes in the paper and pulp industry were examined.

First sum parameters (e.g. content of lignin and carbohydrates) and inorganic components of the liquors were analyzed.

Because of large amounts of inorganic compounds in sulfate spent liquor and high sugar content in sulfite spent liquor lignin degradation products were isolated by well-known methods.

The development of analytical methods was performed by lignin model compounds. In addition to commercially available monomeric substances several dimeric, trimeric and tetrameric compounds with lignin typical linkages were synthesized. Due to the large number of lignin degradation products in spent liquors a GCxGC-(TOF)MS method was developed. With this method monomeric and dimeric lignin model compounds can be analyzed. Even after derivatization trimeric and tetrameric substance cannot be recognized. The optimized method was applied to the examination of the isolated lignin degradation products. It was confirmed that spent liquors are complex mixtures of many compounds which even cannot be separated by comprehensive gas chromatography. So a fractionation of the degradation products via a successive soxhlet-extraction method using different solvents became necessary. After the fractionation some monomers were identified by GCxGC-(TOF)-MS.

Afterwards a liquid chromatography method for the identification of high molecular compounds was developed.

The developed and optimized HPLC-method shows signals in the DAD-chromatogram. With a mass spectrometric detection no signals were available.

Therefore a mass spectrometric analysis method with direct injection using model substances was developed and transferred to the real samples.

The mass spectrometric method enables a qualification of many substances. Using a high-resolution mass spectrometer it is possible to determine the molecular formula by detecting masses with a precision of  $\pm 0.02$  Da. According to the molecular formula double-bound-equivalents were calculated. In particular MS/MS experiments could obtain information

about the number of methoxygroups and the presence of  $\beta$ -O-4'-linkages and sulfonic acid groups.

According to this method several proposals for the structures of 35 monomers in isolated lignosulphonates were evaluated. Eleven monomeric structures include sulfonic acid groups. Additionally eight C-C-linked dimers were identified.

Furthermore masses of trimers, tetramers and pentamers were detected.

In kraft lignin, isolated from the sulphate liquor, 27 monomers and 21 dimers were identified. In addition, high molecular weight substances with masses up to 680 Da were determined in this liquor. MS/MS experiments have shown that there are no  $\beta$ -O-4'-linkages in the identified compounds.

Up to now the masses of detected trimers, tetramers and pentamers were only postulated in literature. So these exact masses were discovered for the first time.

Various determined substances, for example long-chain aromatic structures or condensation products, do not originate from wood and can only be formed during the pulping process.

All identified substances have a uniform basic structure. Therefore the use of the uniform lignin degradation products seems reasonable. For example unification could be performed by hydrogenation. The received substances could serve as renewable raw materials for other chemical products.

## Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
APLI	Atmospheric Pressure Laser Ionization
APPI	Atmospheric Pressure Photo Ionization
Ara	Arabinose
ca	circa
CI	Chemical Ionization
CZE	Capillary Zone Elektrophoresis
Da	Dalton
DBDO	Dibenzodioxon
DFRC	Derivatization Followed by Reductive Cleavage
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	Degree of Polymerization
EI	Electron Ionization
ESI	Electrospray Ionization
FABMS	Fast Atom Bombardment Mass spectrometry
Gal	Galactose
GC	Gaschromatography
Glu	Glucose
HPLC	High Performance(Pressure) Liquid Chromatography
HS	Headspace
IR	Infrarot
K.m.	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
KL	Kraftlignin
LS	Ligninsulfonate
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization
Man	Mannose
MeOH	Methanol

mM	millimolar
MS	Massenspektrometrie
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
P.t.	<i>Pachysolen tannophilus</i>
psig	Pounds-force per square inch gauge (relativer Druck)
QQ-HSQC	Quick Quantitative heteronuclear single quantum coherence
Rha	Rhamnose
S.c.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCP	Single-Cell-Production
SEC	Size Exclusion Chromatography
SPE	Solid Phase Extraction
SPME	Solid Phase Micro Extraction
TOF	Time-of-flight
TS	Trockensubstanz
UV	Ultraviolett
Xyl	Xylose



# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	Theoretische Grundlagen .....	3
2.1	Zusammensetzung von Holz .....	3
2.1.1	Struktur des Lignins .....	7
2.2	Holzaufschluss in der Zellstoffindustrie.....	13
2.2.1	Sulfitaufschluss .....	16
2.2.2	Sulfataufschluss (Kraftverfahren).....	23
2.2.3	Bisherige Nutzung der Ablaugen aus der Zellstoffindustrie.....	32
2.3	Aktueller Stand zur Analytik der Ligninabbauprodukte in den Ablaugen.....	36
3	Zielsetzung .....	41
4	Ergebnisse und Diskussion.....	42
4.1	Allgemeine Charakterisierung der Ablaugen .....	42
4.1.1	Analytik der Monosaccharide in der Sulfitablauge .....	44
4.2	Extraktionsversuche aus den Ablaugen der Zellstoffindustrie.....	50
4.3	Analytische Untersuchungen der isolierten Ligninabbauprodukte .....	53
4.3.1	Comprehensive Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion.....	55
4.3.1.1	Methodenentwicklung mit Modellsubstanzen.....	55
4.3.1.2	Analytik der Ligninsulfonate .....	59
4.3.1.3	Analytik des Kraftlignins .....	63
4.3.2	Flüssigchromatographische Analytik.....	73
4.3.2.1	Methodenentwicklung mit Modellsubstanzen.....	73
4.3.2.2	Analytik der Ligninsulfonate.....	76
4.3.2.3	Analytik des Kraftlignins .....	82
4.3.2.4	Flüssigchromatographie mit massenspektrometrischer Detektion .....	84
4.3.2.5	Festphasenextraktion zur Anreicherung der Ligninabbauprodukte.....	85
4.3.3	Massenspektrometrische Untersuchung.....	96
4.3.3.1	Methodenentwicklung mit Modellsubstanzen.....	97
4.3.3.2	Ionensuppression bei der massenspektrometrischen Analyse .....	106
4.3.3.3	Analytik der Ligninsulfonate .....	108
4.3.3.4	Analytik des Kraftlignins .....	119
4.4	Wertung der analytischen Ergebnisse .....	130

5	Zusammenfassung.....	136
6	Ausblick .....	139
7	Experimenteller Teil.....	140
7.1	Allgemeine Charakterisierung der Ablaugen.....	140
7.2	Analytik der Monosaccharide in der Sulfitablauge.....	143
7.2.1	Zuckeranalytik .....	143
7.2.2	Fermentationsversuche .....	147
7.2.3	Ethanolbestimmung mittels HS-GC-FID .....	148
7.3	Synthese der Modellsubstanzen .....	149
7.3.1	Sulfonierte Modellsubstanz (Natrium-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-methan- sulfonat.....	150
7.3.2	Dehydrodivanillin .....	151
7.3.3	4'-O-[ $\alpha$ -(3,4-Dimethoxyphenyl)- $\alpha$ -oxoethyl]dehydrodivanillin (Trimer) .....	152
7.3.4	2-[(3,4-Dimethoxyphenyl)- $\alpha$ -oxoethyl]dehydrodivanillin (Tetramer).....	155
7.4	Isolierung und Fraktionierung der Ligninabbauprodukte .....	156
7.4.1	Isolierung der Ligninabbauprodukte aus den Ablaugen.....	156
7.4.2	Fraktionierung der Ligninabbauprodukte mittels Soxhlet-Extraktionen.....	157
7.5	Untersuchung der isolierten und fraktionierten Ligninabbau-produkte.....	157
7.5.1	Gaschromatographische Methoden .....	157
7.5.2	Flüssigchromatographische Methoden .....	159
7.5.2.1	Festphasenextraktion.....	167
7.5.3	Massenspektrometrische Untersuchungen.....	171
7.6	Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	174
8	Anhang .....	178
9	Abbildungsverzeichnis.....	203
10	Tabellenverzeichnis.....	209
11	Literaturverzeichnis.....	213

# 1 Einleitung

Wie lange fossile Rohstoffe noch reichen, ist unerheblich – sie sind in jedem Fall endlich. Dies wird nicht nur den Energiesektor beeinflussen, sondern auch die chemische Industrie. Zukünftig müssen Kraftstoffe und Basischemikalien aus anderen Quellen gewonnen werden.

Eine Möglichkeit zur Nutzung nachwachsender Rohstoffe als Energieträger und auch als Rohstoff in der chemischen Industrie ist die Oleochemie. Dabei werden chemische Produkte aus den Fetten und Ölen von Pflanzen gewonnen. Bei den zur Ölgewinnung verwendeten Pflanzen handelt es sich hauptsächlich um Raps und Soja. Diese Art der Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen steht, wie auch viele andere Nutzungsmöglichkeiten, in Konkurrenz zu Nahrungsmitteln sowie zu den Anbauflächen für solche. Um diese Problematik zu umgehen, werden derzeit zwei Ansätze verfolgt. Zum einen die Nutzung von Anbauflächen, die nicht zur Nahrungsmittelerzeugung geeignet sind und zum anderen die Nutzung von Reststoffen, wie zum Beispiel Resthölzern und Abfällen aus den verschiedensten Industrien. Zu letzteren gehören auch die Ablaugen aus der Zellstoffindustrie, deren Hauptbestandteil Ligninabbauprodukte darstellen [1].

Holz besteht zwischen 20% und 30% aus Lignin. Damit ist Lignin das zweithäufigste Biopolymer nach der Cellulose [2]. Im Vergleich zur Oleochemie, wo der Anteil des Öls aus dem Samen nur wenige Prozent der Pflanze beträgt, ist das Vorkommen von Lignin in der Pflanze sehr hoch. Zudem ist Lignin der einzige in größeren Mengen anfallende nachwachsende Rohstoff, der eine aromatische Grundstruktur besitzt und könnte somit die Basis für eine nachhaltige Herstellung vieler Chemikalien sein [3]. In der Zellstoffproduktion fallen weltweit pro Jahr 50 Mio. Tonnen Ligninabbauprodukte in Form von Ablaugen an [4–6]. Allein in der Zellstofffabrik Rosenthal werden pro Tag ca. 1200 Tonnen Zellstoff produziert. Dabei fallen Ligninabbauprodukte mit einer Trockenmasse von ca. 720 Tonnen pro Tag an.

Die bei der Zellstoffherstellung als Nebenprodukt gebildeten Ligninabbauprodukte werden zurzeit zum Zweck der Energiegewinnung verbrannt. Da die Ablauge jedoch eine Trockenmasse von ca. 17% besitzt, muss diese erst eingedickt werden, wodurch der effektive Energiegewinn stark reduziert wird. Aufgrund der energetischen Nutzung liegen bisher kaum Untersuchungen zu der genauen Zusammensetzung der enthaltenen Abbauprodukte vor. Neben den Ligninabbauprodukten aus der Zellstoffindustrie, die

bisher nicht kommerziell stofflich genutzt werden, fallen vor allem in den neu entwickelten Bioraffinerien zukünftig große Mengen an Ligninabbauprodukten an [6].

Besonders unter Berücksichtigung der Endlichkeit der fossilen Rohstoffe verspricht die stoffliche Verwendung der Ligninabbauprodukte eine deutlich gewinnbringendere Perspektive als die bisherige energetische Nutzung. Die Nutzungsmöglichkeiten sind nach einer Veröffentlichung der Pacific National Laboratorys in drei Bereiche zu unterteilen [7]. Zum ersten die Nutzung, die kurzfristig realisierbar ist. Dazu zählen zum Beispiel die Gewinnung von Energie, Treibstoff und Synthesegas. Die mittelfristige Nutzung befasst sich mit der Verwertung von Lignin als Makromolekül, wohingegen die langfristige Nutzung von Lignin die Nutzung von aromatischen Komponenten zur weiteren Verarbeitung beinhaltet und somit eine Alternative zur bisher verwendeten Petrochemie darstellt [7]. Die kurzfristige und mittelfristige Nutzung wird gegenwärtig in geringen Mengen bereits angewendet. Einen großen Anteil der heutigen Ligninforschung stellt die langfristige Nutzung von Lignin dar.

Den großen Mengen an Ligninabbauprodukten, die durch die Zellstoffindustrie und die Lignocellulose-Bioraffinerien anfallen, stehen bis heute nur wenige stoffliche Nutzungsmöglichkeiten gegenüber. Gründe dafür sind verfahrenstechnische und anwendungstechnische Problematiken, die auf die fehlende dezidierte Analytik der komplexen Ligninabbauprodukte zurückzuführen ist [1]. Die Analytik von Ligninabbauprodukten wird aktuell hauptsächlich über Summenparameter und unter dem Aspekt der Molekulargewichtsverteilung durchgeführt. Untersuchungen zur Strukturaufklärung sowohl des polymeren Lignins als auch der Ligninabbauprodukte werden in der Literatur meist mittels einzelner Modellsubstanzen durchgeführt. In den Ablaugen wurden bisher hauptsächlich einzelne Substanzen, wie das Vanillin identifiziert und charakterisiert. Um die in den Ablaugen der Zellstoffindustrie enthaltenen Ligninabbauprodukte stofflich nutzen zu können, ist eine umfassende Entwicklung einer Analytik zur Charakterisierung der gesamten Zusammensetzung der Ligninabbauprodukte notwendig.

## 2 Theoretische Grundlagen

Fossile Energieträger wie Erdöl, Gas und Kohle entstanden in Zeiträumen zwischen hunderttausenden und mehreren Millionen Jahren. Durch die Nutzung dieser Ressourcen im Rahmen der Petrochemie in weitaus weniger Jahren lässt sich über die Endlichkeit dieser wenig diskutieren [1]. Die Nutzung von Non-Food-Biomasse stellt eine Rohstoffalternative mit großem Potential dar. Schlüsselkomponente dieser Biomasse ist die Lignocellulose [8]. Ein ganzheitlicher Ansatz zur Substitution der petrochemischen Raffinerie ist die Bioraffinerie. Dabei sollen, wie in der Petrochemie, durch einen Aufschluss- und Konvertierungsprozess verschiedene Grundstoffe, Spezialchemikalien, weitere Zwischenprodukte und auch Energie bzw. biogene Energieträger gebildet werden. Als Rohstoff wird jedoch statt Rohöl und Erdgas Biomasse, wie zum Beispiel Pflanzen oder auch pflanzliche Abfallprodukte, verwendet. Eine Art der Bioraffinerie ist die Lignocellulose-Raffinerie, bei der alle Bestandteile der Lignocellulose genutzt werden sollen. Dazu gehören Lignin, Hemicellulose, Cellulose und verschiedene Extraktstoffe [1]. Zurzeit befindet sich diese Art der Raffinerie in Form von Pilotanlagen in der Entwicklung [9]. Industriell wird bei der Zellstoffherstellung durch den chemischen Aufschluss von Holz Lignin und Cellulose voneinander getrennt. Die Nutzung bei diesem Prozess beschränkt sich bisher jedoch hauptsächlich auf den Zellstoff [10], obwohl die anfallenden Ligninabbauprodukte ein großes Potential für die stoffliche Nutzung besitzen könnten [1].

### 2.1 Zusammensetzung von Holz

Die Bezeichnung Lignin stammt von dem Lateinischen *lignum* und wird mit „Holz“ übersetzt [11]. Zusammen mit Cellulose und Hemicellulose bildet es die drei wichtigsten Bestandteile im Holz. Je nach Holzart unterscheiden sich die Gehalte der drei Komponenten [2]. In Tabelle 1 ist die Zusammensetzung verschiedener Hölzer gezeigt. Dabei werden neben Cellulose, Hemicellulose und Lignin, die im Holz vorliegenden Extraktstoffe sowie weitere Inhaltsstoffe wie zum Beispiel Pektine berücksichtigt.

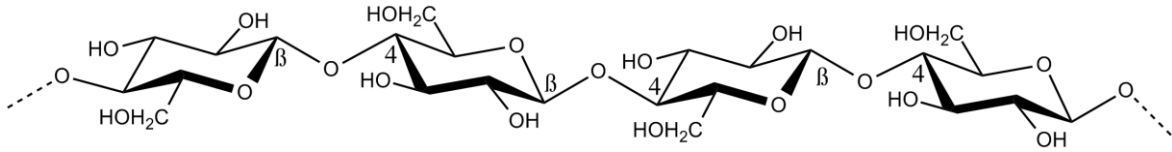
**Tabelle 1: Zusammensetzung verschiedener Hölzer [2]**

	<b>Holzart</b>	Cellulose	Hemicellulose	Lignin	Extraktstoffe	Andere Inhaltsstoffe
Nadelholz	Balsam-Tanne	39%	26%	29%	3%	3%
	Wald-Kiefer	40%	25%	28%	4%	3%
	Gemeine Fichte	42%	25%	27%	2%	4%
Laubholz	Rotahorn	42%	25%	25%	3%	5%
	Rotbuche	39%	29%	25%	1%	6%
	Birke	41%	30%	22%	3%	4%
	Eukalyptus	51%	21%	22%	1%	5%

Wie aus der Tabelle hervorgeht, variiert die Zusammensetzung in den verschiedenen Hölzern. Zusammenfassend liegen der Cellulosegehalt bei 39-51%, der Hemicellulosegehalt bei 25-30% und der Ligningehalt bei 22-29%. In Laubhölzern ist der Ligningehalt in vielen Fällen niedriger als im Nadelholz. Zusätzlich zur Holzart unterscheidet sich die Holzzusammensetzung je nach Herkunft, Wachstumsbedingungen und Alter des Holzes [12].

Auch die Verteilung der Inhaltsstoffe innerhalb des Holzes variieren. Zum einen liegen Unterschiede zwischen dem Holz des Stammes, der Zweige, der Äste, der Baumkrone und der Wurzel vor. Zum anderen liegt innerhalb des Baumstammes eine Verteilung in radialer Richtung vor, die mit dem Alter des Holzes zusammenhängt [13]. Die Zusammensetzung innerhalb der Zellwand unterscheidet sich ebenfalls. So bestehen die Mittellamelle und die primäre Zellwand hauptsächlich aus Lignin (8,5% bezogen auf die Gesamtzusammensetzung des Holzes). Die anderen Inhaltsstoffe liegen dort mit 2,9% vor. Der größte Anteil des Gesamtlignins im Holz befindet sich in der mittleren Schicht der sekundären Zellwand (19,8%). In dieser Schicht befinden sich ebenfalls die höchsten Konzentrationen an Cellulose und Hemicellulose [2,10,13–15].

Bei der Cellulose handelt es sich um ein homogenes lineares Polymer, das aus  $\beta$ -D-Glucopyranose-Einheiten besteht. Diese sind über 1,4-glycosidische Bindungen miteinander verknüpft (Abbildung 1). Der Polymerisationsgrad (DP) liegt bei ca. 10.000 [13].



**Abbildung 1: Ausschnitt aus dem Cellulosepolymer (1,4-verknüpfte  $\beta$ -D-Glucopyranose) [13]**

Hemicellulose ist ein Sammelbegriff für verschiedene im Holz vorkommende heteropolymere Saccharide. Diese haben im Vergleich zur Cellulose ein kleineres Molekulargewicht (DP= 50-200). In Nadelhölzern liegen vor allem das Galactoglucomanan und das Arabinoglucuronoxylan vor. Glucomanan und Glucuronoxylan sind die hauptsächlich vorliegenden Hemicellulosen im Laubholz [13,16]. In Tabelle 2 ist eine Übersicht über die Anteile der nichtglucosidischen Monomereinheiten in verschiedenen Hölzern gezeigt [17].

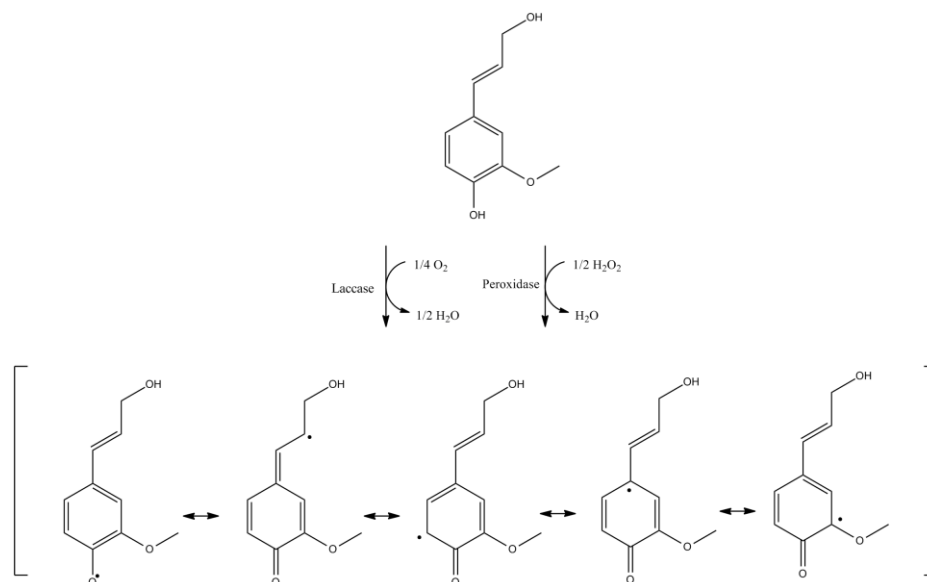
**Tabelle 2: Anteile der nichtglucosidischen Monosaccharide in verschiedenen Hölzern (Man= Mannose, Xyl= Xylose, Gal= Galactose, Ara= Arabinose, Rha= Rhamnose) [17,18]**

	<b>Holzart</b>	Man	Xyl	Gal	Ara	Uron-säuren	Rha	Acetyl-gruppen
Nadelholz	Balsam-Tanne	10%	5,2%	1%	1,1%	4,8%	-	1,4%
	Wald-Kiefer	12,4%	7,6%	1,9%	1,5%	5%	-	1,6%
	Gemeine Fichte	13,6%	5,6%	2,8%	1,2%	1,8%	0,3%	-
Laubholz	Rotahorn	3,3%	18,1%	1%	1%	4,9%	-	3,6%
	Rotbuche	0,9%	19%	1,4%	0,7%	4,8%	0,5%	-
	Birke	3,2%	24,9%	0,7%	0,4%	3,6%	0,6%	-

Die dritte Hauptkomponente im Holz ist das Lignin. Es füllt in der Pflanze den Zwischenraum von Cellulose, Hemicellulose und Pektin aus. Dabei ist es kovalent an die Hemicellulose gebunden [14,19]. Die Funktion des Lignins in der Pflanze ist von enormer Bedeutung. So ist das Lignin für die Festigkeit und Stabilität des Baumstammes

verantwortlich, wodurch überhaupt erst ein senkrechtes Wachstum des Baumes möglich ist. Durch diese Stabilität ist die Pflanze robust gegen Druck und Zug [20]. Weiterhin verleiht das Lignin den Zellwänden hydrophobe Eigenschaften. Durch diese Funktion im Xylem, dem Leitgewebe in der Pflanze, wird der Transport von Wasser und Nährstoffen ermöglicht. In der Rinde werden die Holzzellen dadurch vor dem Aufquellen geschützt. Eine weitere Funktion des Lignins ist der Schutz der Pflanze vor Mikroorganismen. Dabei wird das Eindringen dieser verhindert, so dass es durch die Enzyme der Mikroorganismen nicht zu einem Abbau der Polysaccharide im Holz kommen kann. Ausschließlich die Weißfäulepilze können selektiv Lignin abbauen [11,20–24].

Die Bildung von Lignin im Holz erfolgt über eine Polymerisation ausgehend von drei unterschiedlichen Monolignolen. Wie bei der Bildung vieler anderer aromatischer Substanzen in der Pflanze dient auch bei der Synthese der Monolignole das Phenylalanin als Vorstufe. Über die Bildung von Zimtsäure und nachfolgenden Methoxylierungen werden die Säuren der Monolignole gebildet, welche anschließend zu den Alkoholen reduziert werden [22,25,26]. Der erste Schritt der Polymerisierung der Monolignole erfolgt radikalisch durch eine Peroxidase oder eine Laccase [24]. Dabei entsteht ein resonanzstabilisiertes Radikal (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Bildung des resonanzstabilisierten Radikals zur Polymerisierung der Monolignole bei der Ligninbiosynthese [24]**

Über die Rekombination der Radikale zur Bildung des Ligninpolymers gibt es unterschiedliche Forschungsansätze. Der ursprüngliche Ansatz besagt, dass die



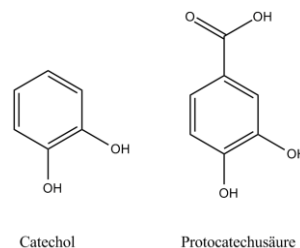
Rekombination ohne jegliche enzymatische Kontrolle zufällig verläuft [22,26–29]. In neueren Arbeiten wird vermutet, dass ein Dirigentenprotein die Ligninbiosynthese enzymatisch steuert [24,30–33].

Auf die Struktur des Lignins wird im folgenden Kapitel detailliert eingegangen.

### 2.1.1 Struktur des Lignins

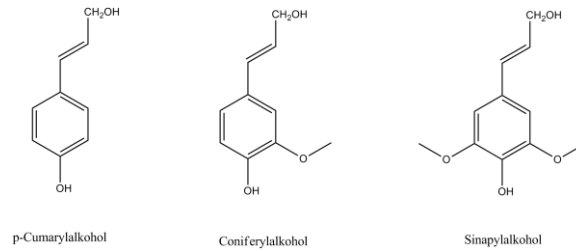
Lignin wurde erstmals 1838 von Payen entdeckt. Er beobachtete bei dem Aufschluss von Holz neben Cellulose eine weitere noch kohlenstoffreichere Verbindung [11].

1842 wurde diese Verbindung von Schleiden als verkrustende Substanz, in der die Cellulose eingebettet ist, bezeichnet. Die Bezeichnung Lignin geht wahrscheinlich auf Schulze im Jahr 1857 zurück [11]. Zur Strukturaufklärung des Lignins haben eine Reihe von Arbeiten beigetragen. 1868 konnte Erdmann die Bildung von Catechol und Protocatechusäure bei der Alkalischmelze von cellulosefreiem Holz nachweisen (Abbildung 3). Dies führte zu der Annahme, dass es sich bei Lignin um ein aromatisches System handelt [14].



**Abbildung 3: Struktur des Catechols und der Protocatechusäure [14]**

1874 und 1875 wurde von Tiemann, Haarmann und Mendelsohn die Struktur des Coniferylalkohols mit Lignin in Zusammenhang gebracht. 1897 wurde diese Aussage von Klason bestätigt [11]. Wie bereits bei der Beschreibung der Ligninbiosynthese genannt, ist Lignin aus drei Phenylpropaneinheiten aufgebaut, die sich in einer unterschiedlichen Anzahl an Methoxygruppen unterscheiden. p-Cumarylalkohol, Coniferylalkohol und Sinapylalkohol sind in Abbildung 4 dargestellt [11,14,25].



**Abbildung 4: Struktur der Monolignole (p-Cumarylalcohol, Coniferylalcohol, Sinapylalcohol) [11,14,25]**

Je nach Holzart liegen diese drei Monomereinheiten in unterschiedlichen Verhältnissen vor. Nadelholz besteht hauptsächlich aus Coniferyleinheiten, Laubholz aus Coniferyl- und Sinapyleinheiten. In anderen Pflanzen, wie zum Beispiel in Gräsern, liegen alle drei Monomereinheiten vor [24]. Eine Übersicht zu der Verteilung der Monomereinheiten in Abhängigkeit von der Pflanzenart ist in Tabelle 3 gezeigt.

**Tabelle 3: Anteile der Monolignole in Nadelholz, Laubholz und Gras [24]**

Pflanzenart	p-Cumarylalcohol	Coniferylalcohol	Sinapylalcohol
Nadelholz	<5%	>95%	Spuren
Laubholz	0-8%	25-50%	46-75%
Gräser	5-33%	33-80%	20-54%

Die exakte Struktur des Ligninpolymers ist bis heute nicht vollständig geklärt. Jedoch liegen verschiedene Modellvorstellungen vor. Das am weitesten verbreiteste Modell ist die 1977 von Adler vorgeschlagene Struktur für Fichtenlignin [14] sowie das 1974 von Nimz entwickelte Modell für Buchenlignin [34]. Letzteres ist in Abbildung 5 dargestellt.

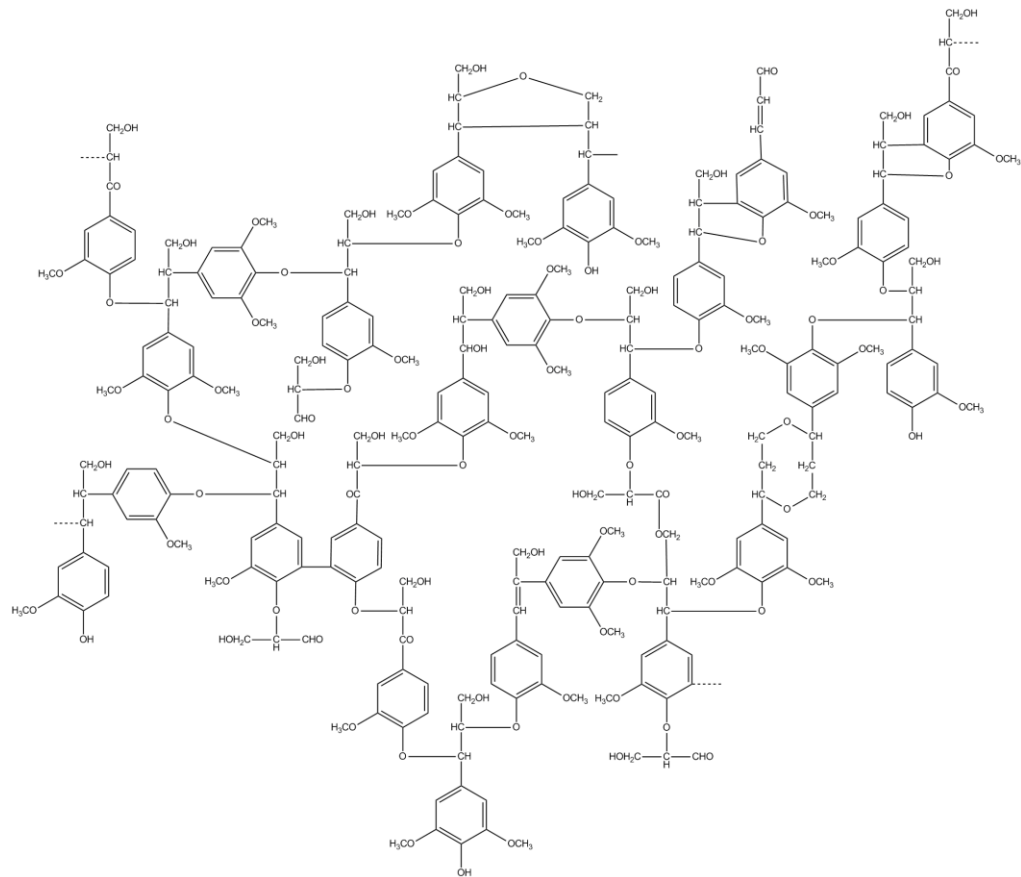


Abbildung 5: Strukturmodell für Lignin (von Nimz) [34]

Neue Untersuchungen postulieren, dass Lignin im Holz nicht als dreidimensionales stark verzweigtes Netzwerk vorliegt, sondern dass es aus linearen Makromolekülen besteht [35,36]. Das Strukturmodell für diese Annahme ist in Abbildung 6 und Abbildung 7 gezeigt.

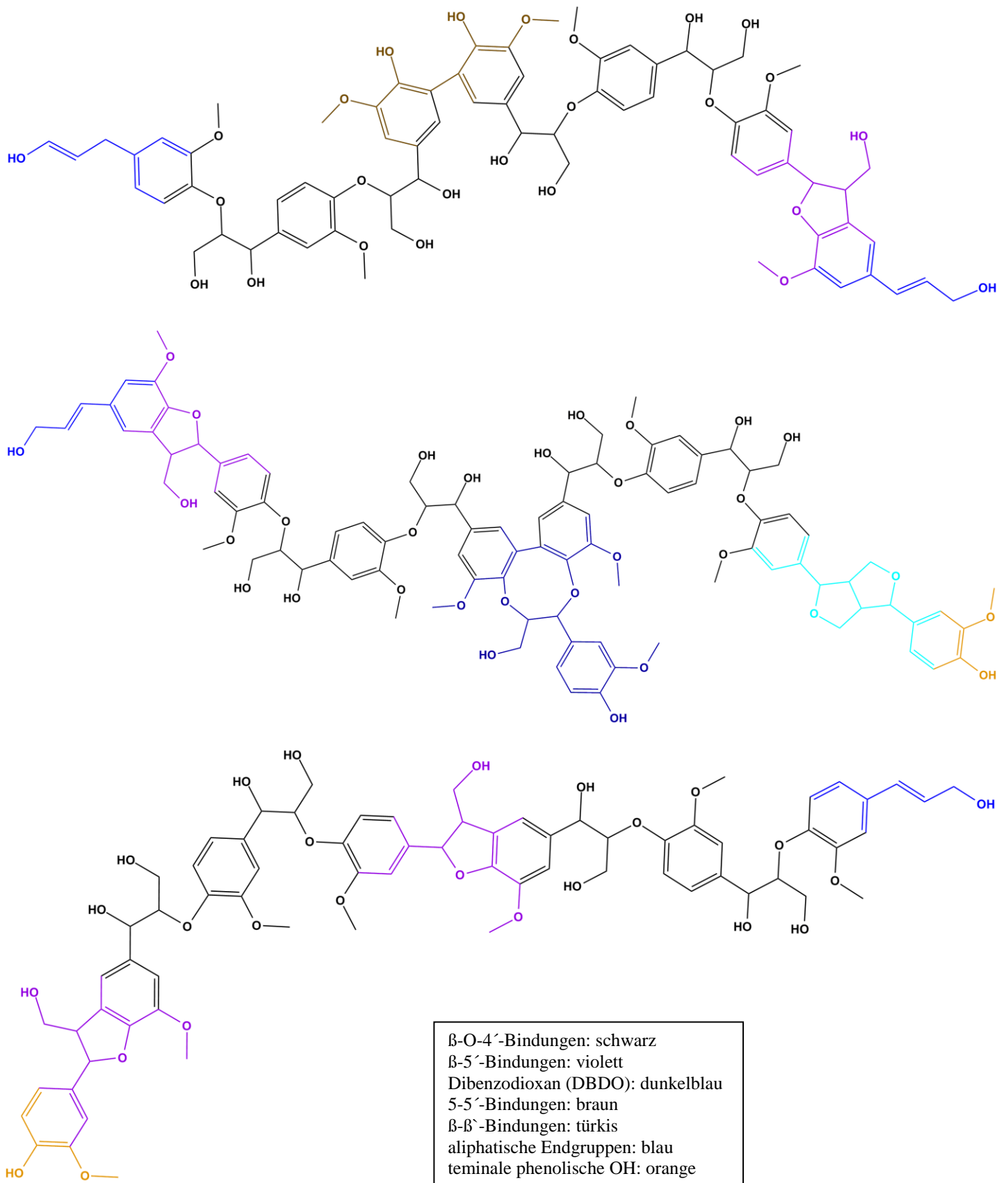


Abbildung 6: Schematische Darstellung der linearen Ligninstruktur (Milled Wood Lignin) Teil 1 [35]

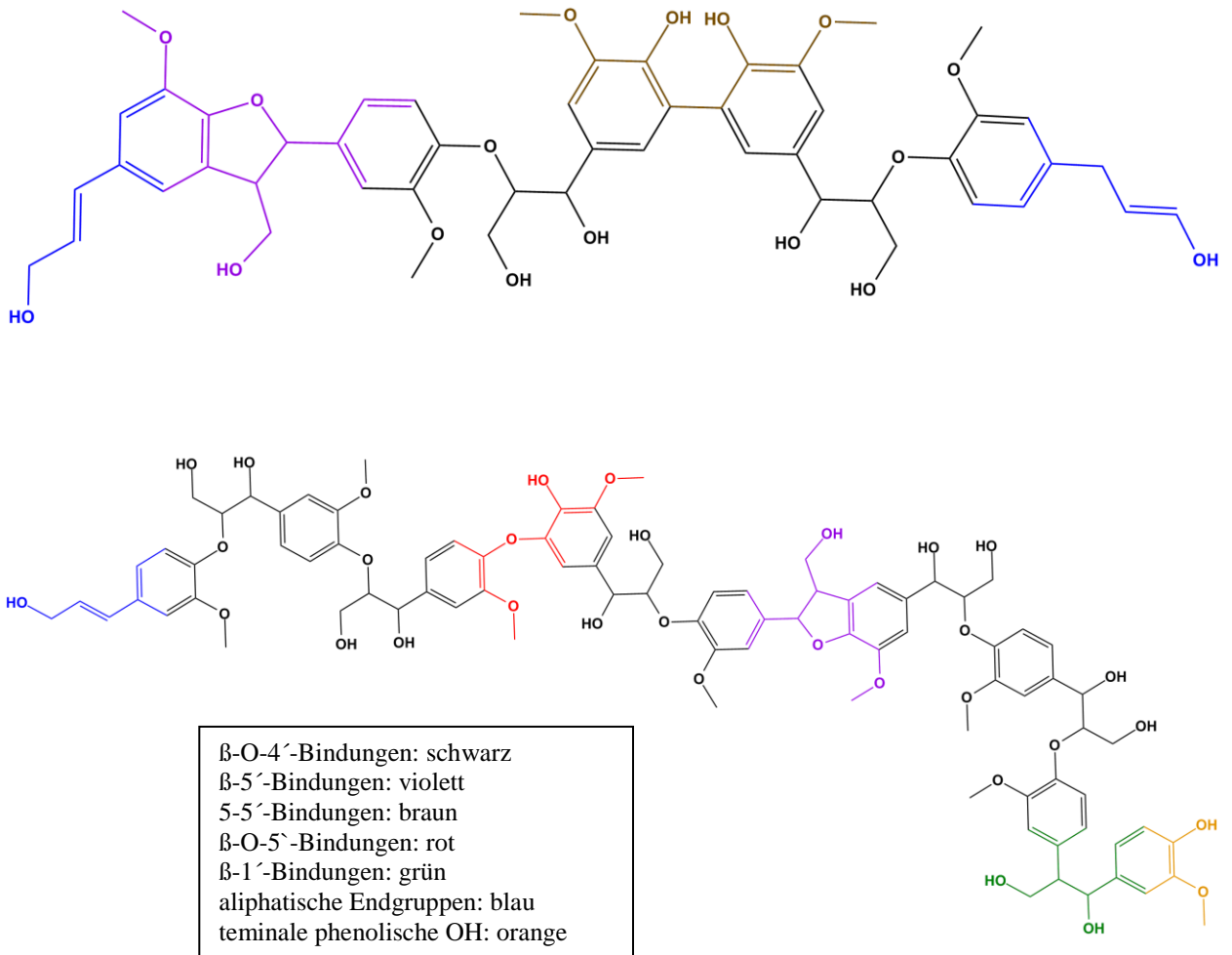


Abbildung 7: Schematische Darstellung der linearen Ligninstruktur (Milled Wood Lignin) Teil 2[35]

Wie in der obigen Abbildung zu erkennen ist, sind die Monomereinheiten des Lignins auf unterschiedlichste Weise miteinander verknüpft. 15-25% des nativen Lignins besitzt freie Phenolgruppen [37]. Um die verschiedenen Verknüpfungsmöglichkeiten näher zu erläutern, soll zunächst die Nomenklatur für die Lignineinheiten definiert werden (Abbildung 8).

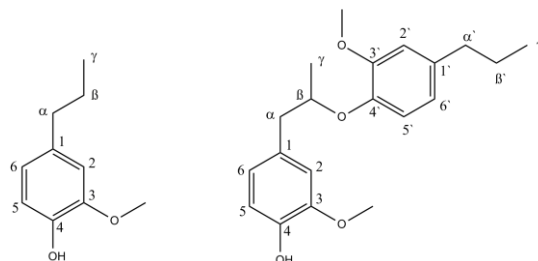


Abbildung 8: Nomenklatur für monomere und dimere Struktureinheiten des Lignins [24]

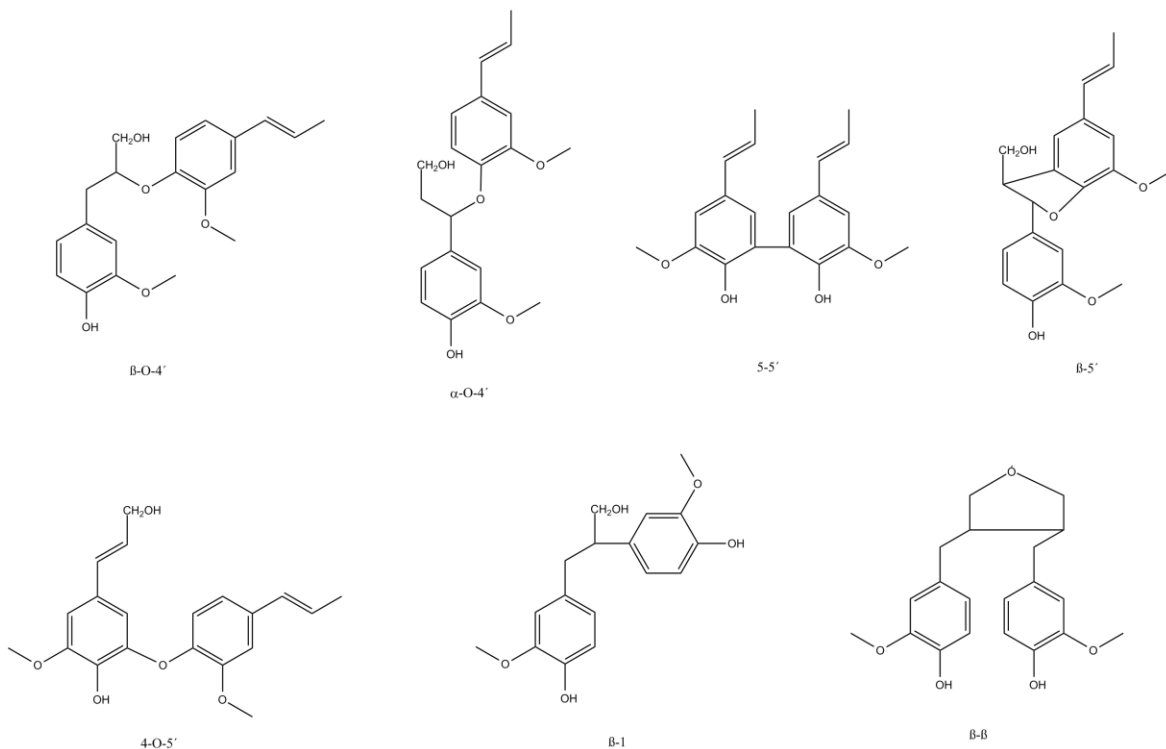
Die am häufigsten vertretene Verknüpfung im Lignin ist die  $\beta$ -O-4'-Bindung. Circa 50% der Bindungen liegen in Form dieser Verknüpfungsart vor. Neben Etherbindungen

kommen ebenfalls C-C-Verknüpfungen vor [38–40]. In Tabelle 4 ist ein Überblick über die verschiedenen Verknüpfungsmöglichkeiten im Lignin mit ihren Häufigkeiten in Nadel- und Laubholz angegeben.

**Tabelle 4: Häufigkeit der Verknüpfungen im Lignin von Nadel- und Laubholz [24,34,38,41]**

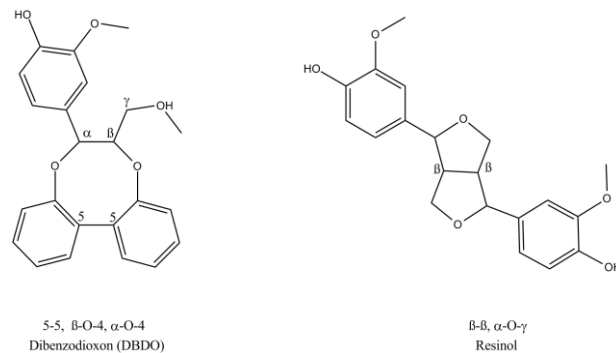
Bindungsart	Nadelholz	Laubholz
$\beta$ -O-4'	35-60%	60-65%
$\alpha$ -O-4'	6-8%	6-8%
5-5'	9,5-11%	2-5%
$\beta$ -5'	9-12%	4-9%
4-O-5'	3,5-4%	1,5%
$\beta$ -1'	1-2%	7-15%
$\beta$ - $\beta$ '	2-3%	7-7,5%

Beispielhafte Strukturen sind in Abbildung 9 dargestellt.



**Abbildung 9: Verknüpfungsmöglichkeiten der Struktureinheiten im nativen Lignin [38,41]**

Zudem kommt es häufig zu Kombinationen der in Abbildung 9 gezeigten Bindungsarten (Abbildung 10) [42,43].



**Abbildung 10: Kombination der oben gezeigten Bindungsarten [42,43]**

## 2.2 Holzaufschluss in der Zellstoffindustrie

Seit der Entwicklung des ersten chemischen Holzaufschlusses 1851 hat sich die Zellstoffproduktion zu einem gewinnbringenden, automatisierten Prozess entwickelt, in dem die Produktqualität, die Effizienz des Prozesses sowie der Umweltschutz zum größten Teil optimiert ist [37].

In der heutigen Zeit werden verschiedene Verfahren zur Zellstoffproduktion genutzt. In Tabelle 5 ist eine Übersicht über die unterschiedlichen Aufschlüsse und deren Anteil an der gesamten globalen Zellstoffproduktion gezeigt.

**Tabelle 5: Globale Zellstoffproduktion der verschiedenen Aufschlussarten bei der Zellstoffproduktion (Stand: 2000) [37]**

Aufschlussart	Anteil an Gesamtzellstoffproduktion [%]
Chemischer Aufschluss	
Kraftverfahren	62%
Sulfitverfahren	4%
Semichemischer Aufschluss	4%
Mechanischer Aufschluss	20%
Aufschluss aus Non-Wood-Bestandteilen	10%

Den größten Anteil der gesamten Zellstoffproduktion hat das Kraftverfahren. Der Anteil des Sulfitverfahrens liegt nur bei 4%. Dies war jedoch nicht immer der Fall. 1925 lag

dieser Anteil noch bei 60% [44], ist jedoch seitdem stetig gesunken. Grund dafür war die Entwicklung geeigneter Bleichtechniken für den Zellstoff. Der Sulfitzellstoff war bis 1930 der hellste ungebleichte Zellstoff [10]. Die Weiterentwicklung des Kraftverfahrens mit anschließender Bleiche führte zu vielen Vorteilen gegenüber dem Sulfitverfahren. Dazu gehörten die bessere Energiewirtschaft und Rückgewinnung der Prozesschemikalien, eine bessere Papierstärke sowie geringere Ansprüche an das verwendete Holz [10,37].

Bei dem semischemischen Aufschluss wird ein milder chemischer Aufschluss durchgeführt. Anschließend wird der erhaltene Zellstoff durch eine mechanische Aufarbeitung veredelt. Circa 20% der Gesamtzellstoffproduktion erfolgen mit einer mechanischen Aufarbeitung. Der dabei erhaltene Zellstoff ist im Vergleich zum chemisch produzierten Zellstoff nicht so reißfest, jedoch ist die Herstellung um circa 50% günstiger [45]. Zu den Non-Wood-Bestandteilen, die 10% der Zellstoffproduktion ausmachen, gehören Stängel, Bast, Blätter und Samen der Pflanzen. Die am häufigsten verwendeten Rohmaterialien für diese Komponenten sind Stroh, Zuckerrohr und Bambus (Stand 1998) [46]. Der Aufschluss dieser Pflanzenbestandteile erfolgt mittels Natronlauge, analog zum Sodaverfahren [37].

Der Verbrauch der unterschiedlichen Zellstoffarten in Deutschland ist in Tabelle 6 dargestellt. Dabei bezeichnet der Papierzellstoff den aus chemischen Verfahren gewonnenen Zellstoff, wohingegen der Holzstoff durch mechanische Verfahren hergestellt wird [47].

**Tabelle 6: Nutzung der verschiedenen Zellstoffarten zur Papierherstellung in Deutschland (Stand: 2013) [47]**

<b>Zellstoff</b>	<b>Anteil an Gesamtverbrauch von Faserstoffen [%]</b>
Papierzellstoff	20%
Sulfatzellstoff	17%
Sulfitzellstoff	3%
Holzstoff	5%
Zellstoff aus Altpapier	74%
Sonstige Faserstoffe	<1%
Faserstoffe gesamt	100%



In Deutschland werden circa 35% des für die Papierherstellung genutzten Zellstoffes innerhalb des Landes produziert [47]. Dazu zählt jedoch hauptsächlich der Sulfitzellstoff, da in Deutschland für das Sulfatverfahren zum Teil strenge Auflagen bezüglich der Geruchsbelästigung vorliegen [48]. Der weitere Sulfatzellstoff wird hauptsächlich aus Brasilien, Schweden und Finnland importiert. Die restliche Menge an Sulfitzellstoff stammt größtenteils aus Frankreich und der Schweiz. Die größte Faserstoffproduktion befindet sich in Nord-Amerika (37% der Gesamtproduktion). Die Produktion in Deutschland macht hingegen nur 2% aus [47].

In den folgenden Kapiteln sollen die beiden chemischen Verfahren näher erläutert werden. Bei beiden Verfahren wird das Lignin durch chemische Reaktionen abgebaut und kann so in Lösung gebracht werden. Die Zellstofffasern werden anschließend mechanisch abgetrennt. Bei der Delignifizierung werden, obwohl es sich um einen selektiven Prozess handelt, neben dem Lignin je nach Prozess auch die Hemicellulose und zum Teil die Cellulose abgebaut. Aus diesem Grund muss der Aufschluss beendet werden, wenn der Ligninabbau möglichst hoch, aber der Celluloseabbau noch nicht fortgeschritten ist. Die durchschnittliche Menge an gewonnenen Zellstoff bei den chemischen Aufschlussverfahren liegt je nach Holzart und Aufschlussbedingungen zwischen 45 und 55%, bezogen auf die eingesetzte Holzmenge [10,37,49]. Die übrigen 45-55% entsprechen den Abbauprodukten des Lignins und der Kohlenhydrate und fallen in den Ablaugen an. Ziel bei der Zellstoffproduktion ist ein hochqualitativer Zellstoff, wohingegen die Ausbeute und Qualität der gebildeten Ligninabbauprodukte dabei nicht berücksichtigt werden.

Weitere Verfahren, die ohne Schwefelverbindungen arbeiten, sind zum Beispiel das Sodaverfahren sowie das Organosolvverfahren. Das alkalische Sodaverfahren wird fast ausschließlich für einjährige Pflanzen, wie zum Beispiel Kenaf und Hanf verwendet. Als Rohstoff wird zudem Bagasse und Stroh genutzt. Die Delignifizierung erfolgt bei diesem Prozess wesentlich langsamer als bei dem Sulfatverfahren. Der Ligningehalt in einjährigen Pflanzen ist jedoch auch signifikant geringer als im Holz [40]. Ein weiteres schwefelfreies Verfahren ist das Organosolvverfahren, was aufgrund der Entwicklung von Bioraffinerien immer mehr an Bedeutung gewinnt [40,50]. Als Aufschlusschemikalie wird bei diesem Verfahren ein Gemisch aus einem organischen Lösungsmittel (Methanol oder Ethanol) und Wasser (50:50) genutzt. Dabei können Säuren, wie Ameisen- oder Essigsäure und

anorganische Substanzen zugesetzt werden [40]. Der bedeutende Vorteil dieser Verfahren liegt darin, dass die anfallenden Ligninabbauprodukte schwefelfrei vorliegen. Der Schwefelgehalt stellt für die Nutzung des Lignins einen Nachteil dar, da er die Produkteigenschaften durch Geruchsbildung beeinträchtigt und bei einer katalytischen Verarbeitung des Lignins den eingesetzten Katalysator schädigt [50,51]. Zudem können bei den schwefelfreien Aufschlussverfahren die Prozesschemikalien einfach z.B. durch Destillation zurück-gewonnen werden [6].

Da die in dieser Arbeit verwendeten, repräsentativen Ablaugen aus dem Sulfit- und dem Sulfataufschluss stammen, werden diese Verfahren im Folgenden näher erläutert.

### 2.2.1 Sulfitaufschluss

Das Sulfitverfahren wurde von Tilghman und Chew 1867 entwickelt. Dabei führten sie den Aufschluss mit Calciumhydrogensulfit und Schwefeldioxid unter Druck durch [52]. 1874 arbeitete bereits die erste Zellstoffmühle mit diesem Verfahren. Jedoch wurde dort Magnesiumhydrogensulfit als Aufschlussreagenz genutzt. Bis 1950 wurde jedoch das, auf Calcium basierende Verfahren aufgrund der besseren Verfügbarkeit und des geringen Preises von Calciumhydrogensulfit bevorzugt. Heutzutage wird bei dem Sulfitaufschluss fast ausschließlich Magnesiumhydrogensulfit verwendet, da es gegenüber dem Aufschluss mit Calciumhydrogensulfit einige Vorteile aufweist. So ist das entsprechende Magnesiumbisulfit bis zu einem pH-Bereich von 5-6 löslich, so dass ein saurer oder auch ein schwach saurer Aufschluss möglich ist. Bei der Nutzung des Calciumsulfits ist infolge der Löslichkeit ausschließlich das saure Verfahren möglich. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Prozesschemikalien zurückgewonnen werden können. Durch die Bildung von Calciumsulfat ist dies bei dem Calciumbisulfitverfahren nicht möglich [15]. Neben den magnesium- und calciumbasierten Verfahren kann ebenfalls Ammonium als entsprechendes Kation genutzt werden. Ein Überblick über die möglichen Prozesse in Abhängigkeit vom pH-Wert ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Einteilung der verschiedenen Sulfitverfahren nach ihrem pH-Wert [15,37]

Verfahren	Anfangs-pH-Wert (25°C)	Mögliche Kationen	Aktive Reagenzien
Saures Bisulfitverfahren	1-2	$\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Na}^+$ , $\text{NH}_4^+$	$\text{H}^+$ , $\text{HSO}_3^-$
Bisulfitverfahren (Magnefit)	3-5	$\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Na}^+$ , $\text{NH}_4^+$	$(\text{H}^+)$ , $\text{HSO}_3^-$
Neutrales Bisulfitverfahren	6-9	$\text{Na}^+$ , $\text{NH}_4^+$	$\text{HSO}_3^-$ , $\text{SO}_3^{2-}$
Alkalisches Sulfitverfahren	10-13,5	$\text{Na}^+$	$\text{SO}_3^{2-}$ , $\text{OH}^-$

Als Hölzer werden bei dem Sulfitverfahren Laub- und Nadelhölzer eingesetzt. Typische Laubhölzer sind Buche, Eukalyptus, Pappel und Birke. Fichte und Tanne werden häufig als Nadelholz verwendet [15]. Kiefernholz lassen sich, aufgrund ihres Gehaltes an Pinosylvin, mit dem Sulfitverfahren nicht aufschließen. Der Grund dafür ist, dass Pinosylvin im sauren Milieu mit Lignin kondensiert und das Lignin nicht mehr aus dem Holz gelöst werden kann [15,53].

Um den Transport der Aufschlusschemikalien in den Holzverbund sowie die Entfernung der Reaktionsprodukte aus dem Holzverbund zu ermöglichen, werden aus Rundhölzern oder Sägewerksabfällen Hackschnitzel produziert. Diese werden anschließend in der Prozessflüssigkeit ( $\text{MgO}$  und  $\text{SO}_2$ ) unter Druck und erhöhter Temperatur gekocht. Typische Parameter liegen bei einer maximalen Temperatur von  $135^\circ\text{C}$  und einem Druck von 8-10 bar. Anschließend wird die Ablauge auf einen Trockensubstanzgehalt von 70-80% eingedampft und danach zur Chemikalienrückgewinnung verbrannt. Durch die Zugabe von Magnesiumsulfat vor der Verbrennung der Ablauge werden die Verluste an  $\text{MgO}$  sowie  $\text{SO}_2$  ausgeglichen [15].

Der schematische Ablauf des Sulfitverfahrens ist in Abbildung 11 dargestellt.

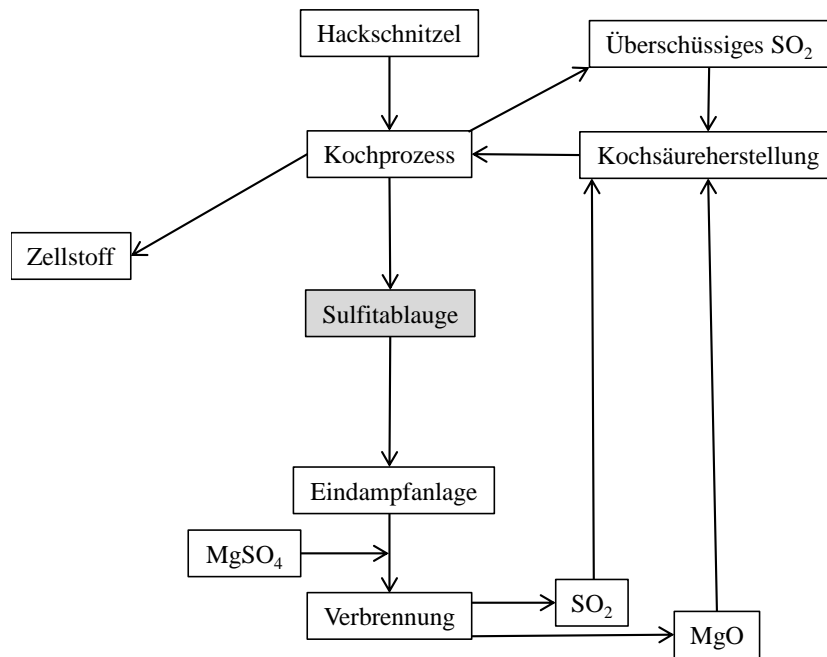


Abbildung 11: Schematischer Ablauf des Sulfitverfahrens [15]

Die aktiven Spezies ( $\text{H}^+$  und  $\text{HSO}_3^-$ ) liegen im folgenden Gleichgewicht vor, welches durch den pH-Wert stark beeinflusst wird [10,54].



Dabei hängt das Produkt aus der  $\text{HSO}_3^-$  Konzentration und der  $\text{H}^+$  Konzentration direkt mit der Delignifizierung im Zusammenhang. Die  $\text{H}^+$  Konzentration wirkt sich zudem auf die Hydrolyse der Cellulose aus [54].

Der Abbau des Lignins erfolgt in dem Sulfitverfahren hauptsächlich durch drei Reaktionsmechanismen. Dazu zählen die Sulfonierung, die Hydrolyse und Kondensationsreaktionen. Durch die Sulfonierung werden die Lignineinheiten polarer und lösen sich in der Prozesslauge. In den folgenden Abbildungen sind die Reaktionen beispielhaft anhand eines Ligninmonomergrundgerüsts gezeigt. Durch die Spaltung einer  $\alpha$ -Etherbindung wird ein resonanzstabilisiertes Benzylum-Kation gebildet, welches anschließend über eine nukleophile Addition sulfoniert werden kann (Abbildung 12). Neben dem Hydrogensulfit können auch andere nukleophile Substanzen, wie zum Beispiel Ligninbruchstücke, Kohlenhydrate oder Extraktstoffe an das Benzylum-Kation addieren [55].

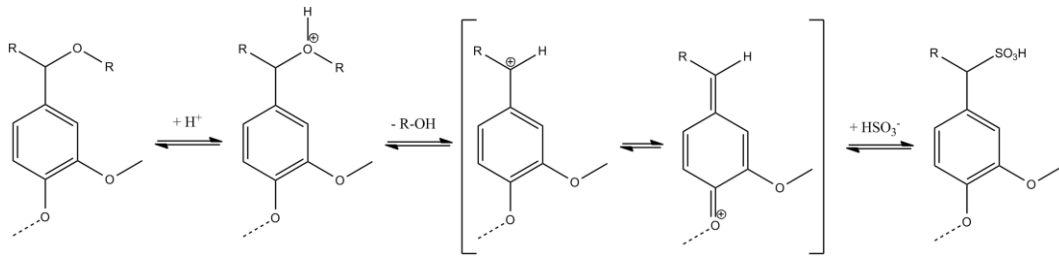


Abbildung 12: Bildung des Benzylium-Kations bei dem sauren Sulfitaufschluss und anschließender Sulfonierung (R= Alkyl, Aryl, H) [55]

Das gebildete Benzylium-Kation kann auf zwei verschiedene Wege reagieren.

Neben der Sulfonierung können Kondensationsreaktionen stattfinden (Abbildung 13).

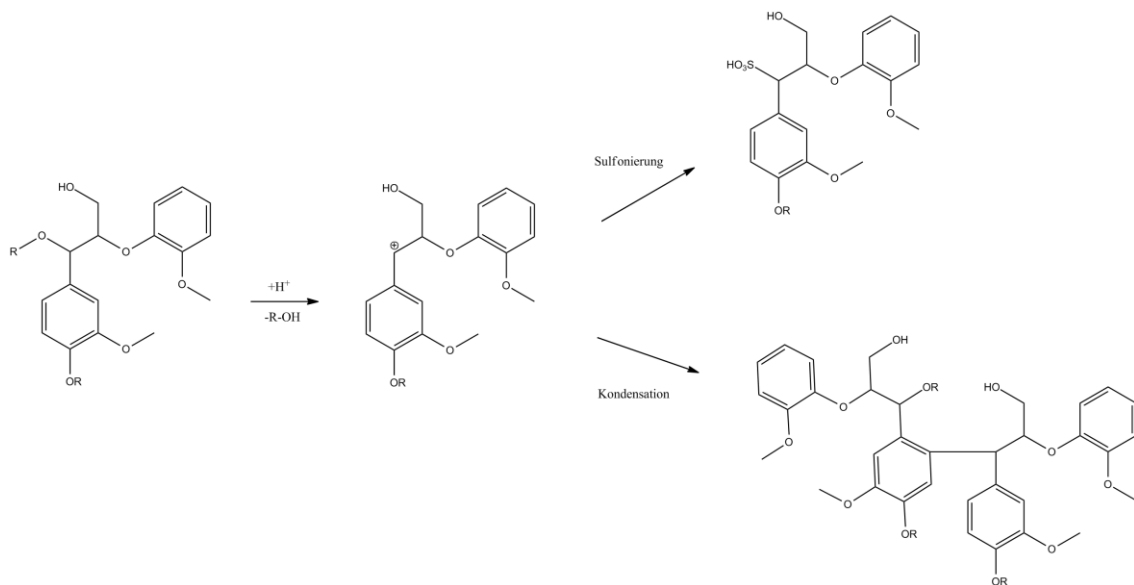


Abbildung 13: Reaktion von  $\beta$ -O-4'-Strukturen bei dem Sulfitaufschluss mit der Möglichkeit der Sulfonierung und Kondensation [56,57]

Da für die Kondensation der Abbauprodukte eine Vielzahl an Möglichkeiten existiert, sind die Strukturen der gebildeten Ligninsulfonate sehr komplex. Besonders durch die Kondensationsreaktionen kann es zur Bildung von Substanzen kommen, die sich von der ursprünglichen Ligninstruktur stark unterscheiden. Zwei Beispiele für Kondensationen sind in Abbildung 14 gezeigt.

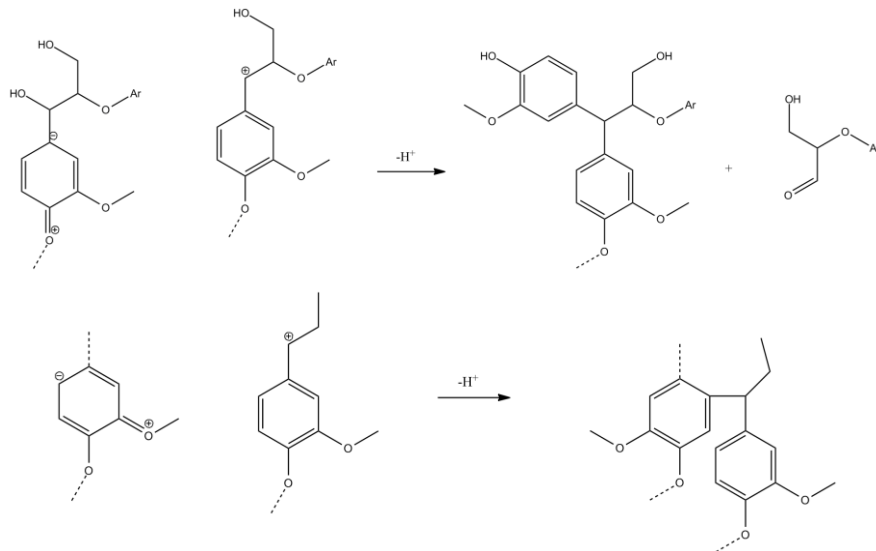


Abbildung 14: Kondensationsreaktionen des reaktiven Benzylum-Kations [56]

Zudem fallen bei einem Bindungsbruch ebenfalls unsulfonierte Ligninabbauprodukte an, die andere Eigenschaften aufweisen als die sulfonierten Verbindungen.

$\beta$ -O-4'-verknüpfte Lignineinheiten werden ausschließlich in  $\alpha$ -Position sulfoniert. Die Sulfonierung ist dabei unabhängig davon, ob eine phenolische oder nicht-phenolische Einheit vorliegt. Jedoch verläuft die Sulfonierung, aufgrund der schnelleren Bildung des Benzylumions, mit Phenoleinheiten schneller [58].

Zu einem bestimmten Anteil können die  $\beta$ -O-4'-Bindungen gespalten werden. Für diese Spaltung ist ein starkes Nukleophil notwendig. Da Sulfit wesentlich nukleophiler als Hydrogensulfit ist, verläuft die Reaktion bei einem höheren pH-Wert (neutrales Bisulfitverfahren) deutlich besser [55,59].

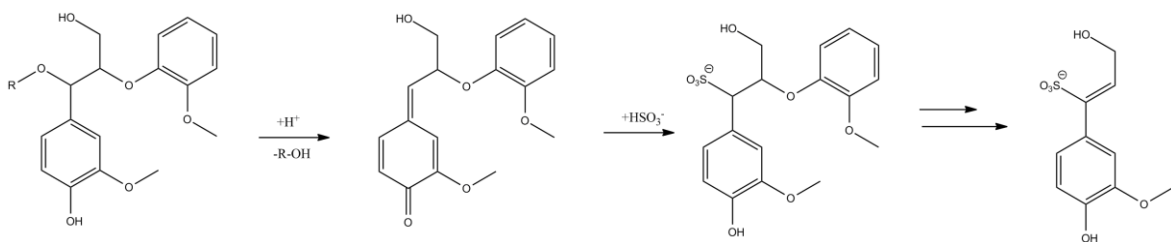


Abbildung 15: Spaltung der  $\beta$ -O-4'-Bindung bei dem Sulfitaufschluss [55,56]

Auch Coniferyleinheiten werden an der  $\alpha$ -Position sulfoniert (Abbildung 16).

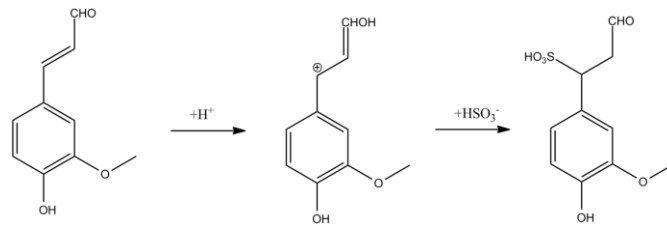


Abbildung 16: Sulfonierung von Coniferyleinheiten (Aldehydstruktur) [55]

Neben dem Ligninabbau findet bei dem Sulfitverfahren ebenfalls ein Abbau der Kohlenhydrate, besonders der Hemicellulose, durch Hydrolyse statt. Dabei findet zunächst eine Depolymerisation der Polymere zu Monosacchariden und Aldonsäuren (terminale Säuregruppe und Hydroxylgruppe) statt [60,61]. Weiterhin können die gebildeten Monosaccharide zu aromatischen Strukturen, wie zum Beispiel Furfural und Hydroxymethylfurfural, reagieren [62–64].

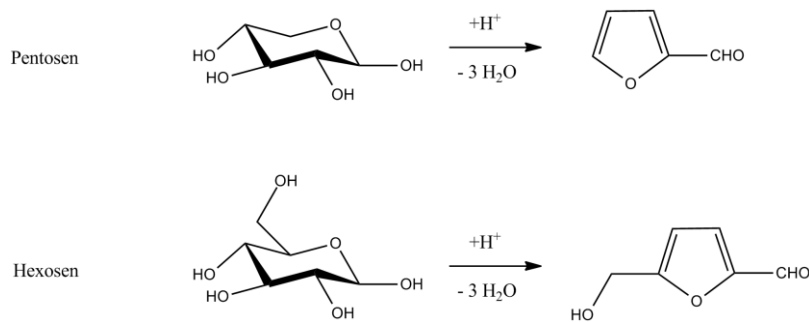


Abbildung 17: Abbau von Pentosen und Hexosen unter sauren Bedingungen

Folgereaktionen dieser Substanzen mit Ligninfragmenten oder anderen Furfuralverbindungen führen zu einer Vielzahl an möglichen Verbindungen in der Ablauge. Ein Beispiel dafür ist in Abbildung 18 dargestellt.

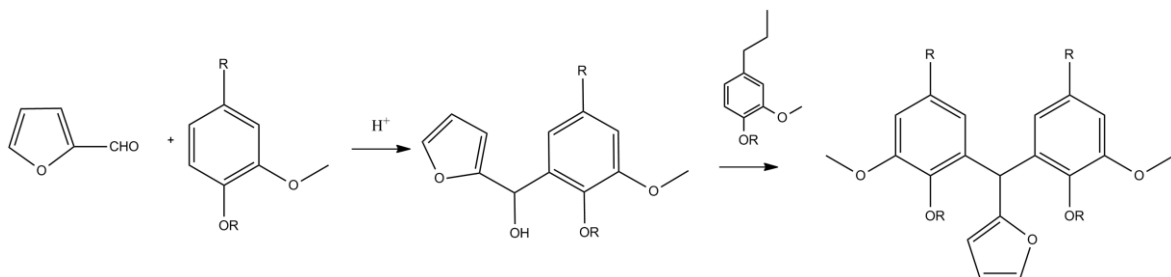
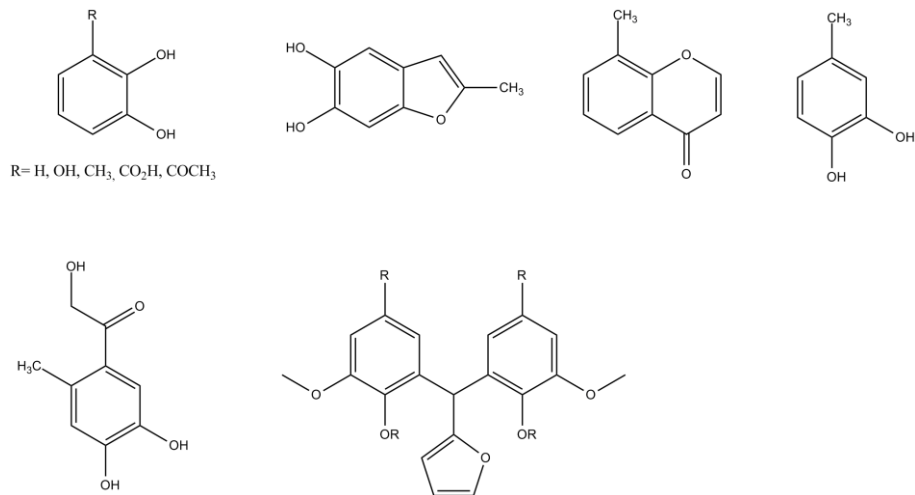


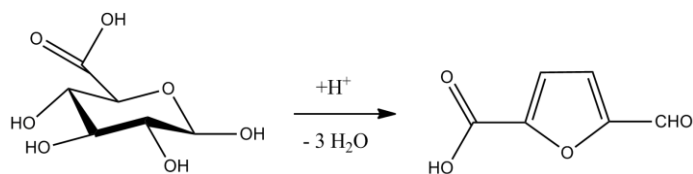
Abbildung 18: Kondensation der Abbauprodukte der Zucker mit Lignineinheiten

Eine Auswahl der Abbauprodukte von Zuckern ist in Abbildung 19 dargestellt.



**Abbildung 19: Aromatische Verbindungen als Abbauprodukte der Zucker [63]**

Liegen neben den Sacchariden auch Hexuronsäuren (terminale Säure- und Aldehydgruppe) in der Ablage vor, können diese zu 5-formylfuran-2-carbonsäure reagieren [37].



**Abbildung 20: Reaktion von Hexuronsäuren bei dem Sulfatverfahren [37]**

Weiterhin können aus den gezeigten Abbauprodukten der Hemicellulosen sulfonsäurehaltige Verbindungen entstehen [37].

Die oben gezeigten Reaktionsmöglichkeiten zeigen die Komplexität der Zusammensetzung der Sulfitablauge. In Tabelle 8 ist die allgemeine Zusammensetzung der Sulfitablauge aus verschiedenen Ausgangshölzern gezeigt.



**Tabelle 8: Zusammensetzung von Ablaugen aus dem Sulfitverfahren (% bezogen auf Trockensubstanz) [2,15,65]**

<b>Verbindungs-klasse</b>	<b>Fichte als Ausgangsholz</b>	<b>Birke als Ausgangsholz</b>
Lignin	52-55%	36-37%
Kohlenhydrate	28-30%	36-38%
Arabinose	1-4%	1-3%
Xylose	6-22%	34-91%
Mannose	12-43%	1-3%
Galactose	5-17%	1-3%
Glucose	4-14%	0,5-1%
Aldonsäuren	5-6%	9-9,5%
Essigsäure	4%	10%
Extraktstoffe	4%	4%
Weitere Verbindungen	4%	6%

Bei den enthaltenen Ligninverbindungen kann es es sich um sulfonierte oder nicht-sulfonierte Phenole handeln. Dabei bestehen die Ligninabbauprodukte zu 83% aus nicht-sulfonierten Einheiten und zu 17% aus Ligninsulfonaten [15].

Weitere Inhaltsstoffe sind [65]:

- Monosaccharide, Aldonsäuren, weitere Säuren und Carbonylverbindungen
- Extraktstoffe (Terpene, Harze, Steroide), wie
  - Fettsäuren
  - Fettalkohole
  - Harzsäuren
  - Phytosterine

### **2.2.2 Sulfataufschluss (Kraftverfahren)**

Das Sulfatverfahren ist das heutzutage am häufigsten eingesetzte Verfahren zur Zellstoffproduktion. Dieser Aufschluss geht auf die Arbeiten von Eaton *et al.* zurück, der sich 1870 mit der Delignifizierung von Holz mittels Natriumhydroxid und Natriumsulfid beschäftigte. Großtechnisch wurde das Verfahren erstmals 1879 von Dahl *et al.*

verwendet [66]. Er setzte dabei zur Chemikalienrückgewinnung Natriumsulfat zu, worauf auch die Bezeichnung Sulfatverfahren zurückzuführen ist. Der Begriff Kraftverfahren wird aufgrund der hohen Festigkeit des Sulfatzellstoffes verwendet. Vorteile des Sulfatverfahrens sind neben der hohen Festigkeit des Zellstoffes auch der hohe Rückgewinnungsgrad der Prozesschemikalien sowie die Möglichkeit alle Holzarten aufzuschließen [15,67]. Der schematische Ablauf des Sulfatverfahrens ist in Abbildung 21 gezeigt.

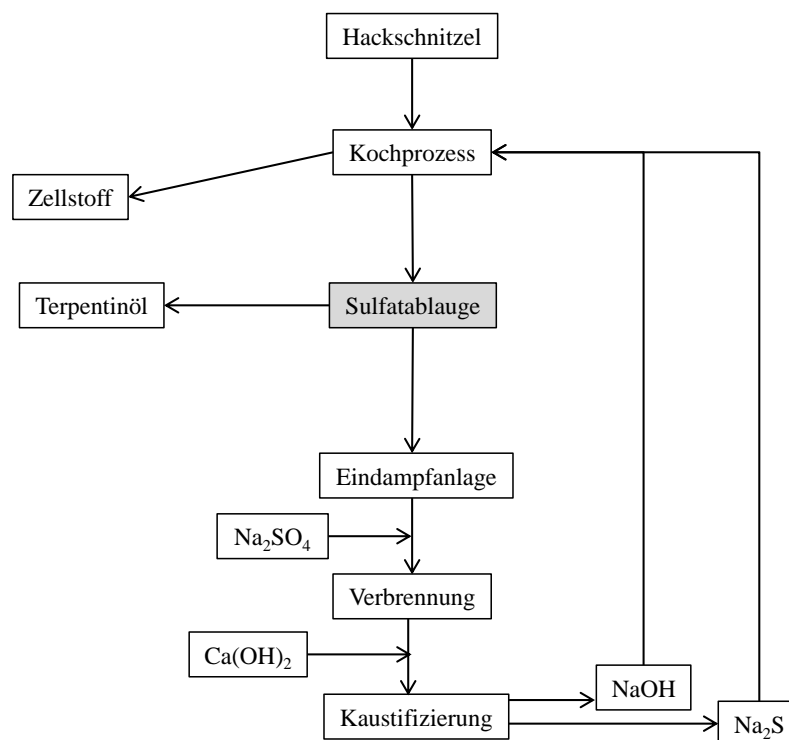
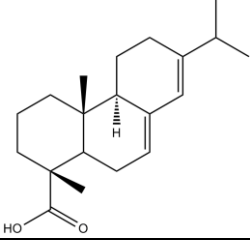
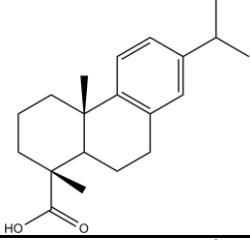
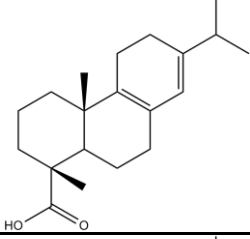
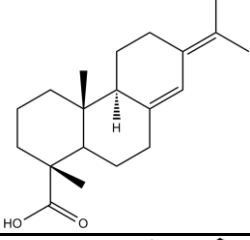
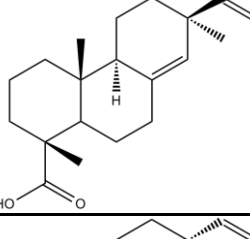
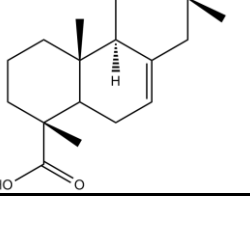


Abbildung 21: Schema zum Sulfataufschluss [15,68]

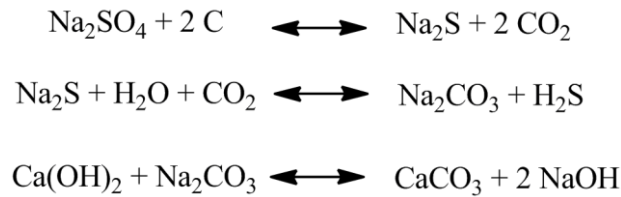
Bei dem Sulfataufschluss erfolgt der Aufschluss der Hackschnitzel in einer alkalischen Prozesslauge. Nach dem Holzaufschluss wird zunächst eine Fraktion aus leicht-flüchtigen Komponenten (Terpentinöl) isoliert [53]. Nach der Entfernung des Sulfatzellstoffes wird die erhaltene Sulfatablauge auf einen ungefähren Trockengehalt von bis zu 75% eingedampft. Dabei setzen sich die Harz- und Fettseifen auf der Oberfläche der Schwarzlauge ab, die bei einem Feststoffgehalt der Schwarzlauge von circa 25% abgeschöpft werden. Diese Fraktion wird zu reinem Tallöl umgesetzt [53]. Durch die Destillation des Tallöls und der Abtrennung von leichtflüchtigen Substanzen kann reines Tallharz gewonnen werden [53]. Die Zusammensetzung der Harzsäuren im Nadelholz sowie im Tallharz ist in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Zusammensetzung der Harzsäuren im Nadelholz und im Tallharz [2]

Harzsäure	Struktur	Anteile in Holz	Anteile im Tallharz
Abietinsäure		16-23%	40-49%
Dehydroabietinsäure		14-21%	13-16%
Palustrinsäure		15-24%	8-13%
Neoabietinsäure		11-12%	10-12%
Pimarsäure		8-10%	9-11%
Isopimarsäure		4-9%	5-7%
andere Harzsäuren		24-30%	2-3%

Die bei dem Eindampfen entstandene Brennlauge wird anschließend im sogenannten Laugenkessel verbrannt. Die enthaltenen Prozesschemikalien setzen sich durch den Zusatz von Natriumsulfat als Schmelze (hauptsächlich Natriumcarbonat) ab und werden

anschließend kaustifiziert. Durch die Zugabe von Calciumhydroxid wird dabei Natriumhydroxid zurückgewonnen.



Der gebildete Kalkschlamm wird anschließend zu Calciumoxid gebrannt, welches wieder in den Chemikalienkreislauf zurückgeführt wird [15,67].

Als aktive Spezies bei dem Sulfataufschluss fungieren Hydroxid- und Hydrosulfidionen, die in der Prozesslösung als NaOH und Na<sub>2</sub>S vorliegen. Die Hydrosulfidionen führen dabei zu einer selektiven Delignifizierung.

Der Abbau des Lignins kann in drei Phasen unterteilt werden. Zu Beginn des Abbaus werden reaktive phenolische Lignineinheiten, wie α-O-4- und β-O-4-Bindungen gespalten. In der zweiten Phase wird der Großteil des Lignins aus dem Holz (ca. 70% des Gesamtlignins) entfernt. Dabei werden hauptsächlich β-O-4-Bindungen von phenolischen und nicht phenolischen Lignineinheiten gespalten. In dieser Phase finden bereits Kondensationsreaktionen statt. In der letzten Phase der Delignifizierung (ab einem Delignifizierungsgrad von 90%) kommt es zu Kondensationsreaktionen und zur Bildung von Chromophoren [57,69]. Das Verhältnis vom Ligninabbau zum Kohlenhydratabbau wird in dieser Phase umgekehrt. Der Prozess wird somit unselektiver. Da die Prozessführung ausschließlich in Bezug auf die Qualität des Zellstoffes erfolgt, wird der Ligninabbau nicht reguliert.

Das entscheidende Intermediat bei dem Ligninabbau ist das para-Quinonmethid. Dieses wird aus einer β-Arylether-Struktur durch die Eliminierung des Arylrestes gebildet (Abbildung 22).

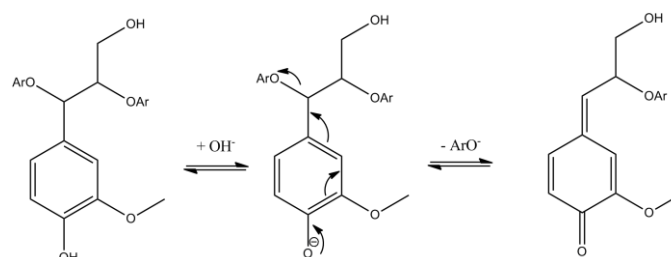


Abbildung 22: Bildung des Quinonmethid-Intermediates [57]

Ausgehend von dem Quinonmethid-Intermediat können verschiedene Reaktionen stattfinden, die in eine Addition, Eliminierung und einen Elektronentransfer unterteilt werden können. Diese drei Reaktionsmechanismen sollen beispielhaft in den folgenden Abbildungen verdeutlicht werden (Abbildung 23 bis Abbildung 29).

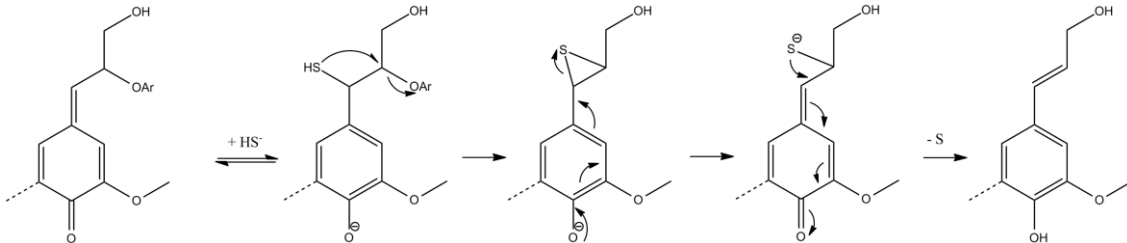


Abbildung 23:  $\beta$ -O-4'-Spaltung durch Addition von Nucleophilen (Hydrogensulfid) [56,57,69]

Bei der nukleophilen Addition wird zunächst ein Methylmercaptan gebildet, wobei die  $\beta$ -O-4'-Bindung gespalten wird. Unter Abspaltung von elementarem Schwefel bildet sich eine Phenyleinheit mit einer ungesättigten Propankette.

Als weitere Additionsreaktion kann es jedoch ebenfalls zu Kondensationsreaktionen kommen, bei der 5-5',  $\beta$ -5, 5-O-4- Bindungen sowie auch Diphenylmethanstrukturen gebildet werden.

Mögliche Eliminierungsreaktionen am Quinonmethid-Intermediat sind in Abbildung 24 dargestellt.

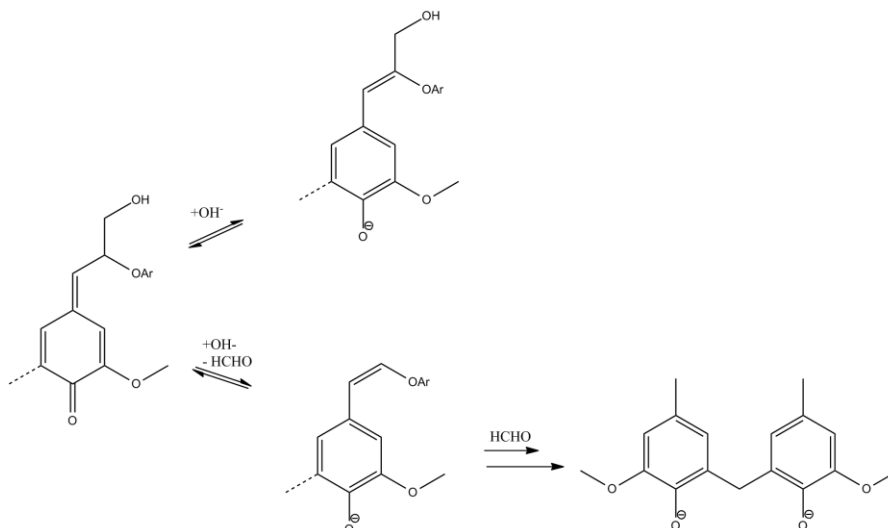
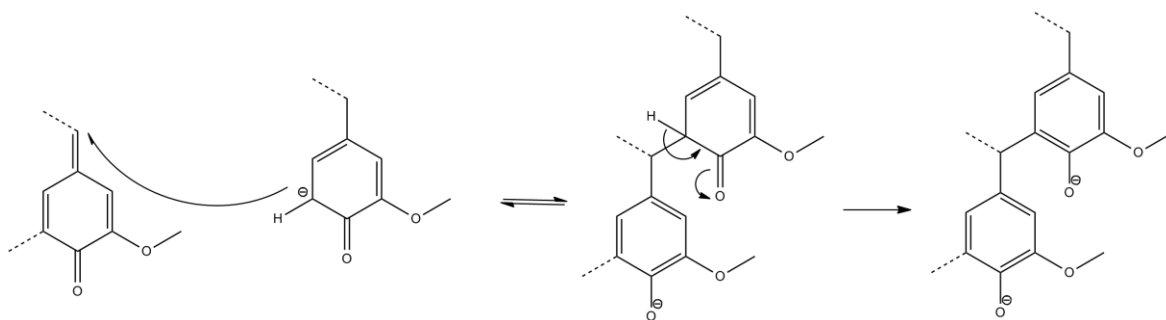


Abbildung 24: Eliminierungsreaktionen am Intermediat [56,57]

Das, bei der Abspaltung entstehende Formaldehyd kann anschließend mit Phenoxyanionen reagieren und so zur Bildung von Diarylmethanstrukturen führen [70]. Die oben gezeigten  $\beta$ -Aroxystyren-Strukturen weisen eine hohe Stabilität gegenüber basischen Bedingungen auf [71,72].

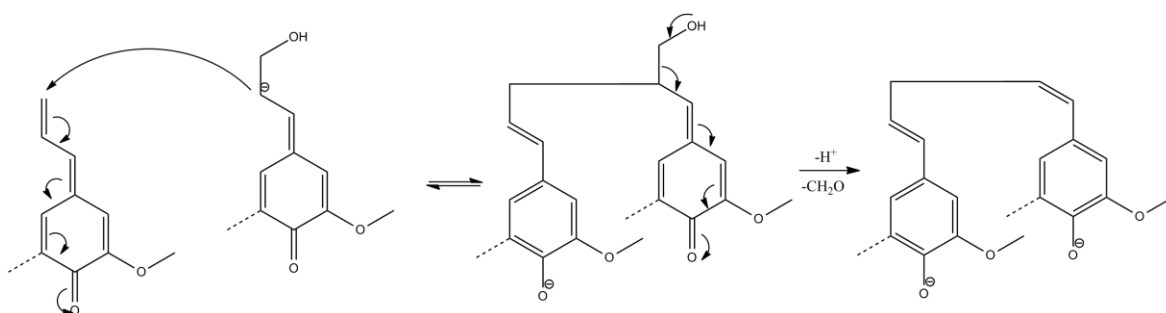
Neben der Kondensationsreaktion in Anwesenheit von Formaldehyd kann es zu weiteren Kondensationsreaktionen kommen [69,73]. Dabei kann es sich um primäre und sekundäre Kondensationsreaktionen handeln. Bei beiden Kondensationen findet im ersten Schritt eine reversible Addition des Carbanions statt. Der zweite Schritt ist eine irreversible Abspaltung eines Protons, die zu einer Rearomatisierung der Struktur führt.

Bei der primären Kondensationsreaktion kondensieren Quinonmethidstrukturen, die aus der Eliminierung des  $\alpha$ -Substituenten stammen. Diese Art der Kondensation ist in Abbildung 25 dargestellt.



**Abbildung 25: Primäre Kondensationsreaktion bei dem Sulfataufschluss [69]**

Bei der sekundären Kondensation reagieren Quinonmethidstrukturen, die bei der Etherspaltung in der Initial Phase des Sulfataufschlusses entstehen (Abbildung 26).



**Abbildung 26: Sekundäre Kondensationsreaktion bei dem Sulfataufschluss [69]**

Mögliche Kondensationsprodukte sind in Abbildung 27 gezeigt.

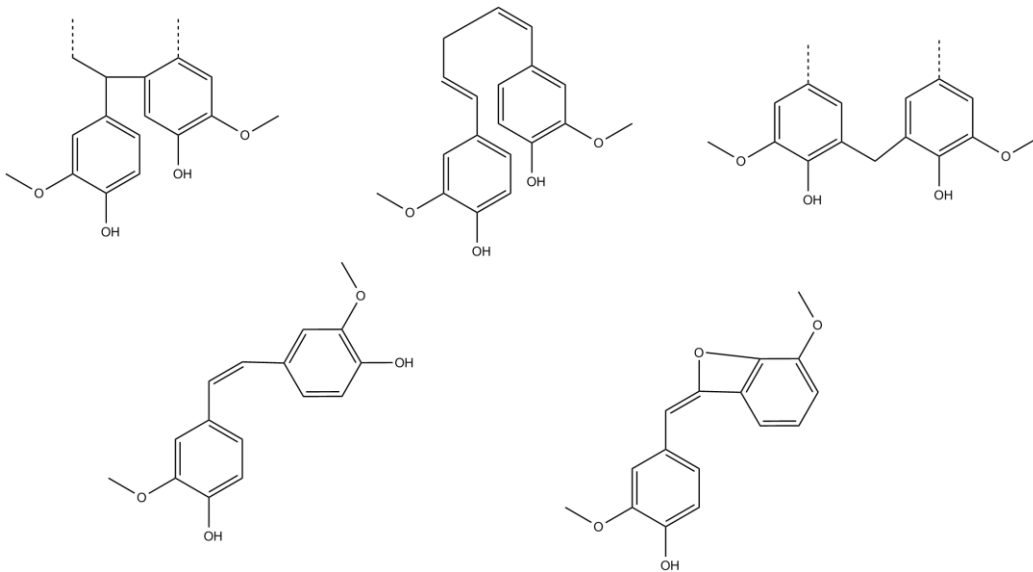


Abbildung 27: Kondensationsprodukte bei dem Sulfataufschluss [69]

Die starke Nucleophilie der  $\text{HS}^-$ -Gruppe kann zudem zu einer Abspaltung der Methylgruppe von der Methoxyeinheit führen. Dabei bildet sich, wie in Abbildung 28 zu erkennen Methanthiol, welches selbst als Nucleophil reagiert und so weitere Methylgruppen eliminieren kann. Daraus bildet sich Dimethylsulfid, welches den typischen Geruch der Sulfatablaue verursacht. Dimethylsulfid kann durch oxidative Vorgänge zum Dimethyldisulfid reagieren.

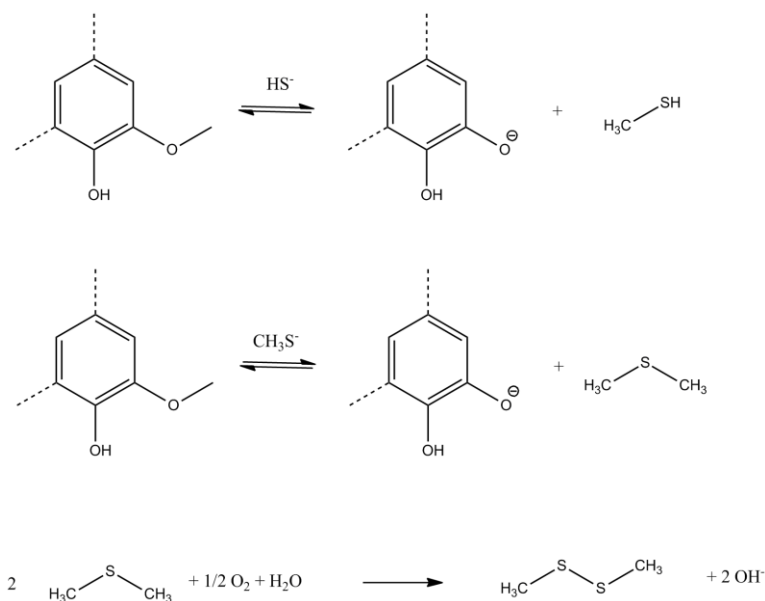


Abbildung 28: Demethylierung an Methoxygruppen [56,57]

Eine weitere wichtige Reaktion der phenolischen Verbindungen ist der Elektronentransfer. Die Quinonmethid-Struktur wird reduziert, wobei ebenfalls ungesättigte Reste am Phenylring entstehen [74].

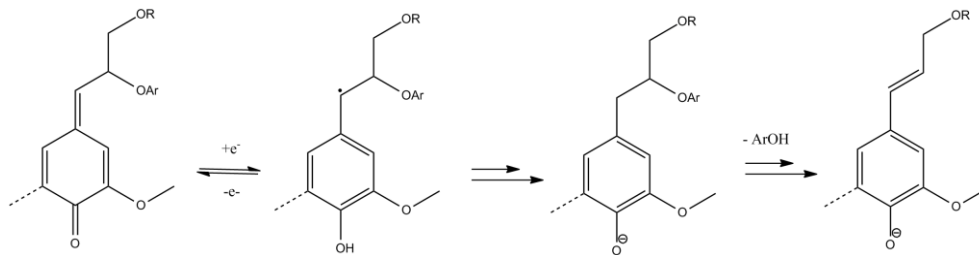


Abbildung 29: Elektronentransfer und Reduktion [74]

In nicht-phenolischen Substanzen ist die Spaltung der  $\beta$ -O-4-Bindung schwieriger, so dass drastischere Bedingungen (höhere Temperatur, höherer pH-Wert) vorliegen müssen. Somit erfolgt dieser Abbau erst in der zweiten Phase der Delignifizierung. Zur Spaltung der Bindung muss in  $\alpha$ -Position eine Hydroxylgruppe vorliegen. Durch das vorliegende alkalische Milieu liegt diese deprotoniert vor. Über die Bildung eines Oxiran-Intermediates wird die Etherbindung gespalten.

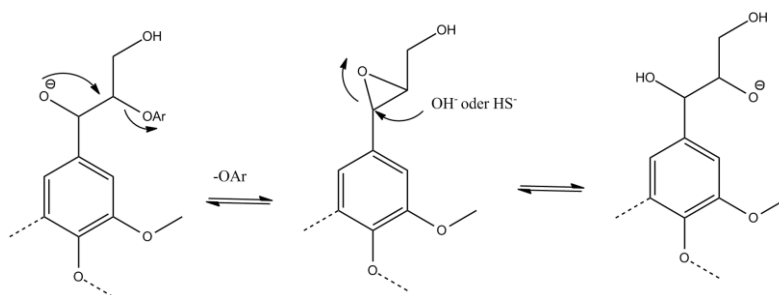


Abbildung 30:  $\beta$ -O-4'-Spaltung an nicht-phenolischen Struktureinheiten [56,69]

Wenn in  $\alpha$ -Position keine Hydroxylgruppe sondern eine Ketogruppe vorliegt, kann die Spaltung der  $\beta$ -O-4'-Bindung durch Bildung eines Thirans erfolgen.

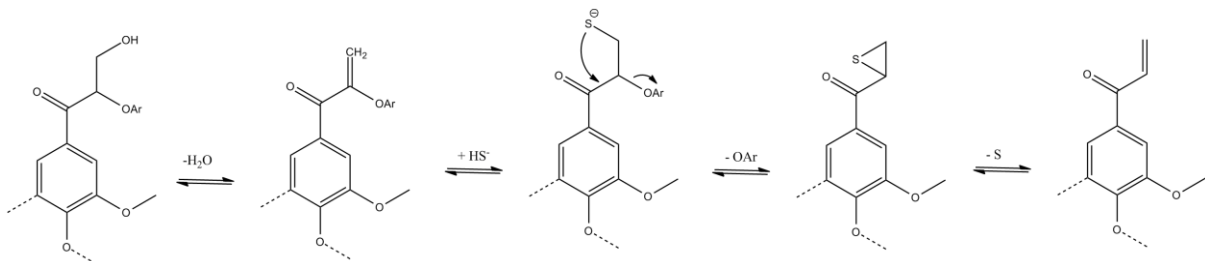


Abbildung 31:  $\beta$ -O-4'-Spaltung an  $\alpha$ -Carbonyl-Verbindungen [55,56,69]



Die Reaktionen der Kohlenhydrate bei dem Sulfataufschluss sind sehr komplex. So kann eine Deacetylierung, eine Abspaltung der Seitenketten oder ein Peeling der Polysaccharide erfolgen. Dabei bilden sich hauptsächlich unterschiedliche Hydroxycarbonsäuren [2]. Der Abbau zu Monosacchariden hat dabei jedoch keine Relevanz [37]. Ausschließlich die Bildung von Cyclopentenonverbindungen ist bekannt [75]. Auch in der Sulfatablaue liegen somit viele verschiedene Stoffklassen vor. In Tabelle 10 ist die allgemeine Zusammensetzung der Sulfatablaue mit Kiefer als Rohstoff für die Zellstoffherstellung gezeigt.

**Tabelle 10: Zusammensetzung der Sulfatablaue (mit Kiefer als Ausgangsholz) [65]**

<b>Verbindungs-klasse</b>	<b>Zusammensetzung der Sulfatablaue in % [TS]</b>
Lignin	31-46%
Aliphatische Carbonsäuren	29-30%
Polysaccharide	2%
Extraktstoffe	4%
Sonstige Organik	1%
Anorganik	33%

Bei den Abbauprodukten der Polysaccharide handelt es sich vor allem um verschiedene Carbonsäuren. Dazu zählen unter anderem Ameisensäure, Essigsäure, Hydroxycarbonsäuren und Hydroxydicarbonsäuren [65,76,77]. Eine besondere Bedeutung haben bei dem Sulfataufschluss die Extraktstoffe. Da bei dem Kraftverfahren hauptsächlich harzreiche Nadelhölzer verwendet werden, ist der Anteil der Extraktstoffe so hoch, dass diese als Tallölseifen aus der Sulfatablaue isoliert werden. In der Sulfatablaue liegen als Extraktstoffe zum Beispiel Fettsäuren, Harzsäuren und verschiedene Terpenoide vor. Des Weiteren liegen weitere phenolische Extraktstoffe wie Hydroxystilbene, Lignane, (Ellagi) Tannine, Flavonoide und Polyphenole vor [78]. Diese werden während des Eindampfens der Ablauge gewonnen [53].

### **2.2.3 Bisherige Nutzung der Ablaugen aus der Zellstoffindustrie**

Die bisherige stoffliche Nutzung des Lignins beschränkt sich auf den Zusatz als polymerer Werkstoff im Niedrig-Preis-Sektor. Bei den meisten Werkstoffen handelt es sich um Polymere, die relativ viele polare Struktureinheiten wie zum Beispiel Hydroxylgruppen besitzen. Dies zeigt sich dementsprechend in deren werkstofflichen Verhalten. Auch Lignin besitzt zahlreiche polare funktionelle Gruppen und kann somit Wasser über Wasserstoffbrückenbindungen binden [1]. Innerhalb dieses Forschungsgebietes wird stark an der Nutzung von biobasierten Werkstoffen auf Lignin-Basis gearbeitet [51,79–83]. Dabei wird dem eigentlichen Werkstoffgemisch Lignin in einer definierten Menge zugemischt. Beispiele für solche Mischungen sind Lignin (45%) -Naturfaser (50%) -Schellack (5%) oder auch Mischungen mit petrochemischen Kunststoffen wie Polystyrol und Polyethylen. Die mechanischen Eigenschaften dieser Produkte sind zum Teil mit denen der petrochemischen Kunststoffe vergleichbar [1]. Die Tecnaro GmbH produziert beispielsweise den thermoplastischen Werkstoff Arboform®. Hier werden die Ligninabbauprodukte aus der Zellstoffindustrie als Rohstoff genutzt, welcher mit Naturfasern wie Flachs oder Hanf vermischt wird. Die Jahresproduktion liegt zurzeit bei 5.000 Tonnen [84].

Ebenfalls wird an der Verwendung von Lignin als Matrixmaterial für Leiterplatten geforscht. Dabei wird das Lignin mit Epoxidharz gemischt. Der maximale Anteil an Lignin beträgt dabei 50%. Bei einem höheren Anteil von Lignin können derzeit die mechanischen und elektrischen Anforderungen der Leiterplatten nicht mehr erfüllt werden. Alternativ wird eine Mischung aus Lignin, Hanf und Baumwollfaser untersucht [1].

Lignin und dessen Abbauprodukte können für eine Reihe weiterer Low-Cost-Anwendungen genutzt werden. Eine Übersicht über die bisherigen Nutzungsmöglichkeiten ist in Tabelle 11 gezeigt.

Einzelne Substanzen die aus den Ablaugen der Zellstoffindustrie gewonnen werden sind Vanillin, Ethanol, Essigsäure, Xylose, Dimethylsulfoxid, Furfural sowie Cymol [1,15,85,86]. Furfural kann zudem weiterverarbeitet und vielseitig genutzt werden. Die am stärksten genutzten Folgeprodukte sind der Furfurylalkohol und Furanharze. Der Furfurylalkohol wird als Lösungsmittel und Reaktivverdünner in Epoxid-, Phenol- und Harnstoffharzen angewendet. Die Hauptanwendung erfolgt jedoch als Furanharz, welches zum Beispiel als Bindemittel für Sandgussformen genutzt wird [1,87].

Tabelle 11: Nutzungsmöglichkeiten von Lignin und dessen Abbauprodukten [1,15,51,79–83,85,88]

<b>Nutzungsmöglichkeit</b>	<b>Industriesparte</b>
Bindemittel	Holzindustrie, Futtermittelindustrie (Pelletierung)
Hilfsgerbstoff	Arzneimittelindustrie, Lederwarenindustrie
Klebstoff	Bauindustrie
Additiv in Bleiakkumulatoren	Elektronikindustrie
Dispergiermittel	Bauindustrie, Farb- und Lackindustrie
Harze	Polymerindustrie
Rohstoff für Carbonfasern	Automobilindustrie, Bauindustrie, Luft- und Raumfahrt und weitere

Parallel zu den, auf Pflanzenöl basierenden Produkten der Oleochemie, können diese Produkte ebenfalls aus dem Tallöl, welches im größeren Maße aus der Ablauge des Sulfatverfahrens gewonnen werden kann, hergestellt werden. Dieses wird nach einer Aufbereitung und Fraktionierung vielfältig eingesetzt. So wird es zum Beispiel als Lack, Bindemittel, Seifen, Reinigungs- und Emulgiermittel und als Schmieröl verwendet [53]. Besonders die Tallölfettsäuren und das Tallharz finden eine vielfältige Verwendung [53,89].

Bei dieser Art der stofflichen Nutzung des Lignins wird eine höhere Wertschöpfungsstufe als bei dem als Abfall anfallenden Ligninabbauprodukten erreicht. Jedoch handelt es sich um Low-Cost-Anwendungen. Um die Wertschöpfungskette signifikant zu erhöhen, ist eine andere Art der stofflichen Nutzung nötig. Dazu zählt die Nutzung der aromatischen Komponenten zur weiteren Verarbeitung zu zahlreichen hochwertigen Produkten [1,90]. Damit stellen die Ligninabbauprodukte aus der Zellstoffindustrie eine geeignete Lösung zum Ersatz der petrochemischen Produktion vieler Plattformchemikalien dar. Die bei der Zellstoffproduktion anfallenden Mengen an Ligninabbauprodukten bieten einen großen Spielraum zur stofflichen Nutzung, ohne dass Engpässe der Rohstoffbereitstellung zu befürchten sind.

Die Ligninabbauprodukte aus den Ablaugen haben somit ein großes Potential zur stofflichen Nutzung mit einer hohen Wertschöpfungsebene außerhalb der Nahrungsmittelkonkurrenz [1].

Zurzeit werden die Ablagen jedoch fast ausschließlich einkonzentriert und verbrannt, um die Prozesschemikalien zurückzugewinnen. Die bei der Verbrennung der Ablage entstehende Wärme wird zur Wasserdampfgewinnung genutzt, aus dem mittels Dampfturbinen Energie gewonnen wird, welche anschließend für den Prozess verwendet wird. Im Werk der Zellstoff- und Papierfabrik Rosenthal GmbH werden zum Beispiel durch die Dampfturbinen 42-48 MW/h Strom erzeugt. Davon werden 28 MW/h für die Produktion benötigt [68]. Die restliche Energie wird ins öffentliche Stromnetz eingespeist. Diese Einspeisung von Strom aus erneuerbaren Energien wird zurzeit noch staatlich gefördert (Erneuerbare Energien Gesetz). Bei der Energiegewinnung hat der Heizwert der Ablage einen entscheidenden Einfluss auf die Dampfgenerierungsrate. Die eingedickte Sulfatablage besitzt einen Heizwert zwischen 13 und 17 MJ/kg [5,91]. Dieser Heizwert ist jedoch von einigen Faktoren abhängig. Dazu zählen die Menge und die Zusammensetzung des bei dem Aufschluss verwendeten Holzes, die Zusammensetzung der enthaltenen organischen Substanzen, sowie das Verhältnis von Anorganik zu Organik. Im Vergleich zu dem Heizwert der eingedickten Ablage beträgt der Heizwert von isoliertem getrockneten Nadelholzlignin 26,9 MJ/kg und von Laubholzlignin 25,1 MJ/kg [15]. Die Differenz zwischen dem Heizwert der Dicklage und den isolierten Ligninen kommt durch den Wassergehalt zustande. Für die Verdampfung des restlichen Wassers in der Dicklage wird zusätzliche Energie benötigt, wodurch der Heizwert deutlich gesenkt wird [5]. Wird zudem berücksichtigt, dass für das Eindampfen der Ablagen bis zu einem Trockensubstanzanteil von ca. 75% ebenfalls große Energiemengen benötigt werden, sinkt der effektive Energiegewinn deutlich. Dies wird durch den Heizwert einer Sulfitablage (nicht eingedickt) deutlich. Dieser liegt zwischen 6,85 und 7,75 MJ/kg [15].

Entfällt die Förderung für die Einspeisung von erneuerbaren Energien, wird sich vom energetischen Standpunkt aus die Verbrennung der Ablagen auf längere Sicht nicht lohnen. Dahingehend ist eine stoffliche Nutzung des Lignins aus den Ablagen erstrebenswert. Diese wird jedoch zurzeit nur auf ca. 2% geschätzt. Die restlichen 98% des anfallenden Lignins in der Zellstoffindustrie werden ausschließlich zu energetischen Zwecken genutzt [6,50,92]. Die Menge des anfallenden Lignins beträgt bei der weltweiten Zellstoffproduktion 50 Millionen Jahrestonnen [4–6]. Somit sind erhebliche Mengen für die stoffliche Nutzung verfügbar. Die bisher durchgeführte energetische Nutzung sollte nach dem Ansatz der Kaskadennutzung erst am stofflichen Lebensende des Lignins erfolgen [1,93].

In der Sulfitablaue liegt neben den Ligninabbauprodukten ebenfalls eine große Menge an Monosacchariden vor, die zur Produktion von Bioethanol genutzt werden könnten. Heutzutage wird für die Produktion von Bioethanol hauptsächlich Saccharose aus Zuckerrohr und Stärke aus Mais und Getreide verwendet. Aufgrund der Konkurrenz zum Nahrungsmittelmarkt ist die Nutzung von Mais und Getreide jedoch keine langfristige Lösung. Die Nutzung von pflanzlichen Reststoffen, in denen die Zucker in Form der Lignocellulose vorliegen, stellt eine Alternative zu diesen Rohstoffen dar. Der daraus entstandene Bioethanol wird als Biokraftstoff der 2. Generation bezeichnet [94,95]. Bei der Suche nach erneuerbaren Energien haben besonders die Sulfitablaugen wissenschaftliches Interesse geweckt. Nach einer Abtrennung der in der Ablauge enthaltenen Kohlenhydrate könnten diese ein kostengünstiges Substrat für die Ethanolproduktion darstellen. In den 1940er Jahren wurden Sulfitablaugen bereits zur Bioethanolproduktion verwendet, anschließend jedoch eher zur Produktion von Proteinfuttermitteln (SCP: single cell protein) [94]. Dabei bauen Mikroorganismen aus den organischen Substanzen in der Ablauge Proteine und Aminosäuren auf, die anschließend geerntet werden und als Futtermittel dienen [96]. Die geringe Konzentration der Monosaccharide, der große Anteil der Xylose sowie eine Reihe von Inhibitorsubstanzen in der Sulfitablaue erschweren die optimale Fermentation der Zucker [97]. Würde die eingedickte Ablauge genutzt werden, ist der Zuckergehalt zwar ausreichend hoch, jedoch steigt die Konzentration der Inhibitorverbindungen, die die Aktivität der Hefe stark hemmen. Dazu gehören zum Beispiel Carbonsäuren, Sulfit, Furfuralderivate, Phenole und Extraktstoffe [97,98]. In der Literatur liegen viele Untersuchungen bezüglich des Hefestammes, der Anzuchtbedingungen der Hefen, der Fermentationsbedingungen sowie auch der Detoxifizierung der Ablauge vor [97–105]. Zudem werden genveränderte Hefen entwickelt, die in der Lage sind, die in den Ablaugen enthaltenen Hexosen und Pentosen ohne Vorbehandlung und in einem Schritt zu fermentieren [106]. Großes Potential liegt ebenfalls in der Produktion von Bioethanol aus den Zuckerfraktionen der Bioraffinerie. In diesen liegen hohe Konzentrationen an Monosacchariden vor. Jedoch enthalten auch diese Fraktionen Inhibitoren wie z.B. Furfurale. Ausschlaggebend für eine effiziente und rentable Umsetzung von Lignocellulose zu Ethanol ist die Co-Fermentation von Hexosen und Pentosen.

### 2.3 Aktueller Stand zur Analytik der Ligninabbauprodukte in den Ablaugen

Die bisher durchgeführten Untersuchungen der Ablaugen beziehen sich hauptsächlich auf eine allgemeine Charakterisierung sowie der Bestimmung von Summenparametern wie zum Beispiel der Hydroxygruppen oder Methoxygruppen. Dabei handelt es sich meist um zeitaufwändige nasschemische Verfahren. Die Charakterisierung der Ligninabbauprodukte anhand von Summenparametern ist zudem stark fehlerbehaftet

Weiterhin existiert eine Vielzahl von Arbeiten zur Molekulargewichtsbestimmung der in den Ablaugen enthaltenen Lignine. Diese ist in der Literatur jedoch ein umstrittenes Thema [35]. Ein Großteil der Forschungsgruppen arbeitet mittels Größenausschlusschromatographie. Jedoch variieren die Ergebnisse stark, je nach verwendeter Säule, Lösungsmittel, pH-Wert, Konzentration der Analyten und Art der Kalibrierstandards [35,107]. In aktuellen Publikationen zeigte sich, dass die Ligninabbauprodukte nicht ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht getrennt werden. Vielmehr gehen die Substanzen aufgrund ihrer unterschiedlichen funktionellen Gruppen zusätzlich Wechselwirkungen mit der stationären Phase ein. Da die verwendeten Standards (meist Polystyrol oder Polyethylenglycol) andere Wechselwirkungen aufweisen, ist eine absolute Molekulargewichtsbestimmung der Ligninabbauprodukte mit dieser Methode nicht geeignet. Zudem zeigt das Lignin und dessen Abbauprodukte eine hohe Affinität zur Aggregatbildung, so dass nicht mehr das reale Molekulargewicht bestimmt werden kann. Weitere Verfahren zur Molekulargewichtsbestimmung sind die Dampfdruckosmometrie, Kryoskopie, Ultrafiltration, MALDI-(TOF)MS und Lichtstreuungsmethoden. All diese analytischen Methoden zeigen stark unterschiedliche Ergebnisse [35].

Neben der Molekulargewichtsbestimmung wurden auch weitere Analysenmethoden zur Charakterisierung der Sulfit- und der Sulfatablauge entwickelt.

Kvasnicka *et al.* konnten 1955 bereits fünf Substanzen in einer Sulfitablauge identifizieren. Dabei isolierten sie die einzelnen Stoffe mittels Extraktionen und Papierchromatographie. Die Identifizierung erfolgte mit Elementaranalyse, UV- und IR-Spektroskopie sowie der Molekulargewichtsbestimmung nach Rast (1922). Zu den identifizierten Substanzen gehörten Vanilloylmethylketon, Vanillin, Dihydroconiferylalkohol, 3,3'-dimethoxy-4,4'-dihydroxystilben sowie eine zu diesem Zeitpunkt unbekannt Substanz mit der Summenformel  $C_{20}H_{24}O_5$  [108].

Pearl *et al.* arbeiteten 1964 mit einer Fraktionierung mittels Ionenaustauschern. Die erhaltenen Fraktionen wurden anschließend ebenfalls mit der Papierchromatographie und der Infrarotspektroskopie untersucht. Dabei wurden neben Monosacchariden einige Fettsäureester, Sterole sowie phenolische Säuren mit gesättigten und ungesättigten Resten identifiziert [109–112].

Zusätzlich wurden von Parrish *et al.* 1964 und 1967 sulfonierte Komponenten gefunden und die Strukturen mittels Modellsubstanzen verifiziert. Dazu nutzten sie ebenfalls die Papierchromatographie sowie die Ionenaustauschchromatographie und NMR [113,114].

Von Hachey *et al.* wurde 1986 eine Gesamtstruktur für enthaltene Ligninabbauprodukte vorgeschlagen. Mittels Elementaranalyse, NMR, IR, UV, SEC, Gaschromatographie und massenspektrometrischer Fragmentierung (FABMS) wurde eine oligomere Struktur mit fünf Phenoleinheiten postuliert [115].

Ebenfalls 1986 identifizierten Sakai *et al.* einige monomere Strukturen in einer Sulfatablauge aus einem Isopropanol-Bisulfitaufschluss. Monomere Produkte konnten dabei mit SEC, GC, Papierchromatographie, UV-Spektroskopie und Elementaranalyse charakterisiert werden [116].

Die Untersuchung von Sulfatablaugen wurde mit ähnlichen Methoden durchgeführt. Da der Sulfataufschluss einige Jahre zur Etablierung benötigte, begann die Charakterisierung der Sulfatablauge erst in den 70er Jahren. Es wurde weitestgehend auf chromatographische Methoden sowie Massenspektrometrie und NMR zurückgegriffen.

1978 charakterisierten Löwendahl *et al.* verschiedene monomere phenolische Substanzen in einer Sulfatablauge. Dabei wurden Anionenaustauscher zur Fraktionierung der Substanzen genutzt. Die Fraktionen wurden anschließend mittels GC-MS untersucht. Es wurden Phenole mit verschiedenen funktionellen Gruppen, wie Keto-, Aldehyd-, Säure- und Alkoholgruppen, identifiziert [117].

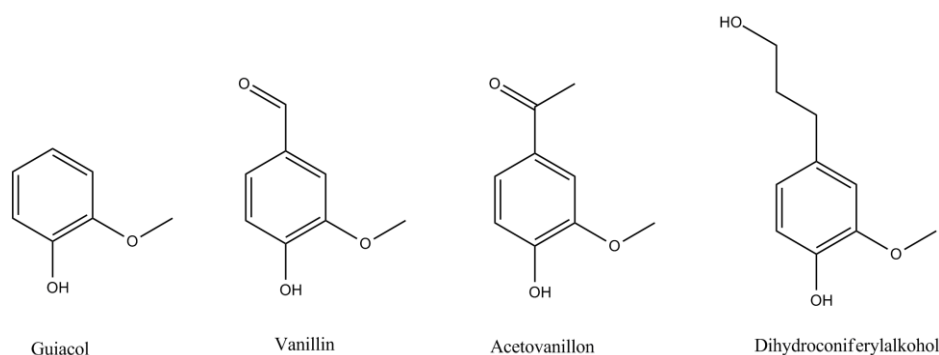
Giere *et al.* isolierten und identifizierten 1980 21 Monomere und 11 Dimere aus der Sulfatablauge. Dazu wurden GC-MS-, HPLC-MS sowie NMR-Methoden verwendet [118].

1984 isolierte die Arbeitsgruppe zudem sechs Hydroxysäuren, bestehend aus einem Coniferylkern mit unterschiedlichen Kettenlängen am Rest. Die Isolierung erfolgte mittels präparativer HPLC, die Identifizierung mit GC-MS und NMR-Methoden [119].

Eine Reihe von Untersuchungen von Ligninen aus verschiedenen Aufschlüssen wurde von van Klashorst *et al.* (1987-1988) durchgeführt. Als analytische Methode wurden dabei hauptsächlich GC-MS und NMR verwendet. Identifiziert wurden einige monomere Strukturen sowie Diarylethane [120–123].

Zeitgleich (1985-1989) untersuchten Niemelä *et al.* verschiedene Ablaugen ebenfalls mittels GC-MS. Dabei wurden Hydroxycarbonsäuren mit Sinapyleinheiten, aliphatische Carbonsäuren, Harzsäuren, Catecholverbindungen sowie weitere monomere und dimere Ligninabbauprodukte identifiziert [124–127].

Alen *et al.* konnten 1989 einige Monomere mittels GC-MS nach einem alkalischen Aufschluss nachweisen. Zudem quantifizierten sie diese mittels GC-FID und zeigten damit, dass in der letzten Prozessstufe vier Hauptmonomere vorliegen (Guaiacol, Vanillin, Acetovanillon und Dihydroconiferylalkohol) [128,129]. Diese sind in Abbildung 32 dargestellt.



**Abbildung 32: Mittels GC-MS nachgewiesene Hauptmonomere [128,129]**

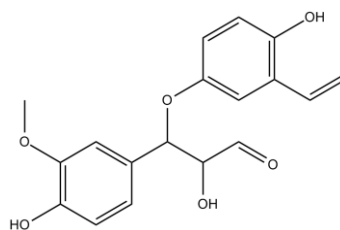
In fast allen der oben beschriebenen Publikationen wird die Gaschromatographie zur Analytik der Ligninabbauprodukte genutzt. Einige weitere Arbeitsgruppen untersuchten diese mittels Kapillarzonenelktrophorese (CZE) [130]. Die Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion ist jedoch die am weitesten verbreiteste Methode zur Identifizierung von niedermolekularen Ligninabbauprodukten. Eine große Anzahl von unterschiedlichen Substanzen ist jedoch eine große Herausforderung für diese Art der Analytik [65].

In den letzten Jahren wurde nach geeigneten massenspektrometrischen Methode gesucht, um die Molekulargewichtsverteilung von verschiedenen Ligninproben zu bestimmen und die einzelnen Ligninabbauprodukte zu charakterisieren und zu identifizieren. Potential für diese Problematik zeigten dabei Ionisierungsmethoden wie ESI, APCI, und APPI. Bei diesen Methoden handelt es sich im Gegensatz zu der mit der Gaschromatographie gekoppelten EI oder CI um Ionisierungen bei Atmosphärendruck. Zudem ermöglichen diese MS-Techniken eine Kopplung zur flüssigchromatographischen Trennung. Damit wäre es möglich, die Analyten in einer komplexen Mischung zu trennen und mittels MS mit einer hohen Genauigkeit zu identifizieren [36].



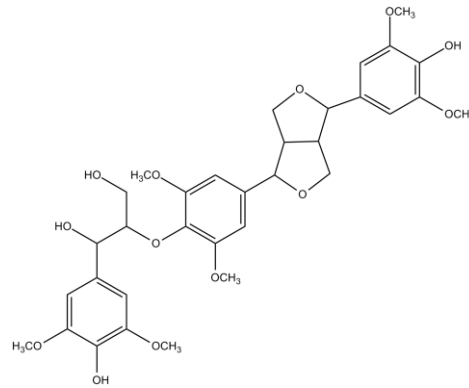
Die Fragmentierung von Oligomeren des Lignins wurde 2010 von Morreel *et al.* untersucht. Ziel dabei war der Aufbau einer Massenspektren-Datenbank für Ligninverbindungen. Mit den untersuchten Fragmentierungsmechanismen von Modellsubstanzen konnten sie eine Methode entwickeln, die eine Sequenzierung verschiedener Ligninoligomere und die Aufklärung neuer Einheiten und Verknüpfungen ermöglicht. Sie konnten so in ihren Arbeiten 134 Oligomere in einer Ligninfraktion aus Holz nachweisen [131,132]. Davon konnten 36 oligomere Substanzen über ihr Fragmentierungsmuster identifiziert werden. Zudem konnten 10 Monomere bestimmt werden, wobei einer Substanz eine Struktur zugeordnet werden konnte (Arylglycerol).

Hauptert *et al.* und Owen *et al.* charakterisierten Modellsubstanzen des Lignins mittels APCI-MS und ESI-MS. Zudem wurden Ligninabbauprodukte aus dem Organosolvverfahren mittels HPLC-MS<sup>n</sup> charakterisiert. Mit einer massenspektrometrischen Methode (ESI-negativ, mit NaOH als Dopant) wurden die Analyten untersucht. Dabei konnte neben Vanillin, eine weitere unbekannte Substanz identifiziert werden (siehe Abbildung 33) [133,134]. Die Identifizierung der dimeren Substanz erfolgte dabei über die Berechnung der Summenformel und der Doppelbindungsäquivalente über die detektierte Präzisionsmasse sowie über MS<sup>n</sup>-Experimente.



**Abbildung 33: Struktur einer von Hauptert et al. identifizierten Substanz [134]**

Massenspektrometrische Untersuchungen wurden an weiteren ligninhaltigen Komponenten durchgeführt. So untersuchten Pinto *et al.* Ablaugen aus dem Sulfatverfahren mittels ESI-MS sowie NMR und SEC. Die in dieser Arbeit gezeigten Massenspektren zeigen jedoch die starke Komplexität der Ablaugen, so dass die Signale als Untergrundrauschen gedeutet werden könnten [36,135]. Evtuguin *et al.* bestimmten die Massenverteilung von aus Holz mittels Dioxan isoliertem Lignin mit ESI-MS. Zur Charakterisierung der detektierten Verbindungen wurden CID-Experimente durchgeführt [136,137]. Dabei wurde die Struktur eines Trimers postuliert (Abbildung 34).



**Abbildung 34: Struktur eines von Evtuguin et al. postulierten Trimers [137]**

Weitere Arbeiten wurden mittels APPI sowie MALDI-MS durchgeführt. Dabei wurde meist polymeres Lignin zur Analytik genutzt [138–140]. Die Analyse von prozessierten bzw. modifizierten Ligninen wurde unter anderem von Bayerbach *et al.* 2009 mittels MALDI-(TOF)MS durchgeführt [141].

Nahezu alle aufgeführten Arbeiten beschäftigen sich entweder mit der Untersuchung einzelner Modellsubstanzen anhand analytischer Methoden und Fragmentierungsvorgängen oder mit der Analytik von polymerem Lignin, um über degradative Studien dessen polymere Struktur aufzuklären. Im Rahmen dieser Arbeiten konnten vereinzelt Strukturen der Ligninbruchstücke identifiziert werden, die zur Aufklärung der polymeren Ligninstruktur beigetragen haben. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus den verschiedenen Arbeitsgruppen muss als kritisch betrachtet werden, da die vermessene Probe je nach Ursprung des Lignins, der Holzart und der Fraktionierung und Aufarbeitung eine unterschiedliche Zusammensetzung besitzt. Diese Arbeiten zeigen das große Potential der massenspektrometrischen Analyse von Lignin und dessen Abbauprodukten. Besonders durch MS/MS-Experimente kann eine Strukturaufklärung der detektierten Substanzen erfolgen. Zu der massenspektrometrischen Analyse von Ligninabbauprodukten aus den Ablagen der Zellstoffindustrie liegen nur wenige Publikationen vor. Ausschließlich Owen *et al.*, Jarrell *et al.* und Pinto *et al.* entwickelten Ansätze zur Bestimmung von Ligninverbindungen in einer Organosolv- und einer Sulfatablage [134,135,142]. Hintergrund dieser Analysen war die Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung nach dem Aufschluss in der Zellstoffindustrie oder eine stark analytisch ausgerichtete Strukturaufklärung -und verifizierung einzelner Substanzen über MS<sup>n</sup>-Experimente mittels ESI-MS. Eine Qualifizierung der Ligninabbauprodukte in Bezug auf die Gesamtheit der Substanzklassen wurde dabei nicht durchgeführt, da die hohe Komplexität der Proben eine Analytik mit den bekannten analytischen Verfahren stark beeinflusst, so dass keine eindeutige Zuordnung einzelner Signale möglich ist.

### 3 Zielsetzung

Aufgrund der Endlichkeit fossiler Brennstoffe innerhalb der nächsten Jahrzehnte ist es notwendig, alternative Rohstoffe für die Energiegewinnung und für die Chemieindustrie zu entwickeln. Dahingehend ist eine stoffliche Nutzung von Lignin und dessen Abbauprodukten von großem Interesse. Die bisher in der Literatur durchgeführten Untersuchungen der Ablaugen mittels Summenparametern sowie die Identifizierung einzelner Verbindungen sind nicht ausreichend, um eine Aussage über deren Verwertbarkeit treffen zu können. Zur Qualifizierung und Quantifizierung der Substanzen sind umfassende analytische Methoden unerlässlich.

Die in der Literatur verwendeten Methoden wurden als Grundlage für die Untersuchungen in dieser Arbeit verwendet, um eine dezidierte Analytik von Ablaugen zu erarbeiten.

Zu Beginn werden sowohl anorganische Bestandteile als auch mit Hilfe der klassischen Summenparameter der Lignin- und Zuckergehalt in den Ablaugen bestimmt sowie leichtflüchtige Komponenten mit HS-GC-MS charakterisiert.

Die Ligninabbauprodukte sollen daraufhin durch literaturbekannte Verfahren aus den Ablaugen isoliert werden. Anschließend sollen Modellsubstanzen verwendet werden, um die analytischen Methoden an typischen Vertretern der zu erwartenden Strukturen der isolierten Ligninabbauprodukte zu entwickeln. Im nächsten Schritt sollen diese auf isolierte Ligninabbauprodukte aus der Sulfit- und der Sulfatablauge als Realsubstanzen angewendet und gegebenenfalls optimiert werden.

Ziel der zu entwickelnden Methoden muss eine umfassende Analyse der Monomere, Dimere, Trimere und Oligomere sein. Zudem sollen die Substanzen über Massenspektren qualifiziert werden, um Rückschlüsse auf die Strukturen diverser Inhaltsstoffe zu ziehen. Als analytische Methoden könnten somit gaschromatographische und flüssigchromatographische Verfahren mit massenspektrometrischer Detektion genutzt werden.

Ausgehend von den Ergebnissen soll eine Wertung in Bezug auf die Nutzung als nachwachsender Rohstoff erfolgen sowie eventuell erforderliche Schritte zur Gewinnung dieser Rohstoffe diskutiert werden.

## **4 Ergebnisse und Diskussion**

In den Ablaugen der Zellstoffindustrie sind, wie in Kapitel 2.2 beschrieben, Abbauprodukte des Lignins und der Kohlenhydrate enthalten.

In diesem Kapitel wird zunächst die allgemeine Zusammensetzung der Ablaugen untersucht. Aufgrund des zu erwartenden hohen Zuckergehalts in der Sulfitablauge, wird die Fermentation der Ablauge als Anwendungsbeispiel für die Analyse der Zucker untersucht.

Zur Qualifizierung der Ligninabbauprodukte werden chromatographische Kopplungsmethoden (GCxGC-MS, HPLC-DAD und HPLC-MS) sowie eine massenspektrometrische Methode (ESI und APCI) mit Modellsubstanzen entwickelt und unter Berücksichtigung der durchgeführten Voruntersuchungen zunächst auf die Ligninsulfonate und anschließend auf das Kraftlignin übertragen. Die ermittelten Strukturen der Ligninabbauprodukte werden dargestellt.

Als industrielle Proben zum Aufbau einer geeigneten Analytik dienten zwei repräsentative Ablaugen aus den beiden vorherrschenden Prozessen in der Zellstoffindustrie. Zum einen wurde die aus dem sauren Bisulfitverfahren stammende Sulfitablauge der Firma Sappi (Alfeld) verwendet. In diesem Prozess werden als Ausgangsmaterial 50% Fichte und 50% Buche genutzt. Die zweite untersuchte Sulfatablauge stammt aus dem Kraftprozess der Zellstoff- und Papierfabrik Rosenthal. Für diesen Prozess wurde ausschließlich Nadelholz eingesetzt (70% Fichte und 30% Kiefer).

Alle, in diesem Kapitel nicht gezeigten Chromatogramme und Massenspektren sind in Kapitel 8 aufgeführt. Die detaillierte Beschreibung der verschiedenen Analysemethoden ist in Kapitel 7 dargestellt.

### **4.1 Allgemeine Charakterisierung der Ablaugen**

Die beiden in dieser Arbeit untersuchten Ablaugen wurden zunächst allgemein charakterisiert. Wesentliche Eigenschaften der Sulfit- und Sulfatablauge sind in Tabelle 12 dargestellt. Die Methoden zur Bestimmung dieser Eigenschaften sind in Kapitel 7.1 angegeben.

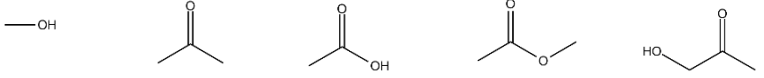
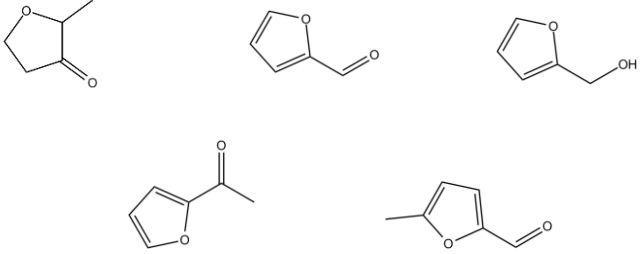
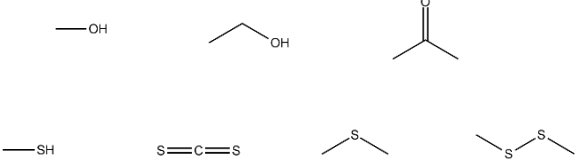
**Tabelle 12: Eigenschaften der Sulfit- und Sulfatablauge (TS = bezogen auf Trockensubstanz)**

<b>Eigenschaft</b>	<b>Sulfitablauge</b>	<b>Sulfatablauge</b>
Farbe	braun	schwarz-braun
pH-Wert	5,4	13,4
Trockenmasse (80 °C)	17%	17%
Ligninabbauprodukte (TS)	49%	32%
<b>Anorganik (TS)</b>		
Natrium	n.n.	22%
Kalium	0,3%	1%
Magnesium	4%	<0,3%
Calcium	<0,3%	<0,3%
Kohlenstoffgehalt (TS)	34%	31%
Wasserstoffgehalt (TS)	6%	4%
Stickstoffgehalt (TS)	0%	0%

Die Sulfitablauge besitzt einen pH-Wert von 5,4. Dieser wird von der Zellstoffabrik nach dem Aufschluss und der Abtrennung des Zellstoffs mit  $Mg(OH)_2$  eingestellt. Der ursprüngliche pH-Wert der Sulfitablauge beträgt ca. 2 [143]. Die enthaltenen anorganischen Substanzen stammen aus den Prozesschemikalien (6,8%  $SO_2$  und 1,05%  $MgO$ ; bezogen auf die Holztrockenmasse) sowie aus dem Neutralisationsmittel ( $Mg(OH)_2$ ) [143]. Bei dem Sulfataufschluss wird Natronlauge als Aufschlusschemikalie eingesetzt. Dies erklärt den pH-Wert von 13,4. Da bei diesem Verfahren die Cellulose und Hemicellulose kaum angegriffen werden, sind diese auch nur in geringem Maße (1,3%) als Abbauprodukte in der Ablauge vorhanden. In der Sulfatablauge liegt ein hoher Anteil an anorganischen Komponenten, hauptsächlich Natrium (22% bez. auf die Trockenmasse), vor. Als Aufschlusschemikalie wird neben  $NaOH$  auch  $Na_2S$  verwendet. Dies erklärt den hohen Natriumgehalt in der Ablauge.

Da beide Ablaugen einen starken Eigengeruch aufweisen, ist zu erwarten, dass eine Vielzahl leichtflüchtiger Substanzen vorliegt. Die Bestimmung dieser erfolgte mittels HS-GC-MS. In Tabelle 13 sind die analysierten Komponenten in den Ablaugen dargestellt.

Tabelle 13: Leichtflüchtige Substanzen in Sulfit- und Sulfatablauge

Ablauge	Strukturen
	
Sulfitablauge	
Sulfatablauge	

Wie in Tabelle 13 zu sehen ist, enthalten beide Ablaugen kurz-kettige leichtflüchtige Substanzen. Weiterhin sind in der Sulfatablauge Schwefelverbindungen (Sulfide, Schwefelkohlenstoff und Methanthiol) zu finden. Im Sulfatverfahren ist  $\text{HS}^-$  eine der aktiven Spezies und reagiert sehr schnell [69]. Daraus ergibt sich eine Reihe von schwefelhaltigen Reaktionsprodukten, die mittels HS-GC-MS detektiert werden konnten. Auffallend ist, dass in der Sulfitablauge eine Vielzahl von Furanverbindungen enthalten ist. Diese stammen aus dem Abbau der Hemicellulose. Während in der Sulfatablauge kaum Kohlenhydrate vorhanden sind (1%), konnte in der Sulfitablauge ein Zuckergehalt von 23% bestimmt werden. Der hohe Kohlenhydratanteil lässt sich damit erklären, dass in dem Sulfitaufschluss aufgrund des niedrigen pH-Wertes neben dem Lignin auch Kohlenhydrate abgebaut und in Lösung gebracht werden

#### 4.1.1 Analytik der Monosaccharide in der Sulfitablauge

Aufgrund des hohen Monosaccharid-Anteils sollen in dieser Arbeit verschiedene analytische Methoden zur Bestimmung der Monosaccharide in der komplexen Matrix der Sulfitablauge verglichen werden. Zudem soll diese analytische Methode auf die Reaktionskontrolle des Fermentationsprozesses der Zucker aus der Ablauge mit verschiedenen Hefen (*Pachysolen tannophilus*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces*

*cerevisiae*) angewendet werden. Bei der, in der Literatur oft untersuchten Hefe *Pichia Stipitis*, handelt es sich um einen sehr empfindlichen Hefestamm, der von den Inhibitorsubstanzen in der Ablauge stark gehemmt wird [98]. Somit wurde dieser Hefestamm nicht für die Fermentation in der Ablauge verwendet.

Zur gaschromatographischen Bestimmung der Monosaccharide wurden verschiedene aus der Literatur bekannten Derivatisierungen miteinander verglichen. Dazu zählen die Silylierung, die Bildung von Alditolacetaten und die Bildung von Aldonitrilacetaten. In Tabelle 14 ist der Vergleich der drei Methoden aufgeführt.

**Tabelle 14: Vergleich verschiedener Derivatisierungsmethoden zur gaschromatographischen Analytik der Monosaccharide**

<b>Parameter</b>	<b>Silylierung</b>	<b>Alditolacetat</b>	<b>Aldonitrilacetat</b>
Reaktions-schritte	1. Oximierung 2. Silylierung	1. Reduktion 2. Alditolacetat-bildung	1. Oximierung 2. Aldonitril-acetatbildung
Zeit für die Aufarbeitung	1 Stunde	4 Stunden	1 Stunde
Experimentelle Hinweise	Probe fällt nach ca. 1 Stunde im Vial aus		
GC-Analytik	Spritze schnell verstopft 2 Peaks pro Zucker	Hohe Retentionszeiten	Bildung von Nebenprodukten
Trennung der Zucker	Nein	Ja	Ja
Standard-abweichung	Nicht bestimmbar	±1-2%	±2-3%

Es ist zu erkennen, dass die Silylierung als Derivatisierung für die erwarteten Zucker nicht geeignet ist, da keine Trennung und somit keine Quantifizierung der Zucker erreicht werden konnte. Die Derivatisierung zum Alditolacetat und zum Aldonitrilacetat zeigen vergleichbare Ergebnisse. Jedoch ist die Zeit für die Probenaufarbeitung bei der Derivatisierung zum Alditolacetat deutlich höher. Der einzige Nachteil der Analytik der Aldonitrilacetate ist die Bildung von Nebenprodukten während der Aufarbeitung. Diese Nebenprodukte sind zum Beispiel die Furanosederivate oder Pyranosederivate der

jeweiligen Zucker. Für die Derivatisierung von Glucose sind das gebildete Aldonitrilacetat sowie die Nebenprodukte in Abbildung 35 dargestellt.

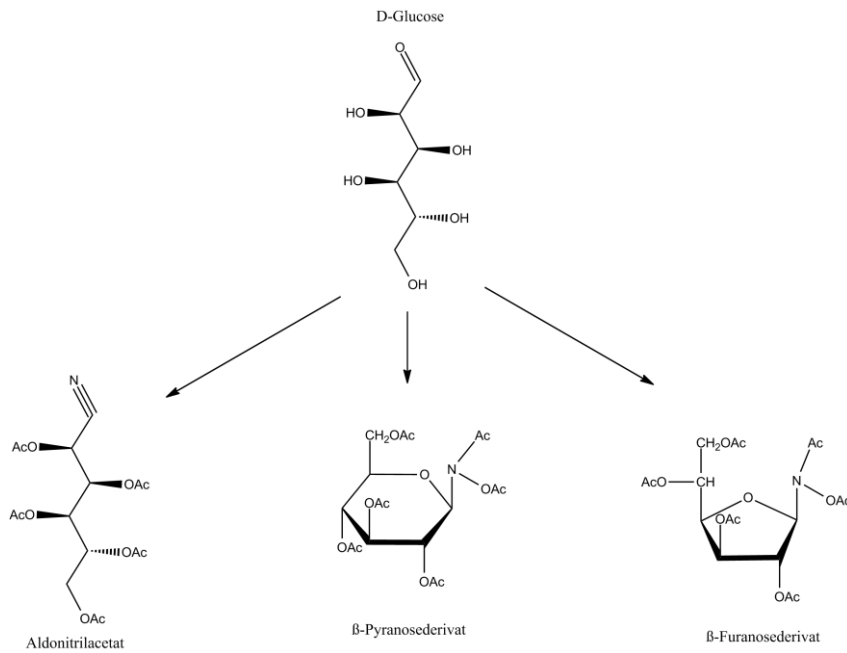


Abbildung 35: Haupt- und Nebenprodukte der Derivatisierung von Glucose zum Aldonitrilacetat [144]

Im GC-FID Chromatogramm eines Gemisches aus sechs Monosacchariden ist die Bildung der Nebenprodukte ebenfalls deutlich zu erkennen (Abbildung 36).

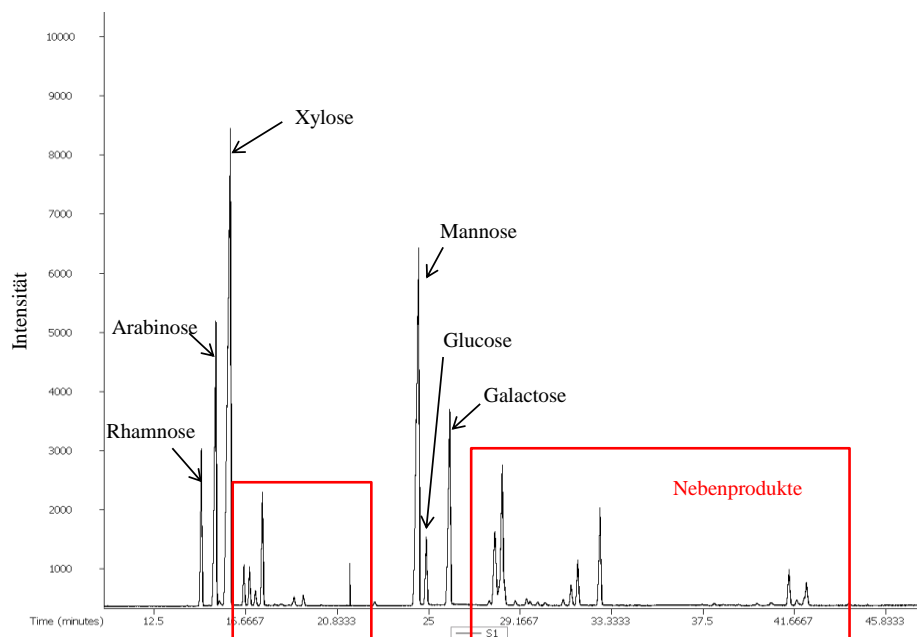


Abbildung 36: GC-FID Chromatogramm von Monosacchariden nach Derivatisierung zu den Aldonitrilacetaten



Die Bildung von Nebenprodukte führt jedoch nicht zu Problemen bei der Quantifizierung der Zucker, da sich Retentionszeiten der Nebenprodukte nicht mit denen der Analyten überschneiden. Zudem ändert sich das Verhältnis von Analyt zu dessen Nebenprodukten nicht in Abhängigkeit von der Konzentration des Analyten. Dies bedeutet, dass durch Integration des Hauptsignals des jeweiligen Zuckers eine zufriedenstellende Quantifizierung zu erreichen ist.

Diese Methode wurde nun für die Analytik der Monosaccharide in der Sulfitablauge genutzt. Die Monosaccharidzusammensetzung ist in Tabelle 15 gezeigt. Die Quantifizierung erfolgte über eine externe Kalibrierung sowie mit Lactose als internem Standard.

**Tabelle 15: Monosaccharidzusammensetzung in der Sulfitablauge**

<b>Monosaccharid</b>	<b>Gehalt [g/L]</b>	<b>Gehalt [% TS]</b>
Xylose	13,28	10,2
Mannose	8,35	6,4
Glucose	4,33	3,3
Galactose	4,06	3,1
Arabinose	3,49	2,7
<b>Gesamt</b>	<b>33,5</b>	<b>25,7</b>

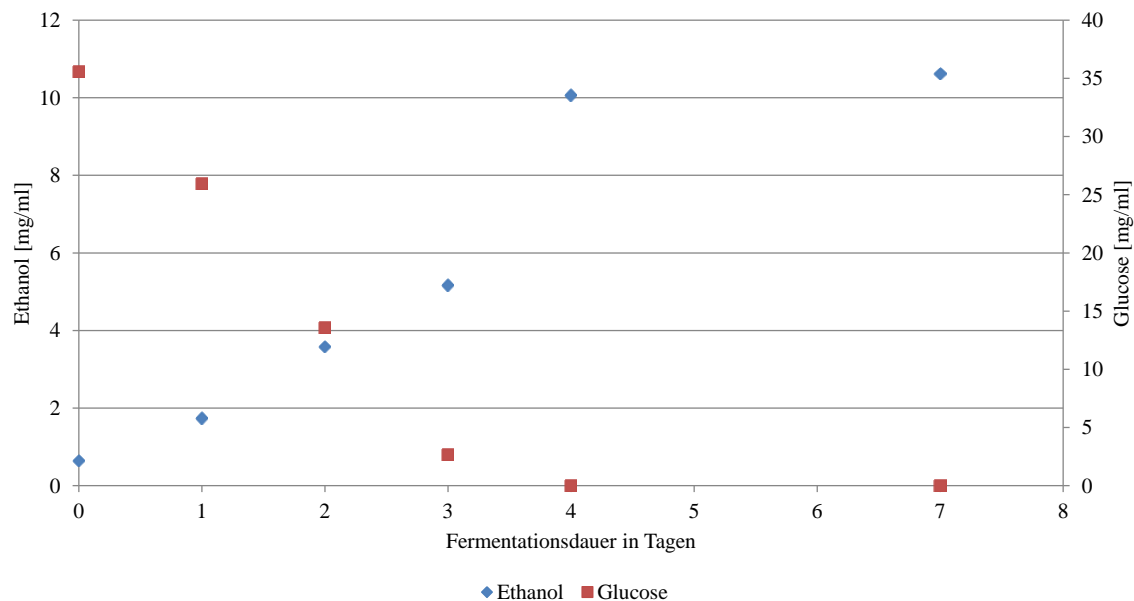
Die Differenz zum Gesamtzuckergehalt von 23% (Anthron) kommt vermutlich durch den hohen Fehler des Anthron-Tests zustande. Da es sich um eine photometrische Untersuchung handelt und die Sulfitablauge trotz starker Verdünnung auch eine eigene Absorption bei 620 nm zeigt. Dies führt zu einer Standardabweichung von 10%.

Die Verteilung der Monosaccharide hängt mit den in dem Holz vorhandenen Hemicellulosen zusammen. Wie in Kapitel 2.1 beschrieben, liegen vor allem substituierte Mannane und Xylane vor. Diese werden während des Sulfitaufschlusses zu den jeweiligen Monosacchariden abgebaut.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass diese Methode für die Analytik der Monosaccharide in der Sulfitablauge geeignet ist, wird diese zur Kontrolle des Fermentationsverlaufs genutzt. Da sich hier Nebenprodukte bilden können, muss die Qualität der analytischen Methode verifiziert werden.

Der Ethanolgehalt während der Fermentation wurde über die Headspace-Gaschromatographie bestimmt.

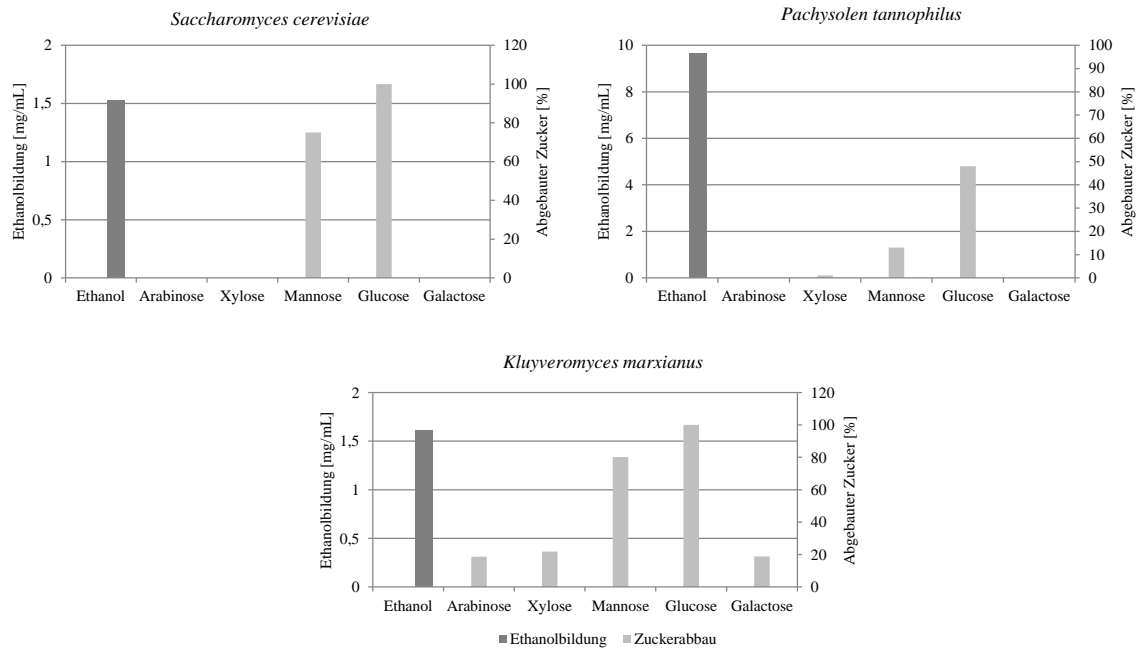
In Abbildung 37 ist beispielhaft der Verlauf der Zuckerkonzentration und der Ethanolkonzentration im Verlauf der Fermentation gezeigt (Fermentation von Glucose mit *S. cerevisiae*; 20% Dünnlauge).



**Abbildung 37:** Verlauf der Zucker- und Ethanolkonzentration der Fermentation von Glucose (*S. cerevisiae*)

Wie in der Abbildung zu erkennen ist, korreliert die Ethanol-Bildung mit dem Zuckerabbau. Während der Fermentation nehmen die Zuckerkonzentration ab und die Ethanolkonzentration mit einem ähnlichen Verlauf zu. In diesem Beispiel wurde nach 4 Tagen Fermentationsdauer die Glucose vollständig zu Ethanol umgesetzt.

Zur Übertragung dieser Ergebnisse auf die Fermentation der Zucker direkt aus der Ablauge wurden drei verschiedene Hefen, wie in der Literatur angegeben, auf einem optimierten Medium angezogen [145]. Zur Fermentation wurde ein 50%iges Sulfitablauge-Medium verwendet. In Abbildung 38 sind die Versuchsergebnisse gezeigt.



**Abbildung 38: Vergleich der Ethanolbildung und des Glucoseabbaus bei der Fermentation der Ablauge (50%ig)**

Wie zu erwarten war, fermentiert *Saccharomyces cerevisiae* ausschließlich die Hexosen Glucose und Mannose. Bei der Fermentation der Zucker aus der Ablauge mit *Pachysolen tannophilus* werden auch ausschließlich Glucose und Mannose fermentiert. Dieser Abbau erfolgte jedoch nur zu einem Anteil von maximal 50%. Auffallend war jedoch die Fermentation mit *Kluyveromyces marxianus*. Mit dieser Hefe ist es möglich, alle Zucker zu fermentieren. Dabei werden Glucose und Mannose nahezu vollständig fermentiert. Die anderen Zucker werden hingegen nur bis zu 20% abgebaut. Mit Hilfe dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die genutzte analytische Methode für diesen Anwendungszweck geeignet ist.

Die Abbauprodukte der Kohlenhydrate stellen einen interessanten nachwachsenden Rohstoff dar. Die Ablaugen aus der Zellstoffindustrie haben jedoch ein enormes Potential zur stofflichen Nutzung der Ligninabbauprodukte, da diese die einzig natürlich vorkommenden aromatischen Verbindungen darstellen.

## 4.2 Extraktionsversuche aus den Ablaugen der Zellstoffindustrie

Um eine dezidierte Analytik der Ligninabbauprodukte zu ermöglichen, müssen zunächst Kenntnisse über das Löslichkeitsverhalten und die Polarität der Substanzen erlangt werden. Dazu wurden die wässrigen Ablaugen mit verschiedenen nicht mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln extrahiert.

Mit Ethylacetat und Diethylether konnten von beiden Ablaugen jeweils circa 10% der enthaltenen Substanzen (bezogen auf die Trockenmasse) extrahiert werden. Mit unpolaren Lösungsmitteln, wie zum Beispiel Hexan, konnten keine Substanzen extrahiert werden. Somit lässt sich sagen, dass in den Ablaugen ausschließlich mittelpolare bis polare Substanzen vorliegen. Mit dieser Flüssig-Flüssig-Extraktion bei Raumtemperatur können 90% der Substanzen nicht extrahiert werden.

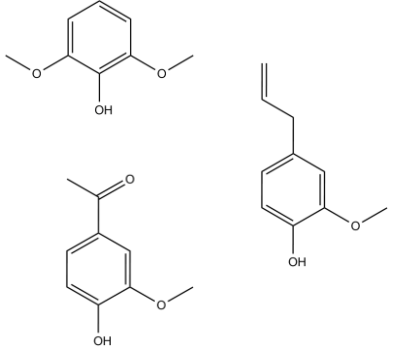
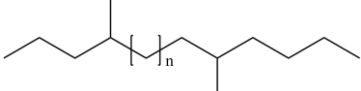
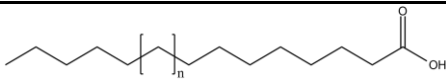
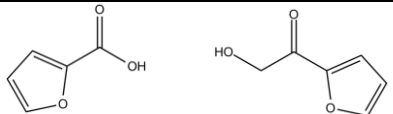
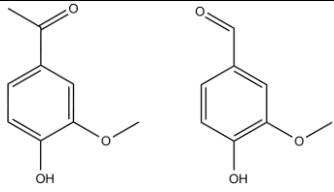
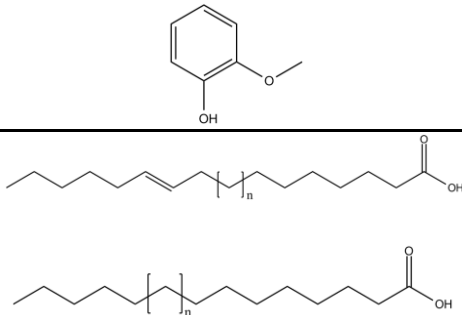
Die qualitative Analyse der Extrakte erfolgte gaschromatographisch (GCxGC-(TOF)MS). In beiden Extrakten ist ein deutlicher Unterschied in der Anzahl der Signale zu erkennen (Tabelle 16).

**Tabelle 16: Peakanzahl in den Chromatogrammen nach Extraktion der Ablaugen mit Ethylacetat und Diethylether**

<b>Ablauge</b>	<b>Ethylacetatextrakt</b>	<b>Diethyletherextrakt</b>
Sulfitablauge	17	27
Sulfatablauge	29	11

Da die detektierten Signale unterschiedliche Retentionszeiten und Massenspektren aufweisen, liegen in den beiden Ablaugen verschiedenartige Extraktstoffe vor. Um welche Substanzklassen es sich handelt, ist in Tabelle 17 zusammengefasst. Dabei ist zu beachten, dass nicht jedem Peak bzw. jedem Massenspektrum eine Substanz zugeordnet werden konnte.

Tabelle 17: Extraktstoffe in Sulfit- und Sulfatablauge n=1-2

Ablauge	Stoffklasse	Beispiele von detektierten Substanzen
Sulfitablauge	Phenole	
	Alkane	
	Ges. Carbonsäuren bzw. Benzoessäuren	
Sulfatablauge	Furane	
	Phenole	
	ungesättigte und gesättigte Carbonsäuren	

In Tabelle 17 wird deutlich, dass in beiden Ablaugen monomere Ligninabbauprodukte extrahiert werden konnten. Die phenolischen Verbindungen unterscheiden sich in ihrer Methoxygruppen-Anzahl und am para-substituierten Rest. Dieser Rest kann zum Beispiel einem Keton, einem Aldehyd oder einer ungesättigten Kohlenwasserstoffkette entsprechen. Verbindungen mit zwei Methoxygruppen liegen ausschließlich in der Sulfitablauge vor.

Dies lässt sich durch die verwendete Holzart bei diesem Prozess erklären. Es werden 50% Laubholz (Buche) verwendet, welches 46-75% des Sinapylalkohols als Monolignol enthält (vergleiche Tabelle 3 in Kapitel 2.1.1). Nadelholz hingegen, wie es bei dem Sulfatprozess verwendet wird, weist ausschließlich Spuren des Sinapylalkohols auf.

Weiterhin konnten in beiden Ablagen Carbonsäuren detektiert werden. In der Sulfitablauge liegen diese als gesättigte Säuren und bei der Sulfatablauge als ungesättigte Säuren vor. Dieser Effekt ist durch den pH-Wert während des Prozesses zu erklären. Im sauren Sulfitverfahren werden die ungesättigten Fettsäuren während des Aufschlusses umgesetzt. Die dabei zum Teil gebildeten gesättigten Fettsäuren sind dagegen stabil [37]. Demgegenüber sind bei dem alkalischen Sulfatverfahren viele Extraktstoffe, wie zum Beispiel neben den gesättigten auch die ungesättigten Fettsäuren stabil. Die langkettigen Carbonsäuren stammen aus den Harzen im Holz [37].

Wie bereits in Kapitel 2.2.1 beschrieben, werden während des Sulfitaufschlusses neben Lignin auch die Kohlenhydrate abgebaut. Die Hexuronsäuren können unter den sauren Prozessbedingungen zu Furanverbindungen abgebaut werden, welche als Extraktstoffe in der Sulfitablauge nachgewiesen werden konnten [37,146].

Da nur wenige Substanzen auf diesem Weg extrahiert werden können, sollen zunächst die Ligninabbauprodukte von der enthaltenen Anorganik und anderer Matrixbestandteile abgetrennt werden. Die Isolierung der Ligninsulfonate aus der Sulfitablauge erfolgte mittels einer Extraktion als Ligninsulfonat-Dicyclohexylamin-Komplex. Das Kraftlignin wurde aus der Sulfatablauge durch Zugabe von Salzsäure gefällt. Beide Isolierungsmethoden sind in Kapitel 7.4.1 detailliert beschrieben.

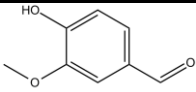
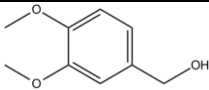
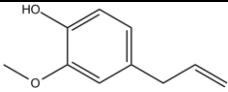
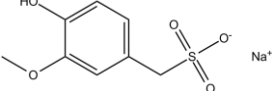
### 4.3 Analytische Untersuchungen der isolierten Ligninabbauprodukte

Wie in Kapitel 2.3 beschrieben, befassen sich die in der Literatur angegebenen Untersuchungen des Lignins hauptsächlich mit der Ermittlung der polymeren Struktur durch degradative Studien mittels Summenparametern und ähnlichem. Die Strukturen der Ligninabbauprodukte in den Ablaugen der Zellstoffindustrie wurden aufgrund der hohen Komplexität bisher nur im geringen Maße untersucht. Zudem existieren nur wenige chromatographische und massenspektrometrische Verfahren zur Analyse der Ligninabbauprodukte.

Zur Qualifizierung der Ligninabbauprodukte wird zunächst eine Methodenentwicklung mit Modellsubstanzen durchgeführt. Die dazu genutzten Modellverbindungen weisen starke strukturelle Ähnlichkeiten mit den zu erwartenden, aus der Literatur bekannten Ligninabbauprodukten auf. Einige der Modellsubstanzen konnten bereits in Ablaugen aus der Zellstoffindustrie identifiziert werden (siehe Kapitel 2.3). Mit Hilfe dieser Methodenentwicklung können erste Rückschlüsse auf das chromatographische und massenspektrometrische Verhalten von Ligninabbauprodukten gezogen werden.

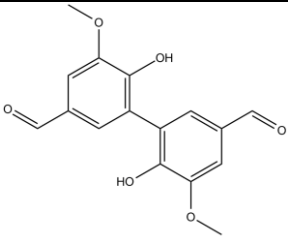
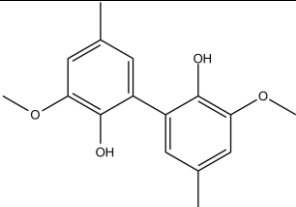
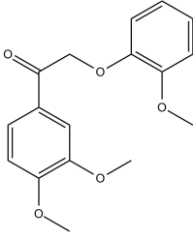
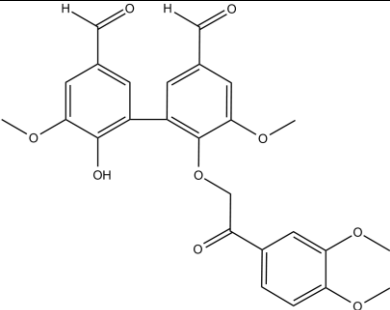
Insgesamt handelt es sich bei den Modellsubstanzen um vier Monomere, drei Dimere, ein Trimer sowie ein Tetramer (Tabelle 18 bis Tabelle 20). Die detaillierten Synthesen sowie die dazugehörigen NMR-Daten sind in Kapitel 7 aufgeführt.

**Tabelle 18: Übersicht über die monomeren Modellsubstanzen**

Name der Modellsubstanz	Exakte Masse [Da]	Struktur
<b>Vanillin</b> 4-Hydroxy-3-methoxy-benzaldehyd	152,0473 Da	
<b>Veratrylalkohol</b> (3,4-Dimethoxyphenyl)-methanol	168,0786 Da	
<b>Eugenol</b> 4-Allyl-2-methoxyphenol	164,0837 Da	
<b>Sulfonierte Modellsubstanz</b> Natrium-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-methansulfonat	240,0068 Da	

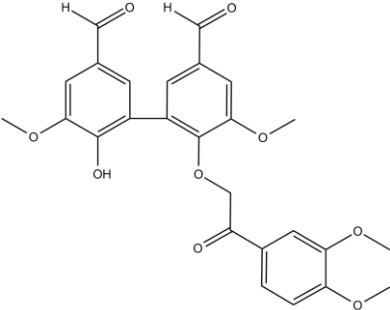
Als Dimere wurden zwei C-C-verknüpfte Substanzen sowie ein Dimer mit einer  $\beta$ -O-4'-Bindung verwendet, um deren unterschiedliches Verhalten bei den jeweiligen Analysen zu untersuchen. Diese beiden Verknüpfungsmöglichkeiten machen den größten Anteil der Ligninbindungen aus [34].

Tabelle 19: Übersicht über die dimeren Modellsubstanzen

Name der Modellsubstanz	Exakte Masse [Da]	Struktur
<b>Dehydrodivanillin</b>	302,0790 Da	
<b>Dimer 1</b>	274,1205 Da	
<b>Dimer 2</b>	302,1154 Da	
<b>Trimer</b>	480,1420 Da	

Zur Überprüfung der analytischen Techniken bezüglich ihrer Eignung für oligomere Ligninabbauprodukte wurde ein Trimer und ein Tetramer synthetisiert (Tabelle 20).

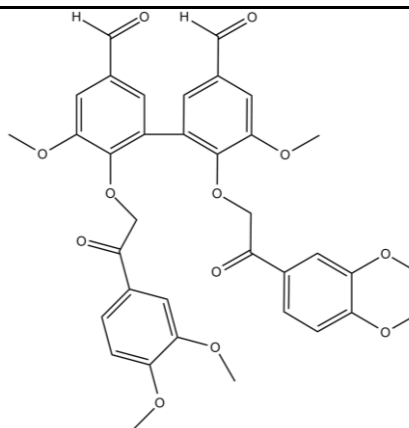
Tabelle 20: Übersicht über die trimere und tetramere Modellsubstanz

Name der Modellsubstanz	Exakte Masse [Da]	Struktur
<b>Trimer</b>	480,1420 Da	



**Tetramer**

658,2050 Da



6,6'-Bis(2-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-oxoethoxy)-5,5'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-dicarbaldehyd

In den folgenden Kapiteln werden die Monomere und Dimere als niedermolekulare Substanzen und Trimere und Tetramere als höhermolekulare Substanzen bezeichnet.

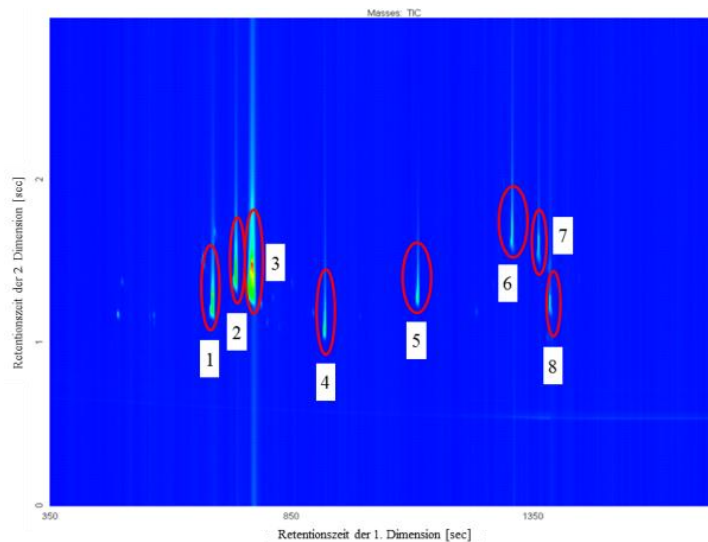
#### 4.3.1 Comprehensive Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion

Wie in Kapitel 4.2 gezeigt, konnten durch eine Flüssig-Flüssig-Extraktion der Ablagen ausschließlich 10% (bezogen auf die Trockenmasse) extrahiert und mittels Gaschromatographie untersucht werden. Eine Möglichkeit, das komplexe System der isolierten Ligninabbauprodukte ohne vorherige Extraktion zu analysieren, bietet die zweidimensionale comprehensive Gaschromatographie (GCxGC). Voraussetzung für eine gaschromatographische Untersuchung ist jedoch die Verdampfbarkeit des Analyten im Injektor.

##### 4.3.1.1 Methodenentwicklung mit Modellsubstanzen

Für eine gaschromatographische Methodenentwicklung zur Bestimmung von Ligninabbauprodukten wurden zunächst die oben gezeigten Modellsubstanzen untersucht.

Dabei ist zu erwarten, dass die Verdampfbarkeit der Analyten mit steigendem Molekulargewicht geringer wird und so gegebenenfalls die Analyse erschwert wird. Durch eine Silylierung sollte es besser möglich sein, diese Substanzen zu analysieren. Dazu zählen zum Beispiel die trimere und tetramere Modellsubstanz, die ohne Silylierung nicht detektiert werden konnte. In Abbildung 39 ist das GCxGC-Chromatogramm eines Gemisches der silylierten Modellsubstanzen gezeigt.

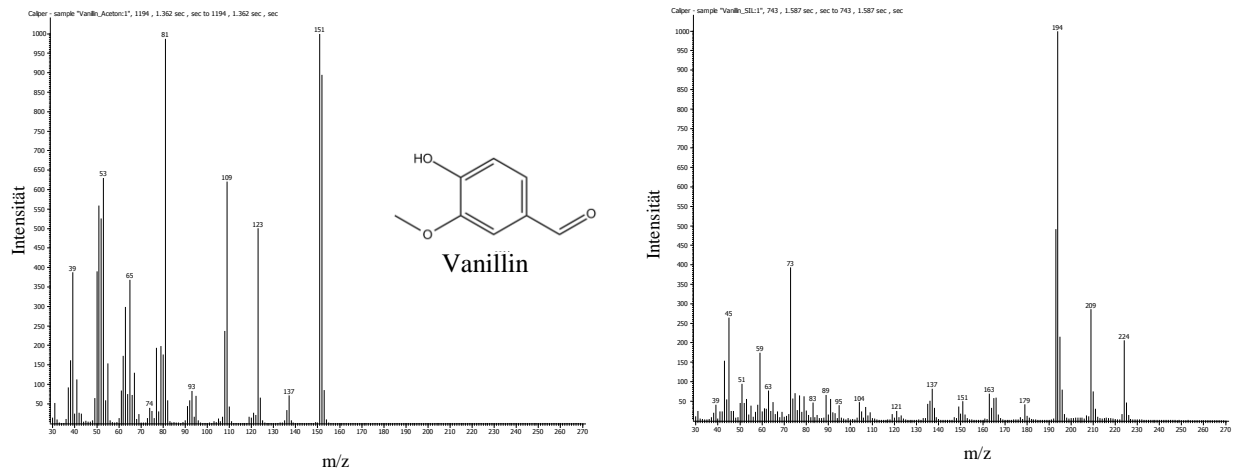


**Abbildung 39: GCxGC-Chromatogramm ausgewählter Modellsubstanzen (silyliert); 1=Eugenol, 2 und 4= Vanillinderivate, 3= Veratrylalkohol, 5= Dimer 1, 6= Dimer 2, 7 und 8 = Dehydrodivanillin-Derivate**

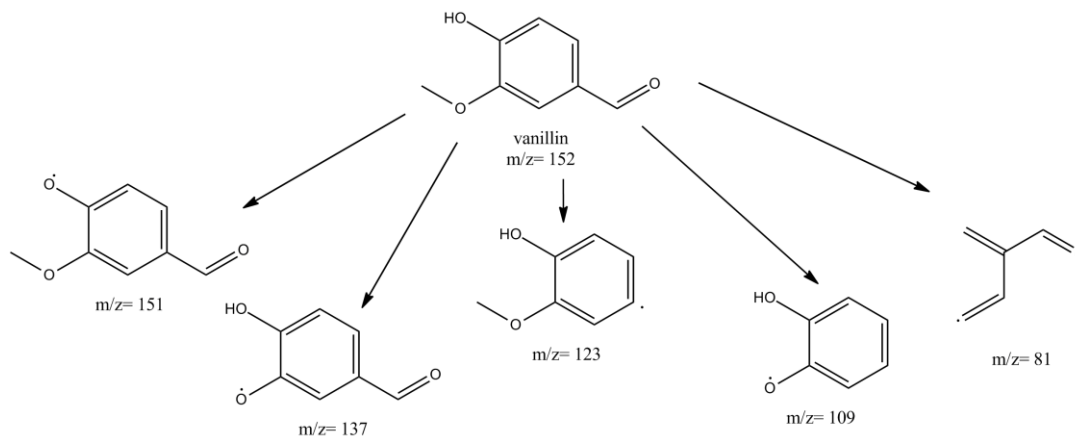
Durch diese Methode sind die eingesetzten Monomere und Dimere mit einer guten Auflösung bestimmbar sind. Dabei bildeten sich bei der Derivatisierung des Vanillins und Dehydrodivanillins jeweils zwei Derivate. Hier hat die Silylierung nicht vollständig stattgefunden. Das Trimer und das Tetramer können mit dieser Methode trotz der Derivatisierung nicht nachgewiesen werden. Auch eine Erhöhung der Injektortemperatur zur besseren Verdampfung führt nicht zur Detektion dieser Analyten. Um auszuschließen, dass die Substanzen durch eine zu starke Retention an der DB5-Phase (5% Diphenyl-, 95% Dimethylpolysiloxan) nicht detektiert werden können, wurden die Messungen mit einer Optima-1-Phase (1% Diphenyl-, 95% Dimethylpolysiloxan) wiederholt. Jedoch konnten auch hier ausschließlich die Monomere und Dimere bestimmt werden. Zusätzlich wurde eine hochtemperaturstabile DB5-Phase genutzt, um das Trimer durch die höhere Temperatur eluieren zu können. Auch hier zeigte sich kein Signal im Chromatogramm. Diese Untersuchungen sprechen dafür, dass das Trimer nicht verdampfbar ist und bei der Injektion im Injektor (Liner) verbleibt. Eine weitere Möglichkeit ist, dass phenolischen Substanzen nicht mehr in der Säureform sondern als Phenolate vorliegen, da als Katalysator die Base Pyridin eingesetzt wird. Diese Phenolate können gegebenenfalls nicht silyliert und detektiert werden.

Alle gemessenen Massenspektren der jeweiligen Monomere und Dimere sind im Anhang in Abbildung 113 und Abbildung 114 jeweils ohne Derivatisierung (links) und silyliert (rechts) gezeigt. Die Silylierung von Dimer 2 erfolgt an der Ketofunktion durch eine Umlagerungsreaktion.

In Abbildung 40 sind beispielhaft die Massenspektren des underivatisierten und silylierten Vanillin gezeigt.



**Abbildung 40: EI-Massenspektren der underivatisierten (links) und silylierten (rechts) Vanillins**  
Die Fragmentzuordnung von Vanillin ist in Abbildung 41 dargestellt.



**Abbildung 41: Fragmentbildung des Vanillins (EI-Spektrum)**

Über dieses Fragmentierungsmuster kann bei unbekanntem Substanzen auf eine bestimmte Grundstruktur geschlossen werden und so eine Strukturzuordnung ermöglicht werden.

Die Fragmentierung der Modellsubstanzen ist stark von deren Struktur abhängig. So wird das  $\beta$ -O-4'-verknüpfte Dimer (Dimer 2) im nicht-derivatisiertem Zustand an der

## Ergebnisse und Diskussion

Verknüpfung gespalten, wodurch ein charakteristisches Massenspektrum entsteht, das in den Realproben einer  $\beta$ -O-4'-Bindung zugeordnet werden kann. Bei den anderen Modellsubstanzen liegt eine stärkere Fragmentierung vor. In den underivatisierten Proben kann problemlos das Molekülion erkannt werden, da dies mit hoher Intensität vorliegt. Bei den silylierten Modellsubstanzen liegt dieses nur noch mit einer sehr geringen Signalintensität vor.

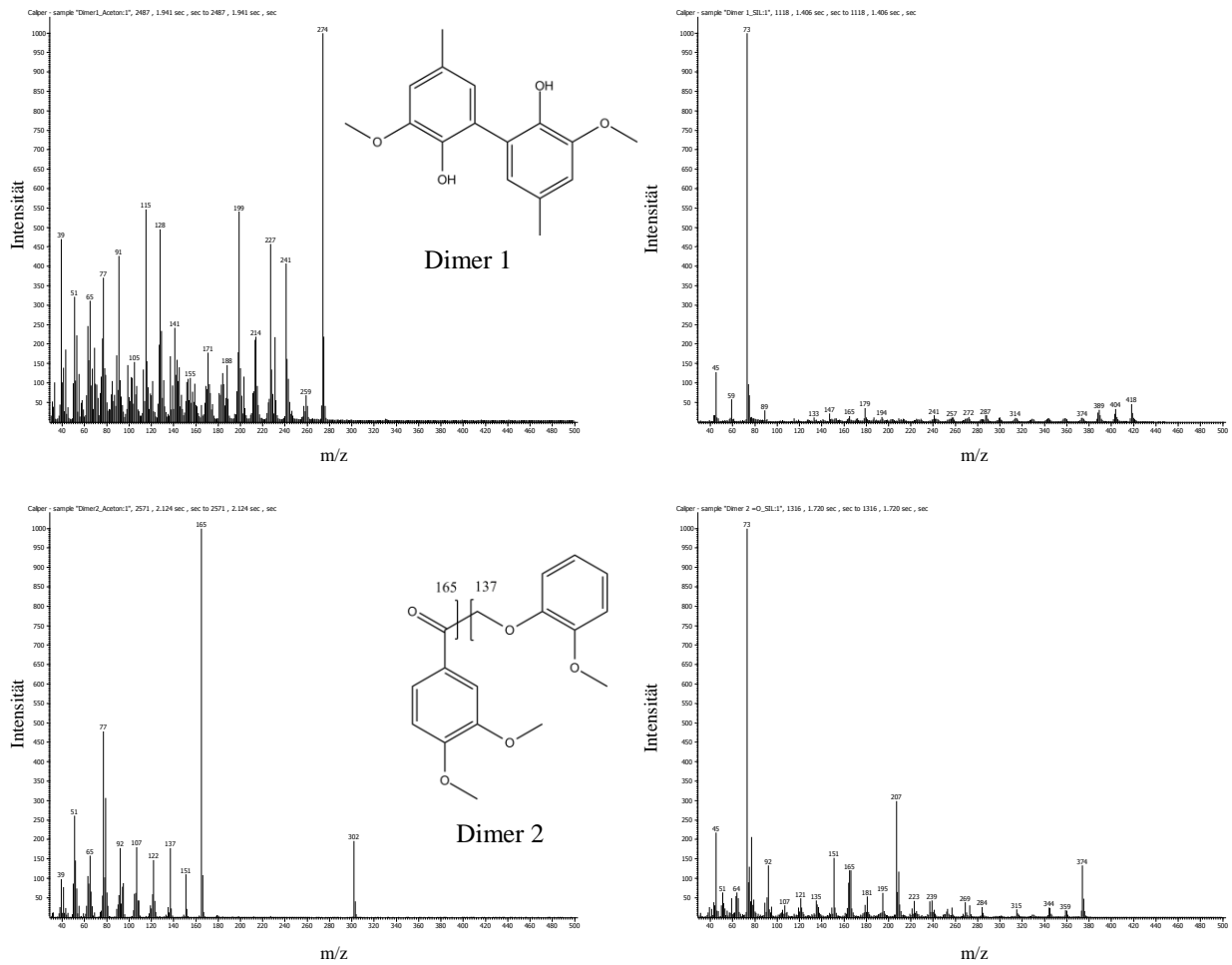
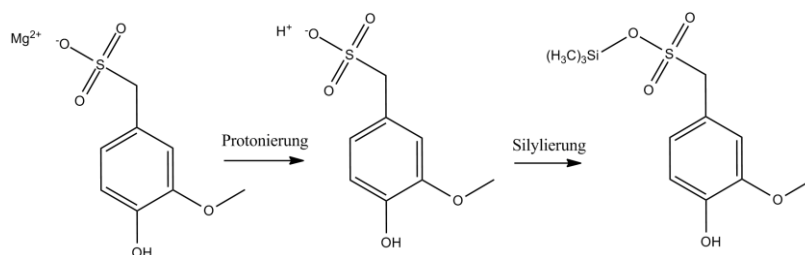


Abbildung 42: EI-Massenspektren der underivatisierten (links) und silylierten (rechts) Dimer 1 und Dimer 2

#### 4.3.1.2 Analytik der Ligninsulfonate

Alle Realproben wurden mit der DB5-Säule in der ersten Dimension und der ZB50-Phase in der zweiten Dimension gemessen.

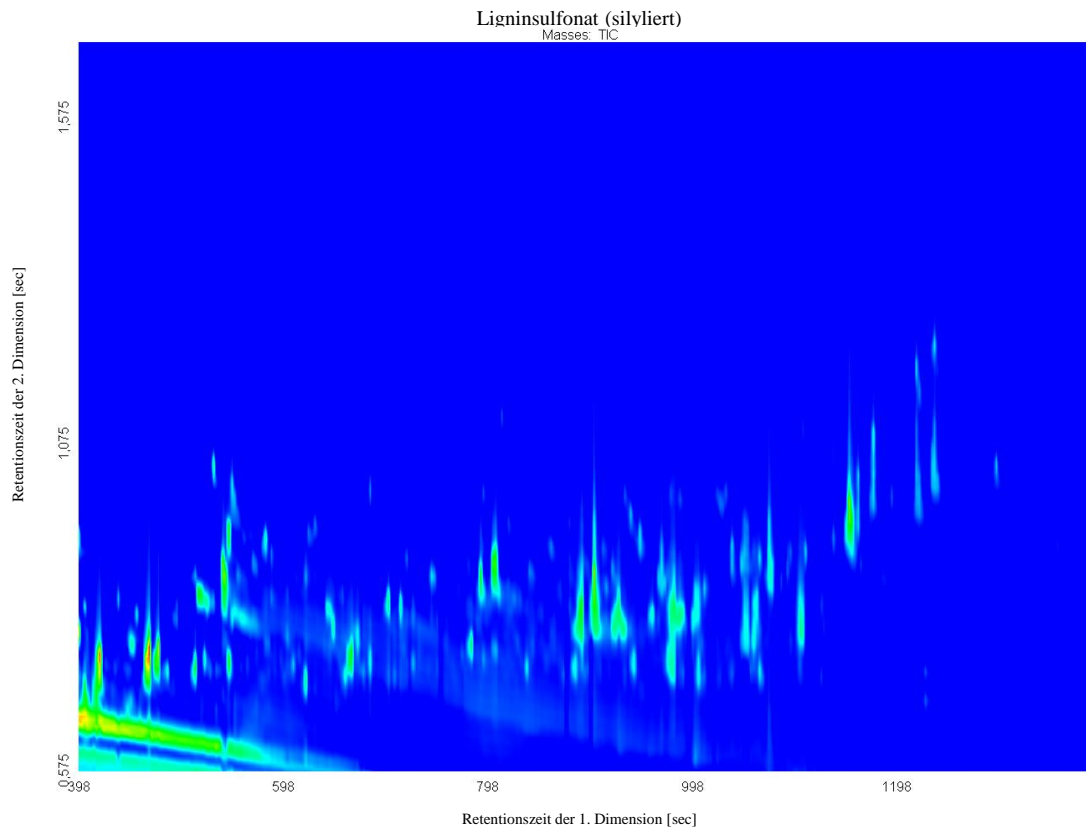
Die isolierten Ligninsulfonate wurden zum einen silyliert und zum anderen vor der Silylierung protoniert. Dabei findet folgende Reaktion statt (Abbildung 43).



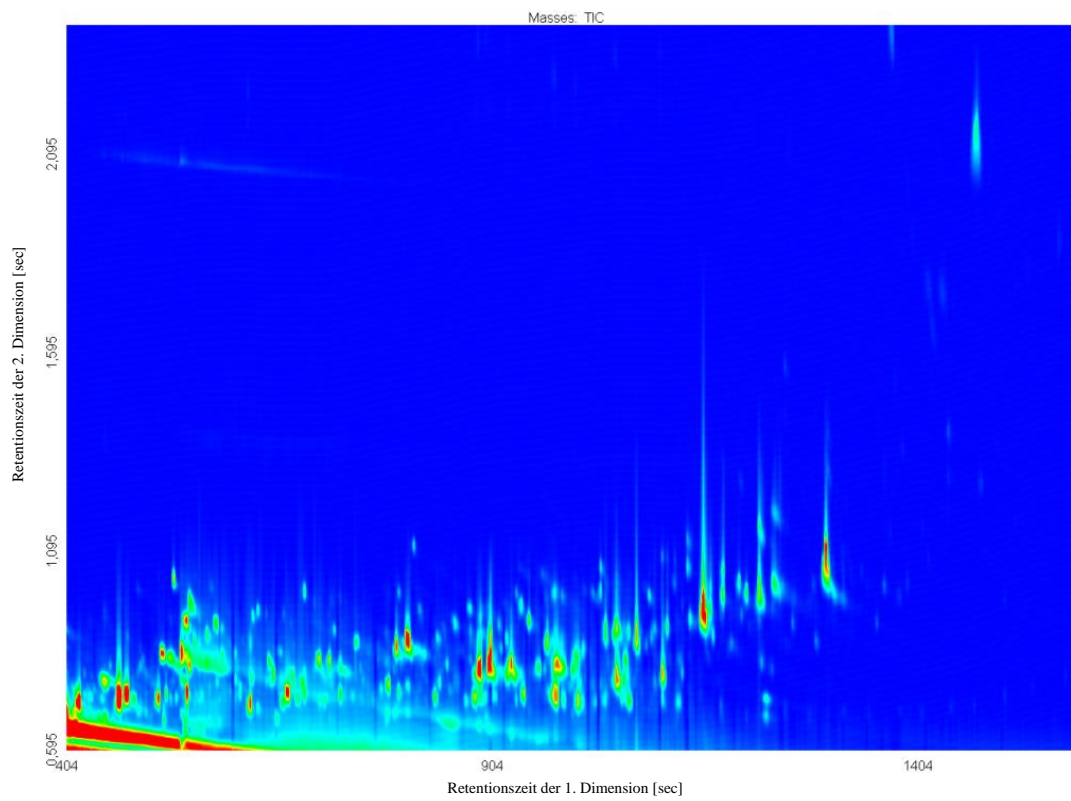
**Abbildung 43: Reaktionsschema zur Protonierung und Silylierung einer sulfonierten Verbindung**

Ligninsulfonate, die in sulfonierter Form ( $[\text{R-SO}_3]_2\text{-Mg}$ ) vorliegen, können nicht direkt silyliert werden und sind in dieser Form nicht mit der Gaschromatographie analysierbar. Die Protonierung mit Salzsäure transformiert die Substanz in die Säureform, welche silyliert und verdampft werden kann.

Beide Proben wurden mit der oben genannten Methode analysiert (Abbildung 44). In den gezeigten Chromatogrammen ist deutlich zu erkennen, dass durch die zusätzliche Protonierung mehr Substanzen detektierbar sind.



**Abbildung 44: GCxGC-Chromatogramm der silylierten Ligninsulfonate**



**Abbildung 45: GCxGC-Chromatogramm der protonierten und silylierten Ligninsulfonate**

Wie bei der gaschromatographische Untersuchung der Ligninsulfonate zu erkennen ist, handelt es sich bei den Ligninabbauprodukten um ein so komplexes Gemisch, dass eine direkte Analyse trotz einer solch leistungsfähigen Methode nicht möglich ist.

Aus diesem Grund ist eine Fraktionierung notwendig. In Kapitel 4.2 konnte bereits gezeigt werden, dass eine Extraktion mit unpolaren Lösungsmitteln nicht erfolgreich war. Ausgehend davon wurden Soxhlet-Extraktionen mit unterschiedlichen Isopropanol/Wasser-Verhältnissen durchgeführt. Diese Art der Extraktion wurde bereits mit technischem Ligninsulfonat (Ammoniumsulfonat aus Nadelholz) durchgeführt um eine Trennung des Lignins von den Kohlenhydraten zu erhalten [147].

Zur Fraktionierung der Ligninsulfonate wurden sukzessiv verschiedene Verhältnisse aus Isopropanol und Wasser als Lösungsmittel genutzt. In Tabelle 21 sind die jeweiligen gravimetrisch bestimmten Ausbeuten sowie die Farbe der Feststoffextrakte aufgeführt.

**Tabelle 21: Gravimetrische Bestimmung und visuelle Beurteilung der Soxhlet-Extrakte der Ligninsulfonate (sukzessive Extraktion)**

<b>Lösungsmittel</b>	<b>Extrahierte Substanz [% TS]</b>	<b>Farbe</b>
100% Isopropanol	5%	schwarz
Isopropanol/Wasser (90/10)	21%	dunkelbraun
Isopropanol/Wasser (80/20)	12%	schwarz
Isopropanol/Wasser (70/30)	14%	braun
Isopropanol/Wasser (60/40)	14%	braun
Isopropanol/Wasser (50/50)	11%	hellbraun
Isopropanol/Wasser (40/60)	1%	braun
Isopropanol/Wasser (30/70)	6%	dunkelbraun
Isopropanol/Wasser (20/80)	1%	dunkelbraun
Isopropanol/Wasser (10/90)	2%	dunkelbraun
100% Wasser	3%	dunkelbraun
Rückstand	12%	braun
<b>Summe</b>	<b>102%</b>	

In Kapitel 4.2 konnten mittels einer Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat und Diethylether ausschließlich 10% (bezogen auf die Trockensubstanz) aus den Ablaugen extrahiert werden. Mit der sukzessiven Soxhlet-Extraktion können jedoch die gesamten Ligninabbauprodukte fraktioniert werden. Bezogen auf eine durchschnittliche Menge des anfallenden Lignins von 720t/Tag allein in der Zellstofffabrik Rosenthal, könnten mit dieser Methode großtechnisch 634t/Tag isoliert werden. Analytisch ist hierbei zu beachten, dass die angegebene Zusammensetzung dem Verhältnis des Lösungsmittelgemischs im Kolben entspricht. Bei einem Gemisch aus 2-Propanol und Wasser sind die Verhältnisse der Komponenten aufgrund der unterschiedlichen Dampfdrücke in der flüssigen Phase und in der Gasphase nicht identisch. Die Zusammensetzung des Lösungsmittelgemischs in der Extraktionshülse ist abweichend von der Zusammensetzung im Kolben und kann mit Hilfe einer Dampfdruckkurve ermittelt werden. Zusätzlich wird die Zusammensetzung durch die bereits extrahierten Substanzen beeinflusst.

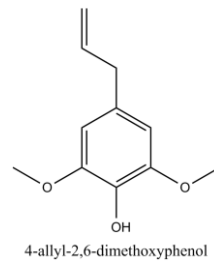
Aufgrund der unterschiedlichen Ausbeuten und Farben der Extrakte (Tabelle 15) wird deutlich, dass es sich nicht um eine Verteilung der gleichen Substanzen über die Extraktionsschritte handelt, sondern eine Fraktionierung stattfindet. Somit scheint die geringe Änderung des Molenbruchs in der Gasphase eine sehr starke Auswirkung auf die Extraktion zu haben, so dass eine fraktionierte Extraktion erfolgen kann.

Auffallend war, dass die Fraktion bei der Extraktion mit 60% Isopropanol/ 40% Wasser ein sehr starkes Schaumverhalten zeigte, so dass das Einengen des Extrakts problematisch war. Es kann angenommen werden, dass in dieser Fraktion eine Vielzahl an Verbindungen mit Sulfonsäuregruppen extrahiert werden konnten, die ein tensidartiges Verhalten aufweisen. Daraus ergibt sich, dass durch die Aufarbeitung diese Substanzen eine Fraktion entsteht (14% bez. auf die Trockenmasse), die ein sehr großes Potential für eine Nutzung als tensidischer Wirkstoff aufweist.

In Kapitel 8 ist eine Übersicht über alle Fraktionierungsschritte und den dabei entstandenen Extrakten dargestellt.

Bei der Analytik der fraktionierten Ligninsulfonate ist eine Zuordnung der detektierten Massen zu einer möglichen Struktur kaum möglich, da die Chromatogramme weiterhin zu komplex sind und so durch die Überlagerungen von Signalen keine spezifischen Massenspektren erhalten werden können. Ausschließlich eine monomere Substanz konnte ausgehend vom Massenspektrum hergeleitet werden (Abbildung 46). Bei dieser Substanz handelt es sich um eine literaturbekannte Verbindung [148].



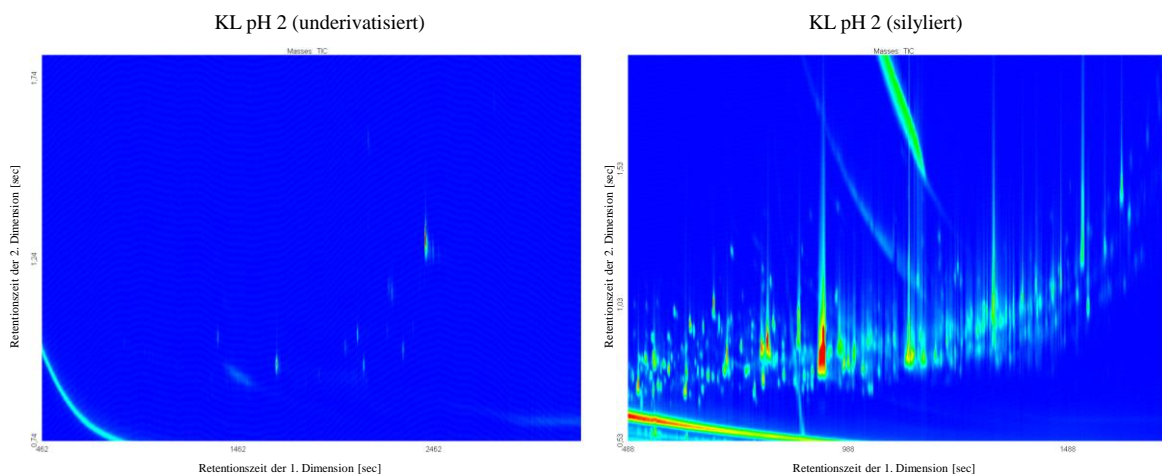


**Abbildung 46: Identifizierte Struktur zu  $m/z=194$  Da im Ligninsulfonat (GCxGC-MS)**

#### 4.3.1.3 Analytik des Kraftlignins

Das isolierte Kraftlignin wurde ebenfalls mit der oben genannten GCxGC-Methode untersucht. Um polare Substanzen mit einem höheren Molekulargewicht nachweisen zu können, wurde die Probe zusätzlich silyliert. Zur Messung der underivatisierten Proben wurden diese aufgrund der guten Löslichkeit in Aceton gelöst.

Im Chromatogramm in Abbildung 47 werden die Chromatogramme des underivatisierten und silylierten Kraftlignins verglichen.



**Abbildung 47: GCxGC-Chromatogramm des underivatisierten und silylierten Kraftlignins**

Bei der Betrachtung der Chromatogramme wird sichtbar, dass in der underivatisierten Probe nur wenige, mit einer geringen Intensität vorliegende Peaks zu erkennen sind. Es ist davon auszugehen, dass einige Ligninabbauprodukte underivatisiert nicht verdampft werden können und höchstwahrscheinlich unverdampft im Injektor verbleiben.

In der silylierten Probe liegen deutlich mehr Substanzen vor, welche jedoch ebenfalls sehr niedrig konzentriert sind und sich trotz der sehr leistungsfähigen zweidimensionalen Gaschromatographie stark überlagern. Dadurch konnten ebenfalls keine spezifischen Massenspektren erhalten werden und so keine Strukturaufklärung erfolgen.

Wie auch bei den Ligninsulfonaten handelt es sich bei den Ligninabbauprodukten aus der Sulfatablaue um ein sehr komplexes Gemisch, dass eine direkte Analyse dieser nicht zulässt. Aus diesem Grund ist eine Fraktionierung notwendig.

Zunächst wurde eine fraktionierte Fällung (pH-Wert Verschiebung) und anschließend Soxhlet-Extraktionen mit unterschiedlichen polaren Lösungsmitteln durchgeführt, da in Kapitel 4.2 bereits gezeigt werden konnte, dass eine Extraktion mit unpolaren Lösungsmitteln nicht möglich ist.

Wie bereits beschrieben, wurde das gesamte Kraftlignin isoliert, indem die Ablauge bis auf einen pH-Wert von 2 angesäuert wurde. Anschließend liegt ein Feststoffanteil von 34% bezogen auf die Trockensubstanz vor. Die zurückbleibende Lösung ist hellgelb und enthält nur noch einen geringen Anteil säurelösliches Lignin (750ppm bezogen auf die Trockensubstanz, kalibriert mit Vanillin, siehe Kapitel 7.4.2).

Neben der Isolierung des gesamten Kraftlignins bis zu einem pH-Wert von 2 wurde ebenfalls eine fraktionierte Fällung durchgeführt (pH 10, pH 8, pH 6, pH 4, pH 2). Die Ausbeuten dieser sukzessiven Fällung sind in Tabelle 22 dargestellt. Die sukzessive Fällung ist abhängig von den pKs-Werten der jeweiligen Substanzen, z.B. Phenolaten, die ab einem pH-Wert von ca. 10 zu Phenolen reagieren. Die pKs-Werte der phenolischen Verbindungen unterscheiden sich deutlich. So liegt der pKs-Wert von Vanillin bei 7,40 und der pKs-Wert des Eugenols bei 10,0 [149].

Zur weiteren Aufreinigung wurden die erhaltenen Fraktionen nochmals in Wasser gelöst und bis zu einem pH-Wert von 2 gefällt. Bei der fraktionierten Fällung zeigte sich, dass diese nicht reproduzierbar war. Dies lässt sich mit assoziativen Wechselwirkungen der Ligninabbauprodukte erklären. Bei der Fällung würde es dann zu einer Mitfällung von Substanzen kommen, deren pKs-Werte eigentlich noch nicht erreicht wurden. Auch die Differenz zwischen der gesamten Fällung bis zu einem pH-Wert von 2 (34% TS) zu der Summe der fraktionierten Fällung (18%) lässt auf eine Mitfällung von anderen Substanzen oder auch auf eine Bildung von Substanzen, die nicht mehr löslich sind, schließen.

**Tabelle 22: Ausbeuten bei der fraktionierten Fällung des Kraftlignins aus der Sulfatablauge (ohne Aufreinigung)**

<b>pH-Wert</b>	<b>Gefällte Substanz [% TS]</b>
10	12%
8	0%
6	0%
4	4% (wasserunlöslich) 1% (sauer gefällt)
2	1%
<b>Summe</b>	<b>18%</b>

Zur besseren Übersicht sind in Tabelle 23 die, bei der Analytik der Proben genutzten Bezeichnungen zusammengefasst.

**Tabelle 23: Übersicht über die verwendeten Bezeichnungen bei der Analytik der Proben**

<b>Abkürzung</b>	<b>Erläuterung</b>
KL pH 2	Gesamtes gefälltes Kraftlignin bis pH 2
KL pH 10	Fraktionierte Fällung der Ablauge bis pH 10 (sauer nachgefällt)
KL pH 4	Fraktionierte Fällung der Ablauge bis pH 4 (wasserunlöslicher Anteil)

Um eine stärkere Fraktionierung des Kraftlignins zu erhalten und so eine Analytik zu ermöglichen, wird das Kraftlignin in mehrere Aliquote aufgeteilt und diese jeweils mit unterschiedlich polaren Lösungsmitteln extrahiert (Tabelle 24). Die Sortierung der Lösungsmittel in der folgenden Tabelle wurde nach der Menge der extrahierten Substanz (% Trockensubstanz) durchgeführt.

**Tabelle 24: Einzelextraktionen des isolierten Kraftlignins (KL pH 2)**

<b>Lösungsmittel</b>	<b>Extrahierte Substanz [% TS]</b>
Dichlormethan	1%
Toluol	2%
Ethanol	16%
1-Propanol	19%
Isopropanol	26%
Ethylacetat	28%
Aceton	28%
Wasser	34%
Methanol	51%
1,4-Dioxan	82%

Mit anderen Lösungsmitteln wie Diethylether und Hexan konnten keine Substanzen aus dem Kraftlignin isoliert werden. Auffallend ist hier, dass die Menge der extrahierten Substanz nicht in einem direkten Zusammenhang zur Polarität des Lösungsmittels steht. So liegen zum Beispiel Substanzen vor, die sich nicht in Ethanol und Wasser lösen, aber mit Methanol extrahiert werden konnten. Dies lässt darauf schließen, dass sehr ähnliche Substanzen vorliegen. Zudem kann es, wie bereits bei der Fällung des Kraftlignins erläutert, zu Zusammenschlüssen der verschiedenen Substanzen kommen.

Aus diesen Einzelextraktionen wurden die Lösungsmittel sowie deren Reihenfolge für eine sukzessive Extraktion ausgewählt, um eine stärkere Fraktionierung des Kraftlignins zu erreichen und die analytischen Untersuchungen durchführen zu können. Diese Reihenfolge ist dabei unabhängig von der Polarität des Lösungsmittels und resultiert stattdessen aus der Ausbeute der Einzelextraktionen.

Zur weiteren Fraktionierung des Kraftlignins wurden diese drei Fraktionen (KL pH 2, KL pH 10 und KL pH 4) mit unterschiedlich polaren Soxhlet-Lösungsmitteln sukzessiv in der in der in Tabelle 25 angegebenen Reihenfolge der Lösungsmittel extrahiert. Es sind jeweils die gravimetrisch bestimmten Ausbeuten der Extrakte von den drei Kraftlignin-Proben aufgeführt. Dabei ist die Angabe in % immer auf die eingesetzte Trockensubstanz vor der ersten Extraktion bezogen.

**Tabelle 25: Gravimetrische Bestimmung und visuelle Beurteilung der Soxhlet-Extrakte der Kraftlignin-Fractionen (sukzessive Extraktion)**

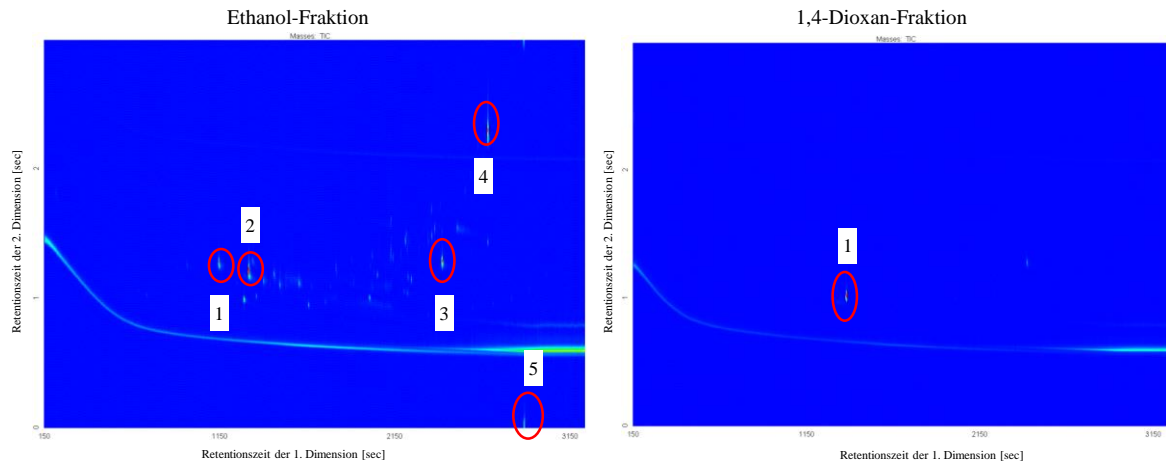
Lösungs- mittel	Extrahierte Substanz [% TS]					
	Kraftlignin pH 2 Gesamt		Kraftlignin pH 10		Kraftlignin pH 4 (wasserunlöslicher Anteil)	
Dichlor- methan	2%	dunkelbraun	4%	dunkelbraun	4%	braun
Ethanol	9%	hellbraun	4%	braun	31%	dunkelbraun
1-Propanol	7%	hellbraun	2%	hellbraun	12%	hellbraun
Aceton	11%	hellbraun	19%	braun	7%	dunkelbraun
Wasser	24%	grau-braun	13%	beige	8%	dunkelbraun
Methanol	6%	hellbraun	9%	hellbraun	13%	beige
1,4-Dioxan	23%	dunkelbraun	17%	dunkelbraun	19%	braun
Rückstand	21%	braun	34%	braun	9%	braun
<b>Summe</b>	103%		102%		103%	

Auch bei den Soxhlet-Extraktionen des Kraftlignins wurde durch die Menge der extrahierten Substanz und der Farbe der Extrakte deutlich, dass eine Fraktionierung stattgefunden hat. Jedoch zeigt sich keine Korrelation zwischen der Farbe der Extrakte und der Reihenfolge der genutzten Lösungsmittel oder der Polarität dieser, sowie zwischen der Farbe und der Ausbeute der Extrakte.

Die stufenweise Extraktion der verschiedenen Kraftlignin-Fractionen zeigt einige Unterschiede. Die, bis zu einem pH-Wert von 10 gefällten Ligninabbauprodukte ähneln dem Gesamt-Lignin (KL pH 2) bezüglich des Extraktionsverhaltens. Der größte Anteil des Gesamtlignins (KL pH 2) lässt sich in Wasser lösen (24%). Die restlichen Ligninabbauprodukte verteilen sich auf die anderen Lösungsmittel bzw. bleiben als Rückstand zurück. Bei der Probe KL pH 10 verbleibt der größte Anteil als Rückstand (34%). Der Anteil des Rückstands vom KL pH 4 fällt hingegen mit 9% kleiner aus. Somit sind viele der Phenole, die sich bei der Fällung schon bei geringer pH-Wert-Änderung bilden, in den verwendeten Extraktionsmitteln unlöslich. Auffallend bei der Extraktion des Kraftlignins pH 4 ist, dass ein großer Anteil in Ethanol löslich ist (31%).

In Kapitel 8 ist eine Übersicht über alle Fraktionierungsschritte und den dabei entstandenen Extrakten dargestellt.

In Abbildung 48 ist beispielhaft der Vergleich der Ethanol-Fraktion (Stufe 2) mit der 1,4-Dioxan-Fraktion (Stufe 7) vom Kraftlignin gezeigt.



**Abbildung 48: GCxGC-Chromatogramme (nicht derivatisiert) der Ethanol-Fraktion und der 1,4-Dioxan-Fraktion aus der stufenweisen Extraktion vom gefällten Kraftlignin (pH 2)**

In Tabelle 26 sind die zugeordneten m/z-Verhältnisse dargestellt. Dabei werden von der komplexeren Ethanol-Fraktion beispielhaft die fünf intensivsten Peaks beschrieben.

**Tabelle 26: Peakzuordnung der Ethanol-Fraktion und 1,4-Dioxan-Fraktion aus der stufenweisen Extraktion vom gefällten Kraftlignin (pH 2)**

Fraktion	Peaknummer	m/z
Ethanol-Fraktion	1	153 Da
	2	166 Da
	3	206 Da
	4	272 Da
	5	344 Da
1,4-Dioxan-Fraktion	1	220 Da

Im Vergleich des Massenspektrums (EI) von Vanillin mit dem von Peak 1 aus der Ethanol-Fraktion sowie der ähnlichen Retentionszeiten wird klar, dass es sich bei dieser Substanz um Vanillin handelt (Abbildung 49).

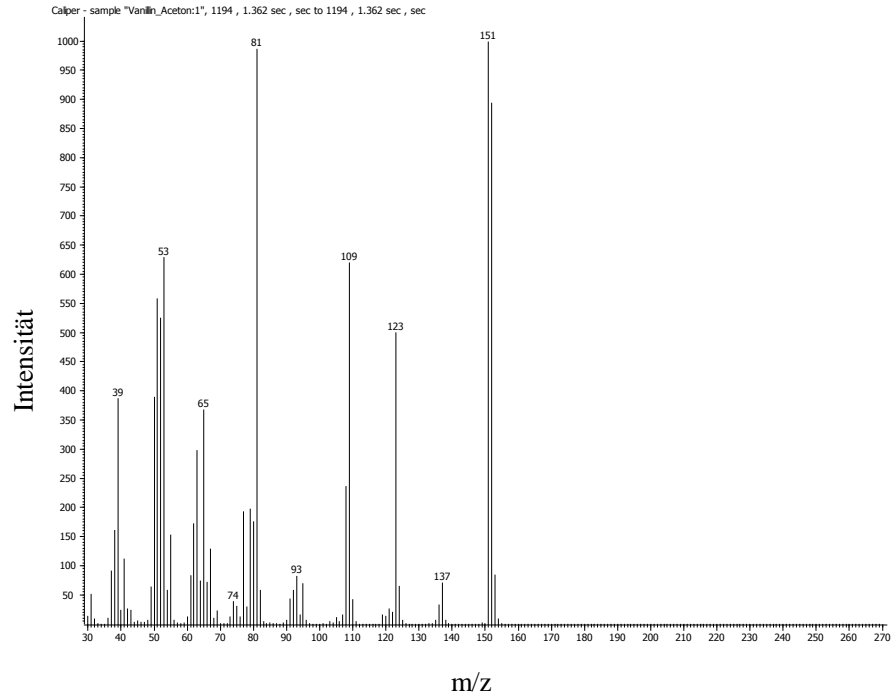


Abbildung 49: EI-Massenspektren von Vanillin

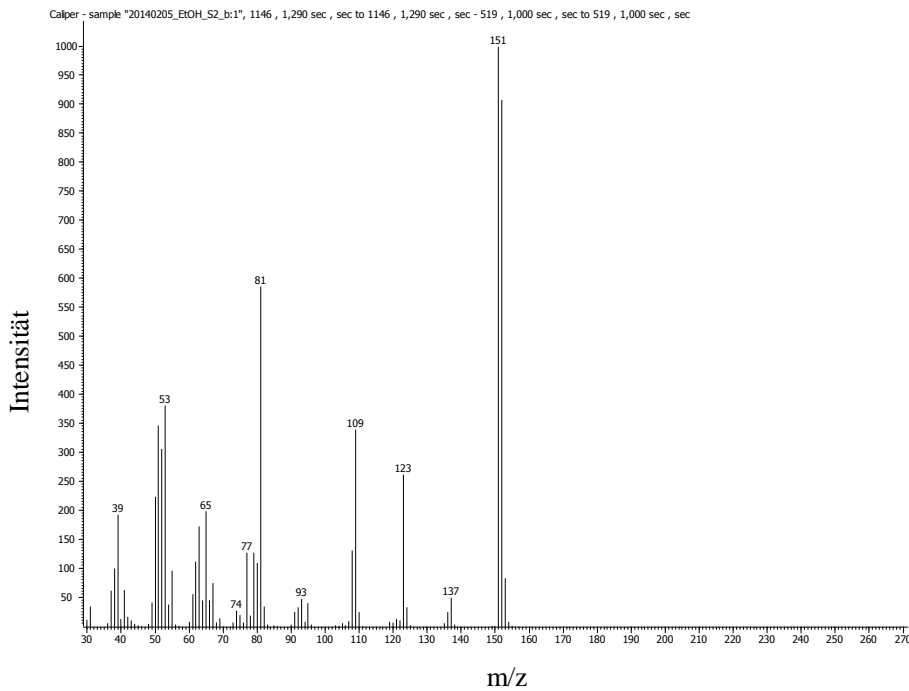
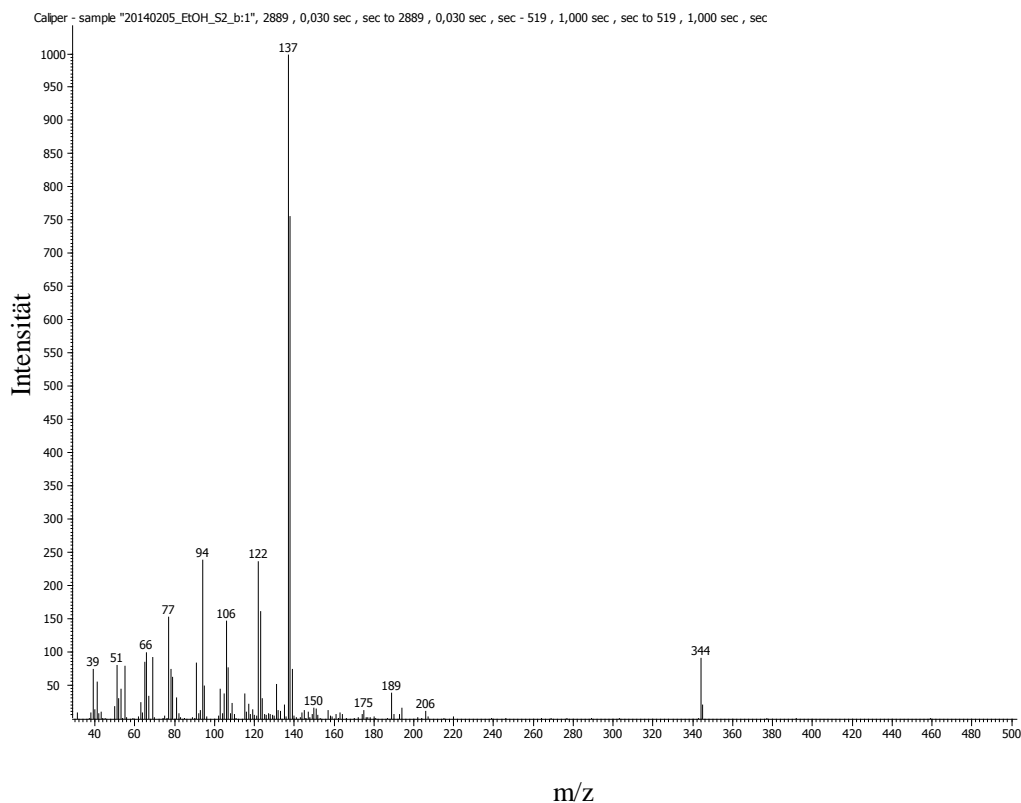


Abbildung 50: EI-Massenspektren von Peak 1 der Ethanol-Fraktion (underivatisiert)

Auffällig ist weiterhin das Massenspektrum von Peak 5 aus der Ethanol-Fraktion. Hier ist, wie bereits bei der Untersuchung der Modellsubstanzen (Dimer 2, Abbildung 42), durch die große Massendifferenz zwischen dem Molekülion und dem höchsten Signal, eine Spaltung des Analyten an der  $\beta$ -O-4-Bindung zu erkennen (Abbildung 51). Daraus geht

hervor, dass es sich bei dieser Substanz um eine etherverknüpfte Verbindung handelt. Da es sich nicht um ein hochauflösendes Massenspektrometer handelt und das Massenspektrum keinen eindeutigen Hinweis auf eine bestimmte Struktur zeigt, kann an dieser Stelle noch kein Strukturvorschlag ermittelt werden.



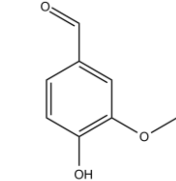
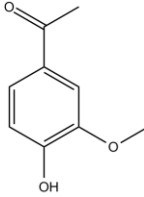
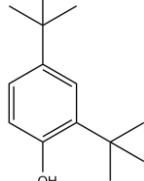
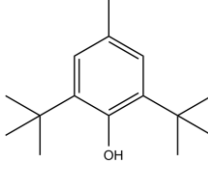
**Abbildung 51: EI-Massenspektrum von Peak 5 der Ethanol-Fraktion (underivatisiert)**

In Kapitel 8 ist eine Übersicht der detektierten Massen in den verschiedenen Fraktionen der Soxhlet-Extraktionen gezeigt (Tabelle 72). In dieser Tabelle wird deutlich, dass nicht alle Substanzen nach ihrer Löslichkeit in nur einem Lösungsmittel fraktioniert werden. Wie oben bereits beschrieben, erfolgt bei der Fraktionierung keine eindeutige Trennung der Substanzen nach ihrer Polarität. Jedoch ist auch hier deutlich zu erkennen, dass es zu einer Fraktionierung kommt. Es ist anzumerken, dass die aufgezeigten Massen nicht zwingend dem Molekül-Ion entsprechen müssen, da die entsprechenden Substanzen ebenso als Fragmente detektiert werden können.

Eine Übersicht einiger ausgewählter Strukturen, die mit Hilfe der Massenspektren zugeordnet werden konnten, ist in Tabelle 27 dargestellt.



Tabelle 27: Übersicht über die identifizierten Ligninabbauprodukte mittels GCxGC-(TOF)MS (Kraftlignin)

m/z	Struktur
153 Da [M+H] <sup>+</sup>	 <p>4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyd Vanillin</p>
166 Da [M]	 <p>1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)ethanon</p>
206 Da [M]	 <p>2,4-di-<i>tert</i>-butylphenol</p>
220 Da [M]	 <p>2,6-di-<i>tert</i>-butyl-4-methylphenol</p>

Einiger der identifizierten Strukturen enthalten *tert*-Butyl-Gruppen. Diese konnten durch die aufgenommenen Massenspektren deutlich nachgewiesen werden. Zudem konnten in der Literatur ebenfalls diese Strukturelemente identifiziert werden [148,150]

Die ermittelten Strukturen zeigen, dass während der Extraktion keine eindeutige Fraktionierung nach Substanzgruppen vorliegt. Jedoch zeigen die verschiedenen Verbindungen Löslichkeitsunterschiede wodurch eine Fraktionierung möglich ist.

Wie zu erwarten war, konnten durch die gaschromatographischen Bestimmungen nur Monomere und Dimere detektiert werden. Der Massenbereich der bestimmaren Substanzen liegt zwischen 153 und 344 Da. Als Ionisierungsmethode wurde die Elektronenstoßionisation verwendet, bei der eine starke Fragmentierung vorliegt. Mit einer CI-Ionenquelle (Chemische Ionisation) ist dieser Effekt weit weniger stark ausgeprägt. Viele der Ligninabbauprodukte zeigen ein komplexes Massenspektrum, worüber keine detaillierte Struktur ermittelt werden konnte. Über die Fragmentierung im Massenspektrum

kann jedoch auf verschiedene Struktureinheiten geschlossen werden. Bei den Dimeren ist die Fragmentierung jedoch bereits so komplex, dass eine eindeutige Zuordnung einer unbekannt Substanz anhand dieser Daten nicht möglich ist.

Tabelle 27 zeigt die starke Variabilität der Strukturen. Es liegen verschiedene Funktionalitäten, wie zum Beispiel Aldehyd-, Keto- sowie auch Alkylgruppen vor. In den Ligninsulfonaten konnten erneut Verbindungen mit zwei Methoxygruppen und im Kraftlignin ausschließlich Substanzen mit einer Methoxygruppe detektiert werden. Wie bereits in Kapitel 2.1.1 beschrieben, liegt der Grund dafür in der für den Holzaufschluss verwendeten Holzart.

Bei der Entwicklung der gaschromatographischen Methode mit den Modellsubstanzen konnten Monomere und Dimere mit einer sehr guten massenspektrometrischen Auflösung bestimmt werden. Höhermolekulare Modellsubstanzen, wie das Trimer und Tetramer, konnten trotz Derivatisierung nicht nachgewiesen werden.

Die gezeigten Chromatogramme der silylierten Proben zeigen eine sehr komplexe Mischung an Fragmenten der Ligninabbauprodukte. Trotz der sehr leistungsfähigen zweidimensionalen Gaschromatographie ist keine ausreichende Auflösung der einzelnen Signale zu erreichen, so dass keine exakte Auswertung der erhaltenen Massenspektren möglich war.

Die Fraktionierung der Ligninabbauprodukte mittels einer sukzessiven Soxhlet-Extraktion ermöglichte eine Isolierung von bis zu 88% (bezogen auf die Trockenmasse). In den Vorversuchen in dieser Arbeit konnten mit einer Flüssig-Flüssig-Extraktion lediglich 10% extrahiert werden. Diese entwickelte Soxhlet-Extraktions-Methode könnte auch ein Ansatz für eine prozesstechnische Isolierung der Ligninabbauprodukte darstellen. In den Chromatogrammen der Fraktionen konnte jedoch auch nur ein geringer Anteil der Substanzen erfasst werden.

Eine Möglichkeit zur weiteren Vorgehensweise wäre die Optimierung der gaschromatographischen Trennung der Analyten. Die Verwendung einer alternativen Analysetechnik erscheint hier jedoch sinnvoller.

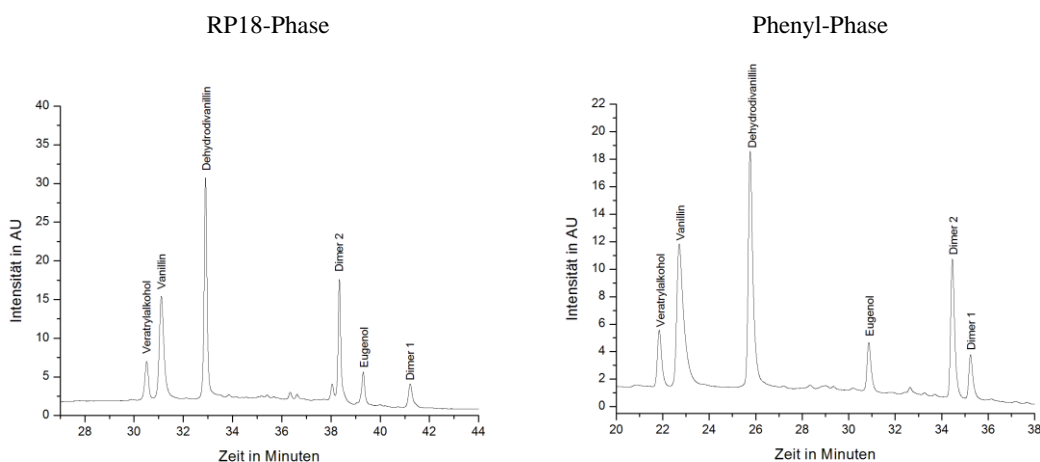
Um neben den Monomeren auch höhermolekulare Substanzen zu untersuchen, wird im Folgenden die Flüssigchromatographie genutzt. Dabei soll eine bessere Trennung aufgrund des anderen Trennverfahrens und durch eine geeignete Wahl des Säulenmaterials erzielt werden.

## 4.3.2 Flüssigchromatographische Analytik

### 4.3.2.1 Methodenentwicklung mit Modellsubstanzen

Zur Entwicklung einer HPLC-DAD-Methode wurden die oben genannten monomeren und dimeren Modellverbindungen mit einer RP18-Phase sowie mit einer Phenylphase untersucht. Diese Phasen wurden ausgewählt, da es sich bei den Ligninabbauprodukten um aromatische Ringsysteme handelt, die  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingehen. Zudem können die Ligninabbauprodukte nach ihrer Polarität getrennt werden. Je nach Substituent der Aromaten -wie zum Beispiel Alkylketten und die Anzahl freier Hydroxylgruppen- treten unterschiedliche Wechselwirkungen auf.

Die Löslichkeit der Modellsubstanzen in typischen HPLC-Lösungsmitteln wie Methanol und Acetonitril erwies sich jedoch als zu gering. Da alle Modellsubstanzen sowie die Realproben vollständig in DMSO löslich sind, wurden die Proben in 95% 10mM Ammoniumacetat und 5% DMSO gelöst, was dem Wasser/Organik-Verhältnis zu Beginn der Messung (95% 10mM Ammoniumacetat/ 5% Methanol) entspricht. In Abbildung 52 ist die Analyse der Modellsubstanzen mit beiden Säulen gezeigt. Die Detektion erfolgte bei 280 nm, da die Modellsubstanzen bei dieser Wellenlänge die größte Absorption zeigen.



**Abbildung 52:** LC-Chromatogramme ausgewählter Modellsubstanzen (Fluss= 0,4mL/min); Links: RP18-Phase (Reprosil-Pur Basic C18-HD 5 $\mu$ m, 250mmx4,6mm ID); Rechts: Phenyl-Phase (Reprosil-Pur Phenyl 5 $\mu$ m, 250mmx4,6mm ID)

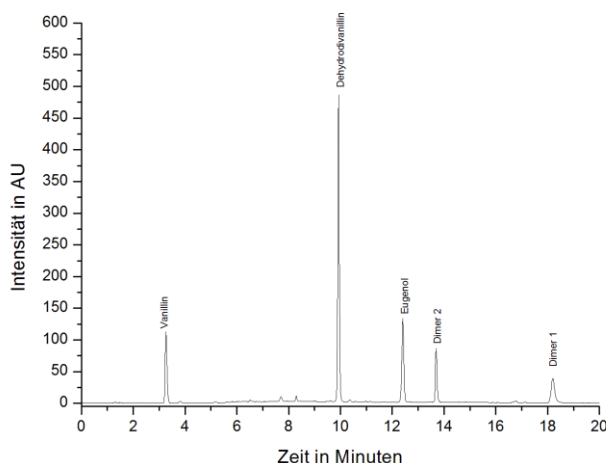
Mit beiden Säulen war mit einem optimierten Gradienten eine Trennung der Modellsubstanzen möglich (Gradienten in Kapitel 7.5.2). Die Zuordnung der Modellsubstanzen erfolgte über Einzelinjektionen der Verbindungen. Bei der zuerst eluierenden Substanz handelt es sich um den Veratrylalkohol. Anschließend eluieren Vanillin und Dehydrodivanillin, die im Vergleich zum Veratrylalkohol zusätzlich eine bzw. zwei

Aldehydfunktionen besitzen. Bei der Elution auf der RP18-Phase folgen Dimer 2, Eugenol und Dimer 1. Mit der Phenylphase ändert sich die Elutionsreihenfolge zu Eugenol, Dimer 2 und Dimer 1. Dies ist durch die stärkere  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung von Dimer 2 zur stationären Phase zu erklären, die zu einer längeren Retentionszeit führt.

Bei beiden Säulen zeigte sich jedoch nach jeder durchgeführten Messung der Modellsubstanzen eine Druckerhöhung, nach einigen Messungen setzte sich die Säule vollständig zu. Daraufhin musste die Säule einer aufwendigen Reinigung unterzogen werden, damit diese wieder nutzbar war. Nach mehrmaligem Regenerieren war das Säulenmaterial jedoch nicht mehr zu verwenden. Im Rahmen von Löslichkeitsversuchen mit den Modellsubstanzen wurde deutlich, dass ausschließlich die Monomere bei Verringerung des DMSO-Anteils im Lösemittelgemisch in Lösung verbleiben. Die Dimere fallen aus und führen somit zum Zusetzen der Säule.

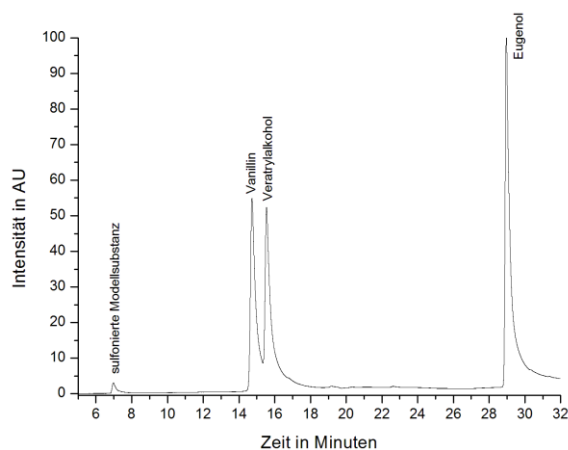
Die genutzten Dimere sind ausschließlich in DMSO und in alkalischer Lösung vollständig löslich. Somit wurde eine RP18-Säule getestet, die bis zu einem pH-Wert von 11,5 stabil ist. Mit dieser Säule ist es möglich, die Analyten in alkalischer Lösung vollständig zu lösen die Analyse durchzuführen.

Für die Untersuchung aller monomeren und dimeren Modellverbindungen mit der pH-stabilen Säule wurden Wasser (HPLC-grade) und Acetonitril (HPLC-grade) mit Ammoniak jeweils auf einen pH-Wert von 10,7 eingestellt und im Verhältnis 95/5 als Lösungsmittel verwendet. Dies entspricht, wie bei vorhergehenden Analysen, dem Start-Eluenten der Analyse. In Abbildung 53 ist das Chromatogramm ausgewählter Modellsubstanzen zu sehen. Der Veratrylalkohol wurde hierbei nicht verwendet, da sich bei dem Lösen eine starke Farbänderung zeigte, was auf eine chemische Reaktion schließen ließ.



**Abbildung 53:** LC-Chromatogramm ausgewählter Modellschubstanzen (ACE Excel 5 Super C18 5µm, 150mmx4,6mm ID; Fluss= 0,8mL/min)

Für die isolierten wasserlöslichen Ligninsulfonate konnte eine übliche RP18-Phase genutzt werden. Dazu wurde eine Säule ohne Endcapping mit einer Länge von 15cm verwendet. Die Methode wurde mit den Monomeren Vanillin, Veratrylalkohol, Eugenol sowie der sulfonierten Modellschubstanz auf diese Säule übertragen (Abbildung 54), da diese, wie bereits beschrieben, wasserlöslich sind. Als Eluent und Lösungsmittel dienten Ammoniumacetat (10mM) und Methanol (95/5 v/v).



**Abbildung 54:** LC-Chromatogramm ausgewählter Modellschubstanzen (Supelco Discovery C18 5µm, 150mmx4,6mm ID; Fluss 0,8mL/min)

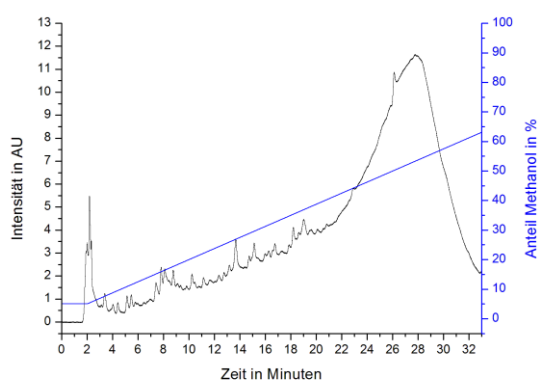
Im Vergleich zu Abbildung 52 zeigt sich eine Elutionsumkehr von Vanillin und dem Veratrylalkohol. Dies ist durch die unterschiedlichen stationären Phasen zu erklären. Die „Reprosil-Pur Basic C18-HD“-Säule von Dr. Maisch zeichnet sich durch ein Endcapping

über 2 kovalente Bindungen aus, wohingegen die „Supelco Discovery C18“-Säule von Sigma Aldrich kein Endcapping aufweist [151,152].

### 4.3.2.2 Analytik der Ligninsulfonate

Durch die Methodenentwicklung mit den Modellsubstanzen konnten die geeigneten Lösungsmittel, Säulen, Injektions- und Detektionsparameter ermittelt werden.

Der für die Modellsubstanzen entwickelte Gradient wurde mit einer geringeren Steigung durchgeführt, um eine optimale Trennung des Stoffgemisches zu erhalten (Gradient siehe Kapitel 7.5.2). In Abbildung 55 ist das Chromatogramm der isolierten Ligninsulfonate aus der Sulfitablaue dargestellt.



**Abbildung 55: LC-Chromatogramm der isolierten Ligninsulfonate (Supelco Discovery C18 5µm, 150mmx4,6mm ID; Fluss 0,8mL/min)**

Im Chromatogramm ist zu Beginn der Messung (1-20 Minuten), also bei einem relativ niedrigen Methanol-Anteil von 5 bis 40%, eine Detektion von mehreren, nicht basisliniengetrennten Substanzen sowie ein leichter Anstieg der Basislinie zu sehen. Die Basislinie steigt im Laufe der Messung immer stärker an, so dass zwischen 20 und 32 Minuten nur noch ein breites, hohes Signal zu erkennen ist. Unter diesem befindet sich eine hohe Anzahl an Substanzen, die mit dieser chromatographischen Methode nicht getrennt werden können. Aufgrund dessen wurden die in Kapitel 4.3.1.2 beschriebenen Soxhletextrakte zur weiteren HPLC-Analytik verwendet.

In Abbildung 56 sind die Chromatogramme der Soxhlet-Fractionen im Vergleich zu den isolierten Ligninsulfonaten gezeigt. Nicht dargestellte Fractionen waren entweder in Ammoniumacetat/MeOH (95/5) unlöslich, oder die Ausbeute war zu gering, so dass keine Analyse möglich war. Zur Schonung der Säule wurden, zusätzlich zur Vorsäule, anstatt 50µL nur 10µL als Injektionsvolumen gewählt.

In Abbildung 56 ist zu erkennen, dass die Vielzahl von Signalen durch die Fraktionierung reduziert wurde. Die Chromatogramme der Ligninsulfonat-Fractionen weisen deutliche Unterschiede zum nicht-fraktionierten Ligninsulfonat auf. Am stärksten ist dieser Unterschied zu der Gesamtprobe bei Extrakt 5 und Extrakt 6 zu sehen. Hier treten zwischen 5 und 10 Minuten deutliche Signale auf, die in der Ligninsulfonatprobe sowie in den anderen Fraktionen kaum auszumachen sind. Weiterhin ist bei allen Fraktionen eine Veränderung des breiten Peaks im hinteren Bereich des Chromatogramms zu sehen. Mit zunehmendem Wasseranteil bei den Soxhlet-Extraktionen scheinen immer mehr der dort eluierenden Substanzen in Lösung zu gehen. Die Signalintensität in diesem Bereich nimmt von Fraktion 1 zu Fraktion 8 deutlich zu. Bei der ersten Fraktion (100% Isopropanol) liegen diese Komponenten kaum vor. Dafür sind in dieser Fraktion bei einer Retentionszeit von 2 bis 5 Minuten vier Signale zu erkennen, wobei die ersten beiden Peaks nicht basisliniengetrennt vorliegen. Insgesamt kann gesagt werden, dass sich durch die Fraktionierung der Ligninsulfonate besser voneinander getrennte Signale detektieren lassen, aber eine Fraktionierung des späteren Peakbereichs nicht erzielt werden konnte.

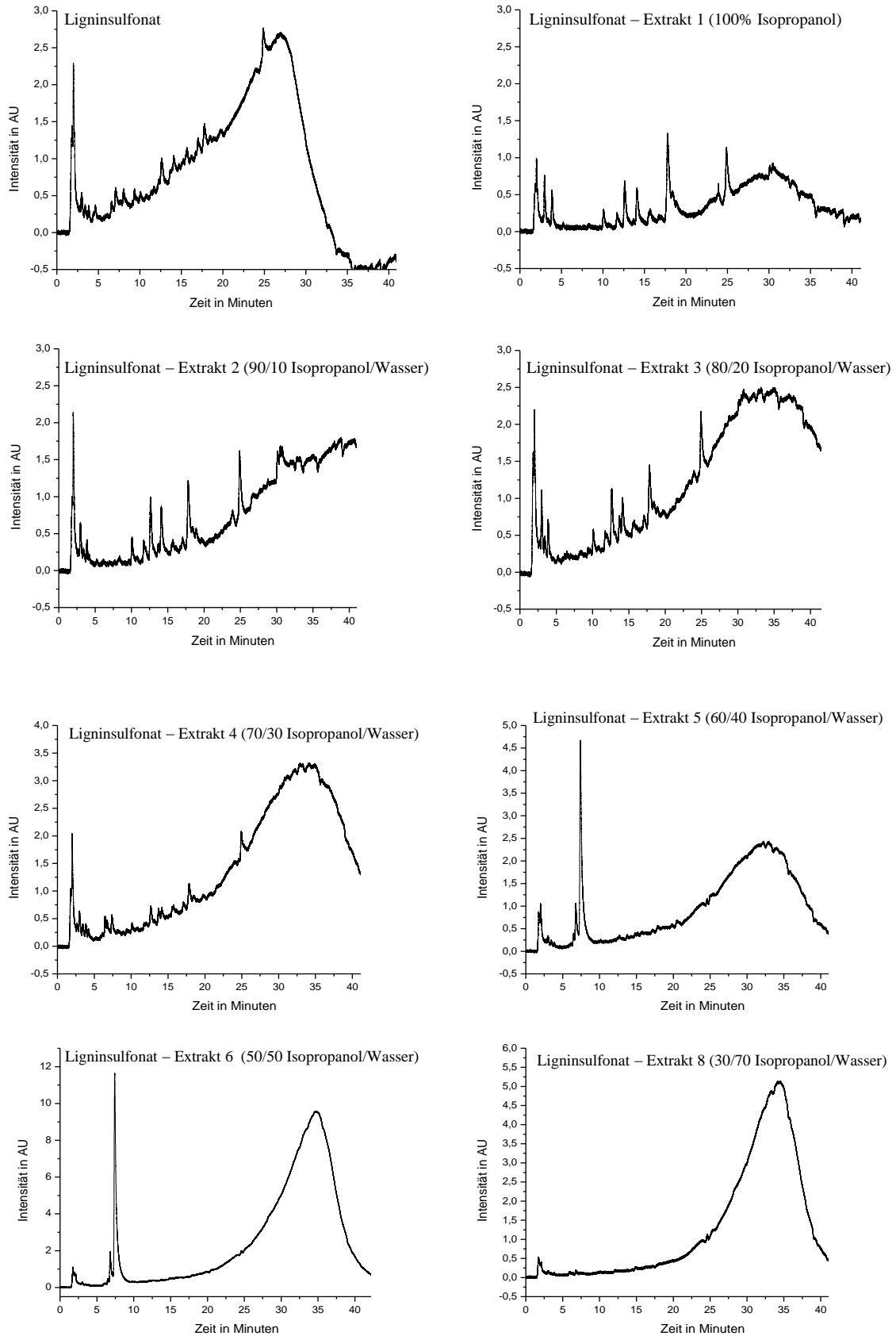
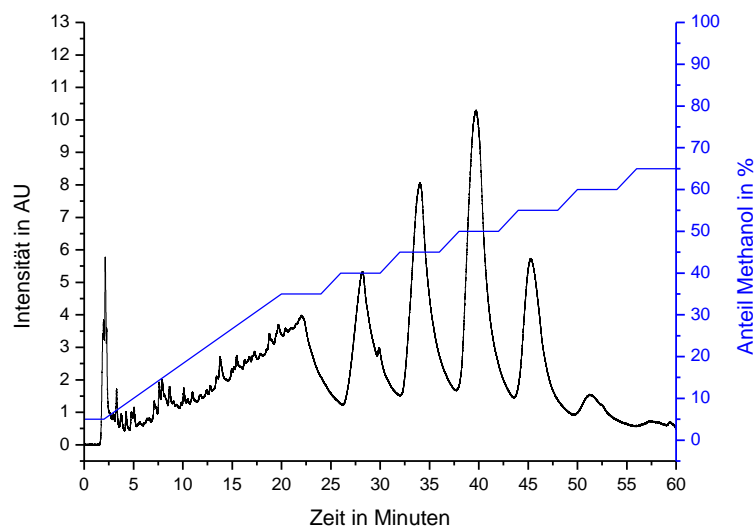


Abbildung 56: LC-Chromatogramme der Ligninsulfonate und dessen Fraktionen (Supelco Discovery C18 5 $\mu$ m, 150mmx4,6mm ID; Fluss 0,8mL/min; 10 $\mu$ L Injektionsvolumen)



Um die Trennung dieser Signale zu verbessern, wurde ein Gradient verwendet, bei dem in diesem Bereich mehrere Elutionsstufen vorlagen. Der detaillierte Gradient ist in Kapitel 7.5.2 beschrieben. Das Chromatogramm mit dem verwendeten Gradienten ist in Abbildung 57 dargestellt.



**Abbildung 57:** LC-Chromatogramm der isolierten Ligninsulfonate (Supelco Discovery C18 5 $\mu$ m, 150mmx4,6mm ID; Fluss 0,8mL/min; Stufengradient)

Hier ist deutlich zu erkennen, dass die Substanzen ausschließlich bei Erhöhung des Organikanteils ohne Retention eluieren. Aus diesen Beobachtungen geht hervor, dass es sich bei dem gesamten vorderen Signalbereich (2 bis 20 Minuten) im Vergleich zum hinteren Peakbereich (20 bis 45 Minuten) um eher unpolare Substanzen handelt. Dies lässt sich daraus schließen, dass die Substanzen während der Soxhletextraktion bei einem hohen Isopropanolanteil extrahiert werden sowie eine Retention auf der unpolaren RP18-Säule aufzeigen. Die Substanzen im hinteren Peakbereich hingegen lassen sich erst mit einem erhöhten Wasseranteil extrahieren (Soxhlet) und eluieren mit einem erhöhten Organik-Anteil.

Ziel bei dem folgenden Experiment soll es sein, diese Substanzen mit einer polarerer Säule fraktionieren zu können. Um sowohl die auf der unpolaren Säule retardierenden Substanzen als auch die Substanzen, die zur Elution einen erhöhten Organik-Anteil benötigen, trennen zu können, wird im Folgenden der Ansatz einer offline LCxLC-Analytik gewählt. Dazu wurde folgender Versuchsaufbau verwendet (Abbildung 58).

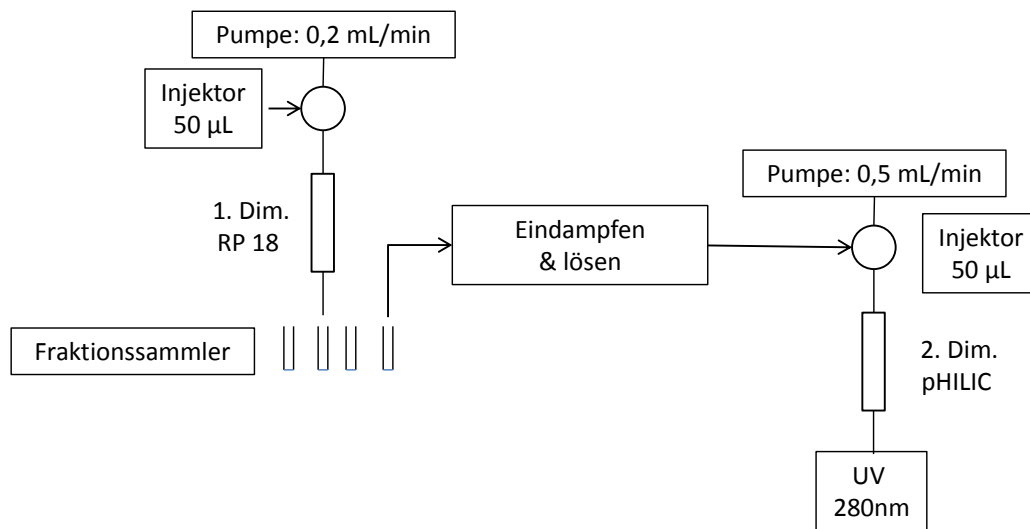


Abbildung 58: Versuchsaufbau zur offline LCxLC-Analytik

Für die zweite Dimension wurde dabei eine pHILIC-Säule gewählt. Mit der HILIC-Phase (Hydrophilic-Interaction-Chromatography) können polare Substanzen im Normalphasenmodus analysiert werden. Diese Art der Chromatographie eignet sich somit für die Analytik der Substanzen, die auf der RP18-Säule nicht retardiert werden [153].

Die oben gezeigte Methode wird zur Analytik der Ligninsulfonate aus der Sulfitablauge (Abbildung 55) verwendet. Dabei wird das Eluat im Retentionsbereich der nicht retardierenden Substanzen aufgefangen und eingedampft. Die Fraktionierung ist in Abbildung 59 dargestellt.

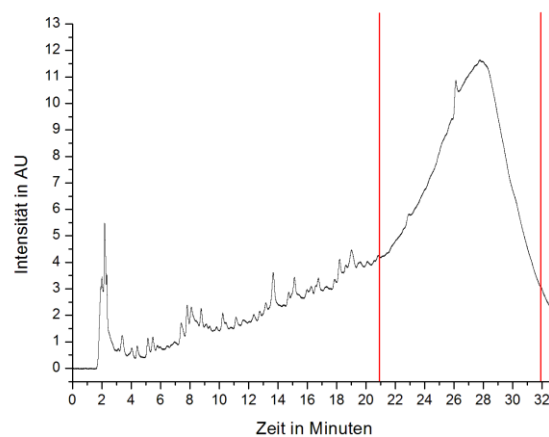
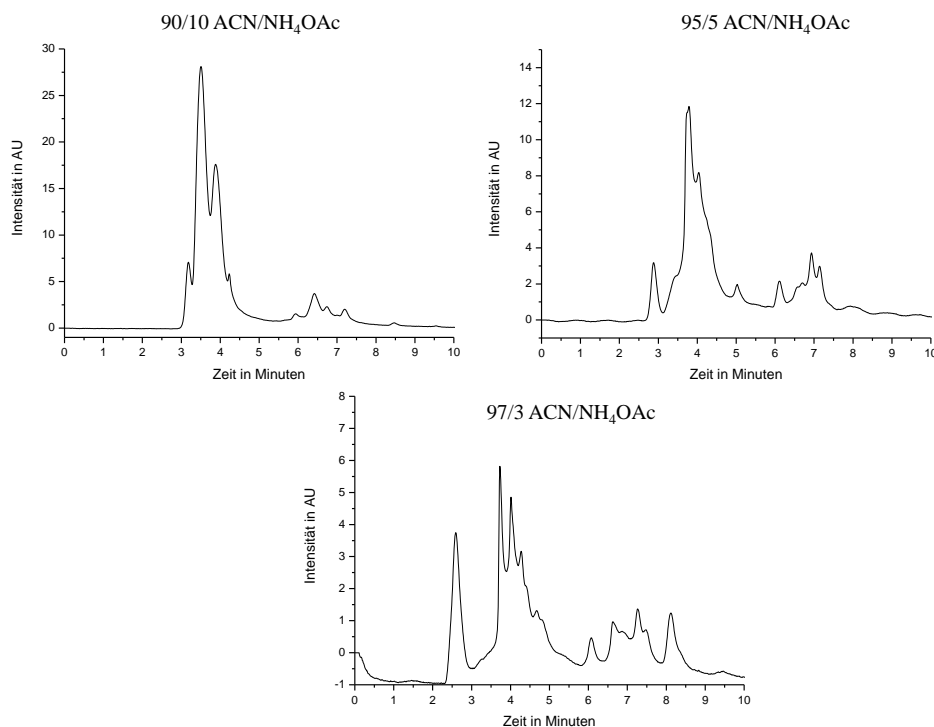


Abbildung 59: LC-Chromatogramm der isolierten Ligninsulfonate (Supelco Discovery C18 5µm, 150mmx4,6mm ID; Fluss 0,8mL/min); Die gesammelte Fraktion ist in rot markiert

Zur Optimierung der Trennung auf der HILIC-Säule wurde die fraktionierte Probe mit verschiedenen Eluentenzusammensetzungen isokratisch analysiert (Abbildung 60). Als Eluenten wurden Acetonitril und 10mM Ammoniumacetat genutzt.



**Abbildung 60: LC-Chromatogramme der Fraktion mit verschiedenen Eluentenzusammensetzungen (Dr. Maisch Reprospher HILIC-P, 5 $\mu$ m, 250x4,6mm ID)**

In Abbildung 60 ist zu sehen, dass eine deutlich bessere Trennung der Substanzen mit einer HILIC-Säule erreicht werden kann als mit einer RP18-Phase. Die fraktionierten Substanzen zeigen eine kurze Retentionszeit auf der HILIC-Säule. Da die Retention auf einer HILIC-Phase nicht nur nach einem Retentionsmechanismus erfolgt, sondern es sich um eine komplexe, multimodale Kombination aus verschiedenen Wechselwirkungen handelt, kann hier keine Aussage über die Eigenschaften der detektierten Substanzgruppe getroffen werden. Bei den vorliegenden Wechselwirkungen handelt es sich um Flüssig-Flüssig-Wechselwirkungen, Adsorption, ionische Wechselwirkungen und hydrophobe Retention [154].

Es ist außerdem zu erkennen, dass die Trennung mit Erhöhung des Acetonitril-Anteils verbessert wird. Somit ergibt sich für eine optimale Trennung eine Eluentenzusammensetzung von 97% Acetonitril und 3% 10mM Ammoniumacetat. Bei dieser Zusammensetzung kann eine Trennung der Substanzen aus der Fraktion erreicht

werden. Jedoch wird auch hier deutlich, dass keine Basislinientrennung der Substanzen vorliegt. Der Acetonitril-Anteil kann zur Verbesserung der Trennung nicht weiter erhöht werden, da sich bei der HILIC-Phase Wasser an die stationäre Phase anlagert. Das angelagerte Wasser stammt dabei aus dem Eluenten, in dem somit immer Wasser in einem bestimmten Anteil enthalten sein muss [153].

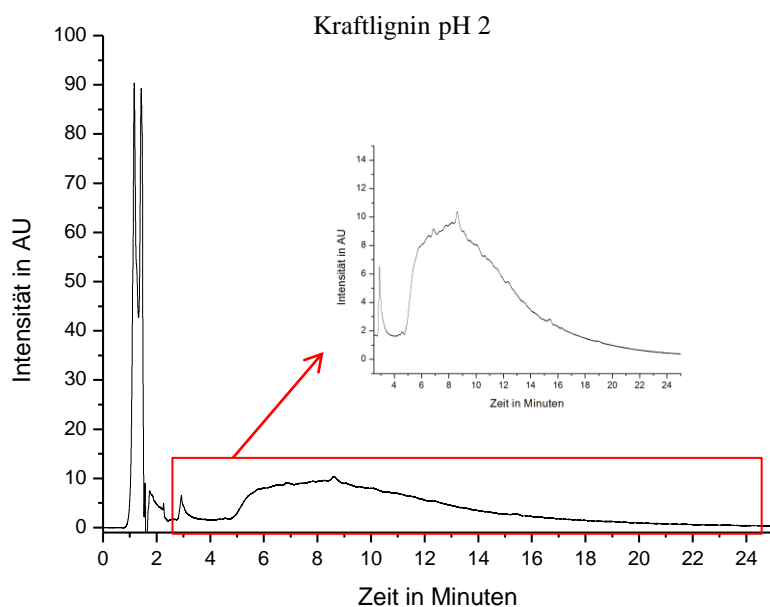
Die Verbesserung ist jedoch im Vergleich zur RP18-Säule, bei der keine Retardierung erfolgte, klar zu erkennen. Dieser Ansatz der zweidimensionalen HPLC zeigt, dass großes Potential zur Nutzung einer online LCxLC vorhanden ist. Bei dieser wird zudem die Peakkapazität im Vergleich zur offline-Methode deutlich erhöht.

### 4.3.2.3 Analytik des Kraftlignins

Nachdem die Fraktionierung der Ligninsulfonate mittels offline-LCxLC verbessert werden konnte, wurde das isolierte Kraftlignin aus der Sulfatablage ebenfalls mit einer RP18-Säule (pH-stabil) analysiert. Dabei wurde wie bei den Modellsubstanzen, 95% Ammoniaklösung (pH 10,7) und 5% Acetonitril (pH 10,7) als Lösungsmittel bzw. als Start-Eluent verwendet.

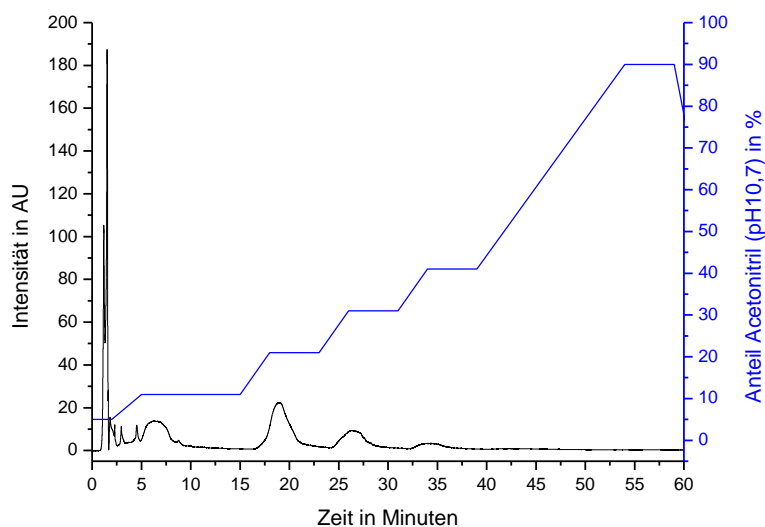
Die die Chromatogramme der bei pH4 und pH10 gefällten Kraftlignine keine signifikanten Unterschiede zum dargestellten Chromatogramm vorliegen, wurde im Folgenden ausschließlich die Gesamtfällung bei pH 2 verwendet.

Im Chromatogramm ist zu Beginn der Messung ( $t_{dr}=1-2$  Minuten) ein intensives Signal zu erkennen (Abbildung 61). Nach etwa 4,5 Minuten steigt die Basislinie langsam an. Wie bei der Analytik der isolierten Ligninsulfonate, entspricht dieser Anstieg einer Vielzahl an Substanzen, die mit dieser chromatographischen Methode nicht getrennt werden können. Da die Signale bei 1-2 Minuten nahezu mit der Totzeit eluiert, handelt es sich wahrscheinlich um eine polare Substanzgruppe, die nicht bzw. kaum mit der stationären Phase wechselwirkt.



**Abbildung 61: LC-Chromatogramme des isolierten Kraftlignins nach vollständiger Fällung bis pH 2; (ACE Excel 5 Super C18, 5 $\mu$ m, 150mmx4,6mm ID)**

Um zu überprüfen, ob auch bei dem Kraftlignin die später eluierenden Substanzen aufgrund ihrer Löslichkeit eluieren, wurde die Probe ebenfalls mit einem Stufengradienten analysiert. Das Chromatogramm ist in Abbildung 62 gezeigt.



**Abbildung 62: LC-Chromatogramm des isolierten Kraftlignins (Fluss 0,8mL/min; Stufengradient); (ACE Excel 5 Super C18, 5 $\mu$ m, 150mmx4,6mm ID)**

Hier ist wie bereits bei der Analyse der Ligninsulfonate deutlich zu sehen, dass die Substanzen nicht auf der RP18-Säule retardieren, sondern erst durch eine Erhöhung des organischen Anteils im Eluenten gelöst werden.

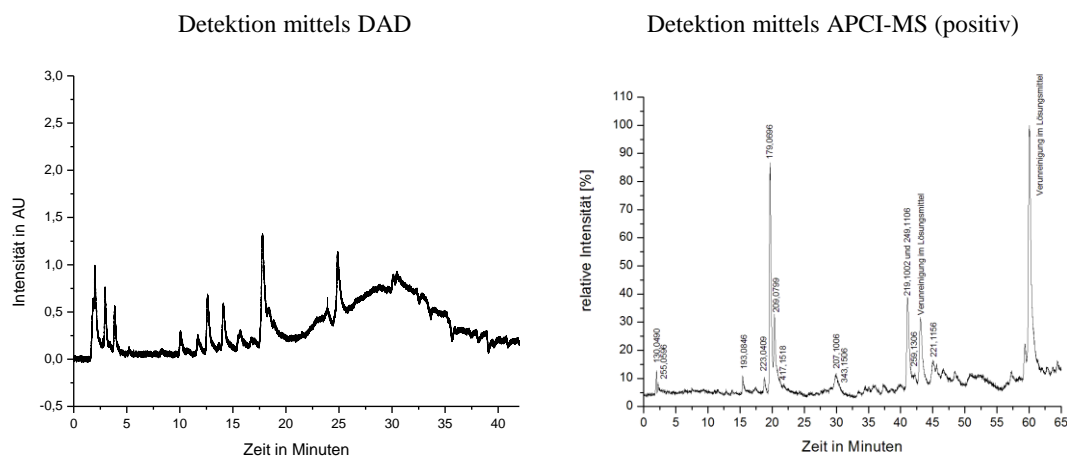
Die Analysen der Kraftlignin-Proben lassen erkennen, dass sich eine chromatographische Trennung der Ligninabbauprodukte als äußerst schwierig erweist. Aufgrund der schlechten Löslichkeit der Proben kann nicht mit einer konventionellen RP18-Phase gearbeitet werden. Die Analytik mit einer pH-stabilen RP18-Säule erwies sich jedoch als ungeeignet für die Ligninabbauprodukte, da hier ausschließlich eine Trennung nach polaren, nicht retardierenden Substanzen und der am Säulenkopf verbleibenden Komponenten, die ebenfalls keine Retention auf der Säule aufweisen, erreicht werden kann. Wie bereits beschrieben, hat der pH-Wert einen entscheidenden Einfluss auf die Ligninabbauprodukte. Der hohe pH-Wert von 10,7 kann zu einer Salzbildung führen, wodurch die Retention der Substanzen auf der stationären Phase verhindert wird.

Somit zeigte sich, dass die Analyse des Kraftlignins mittels HPLC aufgrund des hohen pH-Wertes nicht realisierbar ist. Die Ligninsulfonate konnten jedoch mithilfe der flüssigchromatographischen Analyse fraktioniert werden. Um eine Aussage über die Substanzen treffen zu können, bietet sich die massenspektrometrische Detektion an. Mithilfe von Präzisionsmassen könnten Summenformeln und mögliche Strukturen ermittelt werden.

#### *4.3.2.4 Flüssigchromatographie mit massenspektrometrischer Detektion*

Mittels HPLC-MS wurden die unterschiedlichen Soxhlet-Fractionen der Ligninsulfonate analysiert.

In Abbildung 63 ist das Chromatogramm der Soxhlet--Fraktion „100% Isopropanol“ mit massenspektrometrischen Detektion (APCI im Positiv-Modus) gezeigt. Den Signalen wurden die entsprechenden m/z-Verhältnisse zugeordnet.



**Abbildung 63: Chromatogramme der isolierten und fraktionierten Ligninsulfonate (Fraktion: 100% Isopropanol) mit Detektions mittels DAD und mittels massenspektrometrischer Detektion im Positiv-Modus**

Auffallend ist, dass die Ionisierung der Substanzen, die bei kürzeren Retentionszeiten (5-15 Minuten) mit dem DAD detektiert werden konnten, nicht möglich ist. Im Bereich von 15-45 Minuten konnten die Signale mit einem ausreichenden Signal-zu-Rausch-Verhältnis einem  $m/z$ -Verhältnis zugeordnet werden.

Bei dieser Probe konnte die Komplexität der Matrix durch die Extraktion soweit reduziert werden, dass eine HPLC-MS Analytik möglich war. Es konnte eine gute Auftrennung der Ligninabbauprodukte sowie eine gute Detektion mittels MS erreicht werden.

Bei der nicht-fraktionierten Ligninsulfonat-Probe sowie allen anderen Fraktionen war diese Analytik nicht möglich, da die Konzentration der einzelnen Substanzen aufgrund der chromatographische Peakverbreiterung für die massenspektrometrische Detektion zu gering war. Eine Anreicherung dieser Substanzen beziehungsweise der entsprechenden HPLC-Fractionen könnte eine HPLC-MS Analytik ermöglichen. Aus diesem Grund wird im Folgenden eine Methode zur Festphasenextraktion von Modellsubstanzen entwickelt.

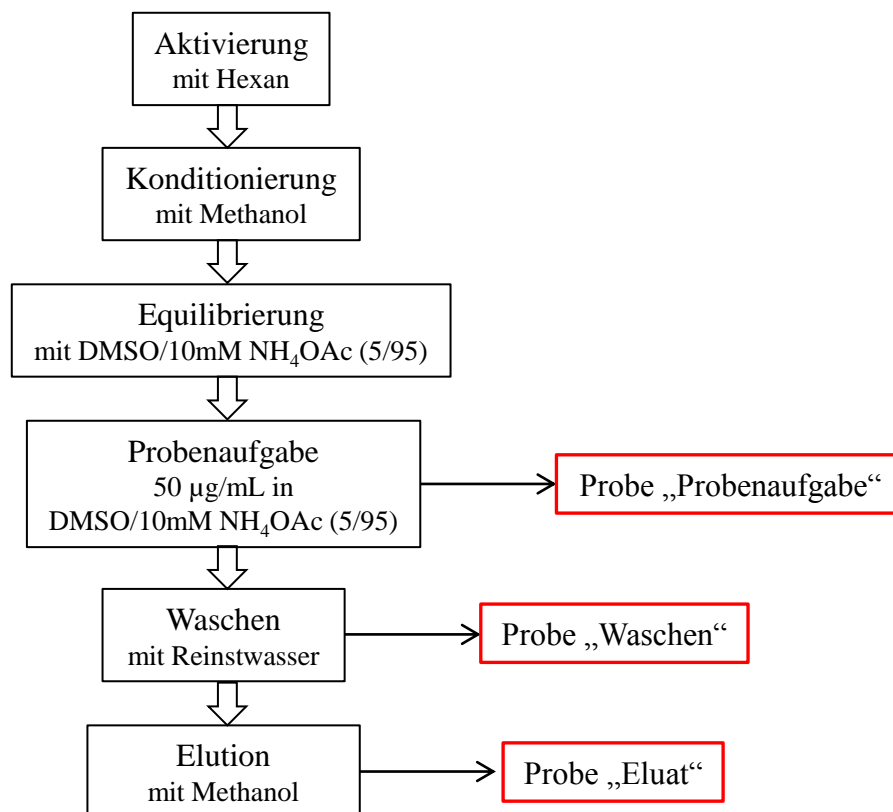
#### 4.3.2.5 Festphasenextraktion zur Anreicherung der Ligninabbauprodukte

Ziel bei der praktischen Durchführung der Festphasenextraktion ist eine vollständige Adsorption des Analyten an dem Sorbent sowie eine vollständige Desorption mit einem geeigneten Lösungsmittel. Die Elution sollte dabei möglichst in einem Schritt mit einem geringen Lösungsmittelvolumen erfolgen.

Die Methodenentwicklung der Festphasenextraktion wurde zunächst mit Dehydrodivanillin als Modellschubstanz durchgeföhrt. Es wurde ein Dimer ausgewöhlt, da in den bisher gezeigten analytischen Messungen die Dimere in geringerem Maße detektiert werden konnten als die Monomere und somit eine Anreicherung dieser nötig ist. Zudem kann Dehydrodivanillin schnell und in großen Mengen synthetisiert werden.

Als Lösungsmittel der Modellschubstanz wurden 95% 10mM Ammoniumacetat und 5% DMSO eingesetzt. Die Quantifizierung des Analyten erfolgte flüssigchromatographisch mit einer RP18-Säule, detektiert wurde mit Hilfe eines DAD-Detektors.

Im ersten Schritt wurde die Adsorption von Dehydrodivanillin an verschiedenen Sorbentien miteinander verglichen. Es wurde eine C18-, eine Phenylphase sowie ein C18-Sorbent mit Endcapping (C18ec) und eine C18-Hydra-Phase verglichen. In Abbildung 64 ist das Schema zur Vorgehensweise am Beispiel einer C18-Phase gezeigt. Bei der Verwendung der Phenylphase entfällt die Aktivierung des Materials. Die Probenahmen sind rot markiert.



**Abbildung 64: Übersicht über die allgemeine Vorgehensweise der Festphasenextraktion und Probenahme**



Um eine vollständige Elution des Dehydrodivanillins vom Sorbent zu gewährleisten, wurde zunächst mit dem zweifachen Probevolumen eluiert. Das Eindampfen aller entnommenen Proben im Stickstoffstrom erfolgte bei ca. 60°C. Anschließend wurden diese wieder im Lösungsmittel (DMSO/NH<sub>4</sub>OAc) resuspendiert. In den Untersuchungen zur Festphasenextraktion ohne Anreicherung entsprach das Resuspensionsvolumen dem Probevolumen. Die Konzentration des Analyten ist in der Probelösung und in der vermessenen Probe nach der Probenaufarbeitung bei 100% Wiederfindung gleich.

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Methode wurde zum einen die Quantifizierung mittels HPLC ohne vorherige SPE (3-fach Bestimmung) und zum anderen die gesamte Probenaufarbeitung (6-fach Bestimmung) überprüft. Als Probe diente für alle Messungen eine Dehydrodivanillin-Lösung mit einer Ursprungskonzentration von 50 µg/mL. Die Ergebnisse sind in Tabelle 28 und Tabelle 29 dargestellt.

**Tabelle 28: Reproduzierbarkeit der Quantifizierung mittels HPLC-DAD (ohne Festphasenextraktion)**

<b>Probe</b>	<b>Gemessene Konzentration von Dehydrodivanillin [µg/mL]</b>	<b>Mittelwert und Standardabweichung [µg/mL]</b>
1	49,48	
2	49,29	49,26 ± 0,14
3	49,09	

**Tabelle 29: Reproduzierbarkeit der Festphasenextraktion und anschließender Probenaufarbeitung**

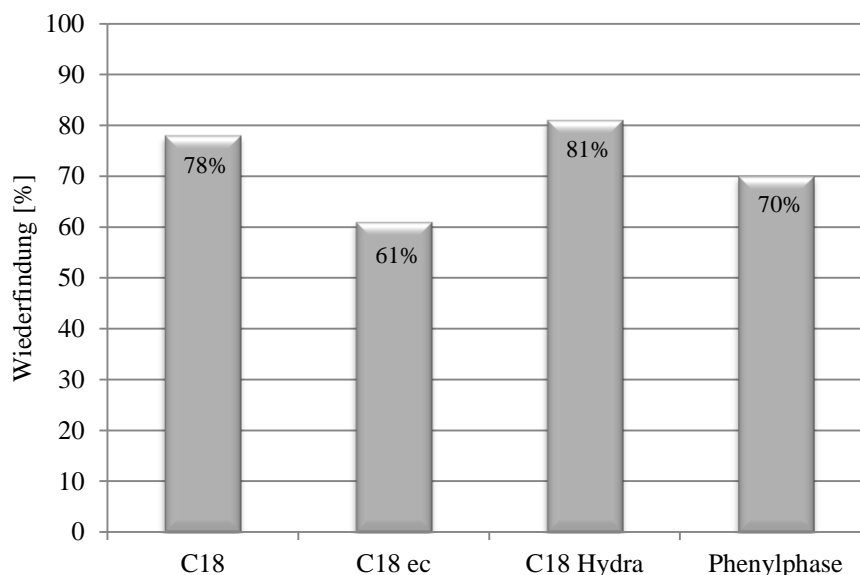
<b>Probe</b>	<b>Gemessene Konzentration von Dehydrodivanillin [µg/mL]</b>	<b>Mittelwert und Standardabweichung [µg/mL]</b>
1	49,43	
2	48,65	
3	49,47	49,14 ± 0,13
4	49,18	
5	48,87	
6	49,25	

Den Tabellen ist zu entnehmen, dass weder bei der Probenaufarbeitung (SPE und Eindampfen) noch bei der HPLC-Messung signifikante Unterschiede bei der gemessenen Konzentration des Dehydrodivanillins auftreten. Die oben verwendete Vorgehensweise ist somit sehr gut geeignet und kann in allen weiteren Versuchen genutzt werden.

In der gesamten Auswertung zur Festphasenextraktion wird die maximale Wiederfindung als die Konzentration des Analyten berechnet, die maximal in der angereicherten Probe vorliegen kann. Wird zum Beispiel eine Lösung mit einer Konzentration von 50 µg/mL um den Faktor 2 angereichert, beträgt die maximale Konzentration 100 µg/mL, was einer Wiederfindung von 100% entspricht.

In Abbildung 65 ist die Wiederfindung des Dehydrodivanillins im Eluat nach der Adsorption auf verschiedenen Sorbentien gezeigt. Dazu wurde die Substanz nach dem Eindampfen mit dem Probevolumen aufgenommen, so dass keine Anreicherung durchgeführt wurde.

Bei der Quantifizierung der Proben „Probenaufgabe“ und „Waschen“ konnte kein Dehydrodivanillin nachgewiesen werden. Daraus ergibt sich eine vollständige Adsorption auf allen Sorbentien.

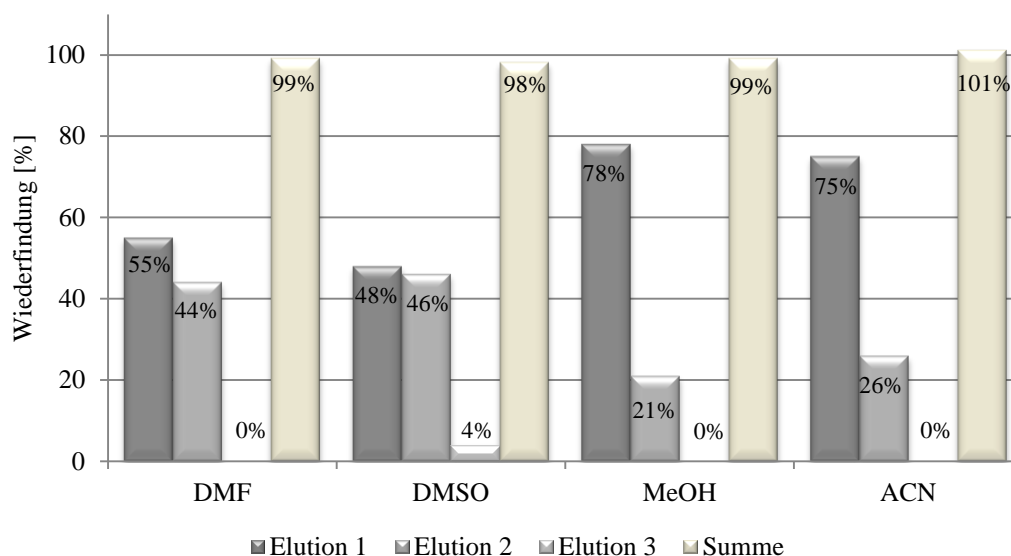


**Abbildung 65: Vergleich verschiedener Sorbentien zur Festphasenextraktion von Dehydrodivanillin**

Die verschiedenen C18-Phasen sowie die Phenylphase zeigen eine gute Elution des Dehydrodivanillins mit Methanol. Bei dem C18-Sorbent mit endcapping (C18ec) scheint die Adsorptionskraft stärker zu sein als bei den anderen Sorbentien, da hier eine geringere Konzentration des Dehydrodivanillins im Eluat vorliegt. Eine zu starke Adsorption ist

nicht geeignet, da dies eine vollständige Elution verhindert. Eine 100%ige Wiederfindung konnte nicht erreicht werden, da nur ein Elutionsschritt verwendet wurde. Für alle weiteren Versuche wurde die C18-Phase als Sorbent genutzt und mehrere Elutionsschritte durchgeführt.

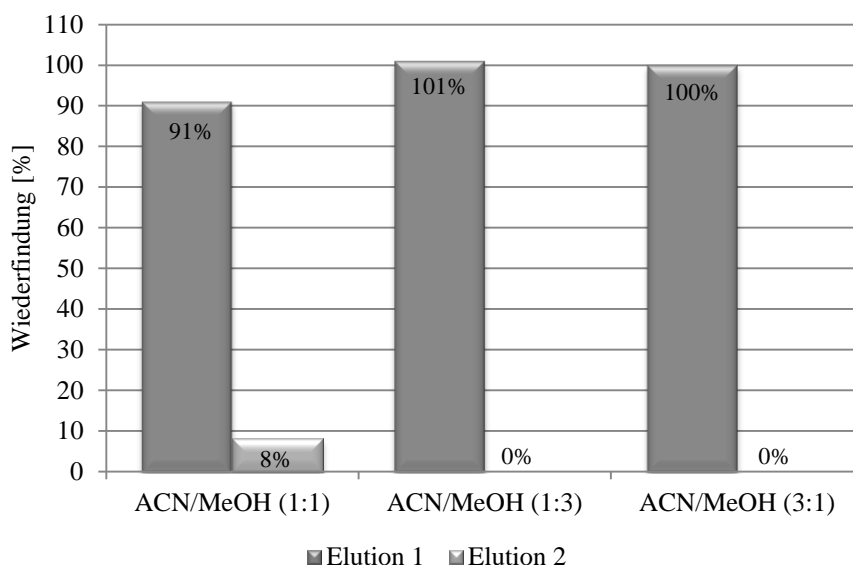
Im nächsten Schritt wurden verschiedene Elutionsmittel zur Elution des Dehydrodivanillins untersucht. Zur quantitativen Überführung der Modellsubstanz wurde dreimal mit dem doppelten Probevolumen eluiert. Als Elutionsmittel wurden für die SPE typische Lösungsmittel wie Acetonitril und Methanol verwendet. Des Weiteren wurden DMSO und DMF als Elutionsmittel getestet, da alle Modellsubstanzen eine sehr gute Löslichkeit in diesen zeigen. Der Vergleich der Elutionsmittel ist in Abbildung 66 dargestellt.



**Abbildung 66: Vergleich verschiedener Elutionsmittel zur Festphasenextraktion von Dehydrodivanillin**

Es ist deutlich zu erkennen, dass für alle Lösungsmittel nach drei Extraktionsschritten eine nahezu vollständige Wiederfindung erreicht werden konnte. Mit den, für das Dehydrodivanillin geeigneten Lösungsmitteln DMF und DMSO ist erst nach der zweiten bzw. dritten Elution eine vollständige Desorption des Analyten möglich. In dem Eluat des ersten Elutionsschrittes beträgt die Wiederfindung nur etwa 50%. Dagegen ist die Wiederfindung mit Methanol und Acetonitril im ersten Elutionsschritt deutlich höher und nach dem zweiten Elutionsschritt ist eine nahezu vollständige Desorption gegeben. Daraus lässt sich schließen, dass das Löslichkeitsvermögen unabhängig von der Elutionskraft ist. Da mit den untersuchten Lösungsmitteln keine einstufige Elution erreicht werden konnte, wurden verschiedene Mischungsverhältnisse der Lösungsmittel Acetonitril und Methanol

für die Elution des Dehydrodivanillins verglichen. Die Wiederfindung des Analyten mit den verschiedenen Lösungsmittelzusammensetzungen ist in Abbildung 67 dargestellt.



**Abbildung 67: Vergleich verschiedener Elutionsmittel-Gemische zur Festphasenextraktion von Dehydrodivanillin**

Mit einem Lösungsmittelgemisch, welches zu gleichen Teilen aus Acetonitril und Methanol besteht, sind ebenfalls zwei Elutionsschritte notwendig um eine vollständige Elution zu erhalten. Jedoch ist zu erkennen, dass das Elutionsvermögen im ersten Elutionsschritt deutlich höher ist als bei der Elution mit den einzelnen Lösungsmitteln. Bei den anderen zwei Gemischen (1:3 und 3:1) wird das gesamte Dehydrodivanillin bereits im ersten Elutionsschritt von dem Sorbent eluiert. Die Elutionskraft dieser Lösungsmittelzusammensetzungen ist somit für das Dehydrodivanillin am größten. Um verifizieren zu können, dass nur bei einer 1:3 bzw. 3:1 Mischung die vollständige Desorption im ersten Schritt erfolgt, wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Daraus ergab sich eine Standardabweichung von 0,5%. In den weiteren Versuchen wurde ACN/MeOH (1:3) als Elutionsmittel verwendet. Diese Zusammensetzung wurde gewählt, da das Abdampfen des Eluats aufgrund des geringeren Dampfdrucks des Methanols schneller stattfindet.

Diese optimierte Methode (Sorbent: RP18, Elutionsmittel: ACN/MeOH 1:3) soll nun zur Anreicherung des Dehydrodivanillins und zur Übertragung auf andere Modellsubstanzen verwendet werden. Dafür wurde zunächst die Reproduzierbarkeit dieser Methode mit Dehydrodivanillin mittels einer Vierfachbestimmung überprüft (Tabelle 30).

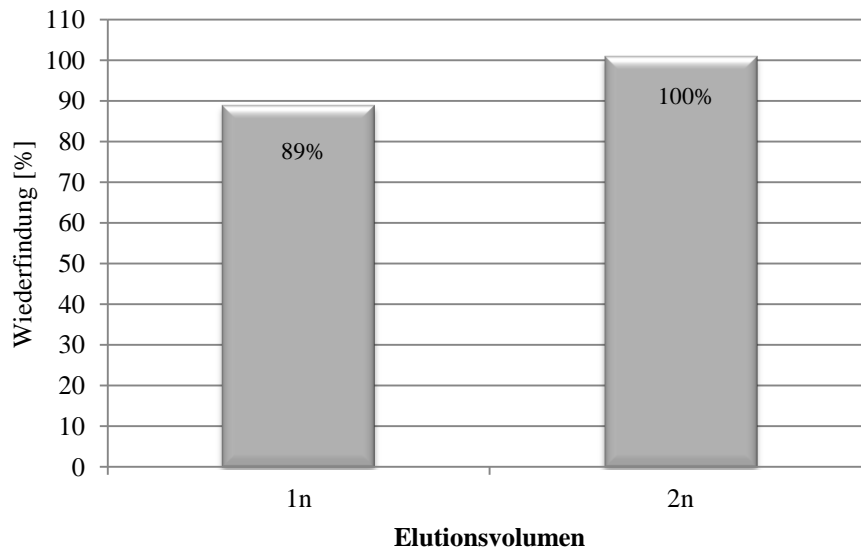
Tabelle 30: Reproduzierbarkeit der optimierten Methode zur Festphasenextraktion

Probe	Wiederfindung [%]	Mittelwert und Standardabweichung [%]
1	99%	99,8% ± 0,5%
2	100%	
3	99%	
4	101%	

Aufgrund der geringen Standardabweichung eignet sich diese Methode sehr gut für die weiteren Untersuchungen.

Zur Anreicherung des Analyten können zwei Methoden angewendet werden. Zum einen kann die Anreicherung über die Verringerung des Elutionsvolumens erfolgen, zum anderen kann die Anreicherung durch die Wahl des Resuspensionsvolumens nach dem Eindampfen des Eluats erreicht werden. Eine optimale Anreicherung wäre mit einer Kombination dieser beiden Methoden zu erreichen. In den bisherigen Untersuchungen zur Festphasenextraktion ohne Anreicherung wurde zur Gewährleistung einer vollständigen Elution mit dem doppelten Probevolumen eluiert. Das Resuspensionsvolumen entsprach wieder dem Probevolumen, so dass die Konzentration des Analyten in der Probelösung und in der vermessenen Probe nach der Probenaufarbeitung unverändert blieb.

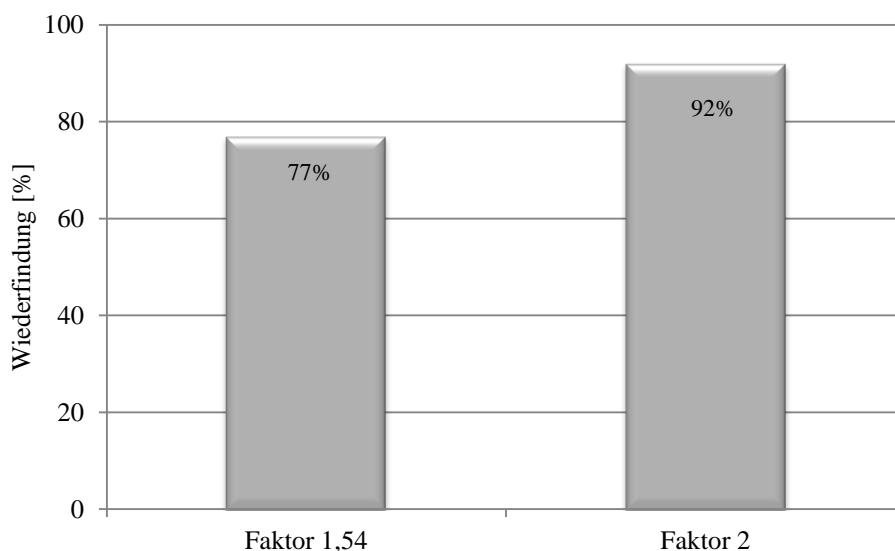
Im Folgenden soll zunächst die Anreicherung über die Reduktion des Elutionsvolumens untersucht werden. Dazu wurde vorerst das Elutionsvolumen um 50% reduziert und entspricht nun dem aufgegebenen Probevolumen. In Abbildung 68 ist ein Vergleich der Wiederfindungen bei der Elution mit einfachem (1n) und mit zweifachem Probevolumen (2n) gezeigt.



**Abbildung 68: Wiederfindungsrate bei Verringerung des Elutionsvolumens (n=aufgegebenes Probevolumen)**

Aus den ermittelten Daten geht hervor, dass die Reduktion des Elutionsvolumen um 50% eine Verringerung der Wiederfindung um 11% zur Folge hat. Um jedoch eine Anreicherung des Dehydrodivanillins mittels Reduktion des Lösungsmittelvolumens zu erreichen, müsste das Elutionsvolumen weiter verringert werden. Dies würde zu einer weiteren Verminderung der Wiederfindungsrate führen. Diese Methode ist somit zur Anreicherung des Analyten nicht geeignet.

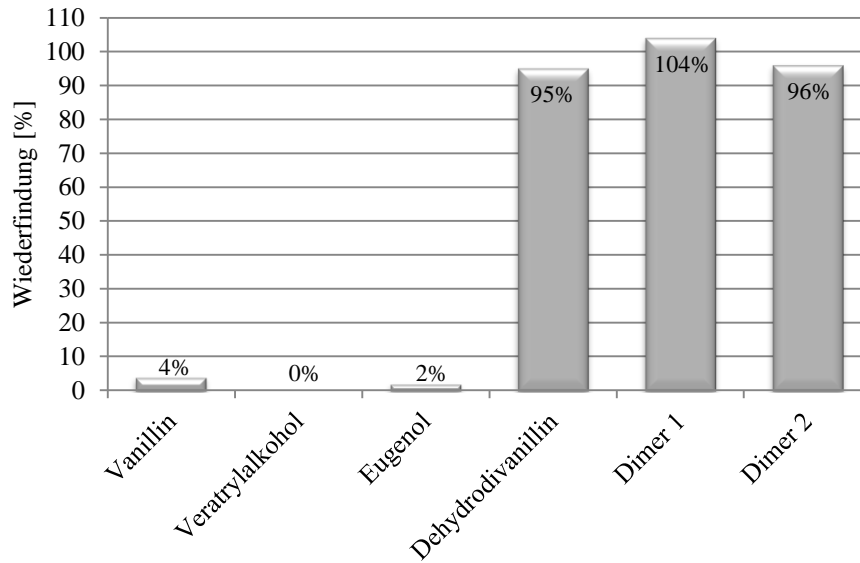
Um die Proben trotzdem anzureichern, wurde das Resuspensionsvolumen der eingedampften Probe verringert. Dazu wurde das Volumen des DMSO/NH<sub>4</sub>OAc-Gemisches zunächst um den Faktor 1,54 (von 1mL auf 650  $\mu$ L) und anschließend um den Faktor 2 (von 1 mL auf 500  $\mu$ L) reduziert. Aufgrund der schlechten Löslichkeit des Dehydrodivanillins in Ammoniumacetat wurde zum Resuspendieren ein Gemisch aus 50% DMSO und 50% 10mM Ammoniumacetat verwendet.



**Abbildung 69: Wiederfindung bei der Anreicherung über die Verringerung des Resuspensionsvolumens**

Die Ergebnisse zeigen, dass die Anreicherung durch die Verringerung des Resuspensionsvolumens sehr gut für die Aufkonzentrierung des Dehydrodivanillins geeignet ist. Es kann eine Wiederfindung von 92% erreicht werden. Eine weitere Reduktion des Volumens ist aufgrund der Löslichkeit des Dehydrodivanillins nicht möglich.

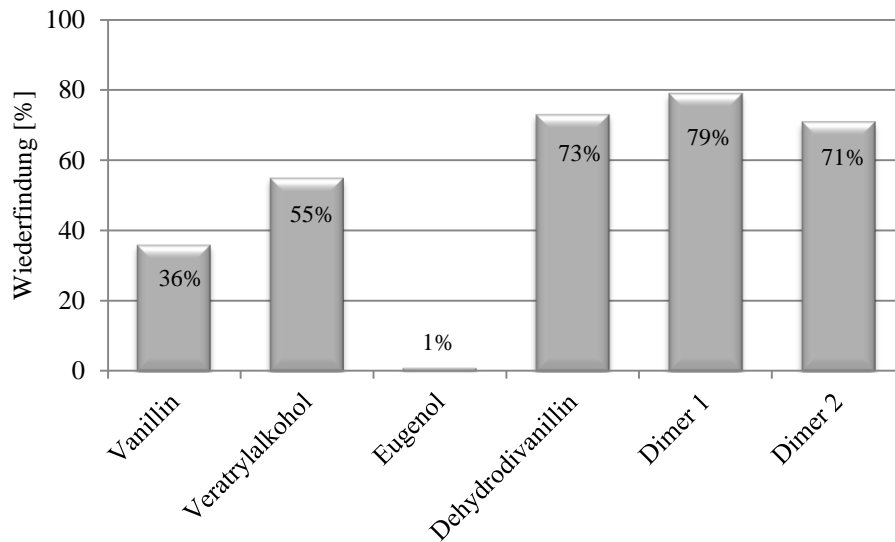
Diese optimierte Methode wurde im Folgenden auf ein Gemisch aus Modellsubstanzen (Monomere und Dimere) angewendet. Die Methode wird detailliert in Kapitel 7.5.2.1 beschrieben. Die Quantifizierung des Gemisches erfolgte mittels der optimierten HPLC-Methode aus Kapitel 4.3.2. Zu einer ersten Untersuchung zur Eignung der entwickelten Methode für ein Gemisch aus Modellsubstanzen wurde die Methode zunächst ohne Anreicherung durchgeführt. In Abbildung 70 sind die Wiederfindungen der einzelnen Substanzen gezeigt.



**Abbildung 70: Festphasenextraktion eines Gemisches aus Modellsubstanzen (ohne Anreicherung)**

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass ausschließlich die Dimere nachgewiesen werden konnten. Da in den gemessenen Proben nach der Aufgabe des Gemisches auf die SPE-Phase und in der Waschlösung ebenfalls keine Substanzen nachgewiesen werden konnten, ist davon auszugehen, dass die Monomere sich entweder nicht von der Phase eluieren lassen oder bei dem Eindampfen verflüchtigt werden. Bei dem Abdampfen der Proben im Stickstoffstrom konnte ein süßlicher Geruch von Vanillin wahrgenommen werden, so dass wahrscheinlich die Monomere während des Abdampfens des Lösungsmittels ebenfalls verdampfen. Die Dimere hingegen können ähnlich zum Dehydrodivanillin mit dieser Methode quantifiziert werden und erreichen eine Wiederfindung zwischen 95% und 104%. Um die Dimere anzureichern und die Annahme des Verdampfens der Monomere zu bestätigen, wurde das Resuspensionsvolumen um den Faktor 2 reduziert und die Verdampfungstemperatur von 60°C auf 32°C reduziert. Die Reduktion der Verdampfungstemperatur soll zeigen, ob die monomeren Modellsubstanzen nachzuweisen sind. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 71 dargestellt.





**Abbildung 71: Festphasenextraktion eines Gemisches aus Modellsubstanzen (mit Anreicherung)**

Auffallend ist, dass die Monomere Vanillin und Veratrylalkohol in dem Eluat nachgewiesen werden konnten. Dies erfolgte jedoch nicht mit einer hohen Wiederfindung wie bei den Dimeren. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Reduktion der Abdampftemperatur ein Austreiben dieser beiden Modellsubstanzen vermindert. Die Nachweisfähigkeit von Eugenol zeigt bei der Verringerung der Temperatur keine Änderung. Eugenol besitzt einen Dampfdruck von  $<10$  Pa und verdampft somit schon bei geringeren Temperaturen [155]. Im Vergleich dazu liegt der Dampfdruck von Vanillin nur bei 0,29 Pa [156]. Die Anreicherung der Dimere konnte mit dieser Methode im guten Maße erreicht werden.

An der Anreicherung des Dehydrodivanillin wird jedoch deutlich, dass die weiteren Substanzen einen Einfluss auf die Festphasenextraktion besitzen. So konnte das Dehydrodivanillin als Einzelanalyt eine Wiederfindung von 92% erreicht werden, wohingegen im Modellsubstanz-Gemisch die Wiederfindung nur 73% betrug. Dies kann aufgrund der hohen Gesamtkonzentration des Gemisches in der Beladbarkeit des Sorbent oder im Elutionsvolumen begründet liegen.

Abschließend kann gesagt werden, dass die entwickelte Methode für Monomere nur bedingt geeignet ist. Hierfür müsste die Anreicherung ausschließlich über die Reduktion des Elutionsvolumens erfolgen. Dafür wären Untersuchungen mit Phasen anderer Dimensionen sowie anderen Faktoren, wie der Einwirkzeit des Elutionsmittels, notwendig. Zur Anreicherung von Dimeren ist die entwickelte Methode gut geeignet. Da Oligomere ebenfalls einen sehr niedrigen Dampfdruck aufweisen, ist die Methode mit hoher

Wahrscheinlichkeit auch für diese geeignet. Es könnten somit zum Beispiel Analyten aus stark verdünnten Fraktionen der HPLC angereichert werden und anschließend einer massenspektrometrischen Analytik identifiziert werden.

Mit der gaschromatographischen Analytik konnten ausschließlich monomere und dimere Ligninabbauprodukte analysiert werden. Die HPLC-MS Analytik, die in der Regel zur Analyse von Substanzen unterschiedlicher Polarität und Massen geeignet ist, zeigte, dass aufgrund des chromatographischen Verdünnungseffekts, nur stark fraktionierte Proben mit einer geringen Komplexität mit einer guten Auftrennung analysiert werden konnten.

Um den chromatographischen Verdünnungseffekt zu verhindern und ebenfalls höhermolekulare Substanzen analysieren zu können, sollen die Ligninabbauprodukte massenspektrometrisch mittels Direktinjektion qualifiziert werden. Dazu wird im Folgenden die massenspektrometrische Analysenmethode optimiert.

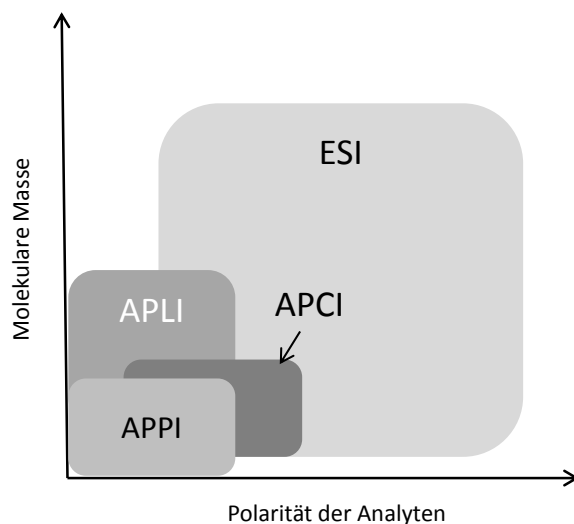
### **4.3.3 Massenspektrometrische Untersuchung**

Für die massenspektrometrische Analyse wird ein hochauflösendes Massenspektrometer verwendet, mit dem die Bestimmung von Präzisionsmassen möglich ist. Über diese können anschließend Summenformeln und mögliche Strukturen der Ligninabbauprodukte ermittelt werden. Zur Methodenentwicklung wurden verschiedene Ionisationsquellen (APCI und ESI) miteinander verglichen sowie die Ionisierungsparameter optimiert. Anschließend wurde die optimierte Methode auf die Ligninabbauprodukte aus den Ablaugen übertragen. Eine Direktinjektion bietet außerdem den Vorteil, dass die Massen von niedrig konzentrierten Substanzen nachgewiesen werden können.

Für die Methodenentwicklung werden die Arbeiten von Owen *et.al.* und Hauptert *et.al.* berücksichtigt. Dieser entwickelte eine HPLC-(ESI)-MS Methode zur Untersuchung von hauptsächlich monomeren Modellsubstanzen zur Analyse von Ligninabbauprodukten. Die Untersuchung von Trimeren und Tetrameren sowie eine Optimierung einer HPLC-(APCI)-MS Methode wurden dabei nicht berücksichtigt.

#### 4.3.3.1 Methodenentwicklung mit Modellsubstanzen

Zunächst soll geprüft werden, welche Ionisierungsmethode am besten für die Analytik der Modellsubstanzen geeignet ist. Typische Ionisierungsmethoden sind in Abbildung 72 dargestellt.



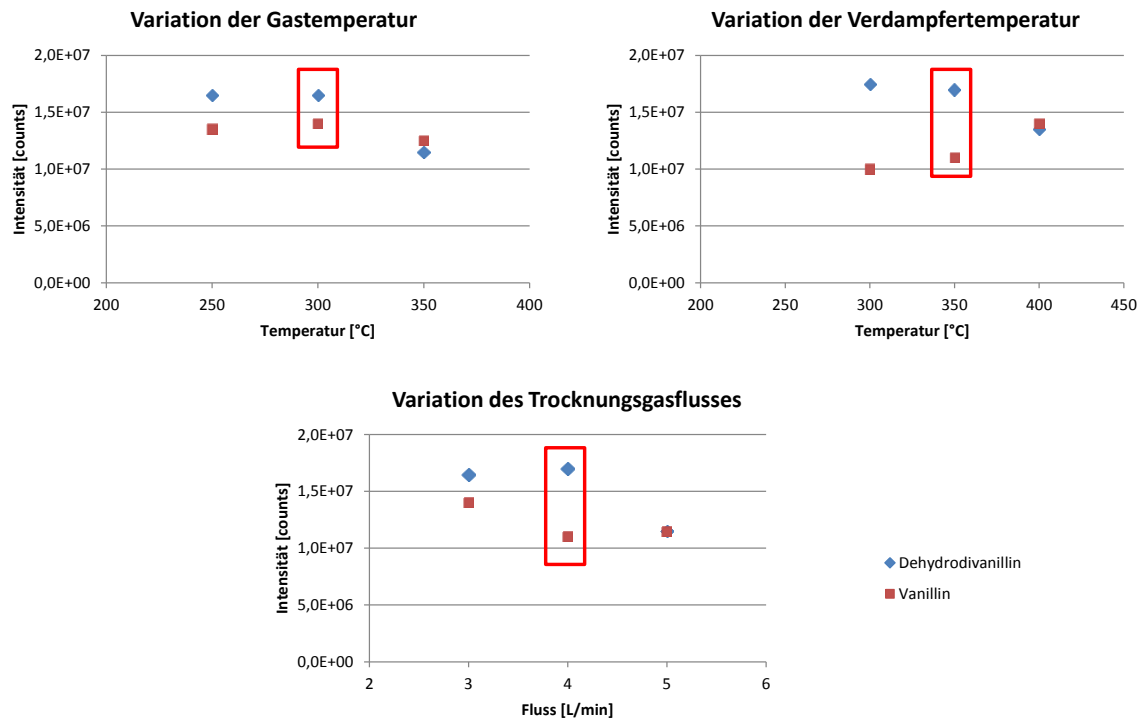
**Abbildung 72: Übersicht über Ionisationsmethoden in Abhängigkeit von der Molaren Masse und der Polarität der Analyten nach [157]**

Da es sich, wie in Kapitel 4.2 gezeigt, bei den Ligninabbauprodukten um mittelpolare bis polare Substanzen handelt, sind die ESI (Electrospray Ionization) und die APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) potentielle Methoden zur Ionisierung dieser Ligninabbauprodukte (siehe Abbildung 72).

Um die Eignung dieser Ionisationsmethoden für die Ligninabbauprodukte zu überprüfen, wurden zunächst die Modellsubstanzen Vanillin und Dehydrodivanillin verwendet, da diese mit hoher Wahrscheinlichkeit in den Realproben vorliegen.

Für die massenspektrometrische Untersuchung wurde zur Injektion eine HPLC-Anlage verwendet, bei dem keine Säule eingesetzt war und somit eine Direktinjektion mit dem Eluenten in die Ionenquelle erfolgte. Zunächst wurden für beide Ionisationsmethoden die Messparameter, wie zum Beispiel die Wahl des Eluenten und der Fluss optimiert. Dabei erwiesen sich eine Eluentenzusammensetzung von 50/50 Methanol/Wasser bei einem Fluss von 0,5mL/min als geeignete Parameter. Als Injektionslösemittel wurde Methanol/Ammoniak (50/50) verwendet, da viele Modellsubstanzen, wie z.B. auch Dehydrodivanillin nicht in Methanol/Wasser löslich sind. Es wurden zudem die Ionisierungsparameter wie zum Beispiel Gastemperatur, Fluss des Drying-Gases und bei der APCI zusätzlich die Verdampfer Temperatur optimiert. Alle Parameter wurden mit der

ESI-Quelle und der APCI-Quelle jeweils im Positiv- und Negativ-Modus optimiert. In Abbildung 73 ist beispielhaft die Intensität des Signals (absolute Höhe des m/z-Verhältnisses) von Vanillin und Dehydrodivanillin bei Änderung verschiedener Parameter bei der Ionisierung mit APCI im Negativ-Modus dargestellt. Rot markiert sind die für die optimierte Methode ausgewählten Größen. Diese wurden so ausgewählt, dass für beide Substanzen eine möglichst hohe Intensität vorlag.



**Abbildung 73: Methodenoptimierung der Ionisierung mittels APCI (Negativ-Modus) durch Änderung verschiedener Parameter (Gastemperatur, Verdampfertemperatur, Gasfluss)**

Bei der Optimierung der Methode ist aufgefallen, dass die Auswirkung der Parameteränderung auf die Signalintensität des Dimers (Dehydrodivanillin) und des Monomers (Vanillin) unterschiedlich ist.

Daraus ergab sich für jede Ionisierungsmethode ein optimiertes Verfahren zur Messung im Negativ- und Positiv-Modus (Tabelle 31).

Tabelle 31: Optimierte APCI und ESI-Methoden (Positiv- und Negativ-Modus)

Parameter	APCI		ESI	
	positiv	negativ	positiv	negativ
Injektionslösemittel	MeOH/NH <sub>3</sub> (50/50)		MeOH/NH <sub>3</sub> (50/50)	
Eluent	MeOH/H <sub>2</sub> O (50/50)		MeOH/H <sub>2</sub> O (50/50)	
Fluss	0,5 mL/min		0,5 mL/min	
Gastemperatur	300 °C	300 °C	300 °C	300 °C
Verdampfungstemperatur	325 °C	350 °C	-	-
Fluss Trocknungsgas (N <sub>2</sub> )	6 L/min	4 L/min	8 L/min	8 L/min
Zerstäubedruck	20 psig	20 psig	35 psig	35 psig
Corona-Ladung	4 µA	20 µA	-	-

Mit diesen optimierten Methoden wurde anschließend ein Vergleich bezüglich der Ionisierungsmodi (Tabelle 32) und der Ionisation von Monomer und Dimer (Tabelle 33) durchgeführt.

Tabelle 32: Vergleich der Ionisationsmodi anhand von Dehydrodivanillin mittels ESI und APCI

Modus	ESI	APCI
	Intensität [counts]	Intensität [counts]
Positiv	$7 \times 10^5$ (m/z= 303 Da)	$4 \times 10^5$ (m/z= 303 Da)
Negativ	$9 \times 10^6$ (m/z= 301 Da)	$1,7 \times 10^7$ (m/z= 301 Da)

Aus Tabelle 32 geht hervor, dass mit beiden Ionisationstechniken das Dehydrodivanillin im Negativ-Modus besser ionisiert wird als im Positiv-Modus. Es ist jedoch kein erheblicher Unterschied zwischen ESI und APCI erkennbar. Die Intensität im APCI-Massenspektrum liegt um ca.  $8 \times 10^6$  Counts höher, jedoch ist der Unterschied nicht ausschlaggebend für die Wahl der Ionisationsart.

**Tabelle 33: Vergleich der Ionisierung von Vanillin und Dehydrodivanillin mittels ESI und APCI (Negativ-Modus)**

<b>Ionisierung</b>	<b>Vanillin Intensität [counts]</b>	<b>Dehydrodivanillin Intensität [counts]</b>
ESI (-)	$1,4 \times 10^6$ (m/z= 151 Da)	$9 \times 10^6$ (m/z= 301 Da)
APCI (-)	$1,4 \times 10^7$ (m/z= 151 Da)	$1,7 \times 10^7$ (m/z= 301 Da)

Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass zur Ionisierung vom Dimer (Dehydrodivanillin) die ESI sowie auch die APCI gut geeignet sind. Bei der Ionisierung von Vanillin hingegen ist eine stark verbesserte Signalintensität bei der Ionisierung mittels APCI (Faktor 10) zu sehen. Grund dafür ist, dass die Ionisierung mittels APCI für Substanzen mit kleineren Molekülmassen besser geeignet ist als die Ionisierung mittels ESI (vergleiche Abbildung 72). Aufgrund der besseren Ionisierbarkeit der Monomere mittels APCI wurde im Folgenden diese Ionisationsmethode verwendet. Für Vanillin und Dehydrodivanillin ist die Bestimmung im Negativ-Modus am besten für die massenspektrometrische Analyse geeignet. Aufgrund der unterschiedlichen Strukturen der Modellsubstanzen und der Ligninabbauprodukte werden diese im Weiteren im Positiv- und Negativ-Modus gemessen.

Da in den Realproben eine große Anzahl an Substanzen mit geringen Konzentrationen vorliegt, wurde für das Vanillin und Dehydrodivanillin die geringste Konzentration bestimmt, die mit dieser Methode erfasst werden kann (Tabelle 34).

**Tabelle 34: Vergleich der kleinsten Konzentrationen von Vanillin und Dehydrodivanillin, die mittels APCI-MS bestimmt werden kann**

<b>Modus</b>	<b>Vanillin</b>	<b>Dehydrodivanillin</b>
APCI (-)	0,1 µg/mL	0,01 µg/mL
APCI (+)	-	1 µg/mL

Da über die genaue Anzahl der enthaltenen Substanzen in den Realproben keine Aussage getroffen werden kann, ist es möglich, dass einige Substanzen die unter der ermittelten Detektionsgrenze liegen, nicht bestimmt werden können. Bei der Gesamtkonzentration der Realprobe von 100 µg/mL können unter der Annahme einer Gleichverteilung ca. 1000 Substanzen detektiert werden.

Im Folgenden werden alle Modellsubstanzen mittels APCI im Negativ- und im Positiv-Modus ionisiert und das m/z-Verhältnis, wie bereits bei den vorhergehenden Messungen, mit einem TOF-Massenanalysator bestimmt.

Tabelle 35 gibt einen Überblick über die massenspektrometrische Analyse aller Modellsubstanzen. Dargestellt sind die detektierten m/z-Verhältnisse mit ihrer relativen Intensität.

**Tabelle 35: Massenspektrometrische Analyse der Modellsubstanzen (APCI- positiv und negativ)**

<b>Modellverbindung</b>	<b>APCI - negativ</b>	<b>APCI - positiv</b>
Vanillin m/z= 152,0473 Da	151,0412 Da [M-H] <sup>-</sup> (100%) 136,0171 Da [M-CH <sub>3</sub> -H] <sup>-</sup> (33%)	Kein Signal
Veratrylalkohol m/z= 168,0786 Da	Kein Signal	151,0751 [M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup> (100%)
Eugenol m/z= 164,0837 Da	163,0768 [M-H] <sup>-</sup> (100%) 148,0533 [M-CH <sub>3</sub> -H] <sup>-</sup> (41%)	Kein Signal
Sulfonierte Modellsubstanz m/z= 240,0068 Da	217,0182 [M-Na] <sup>-</sup> (100%)	Kein Signal
Dehydrodivanillin m/z= 302,0790 Da	301,0739 [M-H] <sup>-</sup> (100%)	303,0862 [M+H] <sup>+</sup> (100%)
Dimer 1 m/z= 274,1205 Da	273,1143 [M-H] <sup>-</sup> (100%)	275,1281 [M+H] <sup>+</sup> (100%)
Dimer 2 m/z= 302,1154 Da	Kein Signal	287,1276 [M-O+H] <sup>+</sup> (100%) 303,1224 [M+H] <sup>+</sup> (35%)
Trimer m/z= 480,1420 Da	479,1356 [M-H] <sup>-</sup> (100%) 301,0727 [M-C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub> -H] <sup>-</sup> (54%)	481,1495 [M+H] <sup>+</sup> (100%)
Tetramer m/z= 658,2050 Da	479,1733 [M-C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub> -H] <sup>-</sup> (100%) 461,1617 (16%) 657,2424 [M-H] <sup>-</sup> (5%)	659,2479 [M+H] <sup>+</sup> (100%) 676,2730 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> (19%)

Vanillin, Eugenol sowie die sulfonierte Modellsubstanz lassen sich ausschließlich im Negativ-Modus ionisieren. Bei der Ionisierung vom Veratrylalkohol und von Dimer 2 (β-O-4'-Verknüpfung) werden hingegen nur im Positiv-Modus Signale erhalten. Alle anderen Modellsubstanzen werden sowohl im Negativ- als auch im Positiv-Modus ionisiert. Somit müssen für die Analytik vom isolierten Kraftlignin und von den

Ligninsulfonaten beide Modi verwendet werden, um möglichst alle Verbindungen ionisieren zu können.

Bei der Ionisierung der Modellverbindungen werden die entsprechenden negativen ( $[M-H]^-$ ) oder positiven Molekülonen ( $[M+H]^+$ ) gebildet. Eine Ausnahme stellt der Veratrylalkohol dar, bei dessen Ionisierung ein Abbauprodukt entsteht, bei dem Wasser abgespalten wurde. Bei den Monomeren Vanillin und Eugenol kommt es zusätzlich zur Bildung des negativen Molekülonen auch zur Abspaltung einer Methylgruppe ( $\Delta m/z = 15$ ). In den untersuchten Realproben kann aus dieser Massendifferenz hergeleitet werden, dass es sich um Analyten mit mindestens einer Methoxygruppe handelt. Die sulfonierte Modellsubstanz liegt in Lösung als Natriumsalz vor und wird ausschließlich als  $[M-Na]^-$ -Ion detektiert.

Dimer 2 bildet im Positiv-Modus neben dem positiv geladenen Molekülon ein Abspaltungsprodukt mit einer Differenz von 16 Da. Dies könnte einer Abspaltung eines Aldehydsauerstoffs entsprechen.

Mit der massenspektrometrischen Bestimmung des Trimers und des Tetramers sollte überprüft werden, ob auch höhermolekulare Ligninabbauprodukte mit der optimierten APCI-Methode ionisiert werden können. Beide Verbindungen lassen sich im Negativ- wie auch im Positiv-Modus ionisieren. Besonders im Positiv-Modus liegt hauptsächlich das nicht fragmentierte Molekülon vor. Bei der Ionisierung des Tetramers wird zusätzlich zum Molekülon das Ammoniumaddukt gebildet. Im Negativ-Modus kommt es bei beiden Substanzen zu der Abspaltung einer Phenoleinheit. Vor allem das Tetramer fragmentiert nahezu vollständig zur trimeren Verbindung. Das Molekülon ist nur noch mit einer relativen Intensität von 5% zu erkennen. Die Fragmentierung des Trimers und Tetramers im Negativ-Modus ist in Abbildung 74 gezeigt.

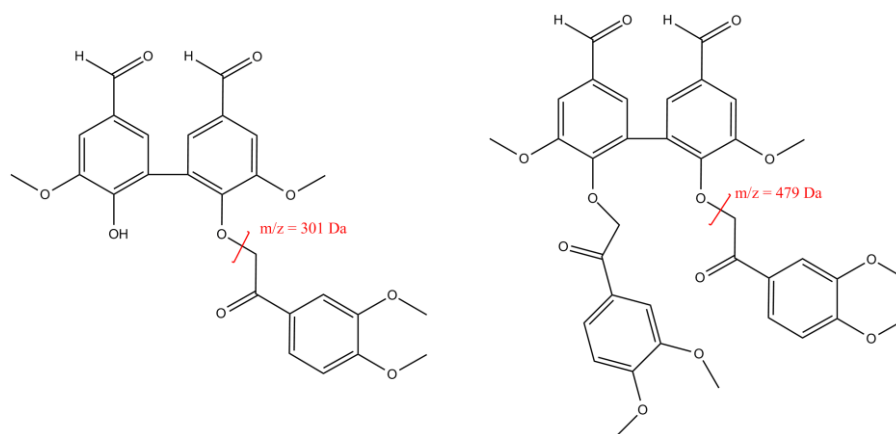


Abbildung 74: Fragmentierung des Trimers und Tetramers bei der massenspektrometrischen Analyse



Die dargestellte Fragmentierung des Tetramers zeigt, dass bei Oligomeren eine Bildung von Fragmenten möglich ist. Somit könnte es möglich sein, dass das  $[M-H]^-$  nicht mehr detektiert wird.

Um eine Aussage über die Genauigkeit der detektierten Massen zu erhalten, wurden die Abweichungen der gemessenen Massen zur den kalkulierten Massen der entsprechenden Summenformeln aufgeführt (Tabelle 36). Zudem können aus der Summenformel die entsprechenden Doppelbindungsäquivalente berechnet werden. Die Doppelbindungsäquivalente geben die Summe der im Molekül enthaltenen Doppelbindungen und Ringe an. Dabei werden Schwefel-Sauerstoffbindungen z.B. in sulfonierten Verbindungen nicht berücksichtigt.

**Tabelle 36: Abweichungen der Präzisionsmassen der Modellsubstanzen (DBA= Doppelbindungsäquivalente)**

Substanz	Ion	m/z (berechnet)	m/z (gemessen)	$\Delta$ ppm	DBA
Vanillin $C_8H_8O_3$	$[M-H]^-$	151,0401	151,0410	-6,13	5
Veratrylalkohol $C_9H_{12}O_3$	$[M-H_2O+H]^+$	151,0754	151,0751	+1,69	4
Eugenol $C_{10}H_{12}O_2$	$[M-H]^-$	163,0765	163,0768	-2,13	5
Sulfonierte Modellsubstanz $C_8H_9NaO_5S$	$[M-Na]^-$	217,0171	217,0182	-5,21	4
Dehydrodivanillin $C_{16}H_{14}O_6$	$[M-H]^-$	301,0718	301,0739	-7,1	10
	$[M+H]^+$	303,0863	303,0862	+0,38	
Dimer 1 $C_{16}H_{18}O_4$	$[M-H]^-$	273,1132	273,1143	-3,91	8
	$[M+H]^+$	275,1278	275,1281	-1,14	
Dimer 2 $C_{17}H_{18}O_5$	$[M+H]^+$	303,1227	303,1224	+0,99	9
Trimer $C_{26}H_{24}O_9$	$[M-H]^-$	479,1348	479,1356	-1,76	15
	$[M+H]^+$	481,1493	481,1495	-0,4	
Tetramer $C_{36}H_{34}O_{12}$	$[M-H]^-$	657,1978	657,2424	-68	20
	$[M+H]^+$	659,2123	659,2479	-54	

Nahezu alle Substanzen zeigen relativ kleine Abweichungen (< 7,5 ppm). Eine Ausnahme ist die Massenanalyse des Tetramers. Bei der Detektion ergeben sich Abweichungen von bis zu 68 ppm. Um Abweichungen in der Struktur des synthetisierten Tetramers auszuschließen, wurde diese mittels NMR bestätigt. Generell sind mit dem verwendeten Massenspektrometer Genauigkeiten von <5 ppm zu erreichen. Bei 8 der insgesamt 13 oben gezeigten Daten liegt die Genauigkeit unter diesem Wert. Die anderen Abweichungen sind, ohne Berücksichtigung des Tetramers, nur leicht erhöht. Bedingt durch die Kalibrierung des Systems ist die Präzision im niedrigen Massenbereich höher.

Bei fast allen Substanzen die als  $[M-H]^-$  oder  $[M+H]^+$  detektiert wurden, konnte eine Zuordnung der detektierten Masse zur Summenformel erfolgen. Aufgrund der detektierten Präzisionsmasse können mögliche Verhältnisse von Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff berechnet werden.

Bei der Detektion des Tetramers ist die Abweichung mit 54 ppm, bzw. 68 ppm zu hoch, so dass im Falle einer unbekanntes Substanz keine Zuordnung zu der realen Summenformel erfolgen könnte.

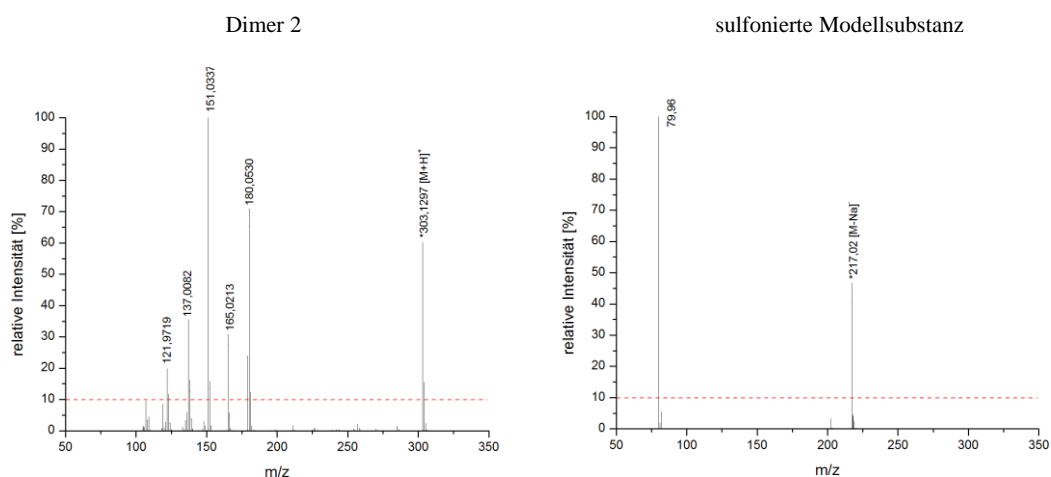
Im Hinblick auf die Strukturaufklärung der zu untersuchenden Realproben mit unbekanntes Analyten wurde eine Methodenentwicklung zur MS/MS-Analytik mit den Modellsubstanzen durchgeführt. Als Kollisionsgas wurde Stickstoffgas verwendet. Die Kollisionsenergien betragen je nach Modus und Intensität des Mutterions zwischen 1V und 20V. In Tabelle 37 sind die Ergebnisse dargestellt, bei denen die Fragmentierung am stärksten war. Dabei zeigte das Mutterion jedoch noch eine relative Intensität von 10%. Die fragmentierte Masse ist mit einem „\*“ gekennzeichnet. Den in grau dargestellten m/z-Verhältnissen konnte kein Fragment zugeordnet werden. Hier kommt es zum Teil zu komplexen Umlagerungen im Molekül.

**Tabelle 37: MS/MS-Untersuchungen der Modellsubstanzen**

Substanz	Modus	Energie [V]	Signal [relative Intensität]
Vanillin	Negativ	10V	136,0151 $[M-CH_3-H]^-$ (100%)
			92,0282 (40%)
			108,0220 (24%)
			151,0376* $[M-H]^-$ (13%)
Veratrylalkohol	Positiv	10V	151,0213* $[M-H_2O+H]^+$ (100%)
			106,9730 (96%)
			76,9644 (92%)
Eugenol	Negativ	10V	148,0552 $[M-CH_3-H]^-$ (100%)
			163,0792* $[M-H]^-$ (12%)

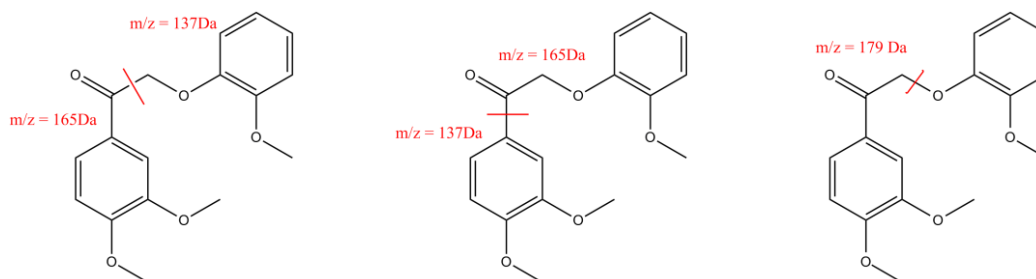
Sulfonierte Modellsubstanz	Negativ	15V	79,9611 [SO <sub>3</sub> ] <sup>-</sup> (100%) 217,0242* [M-Na] <sup>-</sup> (47%)
Dehydrodivanillin	Negativ	10V	301,0871* [M-H] <sup>-</sup> (100%) 286,0528 [M-CH <sub>3</sub> -H] <sup>-</sup> (17%)
Dimer 1	Negativ	15V	258,0976 [M-CH <sub>3</sub> -H] <sup>-</sup> (100%) 273,1202* [M-H] <sup>-</sup> (86%) 243,0707 [M-2CH <sub>3</sub> -H] <sup>-</sup> (26%)
Dimer 2	Positiv	1V	151,0337 [M-C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup> (100%) 180,0530 [M-C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup> (71%) 303,1297* [M+H] <sup>+</sup> (60%) 137,0082 [M-C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub> ] (36%) 165,0213 [M-C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> ] (31%) 121,9719 [M-C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> ] (20%)
Trimer	Negativ	10V	195,0689 [M-C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup> (100%) 479,1357 [M-H] <sup>-</sup> (39%) 167,0718 (32%)
Tetramer	Positiv	5V	659,2144 [M+H] <sup>+</sup> (100%) 179,0708 [M-C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> O <sub>9</sub> ] (54%) 165,0551 [M-C <sub>27</sub> H <sub>25</sub> O <sub>9</sub> ] <sup>-</sup> (41%) 151,0757 [M-C <sub>28</sub> H <sub>28</sub> O <sub>9</sub> +H] <sup>+</sup> (36%) 493,1501 [M-C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub> ] (12%)

Im Negativ-Modus ist die Abspaltung der CH<sub>3</sub>-Gruppen der Methoxyfunktion die Hauptfragmentierungsreaktion. Im Positiv-Modus treten komplexe Fragmentierungsmuster auf, die durch Abspaltungsvorgänge hervorgerufen werden. Auffallend sind die Fragmentierungen von Dimer 2 und von der sulfonierten Modellsubstanz (Abbildung 75).



**Abbildung 75: MS/MS-Spektren von Dimer 2 (Positiv-Modus, 1V) und von der sulfonierten Modellsubstanz (Negativ-Modus, 15V)**

Die Fragmentierung von Dimer 2 beruht auf Spaltungen an der Ether bzw. Ketofunktion. Die Fragmente sind in Abbildung 76 dargestellt.



**Abbildung 76: Fragmentierung von Dimer 2**

Dieser Bruch des Moleküls in die zwei Fragmente ist deutlich im Massenspektrum zu sehen. Auch bei der Fragmentierung des  $\beta$ -O-4-verknüpften Trimers ist dieser Effekt deutlich zu erkennen. In Realproben wäre es möglich, durch die Fragmentierung bestimmter  $m/z$ -Verhältnisse eine Aussage über die Verknüpfungsart der Lignineinheiten zu erhalten. Bei der Fragmentierung der sulfonierten Modellsubstanz wird das  $[M-Na]^-$  sowie auch das  $[SO_3]^-$ -Ion gebildet. In Realproben besteht somit die Möglichkeit, Substanzen zu identifizieren, die als Natriumsulfonat vorliegen. Eine weitere Strukturaufklärung ist nicht möglich, da keine weitere Fragmentierung zu erkennen ist.

Anhand der Modellsubstanzen konnte eine optimierte massenspektrometrische Methode entwickelt werden, mit der die Modellsubstanzen erfolgreich charakterisiert werden konnten. Durch MS/MS Experimente konnten substanzspezifische Fragmentierungsmuster bestimmt werden. Nachdem diese Optimierung erfolgreich war, soll im Folgenden der Einfluss anderer Ionen auf die Detektierbarkeit (Ionensuppression) untersucht werden.

### 4.3.3.2 Ionensuppression bei der massenspektrometrischen Analyse

Um das Ausmaß der Ionensuppression zu untersuchen, wurde zunächst ein Gemisch der Modellsubstanzen analysiert. Dabei betrug die Konzentration wie bereits bei den Einzelinjektionen 10  $\mu\text{g/mL}$  pro Substanz. Die Massenspektren im Negativ- und Positiv-Modus sind in Abbildung 77 gezeigt.

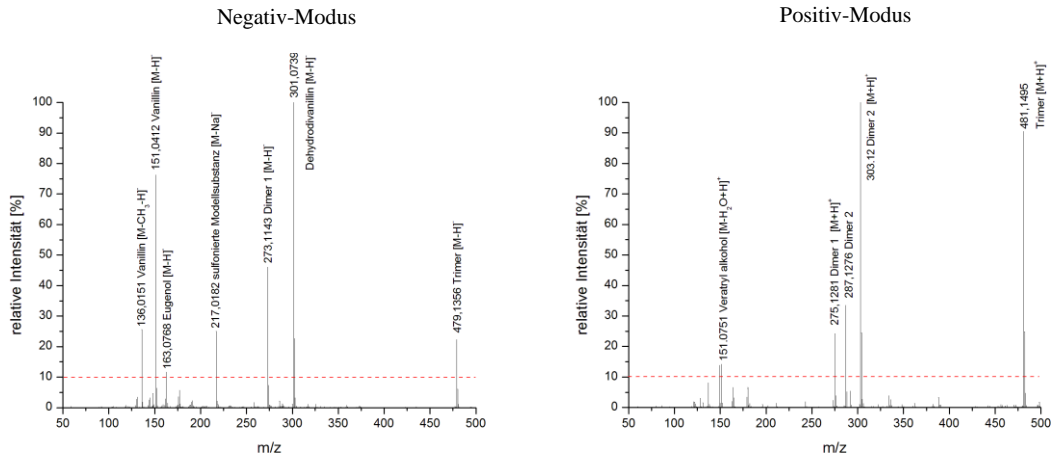


Abbildung 77: Massenspektren (Negativ- und Positiv-Modus) von Gemischen der Modellsubstanzen

Alle eingesetzten Modellsubstanzen zeigen deutliche Signale und werden somit nicht signifikant unterdrückt. Im Vergleich der Signalintensitäten der Analyten im Gemisch zu den Einzelinjektionen zeigt ausschließlich der Veratrylalkohol eine deutliche Abnahme (80%).

Da in den isolierten Ligninabbauprodukten jedoch eine wesentlich komplexere Matrix vorliegt als bei dem Gemisch der Modellsubstanzen, wird zudem der Einfluss der Realproben auf die trimere Modellsubstanz untersucht. Um zu überprüfen, ob trimere Verbindungen von der Matrix beeinflusst werden, wurden die Realproben mit der trimeren Modellsubstanz gespickt. In Tabelle 38 sind die Signalintensitäten des Trimers in den jeweiligen Realproben dargestellt.

Tabelle 38: Prozentuale Signalintensität des Trimers (bezogen auf das höchste Signal) in den gespickten Realproben

Probe	Modus	1 µg/mL	5 µg/mL
Ligninsulfonate	negativ	5%	99%
	positiv	17%	100%
Kraftlignin	negativ	-	-
	positiv	-	-

Hier wird deutlich, dass der Einfluss der Ionensuppression je nach Realprobe unterschiedlich ist. So lag bei der Messung der Ligninsulfonate kaum Ionensuppression vor,

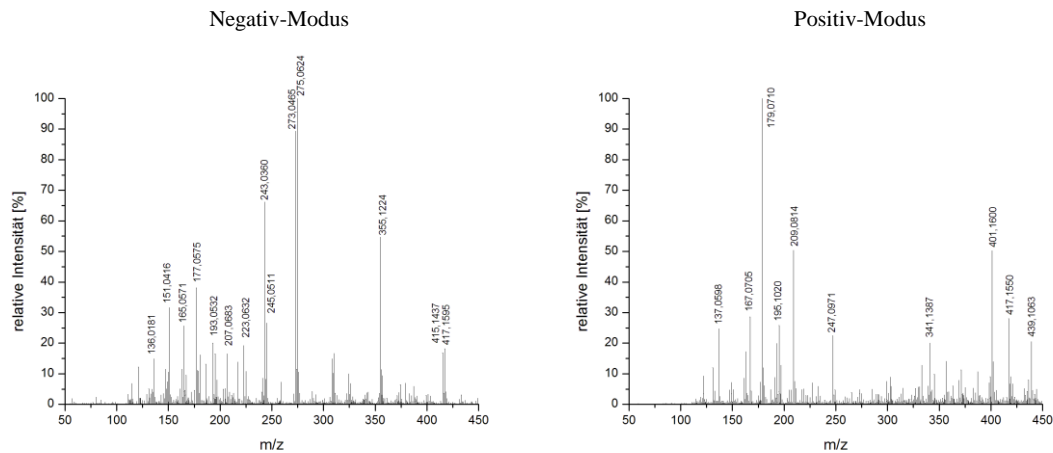
so dass das Trimer bei einer Konzentration von 1 µg/mL erfasst werden konnte. Bei der Analyse des gespikten Kraftlignins zeigt sich jedoch eine starke Inhibierung des Signals vom Trimer. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass höhermolekulare Substanzen in den gemessenen Realproben des Kraftlignins inhibiert werden.

Nachdem sowohl die Methode optimiert und auch chemische Einflüsse untersucht wurden, sollen im Folgenden die Realproben mit dieser Methode analysiert werden

### *4.3.3.3 Analytik der Ligninsulfonate*

Bei der Methodenentwicklung mit den Modellsubstanzen konnte gezeigt werden, dass bei hinreichender Genauigkeit des m/z-Verhältnisses die Bestimmung der Summenformel möglich ist. Zudem können aus der Summenformel die entsprechenden Doppelbindungsäquivalente berechnet werden, sodass ein Hinweis auf die Struktur der Verbindungen erhalten werden kann. Durch die optimierte MS/MS-Analyse lassen sich zudem Aussagen über die Anzahl der Methoxygruppen, die Anwesenheit von β-O-4'-Bindungen und Sulfonsäuregruppen treffen. Eine stärkere Fragmentierung kann durch die Erhöhung der Fragmentierungsenergie erreicht werden. Dadurch sind jedoch keine weiteren Aussagen zur Struktur möglich.

Zur Übertragung der optimierten Methode auf die isolierten Ligninabbauprodukte wurden diese mit einer Konzentration von 100 µg/mL in MeOH/NH<sub>3</sub> (50/50) gelöst. Die gelöste Substanz wurde anschließend, wie auch die Modellsubstanzen, per Direktinjektion gemessen. Dabei wurde ein Massenbereich von 100-1200 Da gewählt. Bei einem höheren Massenbereich (bis 4000 Da) wurden keine weiteren Signale detektiert. Das Kraftlignin sowie die Ligninsulfonate wurden im Negativ- und im Positiv-Modus gemessen. Die Massenspektren der isolierten Ligninsulfonate sind in Abbildung 78 dargestellt.



**Abbildung 78: Massenspektren (Negativ- und Positiv-Modus) der isolierten Ligninsulfonate**

Der Massenbereich der detektierten Signale liegt zwischen 100 und 450 Da. Somit kann es sich maximal um Trimere handeln. Mehrfachladungen liegen aufgrund des Isotopenmusters nicht vor. Eine weitere Möglichkeit ist die Fragmentierung von höhermolekularen Substanzen zu monomeren und dimeren Struktureinheiten.

Bei der Auswertung aller gemessenen Massenspektren wurde nach folgendem Schema vorgegangen.

1. Als Messdaten wurden alle Signale mit einer relativen Intensität über 10% berücksichtigt. Unter dieser Grenze kommt es zu einer starken Überlagerung von Signalen, so dass keine Zuordnung des Moleküliions und Isotopenpeaks möglich ist.
2. Bei der Auswertung der Daten wird davon ausgegangen, dass es sich bei den im Negativ-Modus detektierten Substanzen hauptsächlich um  $[M-H]^-$  handelt. Die sulfonierten Verbindungen werden als  $[M-Na]^-$ -Ionen detektiert. Im Positiv-Modus können  $[M+H]^+$  sowie Ammoniumaddukte gebildet werden, da als Lösungsmittel Ammoniak verwendet wurde.
3. Da ein hochauflösendes Massenspektrometer verwendet wurde, kann über die detektierte Präzisionsmasse eine Summenformel ermittelt werden.
4. Es wurden ausschließlich Summenformeln mit den Elementen Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff und Schwefel berücksichtigt. Da bei der Elementaranalyse der Ablaugen (siehe Kapitel 4.1) kein Stickstoff nachgewiesen werden konnte, wird dieser bei der Ermittlung der Summenformel nicht einbezogen.
5. Wurde für ein  $m/z$ -Verhältnis eine sulfonierte und eine nicht sulfonierte Summenformel vorgeschlagen, wurde durch ein MS/MS-Experiment die sulfonierte Struktur bestätigt oder widerlegt.

6. Aus den ermittelten Summenformeln können anschließend die Doppelbindungsäquivalente berechnet (Berechnung siehe Modellsubstanzen) und so ein Hinweis auf die jeweilige Struktur erhalten werden. Die Doppelbindungsäquivalente geben die Summe, der im Molekül enthaltenen Doppelbindungen und Ringe an. Dabei werden Schwefel-Sauerstoffbindungen z.B. in sulfonierten Verbindungen nicht berücksichtigt. Für die aromatischen Ligninabbauprodukte müssen somit mindestens vier Doppelbindungsäquivalente vorliegen. Zudem kann von der Anzahl der Doppelbindungsäquivalente auf eine monomere (mindestens 4 DBA), dimere (mindestens 8 DBA) oder trimere (mindestens 12 DBA) Struktur geschlossen werden.
7. Über die entsprechend berechneten Doppelbindungsäquivalente (DBA) können Hinweise auf die Struktur der Substanzen erhalten werden. Zudem konnten durch MS/MS Experimente das Vorliegen von Sulfonsäuregruppen, die Anzahl an Methoxygruppen sowie eine  $\beta$ -O-4-Verknüpfung nachgewiesen werden. Für weitere strukturelle Informationen, z.B. über die Positionen von funktionellen Gruppen, werden verschiedene Möglichkeiten in Betracht gezogen. Aus diesen Informationen wurden anschließend Strukturvorschläge ermittelt.

Die tabellarische Darstellung ist exemplarisch für das Massenspektrum des isolierten Ligninsulfonats im Negativ-Modus gezeigt. Alle weiteren Auswertungen befinden sich im Anhang (Kapitel 8). Eine Aufstellung der gemessenen m/z-Verhältnisse, der berechneten Summenformeln, den Abweichungen sowie den Doppelbindungsäquivalenten ist in Tabelle 39 (Negativ-Modus) gezeigt. Die sulfonierten Substanzen werden in der Tabelle sowie in den späteren Strukturzuordnungen in ihrer Säureform (als  $[M-H]^-$ ) angegeben.

**Tabelle 39: Signale der isolierten Ligninsulfonate und ihre Zuordnung zu Summenformeln (Negativ-Modus)**

m/z	Spezies	Mögliche Summenformel	Abweichung [ppm]	DBA
151,0416 136,0181	$[M-H]^-$	$C_8H_8O_3$	-10,08	5
165,0571	$[M-H]^-$	$C_9H_{10}O_3$	-8,32	5
167,0361	$[M-H]^-$	$C_8H_8O_4$	-6,65	5
177,0575	$[M-H]^-$	$C_{10}H_{10}O_3$	-10,01	6
181,0523	$[M-H]^-$	$C_9H_{10}O_4$	-9,16	5



193,0532	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	-13,23	6
195,0683	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	-10,29	5
207,0683	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	-9,7	6
223,0632	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	-8,94	6
225,0790	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	-9,52	5
241,0204	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> S	-11,5	6
243,0360	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub> S	-11,2	5
245,0511	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sub>5</sub> S	-8,87	4
259,0311	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub> S	-11,22	5
273,0465	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> O <sub>6</sub> S	-9,73	5
275,0624	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> O <sub>6</sub> S	-10,57	4
289,0418	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> O <sub>7</sub> S	-10,53	5
307,0522	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub> S	-9,38	4
355,1224	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	-10,36	11
415,1437	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> O <sub>8</sub>	-9,27	11
417,1595	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub>	-9,59	10

Auffallend ist die auftretende  $m/z$ -Differenz von 2 Da (wie zum Beispiel bei 245 Da, 275 Da, 415 Da). Da bei Erhöhung des  $m/z$ -Verhältnisses die Doppelbindungsäquivalente abnehmen, kann es sich um eine Reduktion einer Doppelbindung oder um eine chinonartige Umlagerung des Analyten handeln (Abbildung 79).

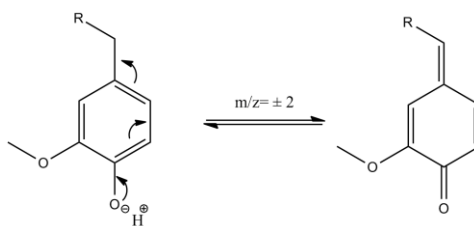
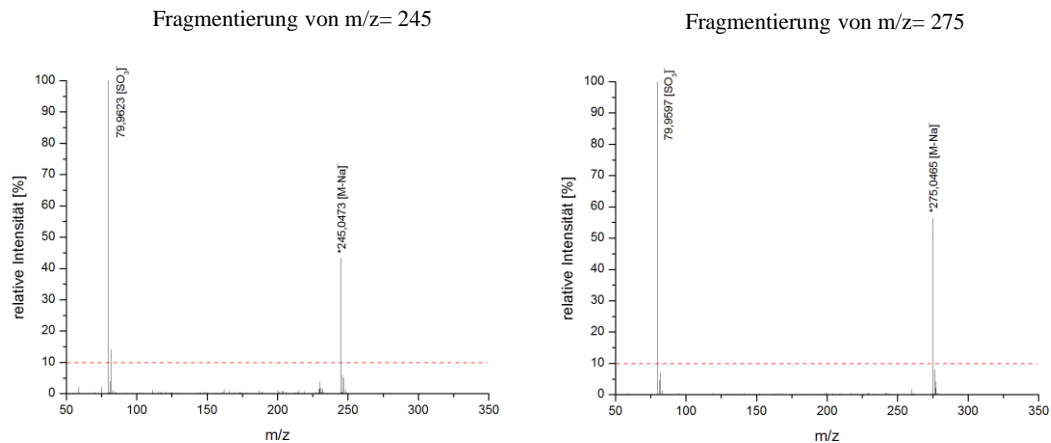


Abbildung 79: Chinon-Methid-Umlagerung an einer phenolischen Substanz [131]

Um die aus den Präzisionsmassen ermittelte mögliche Summenformel zu bestätigen und um Hinweise auf die entsprechende Struktur zu erhalten wurden MS/MS Experimente durchgeführt.

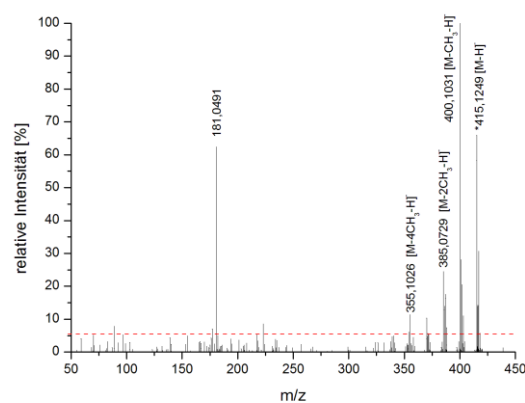
Durch MS/MS-Experimente der einzelnen Ionen können Rückschlüsse auf eine mögliche Struktur gezogen werden. So kann zum Beispiel gezeigt werden, dass es sich bei der, in der Realprobe detektierten Masse von 151,0416 Da um Vanillin handelt. Zudem konnten einige sulfonierte Verbindungen identifiziert werden, da bei der Methodenentwicklung mit

den Modellsubstanzen gezeigt werden konnte, dass sulfonierte Substanzen ausschließlich das  $[M-Na]^-$ -Ion und das  $[SO_3]^-$ -Fragment bilden. Dies ist auch bei den Substanzen mit einem  $m/z=245$  und  $m/z=275$  zu erkennen. Die MS/MS-Spektren bei einer Fragmentierung mit 15V sind in Abbildung 80 gezeigt.



**Abbildung 80: MS/MS-Spektren von  $m/z=245$  und  $m/z=275$  aus den isolierten Ligninsulfonaten (Negativ-Modus, 15V)**

Dagegen zeigt sich bei der Fragmentierung der Substanz mit einem  $m/z=417$  bzw. 415 (Negativ-Modus) ein anderes Fragmentierungsmuster (Abbildung 81). Daher kann die zu der Präzisionsmasse passende Summenformel  $C_{19}H_{30}O_5SO_3$  widerlegt werden. Die Summenformel  $C_{22}H_{26}O_8$  ist somit für diese Verbindung wahrscheinlicher.

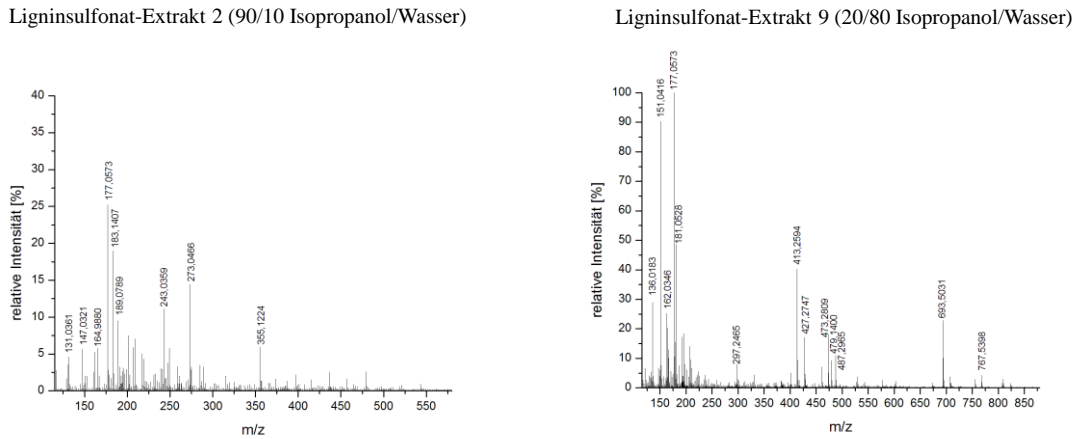


**Abbildung 81: MS/MS-Spektren von  $m/z=415$  aus den isolierten Ligninsulfonaten (Negativ-Modus, 20V)**

Um weitere Strukturen identifizieren zu können, wurden die in Kapitel 4.3.1.2 beschriebenen Soxhletextrakte zur weiteren massenspektrometrischen Analytik verwendet.

Analytik der fraktionierten Ligninsulfonate

Werden die Soxhlet-Fractionen der Ligninsulfonate (Kapitel 4.3.1.2) miteinander verglichen, sind einige Fraktionen besonders auffallend (Abbildung 82).



**Abbildung 82: Massenspektren (Negativ-Modus) der isolierten und fraktionierten Ligninsulfonate (Extrakt 2 (links) und Extrakt 9 (rechts))**

In den polaren Fraktionen (höherer Wasseranteil bei der Soxhlet-Extraktion) konnten höhermolekulare Substanzen detektiert werden. Die höchste detektierte Masse liegt bei  $m/z=809,5150$ . Diese Masse entspricht dem Massenbereich eines Oligomers.

In den folgenden Tabellen sind alle detektierten Massen mit mindestens 12 Doppelbindungsäquivalenten der Soxhlet-Fractionen der Ligninsulfonate dargestellt, denen eine Summenformel zugeordnet werden konnte. Dabei kann es sich um trimere Substanzen handeln, da diese mindestens 12 Doppelbindungsäquivalente enthalten.

Im Anhang ist eine vollständige Auswertung der Massenspektren aufgeführt, wobei die  $m/z$ -Verhältnisse, die bereits in der unfraktionierten Probe erfasst wurden, nicht erneut aufgeführt werden. Die Signale im Negativ-Modus sind in Tabelle 40 dargestellt.

Tabelle 41 zeigt die Signale im Positiv-Modus.

**Tabelle 40: Signale der Soxhlet-Fractionen der isolierten Ligninsulfonate und ihre Zuordnung zu Summenformeln (Negativ-Modus)**

m/z	Spezies	Mögliche Summenformel	Abweichung [ppm]	DBA
473,2819	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>35</sub> H <sub>38</sub> O	6,51	17
487,2965	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>36</sub> H <sub>40</sub> O	8,48	17
693,5031	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>51</sub> H <sub>66</sub> O	1,43	19
767,5398	[M-Na] <sup>-</sup>	C <sub>51</sub> H <sub>76</sub> SO <sub>3</sub>	5,78	14
	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>54</sub> H <sub>72</sub> O <sub>3</sub>	1,39	19

**Tabelle 41: Signale der Soxhlet-Fractionen der isolierten Ligninsulfonate und ihre Zuordnung zu Summenformeln (Positiv-Modus)**

m/z	Spezies	Mögliche Summenformel	Abweichung [ppm]	DBA
357,1272	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>16</sub> O	0,54	20
369,1276	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>28</sub> H <sub>16</sub> O	-0,57	21
371,1421		C <sub>28</sub> H <sub>18</sub> O	2,54	20
385,1562	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>20</sub> O	6,49	20
387,1369	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>28</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	2,74	20
399,1714	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>22</sub> O	7,39	20
401,1524	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	3,01	20
459,1938	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>32</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	3,65	20
481,1461	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub> S	1,47	19
521,1793	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>28</sub> O <sub>9</sub>	2,52	16
659,2122	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>36</sub> H <sub>34</sub> O <sub>12</sub>	0,16	20
676,2384	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>		0,69	
786,5713	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>50</sub> H <sub>72</sub> O <sub>6</sub>	-5,97	15

Aufgrund der Vielzahl der Summenformeln die DBA größer 12 besitzen, ist es sehr wahrscheinlich dass Trimere, Tetramere und Pentamere in den Soxhlet-Fractionen des Ligninsulfonats vorliegen.

In der Literatur wurden bisher ebenfalls Tri-, Tetra- und Pentamere postuliert. Jedoch konnten dort durch die massenspektrometrischen Methoden keine präzisen Massen

ermittelt werden. Zudem war das Grundrauschen der Massenspektren sehr hoch, so dass die Bestimmung einzelner Massen nicht gut möglich war (Abbildung 83).

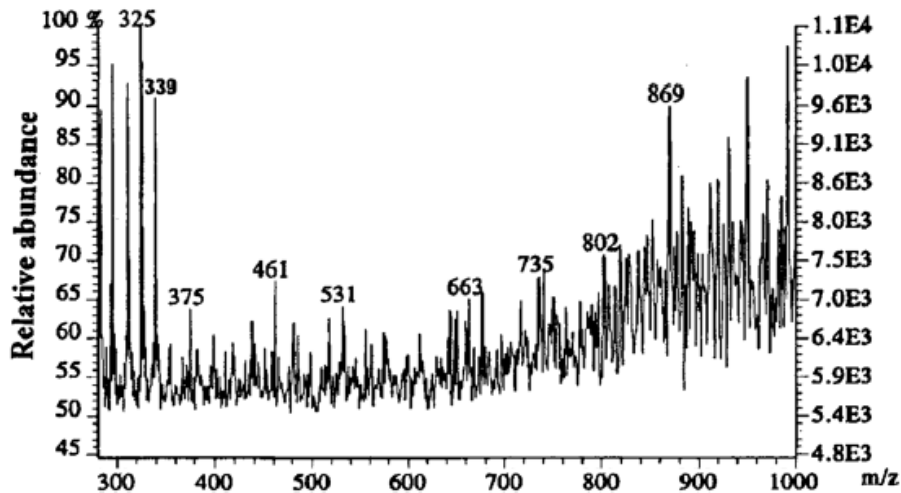


Abbildung 83: Negative mode ESI-MS spectrum of Black Lignin isolated from black liquor after 94.4% delignification of eucalypt wood, mit Genehmigung von P.C. Pinto et al. (2002). Copyright 2002 by Marcel Dekker, Inc. All rights reserved [135]

In dieser Arbeit konnte hingegen mittels einer geeigneten Probenvorbereitung und der entwickelten analytischen Methode Massenspektren erzeugt werden, aus denen eindeutige Präzisionsmassen zur Strukturaufklärung erhalten wurden.

So konnten für viele Signale Summenformeln mithilfe der Präzisionsmasse ermittelt werden. Über die entsprechend berechneten Doppelbindungsäquivalente (DBA) können Hinweise auf die Struktur der Substanzen erhalten werden. Zudem konnte durch MS/MS Experimente das Vorliegen von Sulfonsäuregruppen sowie die Anzahl an Methoxygruppen nachgewiesen werden. Aus diesen Informationen wurden anschließend Strukturvorschläge ermittelt. Die Substitution sowie die Position der Doppelbindungen können in der realen Struktur vom Strukturvorschlag abweichen. Mögliche Bildungswege für einige Substanzen sind in Kapitel 2.2 dargestellt. In Abbildung 84 sind die ermittelten Strukturen mit vier Doppelbindungsäquivalenten gezeigt. Dabei handelt es sich neben den Phenolverbindungen auch um Furfuralderivate. Die Phenolverbindungen stellen die monomeren Abbauprodukte des Lignins dar. Die Furfuralderivate stammen aus dem Abbau der im Holz enthaltenen Saccharide.

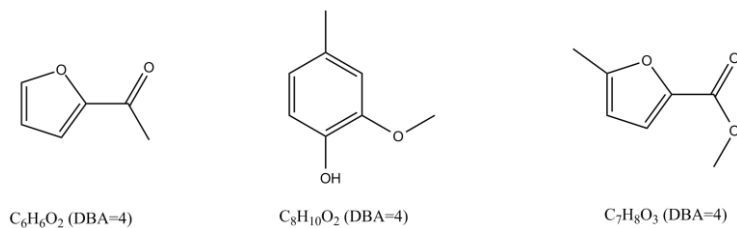
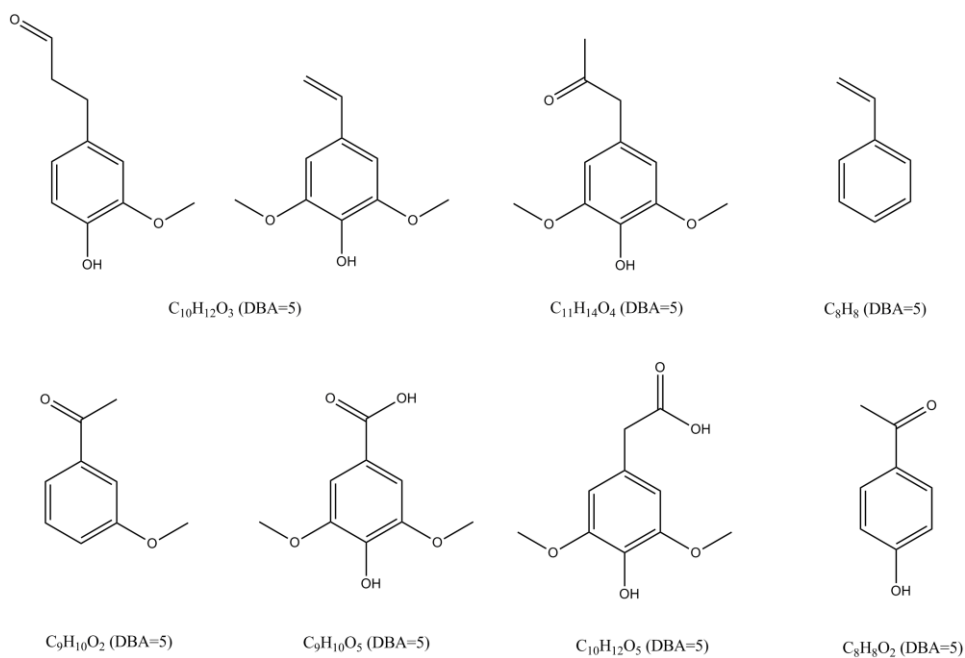


Abbildung 84: Strukturvorschläge für die Summenformeln mit vier Doppelbindungsäquivalenten

In Abbildung 85 sind weitere monomere Strukturen gezeigt. Dabei handelt es sich um Substanzen mit fünf bis sieben Doppelbindungsäquivalenten. Wie zu erkennen ist, liegt als Basisstruktur häufig die Phenoleinheit mit einer unterschiedlichen Anzahl an Methoxygruppen vor. In den Ligninsulfonaten kommen aufgrund der verwendeten Holzart meist eine oder zwei Methoxygruppen vor. Die funktionellen Gruppen am Phenolring variieren jedoch sehr stark. Dazu zählen Keto-, Aldehyd-, Säure-, Esterfunktionen sowie ungesättigte Alkylketten. Diese nicht-sulfonierten Strukturen werden bei dem Sulfitaufschluss zum Beispiel durch die saure Spaltung von Etherbindungen gebildet.



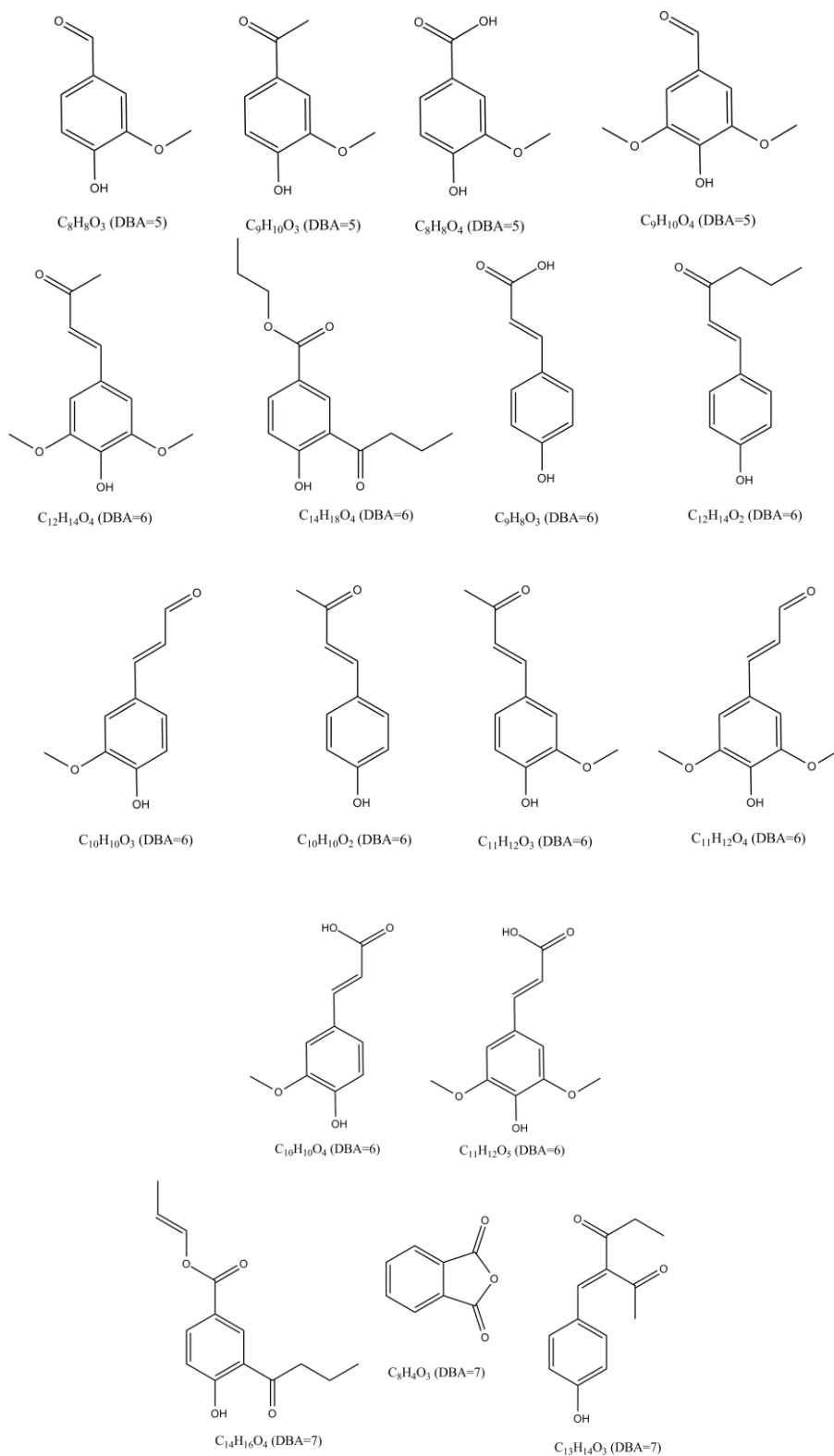
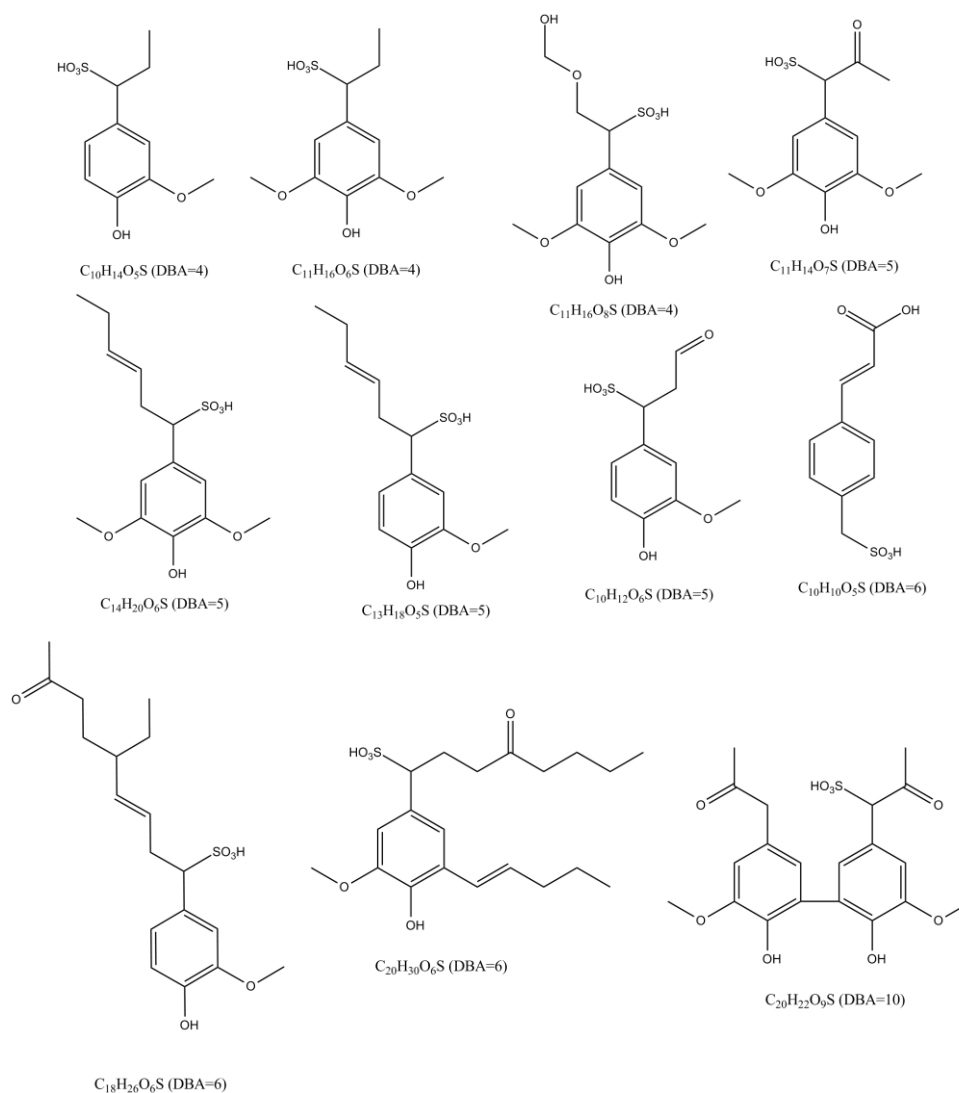


Abbildung 85: Strukturvorschläge für die Summenformeln mit fünf bis sieben Doppelbindungsäquivalenten

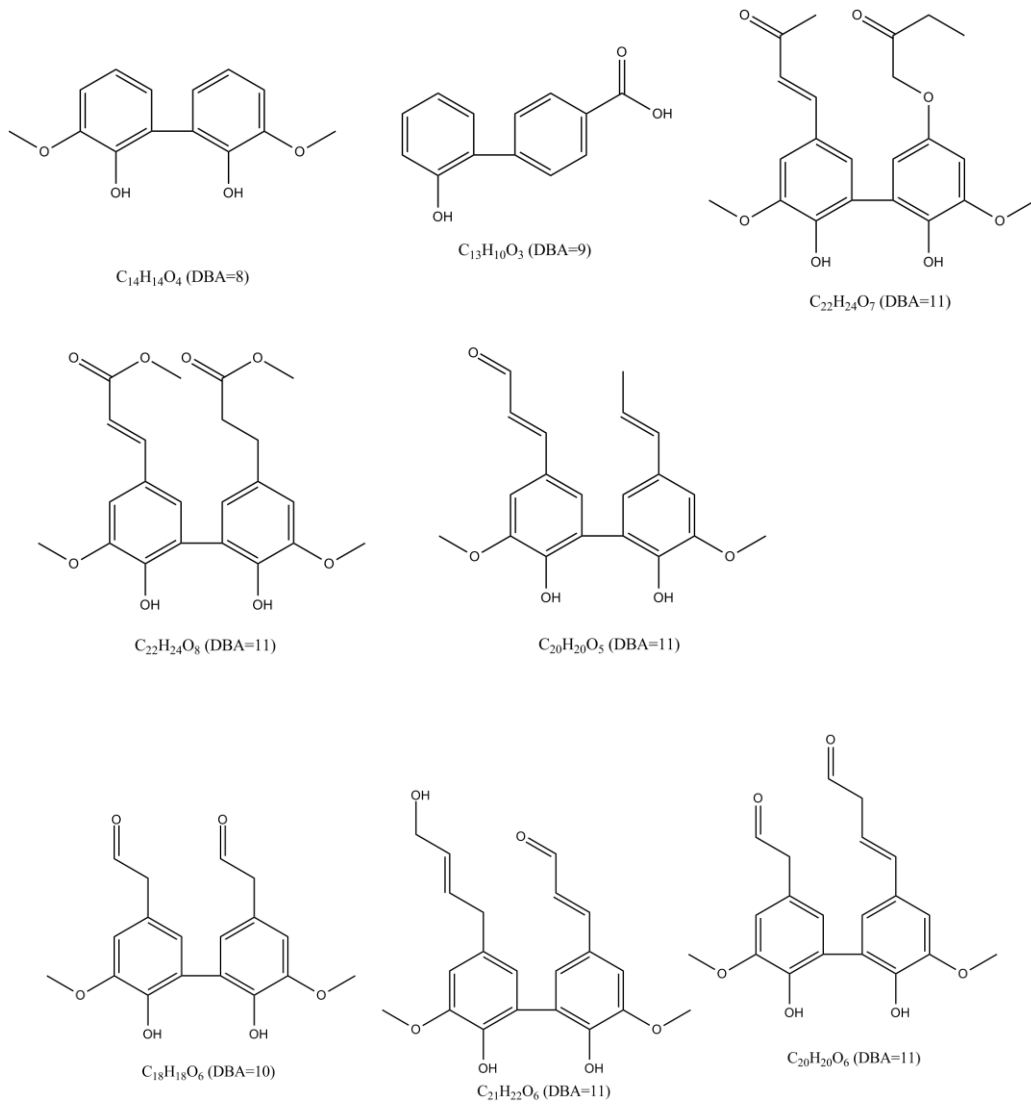
Neben den unsulfoierten Strukturen konnten ebenso über MS/MS Experimente sulfonierte Komponenten identifiziert werden (Abbildung 86). Dabei wurde neben den monomeren Verbindungen eine sulfonierte dimere Verbindung zugeordnet. Diese Substanzgruppe wird durch die Reaktion mit den aktiven Sulfid-Ionen gebildet (Abbildung 12 in Kapitel 2.2.1).



**Abbildung 86: Strukturvorschläge für die Summenformeln mit Sulfonsäuregruppe**

Die unsulfoierten Dimere sind in Abbildung 87 dargestellt. Bei diesen Strukturen treten ebenfalls unterschiedliche funktionelle Gruppen auf. Diese Substanzen können entweder durch den Abbau oligomerer Ligninabbauprodukte oder durch Kondensationsreaktionen von Monomeren gebildet werden.



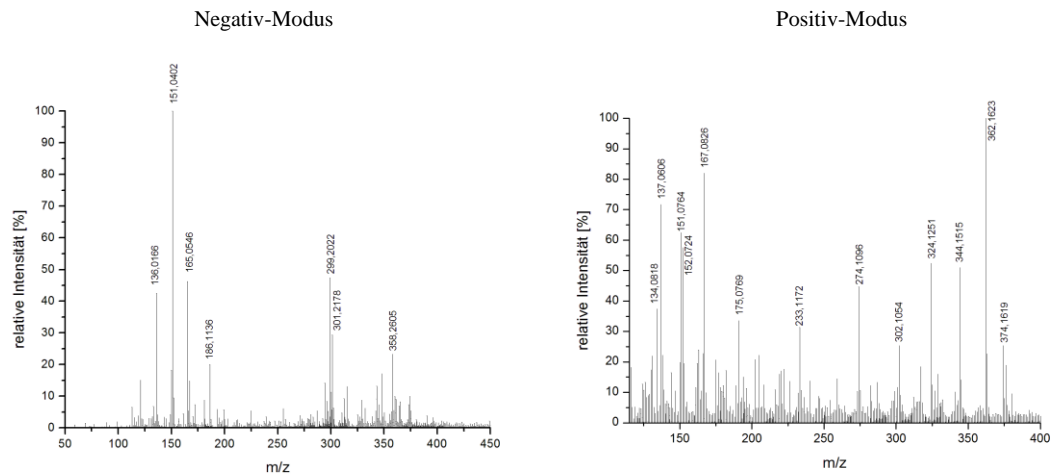


**Abbildung 87: Strukturvorschläge für die Summenformeln von dimeren Verbindungen**

In den isolierten Ligninsulfonaten liegen 35 monomere Ligninabbauprodukte vor, wovon 11 Strukturen sulfoniert sind. Die detektierten Dimere (8 Substanzen) zeigten in den MS/MS-Experimenten keinen Hinweis auf  $\beta$ -O-4'-Verknüpfungen.

#### 4.3.3.4 Analytik des Kraftlignins

In Abbildung 88 sind die Massenspektren des isolierten Kraftlignins (pH 2) aus der Sulfatablage im Negativ- und Positiv-Modus gezeigt. Der Ausschnitt gibt die Signale zwischen 50 und 450 Da wieder. In einem höheren Massenbereich waren keine Signale mit ausreichendem Signal-zu-Rauschen-Verhältnis zu erkennen.



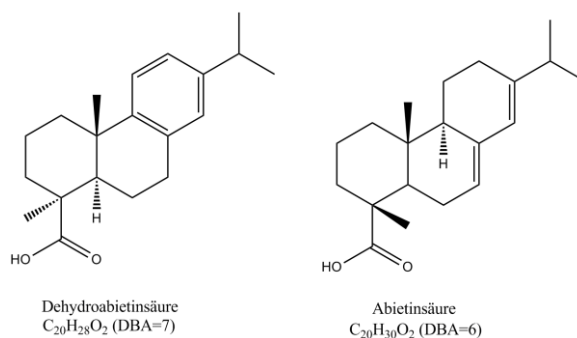
**Abbildung 88: Massenspektren (Negativ- und Positiv-Modus) des isolierten Kraftlignins (pH 2)**

Aus den Signalen geht hervor, dass im Kraftlignin wie auch in den Ligninsulfonaten ausschließlich niedermolekulare Ligninabbauprodukte vorliegen. Bei einer maximalen Masse von 362 Da kann es sich höchstens um ein Trimer handeln. Jedoch kann eine Fragmentierung von höhermolekularen Substanzen zu monomeren und dimeren Struktureinheiten erfolgen. Jedoch muss wie in Kapitel 4.3.3.2 beschrieben eine Ionensuppression von höhermolekularen Substanzen berücksichtigt werden.

Unter der Annahme, dass es sich bei den detektierten Substanzen um  $[M-H]^-$  bzw.  $[M+H]^+$  und  $[M+NH_4]^+$  Ionen handelt, konnte zu einigen Massen Summenformeln ermittelt werden. Eine Übersicht über die zugeordneten Signale ist im Anhang gezeigt.

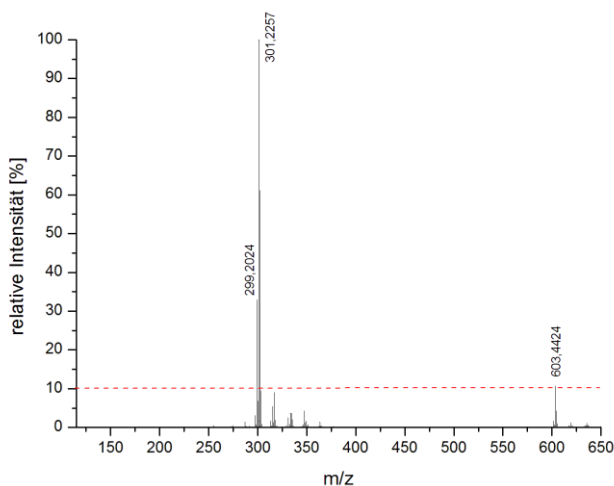
Auffallend ist, dass im Vergleich zu den Ligninsulfonaten im Positiv-Modus eine große Anzahl an Ammoniumaddukten gebildet wird. Diese können entstehen, weil Ammoniak als Lösungsmittel-Zusatz verwendet wird. Der Grund für die vermehrte Bildung der Ammoniumaddukte im Kraftlignin könnte in der unterschiedlichen Probenmatrix, wie zum Beispiel dem Salzgehalt, liegen. Möglich ist auch die Bildung von Natriumaddukten, da aufgrund der verwendeten Prozesschemikalien Natrium in der Probelösung vorliegt.

Die Summenformeln  $C_{20}H_{30}O_2$  ( $m/z=302,2246$ ) und  $C_{20}H_{28}O_2$  ( $m/z=300,2089$ ) entsprechen Harzsäuren. Harzsäuren sind ein großer Bestandteil in harzreichen Holzarten wie den, in diesem Verfahren verwendeten Nadelhölzern Fichte und Kiefer (Kapitel 2.2.2). Die am häufigsten vorkommenden Harzsäuren sind unter anderem die Abietinsäure und die Dehydroabietinsäure. Diese sind in Abbildung 89 dargestellt.



**Abbildung 89: Strukturen der Dehydroabietinsäure und der Abietinsäure**

Um den beiden im Massenspektrum detektierten  $[M-H]^-$ -Ionen diese Verbindungen zuordnen zu können, wurde Abietinsäure als Standard (10  $\mu\text{g/mL}$ ) gemessen. Das Massenspektrum (Negativ-Modus) ist in Abbildung 90 gezeigt.



**Abbildung 90: Massenspektrum (Negativ-Modus) der Abietinsäure**

Zu erkennen sind beide oben genannten  $m/z$ -Verhältnisse, sowie ein  $m/z$  von 603,4424. Ob eine Umlagerung der Abietinsäure zur Dehydroabietinsäure in der Ionenquelle stattfindet oder ob diese als Nebenprodukt im technischen Standard der Abietinsäure (75% Reinheit) vorliegt, kann nicht geklärt werden. Im isolierten Kraftlignin ist das Verhältnis der Dehydroabietinsäure zur Abietinsäure umgekehrt. Somit ist es wahrscheinlich, dass ein größerer Anteil der Dehydroabietinsäure vorliegt, sich jedoch auch in der Ionenquelle zusätzliche Dehydroabietinsäure bilden kann.

Die Dimerisierung der Abietinsäure in der Ionenquelle erklärt das Signal mit 603,4424 Da. Bei der Analyse des Kraftlignins ist dieses Signal nicht zu erkennen. Jedoch liegt es im technischen Standard nur mit einer relativen Intensität von ca. 10% vor. Somit würde es in

der Realprobe, wo die Abietinsäure mit einer relativen Intensität von 30% vorliegt, unterhalb der Asuwertungsgrenze liegen.

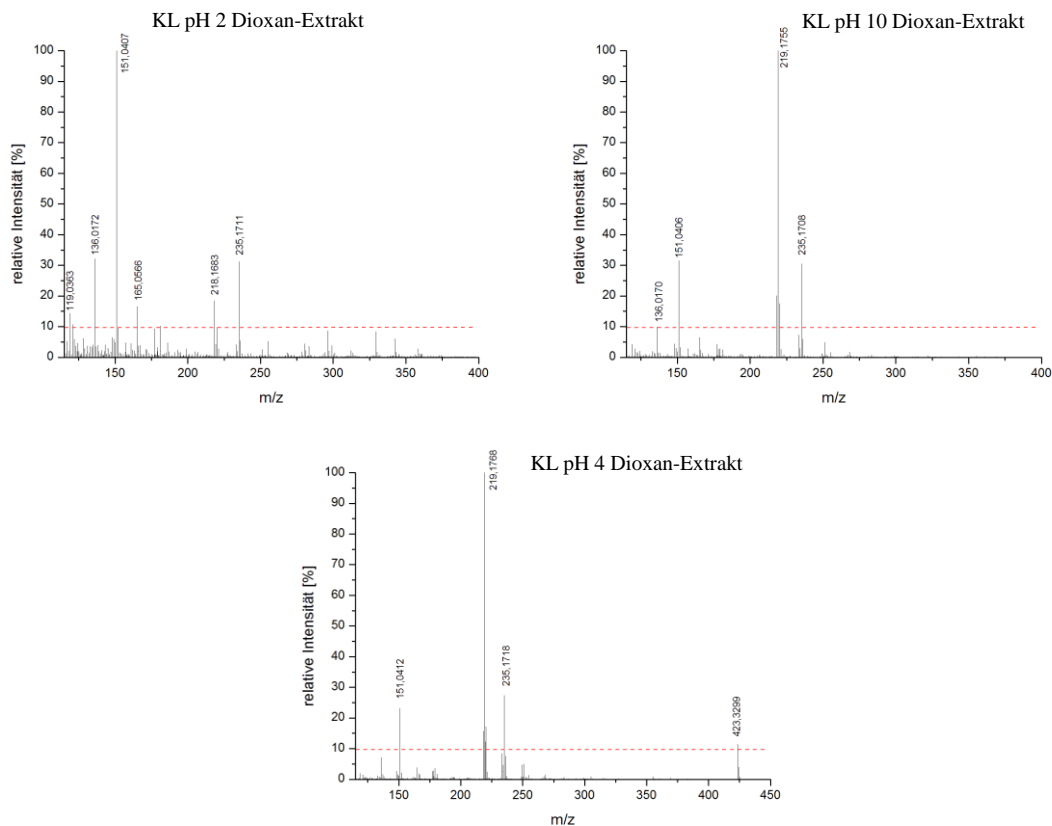
Um weitere Summenformeln ermitteln zu können, wurden die in Kapitel 4.3.1.3 beschriebenen Soxhletextrakte analysiert.

### Analytik des fraktionierten Kraftlignins

Im Anhang sind alle detektierten Massen und deren mögliche Summenformeln der Soxhlet-Fractionen vom Kraftlignin pH 2, pH 4 und pH 10 dargestellt. Dabei wurden die m/z-Verhältnisse, die bereits in der unfraktionierten Probe erfasst wurden nicht erneut aufgeführt.

Die Proben der Soxhlet-Extraktionen der fraktionierten Fällung (KL pH 10, KL pH 4 und KL pH 2) wurden mittels der entwickelten massenspektrometrischen Methode miteinander verglichen. Dabei konnten jedoch deutliche Unterschiede ausgemacht werden.

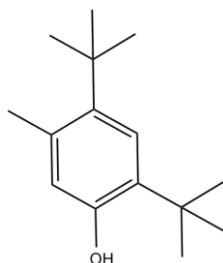
Dies ist beispielhaft an den 1,4-Dioxan-Extrakten der Fraktionen gezeigt (Abbildung 91).



**Abbildung 91: Massenspektren (Negativ-Modus) der 1,4-Dioxan-Fraktion von KL pH 2, KL pH 10 und KL pH 4**

Aus den gezeigten Massenspektren wird deutlich, dass eine Fraktionierung durch die Fällung sowie durch die Soxhlet-Extraktionen stattgefunden hat. Die Substanz mit dem  $m/z=219,18$  Da ist ausschließlich in den Dioxan-Extrakten von KL pH 10 und KL pH 4 zu finden. Daraus lässt sich schließen, dass es bei der vollständigen Fällung bis pH 2 (KL pH 2) zu einer Folgereaktion dieses Analyten kommt (zum Beispiel durch saure Hydrolyse) oder eine Ionensuppression vorliegt. In den fraktionierten Fällungen (pH 10 und pH 4) ist ein ähnliches Massenspektrum zu erkennen. Die Substanz mit 423,33 Da liegt jedoch ausschließlich in der Fällung bis pH 4 vor.

Die unbekannte Substanz ( $m/z=219,18$  Da) wurde ebenfalls bei den GCxGC-MS-Untersuchungen detektiert (Kapitel 4.3.1.2). Über die Ermittlung der Summenformel durch die APCI-MS-Analyse sowie der Interpretation des EI-Massenspektrums, konnte für diese Substanz ein Strukturvorschlag ermittelt werden (Abbildung 92).

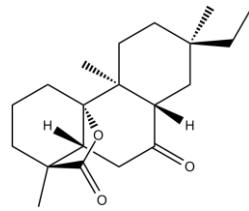


**Abbildung 92: Mögliche Struktur für die Substanz mit  $m/z=219$  Da (2,4-Di-tert-butyl-m-Cresol)**

In der Literatur wird diese Struktur in Pyrolyse-Produkten des Lignins gefunden [148]. Die Bildung dieser Substanz bei dem Zellstoffaufschluss ist jedoch als kritisch zu betrachten, da im Lignin keine tert-Butyl-Gruppen vorliegen. Ebenfalls auffällig ist die Substitution an der ortho- und meta-Position. Diese ist unüblich für Verbindungen, die aus nativem Lignin stammen.

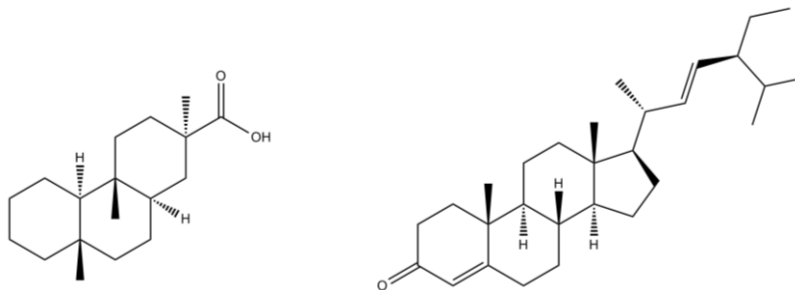
Zudem wurde im Dioxan-Extrakt von KL pH 4 eine Substanz mit einem  $m/z=423,3299$  erfasst, die in vorhergehenden Messungen noch nicht bestimmt werden konnte. Eine Tabelle mit den detektierten Substanzen aus den Soxhlet-Extrakten von KL pH 10 und KL pH 4 ist im Folgenden dargestellt (Tabelle 80 und Tabelle 81).

Weiterhin konnten Diterpenoide identifiziert werden ( $C_{20}H_{30}O_3$ ,  $C_{20}H_{28}O_3$  und  $C_{20}H_{26}O_3$ ). Dabei könnte es sich um Phenanthrendione handeln. Eine Beispielstruktur ist in Abbildung 93 dargestellt. Diese Substanzen liegen wie die Harzsäuren in dem Holz der Pflanzen vor [53,158].



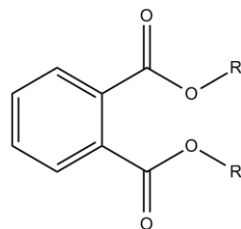
**Abbildung 93: Beispielstruktur für ein substituiertes Phenanthrenion**

Viele Substanzen mit relativ hohen  $m/z$ -Verhältnissen ( $m/z= 279, 391, 411, 413$ ), aber geringen Doppelbindungsäquivalenten können ähnlichen Verbindungsklassen, wie zum Beispiel auch den carboxylierten Phenanthrenverbindungen oder Steroidderivaten, angehören (Abbildung 94).



**Abbildung 94: Beispielstrukturen für ein carboxyliertes Phenanthren (links) und ein Steroidderivat (rechts)**

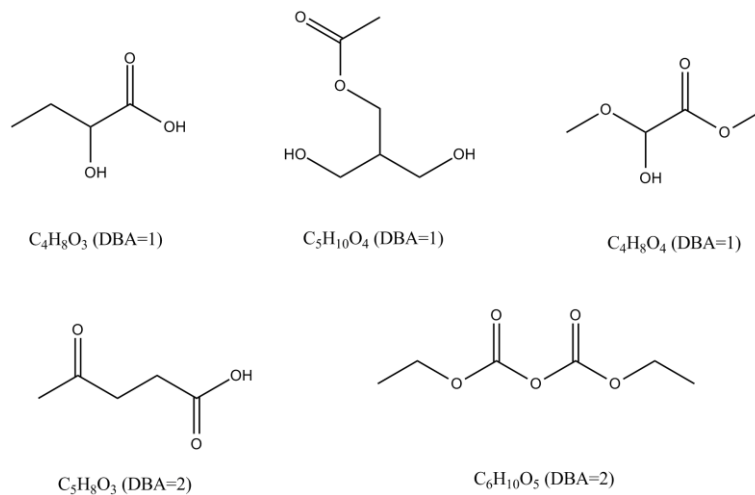
Zudem kann es sich bei der Substanz mit 391 Da um ein Phthalat handeln (Abbildung 95). Phthalate können als Oxidationsprodukt aus phenolischen Dicarbonsäuren stammen oder auch ubiquitär vorliegen.



**Abbildung 95: Phthalat-Grundstruktur**

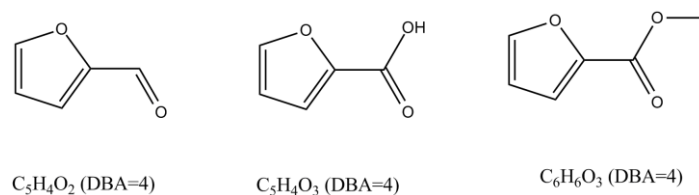
Die in Tabelle 81 gezeigte Substanz mit dem  $m/z$ -Verhältnis von 505,1787 Da mit drei Doppelbindungsäquivalenten könnten Kohlenhydraten, wie Raffinose, Isomaltotriose oder ähnlichen Strukturen entsprechen.

Aus den erhaltenen Daten werden im Folgenden weitere Strukturvorschläge ermittelt. Dabei wird davon ausgegangen, dass es sich hauptsächlich um Coniferyleinheiten handelt, da bei dem Kraftverfahren ausschließlich Nadelholz eingesetzt wird. Bei einigen Strukturen mit einem oder zwei Doppelbindungsäquivalenten handelt es sich um abgespaltene Reste aus den Ligninderivaten (Abbildung 96).



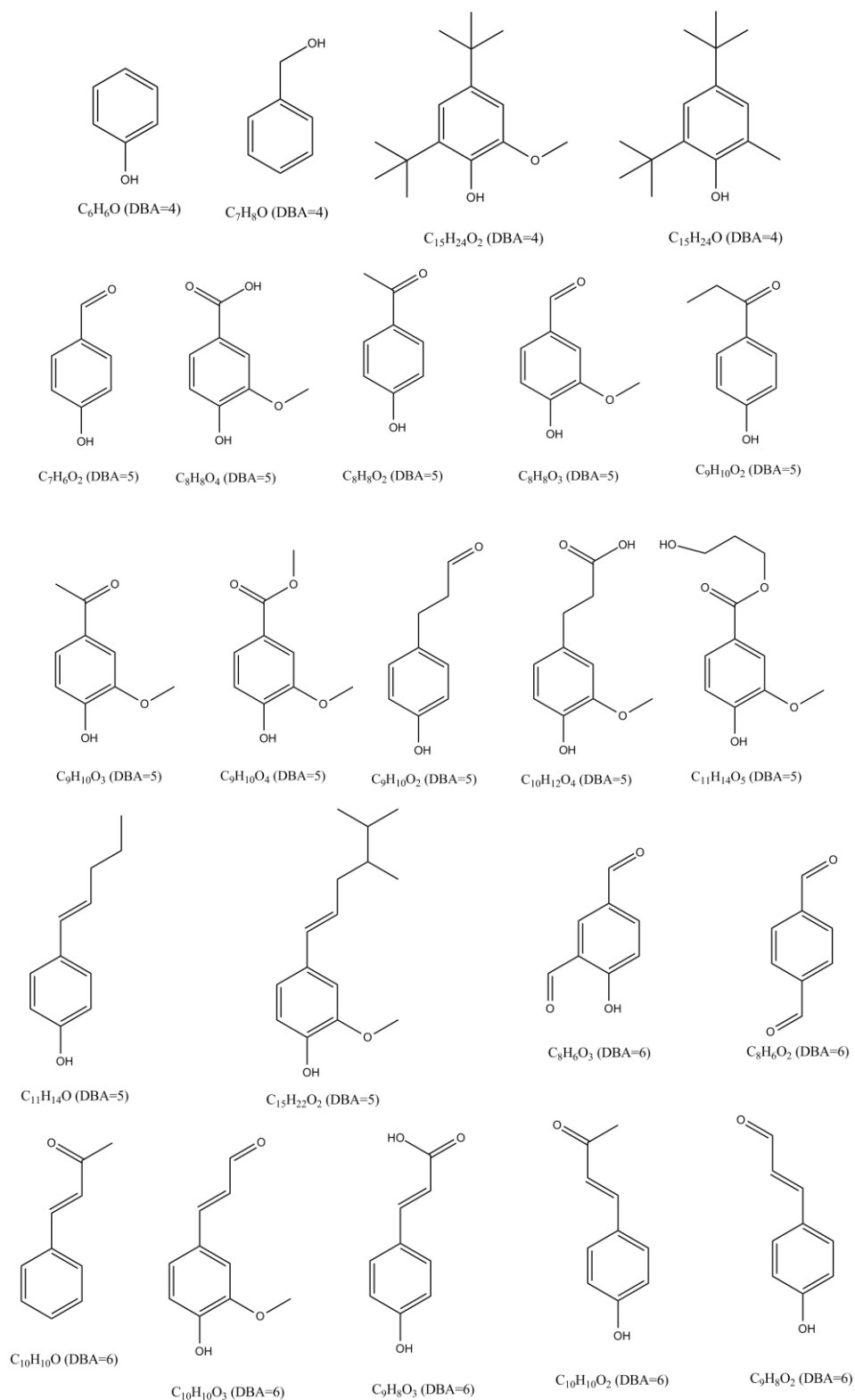
**Abbildung 96: Strukturvorschläge für die bestimmten Summenformeln mit ein bis zwei Doppelbindungsäquivalenten**

Zudem wurden einige Furanderivate detektiert (Abbildung 97). Diese können durch den Abbau von Polysacchariden aus dem Holz in die Ablauge gelangen. Bei der Sulfatablauge handelt es sich jedoch nur um geringe Mengen.

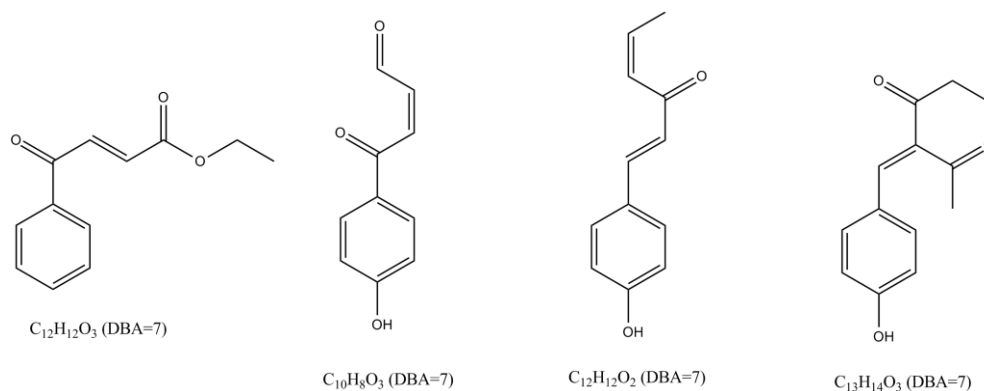


**Abbildung 97: Strukturvorschläge für Furanderivate (vier Doppelbindungsäquivalente)**

In der folgenden Abbildung sind Strukturvorschläge für mögliche Monomere in dem Kraftlignin gezeigt (Abbildung 98).

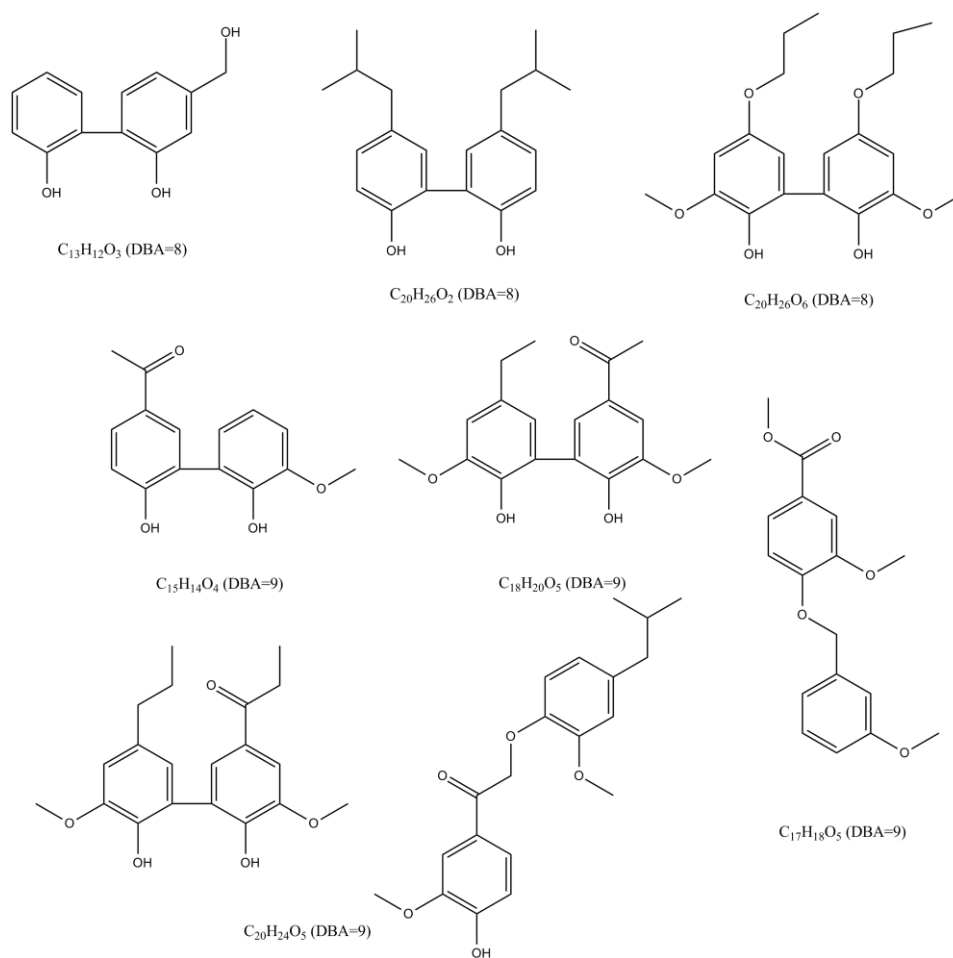






**Abbildung 98: Strukturvorschläge für Monomerverbindungen (fünf bis sieben Doppelbindungsäquivalente)**

Zudem konnten in dem Kraftlignin viele dimere und auch einige trimere Verbindungen erfasst werden. Die Strukturvorschläge sind in Abbildung 99 und Abbildung 100 gezeigt. Diese können, wie bereits bei der Sulfitablauge beschrieben, aus dem Abbau von Oligomeren oder durch Kondensationsreaktionen von Monomeren entstehen.



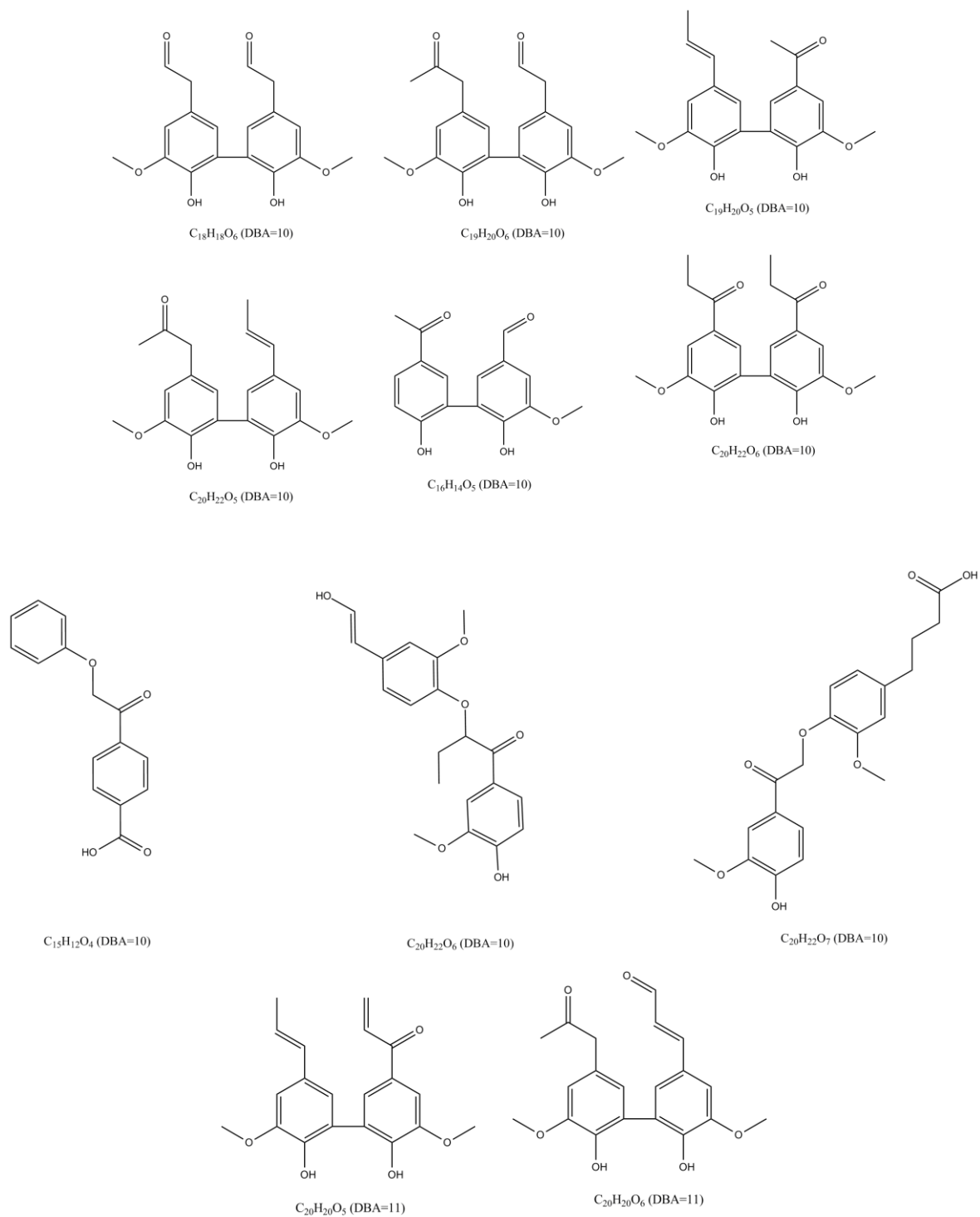
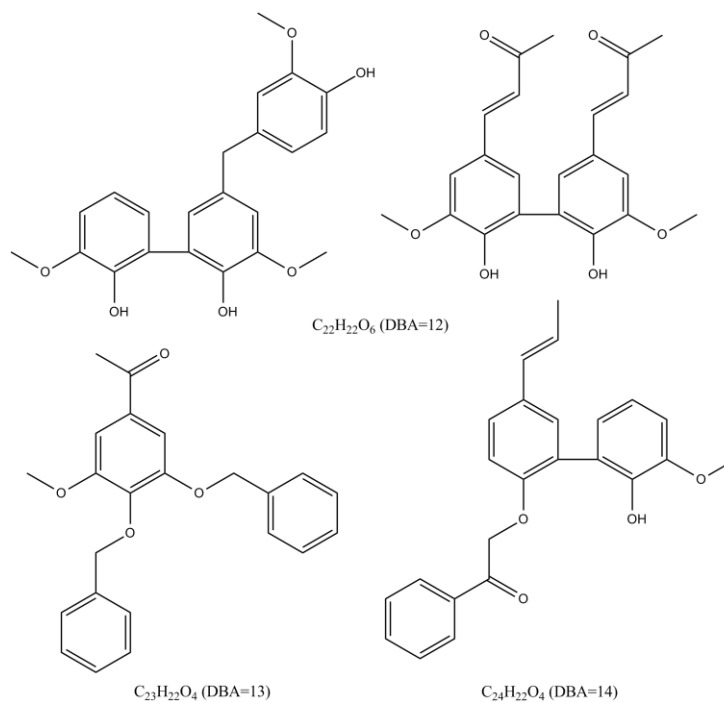
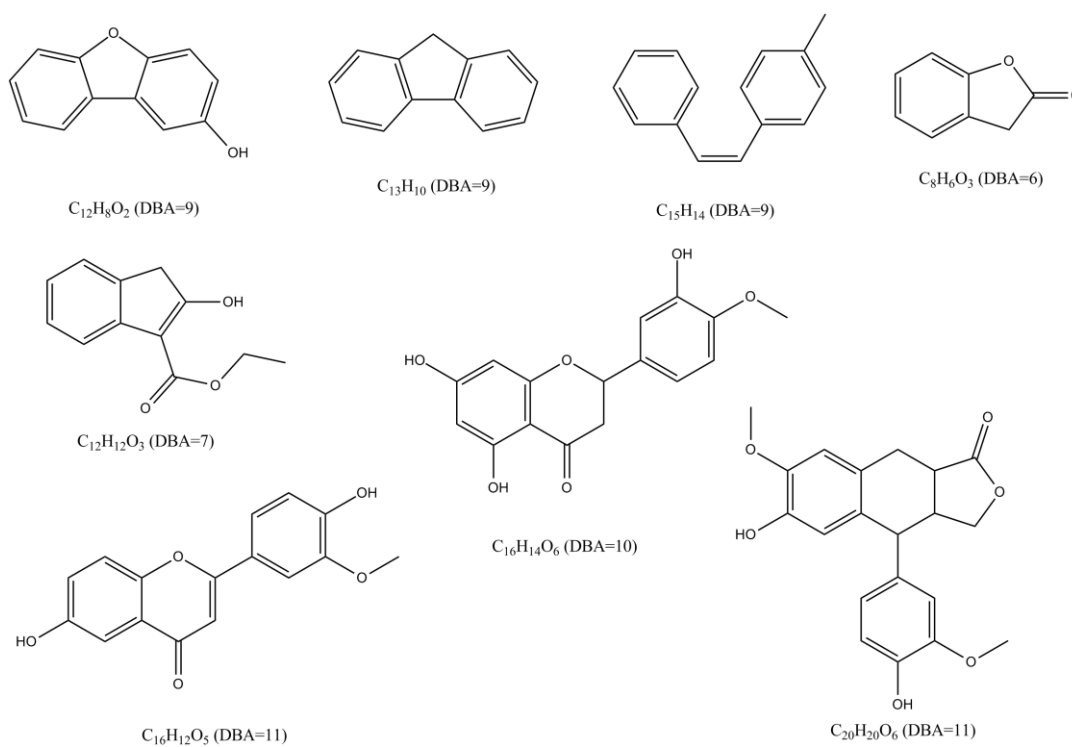


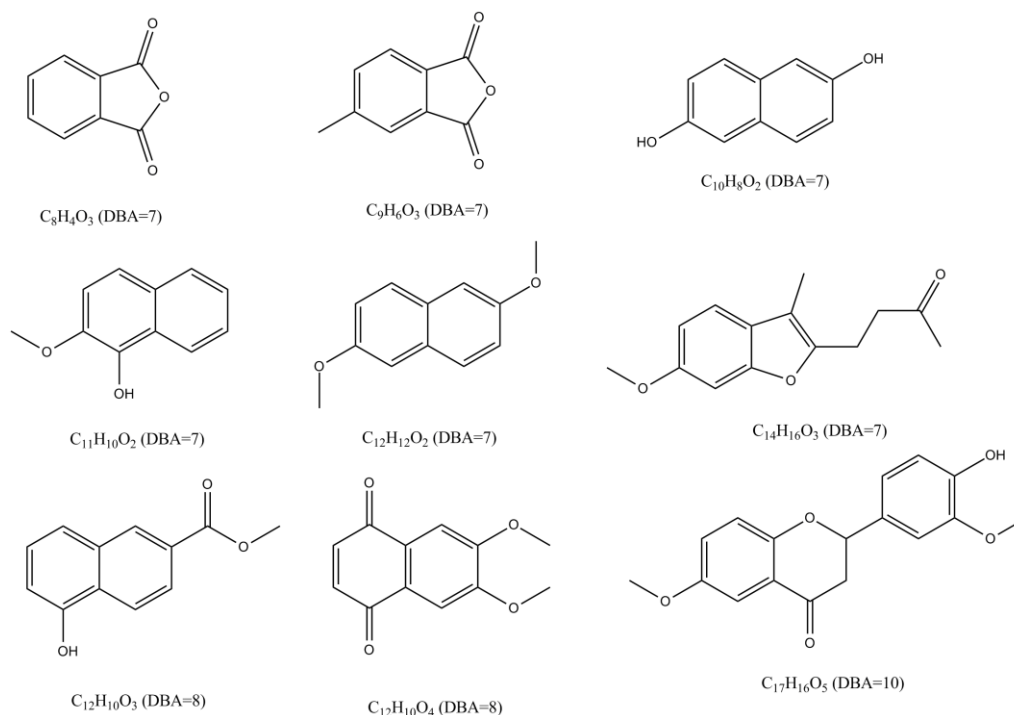
Abbildung 99: Strukturvorschläge für Dimere (acht bis elf Doppelbindungsäquivalente)



**Abbildung 100: Strukturvorschläge für Trimere (12 bis 14 Doppelbindungsäquivalente)**

Im Vergleich zu den Ligninsulfonaten konnten bei der Untersuchung des Kraftlignins viele kondensierte Aromaten bestimmt werden. Diese können sich durch Ringschlussreaktionen während des Sulfataufschlusses bilden. Strukturvorschläge sind in Abbildung 101 dargestellt.





**Abbildung 101: Strukturvorschläge für kondensierte Aromaten**

Die zum Teil derivatisierten Benzofurandione können bei dem Sulfataufschluss zum Beispiel aus den enthaltenen Phthalaten gebildet werden ( $m/z = 391$  Da, siehe Seite 104). Auffallend bei der Ermittlung der Strukturvorschläge ist die hohe Anzahl an Cumaryleinheiten vorliegt, welche keine Methoxygruppe enthalten. Da im Nadelholz jedoch nur <5% dieser Einheiten vorliegt, kommt es während des Sulfataufschlusses wahrscheinlich zu einer Abspaltung einiger Methoxygruppen. Dies erklärt zudem den hohen Gehalt an Dimethylsulfid in der Sulfatablauge.

Im folgenden Kapitel erfolgt eine Zusammenfassung der ermittelten Daten und ein Vergleich mit der Literatur.

#### 4.4 Wertung der analytischen Ergebnisse

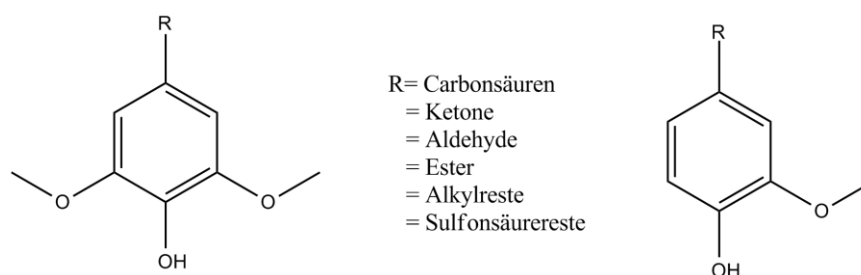
Zur stofflichen Nutzung der Ligninabbauprodukte existieren, wie bereits in Kapitel 3 beschrieben, generell mehrere Möglichkeiten.

Für die Nutzung einer einzelnen hochwertigen Substanz wäre neben der Qualifizierung und Quantifizierung der Substanz eine Isolierung des Stoffes notwendig, so dass es sich um einen höherpreisigen Wertstoff handeln müsste, damit diese Aufarbeitung lohnenswert wäre. Das in den Ablaugen in großen Mengen vorkommende Vanillin (ca. 1%) stellt mit einem Preis von ca. 11 €/kg einen teuren Rohstoff dar, jedoch herrscht ein

Angebotsüberschuss des Vanillins [159]. Zudem ist eine Isolierung des Vanillins aus den Ablaugen sehr kostenintensiv. Die Steigerung der Wertschöpfungskette könnte durch Derivatisierungen des Vanillins erreicht werden.

Bei der Qualifizierung der Ligninabbauprodukte ist zu erkennen, dass keine weiteren Substanzen in einer dominierenden Konzentration vorliegen. Vielmehr liegen viele Substanzen in geringen Konzentrationen (vermutlich  $\leq 1\%$ ) vor.

Die in den Ablaugen enthaltenen Ligninabbauprodukte stellen eine komplexe Fraktion aus verschiedensten Grundstrukturen und funktionellen Gruppen dar. Am Beispiel von monomeren Ligninabbauprodukten ist die Vielzahl der möglichen Strukturen dargestellt (Abbildung 102).



**Abbildung 102: Allgemeine Struktur der qualifizierten Ligninabbauprodukte**

Neben den auf Lignin basierenden Grundstrukturen konnten zudem weitere Verbindungsklassen identifiziert werden. Alle Verbindungsklassen für beide Realproben sind in Tabelle 42 dargestellt.

**Tabelle 42: Anzahl der identifizierten Verbindungsklassen in den Ligninsulfonaten und im Kraftlignin**

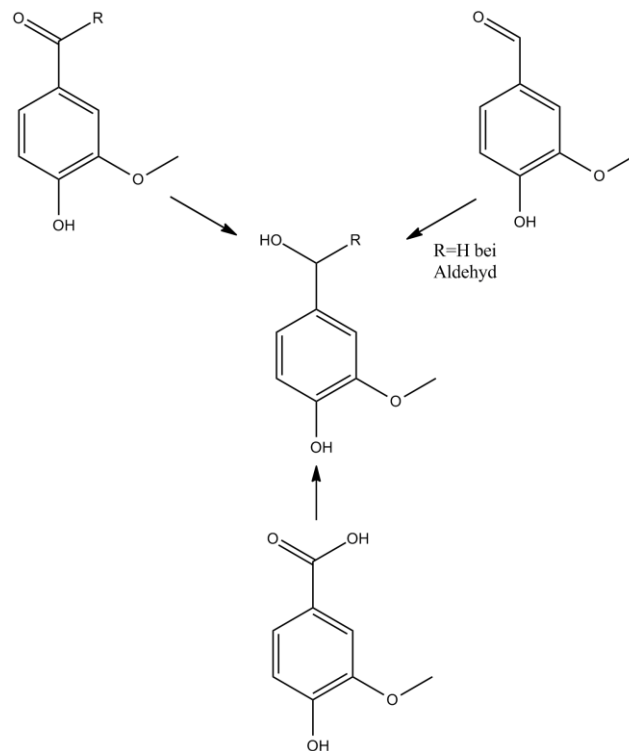
Verbindungsklassen	Ligninsulfonate	Kraftlignin
Aliphatische Verbindungen (Bruchstücke)	-	5
Furanverbindungen	2	3
Monomere Ligninabbauprodukte	25	27
Dimere Ligninabbauprodukte	8	21
Trimere Ligninabbauprodukte	-	3
Sulfonierte Ligninabbauprodukte	11	-
Kondensierte Aromaten	1	17

Die Übersicht über die identifizierten Verbindungsklassen (Tabelle 42) macht deutlich, dass es sich bei den detektierten Substanzen ausschließlich um niedermolekulare Verbindungen handelt. Zudem konnten Massen detektiert werden, die Trimeren, Tetrameren und Pentameren entsprechen. In der Literatur (Kapitel 2.3) wurden hingegen mittels massenspektrometrischer Methoden kaum hochmolekulare Ligninbruchstücke gefunden. Dies liegt jedoch nicht an den jeweiligen Massenbereichen der Messsysteme, sondern daran, dass hochmolekulare Ligninverbindungen, falls diese existieren, bisher nicht isoliert werden konnten [36]. In Kapitel 2.1 wurde bereits die Struktur des Lignins im Holz beschrieben. Der Ansatz zu einem polymeren, dreidimensionalen Lignin-Netzwerk wurde ausschließlich durch Strukturuntersuchungen nach dem Abbau von Lignin ermittelt. Neue Untersuchungen zeigen, wie bereits beschrieben, dass die Biosynthese des Lignins über andere Mechanismen verläuft als bisher angenommen [30,31]. Zudem liegen Ergebnisse vor, aus denen hervorgeht, dass es sich bei dem nativen Lignin ausschließlich um oligomere Substanzen handelt [35]. Bereits in früheren Publikationen wurde über die vernetzte polymere Struktur des Lignins diskutiert. Jedoch fehlten zu dieser Zeit geeignete Methoden zum Nachweis der oligomeren Struktur [35,160]. In der Veröffentlichung von Crestini *et al.* konnte durch P-NMR, QQ-HSQC sowie DFRC-P-NMR die Abwesenheit von Verzweigungen im Lignin gezeigt werden. Demnach handelt es sich bei der Struktur von Lignin nach neuen Erkenntnissen um ein lineares Oligomer [35].

Die Ergebnisse aus dieser Arbeit bestärken diesen Ansatz. Somit ist es wahrscheinlich, dass während des Holzaufschlusses in der Zellstoffindustrie hauptsächlich niedermolekulare Verbindungen entstehen, die in dieser Arbeit nachgewiesen wurden. Auffallend sind jedoch einige Strukturen, deren Substitution am phenolischen Ring nicht aus nativem Lignin stammt. Dazu gehören zum Beispiel kondensierte Aromaten und aromatische Verbindungen mit langen aliphatischen Substituenten. Diese Substanzen können ausschließlich aus Kondensationsreaktionen der entstandenen Abbauprodukte stammen.

Durch die Fraktionierung der Ligninabbauprodukte nach Löslichkeit konnten Fraktionen mit unterschiedlichen Eigenschaften erhalten werden. Die Fraktionen zeigen jedoch keine eindeutigen Unterschiede in Bezug auf ihre funktionellen Gruppen oder Strukturelemente. Da die Substanzen eine einheitliche Struktur aufweisen, erscheint eine Uniformierung sinnvoll.

Die Uniformierung der Ligninabbauprodukte kann zum größten Teil durch eine optimierte Prozesskontrolle erfolgen. Bisher wird bei der Zellstoffherstellung der Fokus auf der Qualität des Zellstoffs gelegt. Die Ligninabbauprodukte liegen somit nicht uniformiert vor. Diese Uniformierung müsste mit den gebildeten Ligninabbauprodukten zur stofflichen Nutzung zunächst erfolgen, um sie dann in verschiedenster Weise einsetzen zu können. Auch eventuell vorliegende größere Struktureinheiten mit einer großen Variation an funktionellen Gruppen müssten für eine stoffliche Nutzung ebenfalls uniformiert werden. Im Folgenden sind verschiedene literaturbekannte Reaktionswege zur Uniformierung der Abbauprodukte aufgeführt. Dabei kann es sich um chemische, enzymatische und katalytische Verfahren handeln [161]. Zur chemischen Uniformierung des Lignins untersuchen verschiedene Forschungsgruppen unterschiedliche Reaktionen, wie zum Beispiel die oxidative, pyrolytische, hydrogenolytische und die hydrolytische Reaktion [41,90,161–165]. Dabei werden die möglicherweise noch vorliegenden höhermolekularen Substanzen abgebaut und die monomeren Einheiten können durch eine Hydrierung uniformiert werden (Abbildung 103).



**Abbildung 103: Uniformierung von Ligninabbauprodukten mittels Hydrierung**

Ebenfalls eine Methode zur Degradation und zur Uniformierung von Ligninabbauprodukten ist der enzymatische Umsatz, der über verschiedene Organismen

erfolgen kann. Besondere Aufmerksamkeit gilt dabei den Weißfäulepilzen [26,161,166,167].

Durch die Uniformierung könnten aus den Ligninabbauprodukten einheitliche aromatische Verbindungen synthetisiert werden, die dann in den Prozess der Petrochemie bzw. der Aromatenherstellung eingebunden werden können. Vor dieser Uniformierung kann in der Sulfitablaue eine Verarbeitung der Zucker (Kapitel 4.1.1) erfolgen. Im Anschluss an die Abtrennung der gewonnenen Wertstoffe, wie z.B. Ethanol, können die Ligninabbauprodukte uniformiert werden.

Die in den Ablagen vorliegenden monomeren und dimeren Verbindungen ähneln den Produkten der Petrochemie stark und haben somit ein großes Potential als mögliche Ersatzstoffe eingesetzt werden zu können [168].

Derzeit werden rund 100.000 verschiedene chemische Substanzen vermarktet, wobei jedoch nahezu alle diese Substanzen aus den folgenden acht Basischemikalien synthetisiert werden. Dabei handelt es sich um Benzol, Xylol, Toluol, Butan, Ethan/Ethylen, Chlor, Synthesegas und Schwefelsäure. Diese werden zu Zwischenprodukten und schließlich zu diversen Endprodukten umgesetzt [168,169]. Die zur jetzigen Zeit bedeutsamsten Industriezweige der Endprodukte der Petrochemie sind in Tabelle 43 dargestellt.

**Tabelle 43: Nutzungsmöglichkeiten der Endprodukte aus der petrochemischen Industrie [170]**

<b>Ausgangssubstanz</b>	<b>Industriezweige</b>
Ethylen	Unterhaltungselektronik, Glasfaserverstärkte Kunststoffe, Automobilbereich, Lebensmittelverpackung, medizinische Ausrüstung, Reinigungsmittel, Agrochemikalien, Kühlflüssigkeit, Schuhe, Reifen, Papier, Beschichtungen, Klebstoffe, Farben, Pharmazeutika, chemische Synthesebausteine, elektrische und elektronische Anwendungen
Propylen	Sportausstattung, Automobilbereich, Windeln, Lebensmittelverpackung, Möbelindustrie, Bauwirtschaft, elektrische und elektronische Anwendungen, Textilindustrie, Glasindustrie, Lebensmittelindustrie, Pharmazeutika, Kosmetika, Kühlflüssigkeit, Schiffsindustrie, Farben, Lacke, Beschichtungen, Klebstoffe
Buten	Motorenschmierstoff, Automobilbereich, Kraftstoff, Reinigungsmittel, Agrochemikalien, Gartengeräte
Benzol	Lebensmittelverpackungen, Automobilbereich, elektrische und elektronische Anwendungen, CDs, Pharmazeutika, Möbelindustrie, Sportgeräte, Reinigungsmittel
Toluol	Beschichtungen, Farben, Klebstoffe, chemische Verarbeitung, Sportgeräte
Xylol	Textilindustrie, Bauindustrie



Alle Verbindungen sind Synthesebausteine für eine Vielzahl an Produkten mit einer großen Vielfalt an Anwendungsmöglichkeiten. Fast alle diese Ausgangssubstanzen bzw. Folgeprodukte könnten ebenfalls aus den Ligninabbauprodukten der Zellstoffindustrie gebildet werden.

Die in Kapitel 1 genannte Problematik macht deutlich, dass nach Ersatzstoffen in der Petrochemie gesucht wird. Da Aromaten zu den wichtigsten Rohstoffen in der Kunststoff-, Synthesekautschuk- und Synthesefaserproduktion gehören, ist der Bedarf für Aromaten überdurchschnittlich hoch.

Die nach der Uniformierung erhaltenen Produkte könnten neben der Aromatenproduktion auch als Vergaserkraftstoff eingesetzt werden. Eine weitere Anwendung könnte die Nutzung als Polymer Building Block für Beschichtungen in der Lackindustrie sein [168]. Für eine solche Anwendung müssen die Ligninabbauprodukte nicht zwingend uniformiert sein, sondern nur standardisiert. Da der Holzaufschluss in der Zellstoffindustrie jedoch nur in Richtung der Qualität des Zellstoffs optimiert wird, müsste diese Standardisierung bei der Ablaugenaufbereitung stattfinden.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden zwei repräsentative ligninhaltige Ablaugen aus den beiden vorherrschenden Prozessen in der Zellstoffindustrie untersucht. Zunächst wurden Summenparameter (Ligningehalt, Zuckergehalt) sowie anorganische Bestandteile analysiert. Da in der Sulfatablauge neben den Ligninabbauprodukten große Mengen Anorganik nachgewiesen werden konnten und in der Sulfitablauge ein hoher Anteil an Zuckern enthalten ist, wurden die Ligninabbauprodukte mit Hilfe literaturbekannter Methoden isoliert.

Zur Entwicklung analytischer Methoden wurden Modellsubstanzen verwendet, die den Ligninabbauprodukten strukturell ähnlich sind. Neben käuflich erwerblichen Monomeren wurden Dimere, Trimere und Tetramere mit typischen Verknüpfungsarten synthetisiert, um auch die Anwendung auf höhermolekulare Verbindungen untersuchen zu können.

Zuerst wurden die Modellsubstanzen zur Entwicklung einer gaschromatographischen Methode verwendet. Aufgrund der in der Literatur mehrfach beschriebenen hohen Komplexität der Proben wurde ein comprehensives GCxGC-(ToF)-MS eingesetzt.

Bei der Entwicklung dieser gaschromatographischen Methode mit den Modellsubstanzen konnten Monomere und Dimere mit einer sehr guten massenspektrometrischen Auflösung bestimmt werden. Höhermolekulare Modellsubstanzen, wie das Trimer und Tetramer, konnten trotz Derivatisierung aufgrund der geringen Flüchtigkeit nicht nachgewiesen werden.

Diese, für die Monomere und Dimere entwickelte Methode wurde anschließend auf die Realproben angewendet. Dabei zeigte sich, dass trotz zweidimensionaler Trennung eine starke Überlagerung der Signale zu erkennen war. Um die Matrix der komplexen Realproben zu reduzieren, konnten die Ligninabbauprodukte mittels sukzessiver Soxhlet-Extraktion fraktioniert werden. Nach der Analyse der fraktionierten Ligninabbauprodukte konnten einige Substanzen, wie z.B. verschiedene Monomere qualifiziert werden.

Damit neben den, mit der GC detektierten Monomeren, auch höhermolekulare Substanzen untersucht werden können, wurde anschließend eine flüssigchromatographische Trennmethode mit Hilfe von Modellsubstanzen entwickelt. Die Übertragung auf Realproben stellte sich problematisch dar. Während eine Detektion mit einem DAD eine Trennung der Substanzen zeigte, konnten mit einer massenspektrometrischen Detektion nach flüssigchromatographischer Trennung keine Signale detektiert werden.

Mittels Direktinjektion und somit einer kontinuierlichen Injektion der Probe ohne die Verwendung einer Chromatographie kann eine höhere Konzentration der Substanzen aufgegeben werden.

Aus diesem Grund wurde eine massenspektrometrische Analysenmethode über eine Direktinjektion mittels Modellsubstanzen entwickelt und auf die Realproben übertragen. Dabei konnte eine Vielzahl von Signalen detektiert werden. Mithilfe des hochauflösenden Massenspektrometers konnten aus den detektierten Präzisionsmassen Summenformeln bestimmt werden. Die daraus berechneten Doppelbindungsäquivalente konnten Hinweise auf die Struktur der Verbindungen geben. Diese konnten mittels MS/MS-Experimenten verifiziert werden. Dabei ließen sich Aussagen über die Anzahl der Methoxygruppen und die Anwesenheit von  $\beta$ -O-4'-Bindungen und Sulfonsäuregruppen treffen. Mit dieser Methodik konnten in dieser Arbeit eine Reihe von Strukturvorschlägen für die Ligninabbauprodukte ermittelt werden.

In den isolierten Ligninsulfonaten konnten für 35 monomere Ligninabbauprodukte Strukturvorschläge ermittelt werden, wovon 11 Strukturen sulfoniert sind. Die detektierten Dimere (8 Substanzen) sind nicht über  $\beta$ -O-4'-Bindungen verknüpft, was aufgrund der Aufschlussbedingungen zu erwarten war. Zudem konnten nicht-sulfonierte Trimere, Tetramere und Pentamere nachgewiesen werden.

In dem isolierten Kraftlignin konnten neben 27 Monomeren auch 21 Dimere nachgewiesen werden. Zudem konnten auch in dieser Ablauge höhermolekulare Substanzen mit Massen bis zu 680 Da bestimmt werden. Mit Hilfe von MS/MS Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass diese nicht  $\beta$ -O-4' verknüpft sind.

Die meisten der identifizierten Monomere und Dimere wurden bereits in der Literatur mittels massenspektrometrische Methoden nachgewiesen oder postuliert, während die exakten Massen für höhermolekulare Verbindungen wie Trimere, Tetramere und Pentamere in dieser Arbeit erstmals nachgewiesen wurden.

Auffallend sind einige Strukturen, wie zum Beispiel kondensierte Aromaten und aromatische Verbindungen mit langen aliphatischen Substituenten. Laut Literatur wurden diese Substanzen nicht im Holz beziehungsweise nativem Lignin nachgewiesen, so dass anzunehmen ist, dass diese während des Aufschlusses gebildet werden. Die Strukturen können zum Beispiel durch Kondensationsreaktionen der gebildeten Ligninabbauprodukte sowie Reaktionen mit anderen Holzbestandteilen entstanden sein.

Bei den durchgeführten Analysen war keine Substanz in dominanten Mengen vorhanden, so dass eine Isolierung einzelner Substanzen nicht lohnenswert ist. Da jedoch alle identifizierten Substanzen eine einheitliche Basisstruktur aufweisen, erscheint die Verwertbarkeit der Ligninabbauprodukte mittels einer Uniformierung sinnvoll. Diese könnten z.B. durch eine Hydrierung uniformiert und anschließend in hochwertige Chemikalien und Kraftstoffe auf Basis nachwachsender Rohstoffe umgesetzt werden

---

## 6 Ausblick

Die identifizierten Kondensationsprodukte bilden sich, wie in der Literatur beschrieben, in der letzten Phase des Aufschlussprozesses. In dieser Phase ist ca. 90% des Lignins bereits abgebaut. Um die Ausbeute des Zellstoffs zu erhöhen, wird jedoch diese terminale Prozessphase durchgeführt, in der es zu Kondensationsreaktionen der gebildeten Ligninabbauprodukte und somit zu einer solch großen Vielfalt an Substanzen kommt. Um die Bildung der Kondensationsprodukte zu vermeiden, könnte untersucht werden, ob ein vorzeitiges Beenden des Prozesses zu einer veränderten Zusammensetzung der Ligninabbauprodukte führt. Würde der Prozess zu einem früheren, definierten Zeitpunkt abgeschlossen werden, könnte die Uniformierung der Ligninabbauprodukte erleichtert werden.

Zudem wird bei der Zellstoffherstellung bisher das des Prozess durch die Farbe des Zellstoffs festgelegt (Kappa-Zahl). Um eine optimierte Zusammensetzung der nicht-kondensierten Ligninabbauprodukte bei guter Zellstoffqualität zu erhalten, muss zukünftig in der Zellstoffindustrie bzw. in Technikumsversuchen der Prozess beobachtet, optimiert und verstanden werden. Die dafür notwendigen modernen analytischen Methoden konnten in dieser Arbeit entwickelt werden. Bei der Optimierung des Prozesses könnte auch die Kaskadennutzung ein interessanter, sinnvoller Ansatz sein, bei der die Ablauge zu einem bestimmten Zeitpunkt aus dem Reaktor abgelassen und das Holz/Zellstoff-Gemisch mit der neuen Prozesslauge versetzt wird.

Anschließende Analysen der Ablaugen aus der Kaskadennutzung können zeigen, ob dieses Verfahren zur Vermeidung von Kondensationsreaktionen beiträgt und somit die Vielzahl an Reaktionsprodukten vermindert werden kann. Durch die Verringerung der Komplexität der Ligninabbauprodukte, könnte die Uniformierung dieser stark vereinfacht werden.

## 7 Experimenteller Teil

### 7.1 Allgemeine Charakterisierung der Ablaugen

#### Trockenmasse

Zur Bestimmung der Trockenmasse wurden 1 g der Ablauge bei 90°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

#### Bestimmung des Ligningehaltes

Die Bestimmung des Ligninanteils erfolgte photometrisch bei 280 nm. Die Ablaugen wurden mit 1M HCl (Sulfitablauge) bzw. 1M NaOH (Sulfatablauge) verdünnt. Die jeweiligen isolierten Ligninabbauprodukte aus den Ablaugen dienten zur Kalibrierung (Kapitel 7.4.1). Der Messbereich für die Ligninsulfonate lag dabei zwischen 25 und 70 µg/mL. Die Kalibrierung mit dem Kraftlignin wurde zwischen 10 und 40 µg/mL durchgeführt.

#### Kohlenhydratbestimmung [171]

Die in den Ablaugen enthaltenen Kohlenhydrate wurden photometrisch bestimmt (Thermo Spectronic Helios  $\gamma$ ). Dazu wurden 0,5 mL der Probe mit 1 mL Anthron-Lösung versetzt. Anschließend wurde diese Lösung bei 95°C 15 Minuten erhitzt. Die Kalibrierung erfolgte mit D-(+)-Glucose Monohydrat im Bereich von 4 - 41 µg/mL. Die photometrische Messung wurde bei 620 nm durchgeführt. Die verwendete Anthronlösung enthielt 0,2% Anthron in Schwefelsäure.

#### Kationenbestimmung mittels ICP-OES

Zur Bestimmung der Kationen wurde eine Kalibrierreihe mit einem Multielementstandard (1 g/l) hergestellt. Aus einer Stammlösung mit 6 mg/l wurden Kalibrierlösungen im Bereich von 0 bis 1200 µg/l hergestellt, die mit jeweils 2 ml konzentrierter Salpetersäure (bei 50 mL Kolben) versetzt wurden. Zur Messung der Ablaugen wurden diese getrocknet und eine wässrige Lösung mit einer Konzentration von 10 g/L hergestellt. Diese wurde anschließend verdünnt (1:100, 1:1000, 1:5000) und mit HNO<sub>3</sub> entsprechend der Kalibrierlösungen angesäuert. Die verwendeten Parameter zur Bestimmung der Kationen mittels ICP-OES sind in Tabelle 44 dargestellt.

Tabelle 44: Kationenbestimmung mittels ICP-OES

Komponente	Daten
System	Varian 720-ES Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Software	ICP Expert II, Version 1.1.2 Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Plasmaleistung	1,2 kW
Plasmagas	16,5 L/min
Hilfsgas	1,5 L/min
Zerstäuberdruck	200 kPa
Messzeit	30 s
Stabilisierungszeit	30 s
Probenansaugzeit	15 s
Pumpgeschwindigkeit	18 upm
Spülzeit	20 s

Elementaranalyse (Messung durchgeführt vom MPI Mülheim)

Zur Bestimmung der Elementarzusammensetzung der Ablaugen wurden diese bei 80°C getrocknet und anschließend gemörsert. Zur Analyse wurden jeweils 5 mg in einem Vario EL V2.6 der Firma Elementar Analysensysteme GmbH im CHNS Modus untersucht.

GCxGC-(TOF)-MS-Analyse zur Bestimmung der Extraktstoffe

Zur gaschromatographischen Analyse der Extraktstoffe in den Ablaugen wurden diese jeweils mit Ethylacetat und mit Diethylether im Scheidetrichter extrahiert. Dafür wurden 100 mg der jeweiligen getrockneten Ablauge in 50 mL Wasser gelöst und mit je 50 mL des organischen Lösungsmittels ausgeschüttelt. Die erhaltenen organischen Phasen wurden eingengt und in 1 mL des Lösungsmittels aufgenommen. Die für die Messung verwendeten Parameter sind in Tabelle 45 gezeigt.

Tabelle 45: Geräteparameter zum GCxGC-(TOF)-MS-System zur Analytik der Extraktstoffe in den Ablaugen

Komponente	Daten
GC-System	6890 N Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Detektor	Flugzeitmassenspektrometer LECO®Corporation, St. Joseph, USA
Split	1:10
Injektortemperatur	320 °C
Injektionsvolumen	1 µl
Trägergas	Helium
Trägerfluss	1,4 ml/Min
GC-Kapillaren	<u>1.Dimension:</u> Factor Four VF-5ms (30mx0,25mmx0,25µm) Varian, Darmstadt,Deutschland <u>2.Dimension:</u> BPX50 (1mx0,1mmx0,1µm) SGE, Darmstadt,Deutschland
Temperaturprogramm	<u>1.Ofen:</u> 75 °C (1 Minute halten) 3°C/Min auf 320 °C (10 Minuten halten) <u>2.Ofen:</u> 95 °C (1 Minute halten) 3 °C/Min auf 340 °C (10 Minuten halten)
Modulationszeit	3,0 s Hot Jet: 0,9 s Cold Jet: 0,6 s
Messmodus MS	EI, 70 eV
Messbereich	45 - 500 u
Transferline-Temperatur	300 °C
Ionenquellen-Temperatur	200 °C
Detektorspannung (MCP)	1600 V
Aufnahmerate	200 Spektren/s
Solvent Delay	150 s



HS-GC-MS-Analyse zur Bestimmung leichtflüchtiger Substanzen (durchgeführt vom Labor R. Fülling)

Zur gaschromatographischen Analyse der flüchtigen Substanzen in den Ablaugen wurden diese unverdünnt mit den in Tabelle 46 gezeigten Parametern gemessen.

**Tabelle 46: HS-GC-MS-Analytik der Ablaugen**

<b>Komponente</b>	<b>Daten</b>
GC-System	Agilent 6890
Probeneinwaage	1 g Ablauge
Temperierung	80 °C
Temperierzeit	60 Minuten
Säule	Petrocol DH 50.2 50m x 0,2mm x 0,5µm
Temperaturprogramm	40 °C , 2 Minuten halten 2 °C/Min auf 50 °C 10 °C/Min auf 110 °C 40 °C/Min auf 250 °C , 6 Minuten halten
Trägergas	Helium
Detektor	HP MSD 5973 Scan 29 – 300 m/z

## 7.2 Analytik der Monosaccharide in der Sulfitablauge

### 7.2.1 Zuckanalytik

Gaschromatographische Einstellungen

**Tabelle 47: Gaschromatographische Einstellung zur Analytik der Monosaccharide (GC-FID)**

<b>Komponente</b>	<b>Daten</b>
GC-System	6890 N Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Detektor	Flammenionisationsdetektor Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Split	1:50
Injektortemperatur	300 °C

Injektionsvolumen	1 µl
Trägergas	Helium
Trägerfluss	1,6 ml/Min
GC-Kapillare	Factor Four VF-5ms (30mx0,25mmx0,25µm) Varian, Darmstadt, Deutschland Macherey Nagel, Düren, Deutschland
Temperaturprogramm	150 °C (1 Minute halten) 2°C/Min auf 250 °C (5 Minuten halten)
FID-Temperatur	300 °C
Gasflüsse für FID	Wasserstoff: 30 mL/min Synthetische Luft: 400 mL/min Stickstoff (Make-Up-Gas): 30 mL/min

### Silylierung

Vor der Silylierung der Zucker erfolgte eine Oximierung der Aldehydfunktion (Abbildung 104).

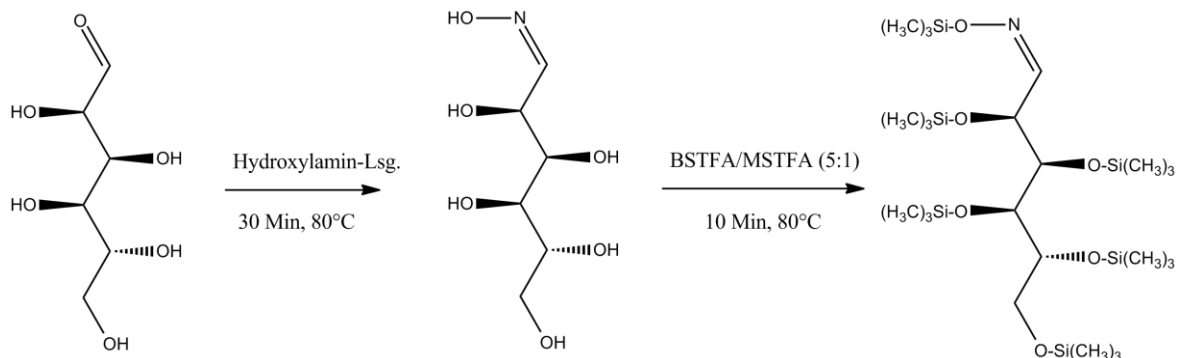


Abbildung 104: Reaktionsschema zur Silylierung von Monosacchariden [172]

120,3 mg Xylose, 80,1 mg Mannose, 39,5 mg Glucose, 40,5 mg Galactose, 40,4 mg Arabinose und 30 mg Rhamnose wurden eingewogen und in 5 mL Hydroxylamin-Lösung (2,5% in Pyridin) gelöst. Aus dieser Stammlösung wurden die Kalibrierlösungen zur Quantifizierung hergestellt. Aufgrund der unterschiedlichen Gehalte der Monosaccharide in der Sulfitablauge wurde der Kalibrierbereich für jeden Zucker anders gewählt:

Xylose: 2,4-24,1 mg/mL

Mannose: 1,6-16,0 mg/mL

Glucose: 0,7-7,2 mg/mL

Galactose: 0,8-8,1 mg/mL

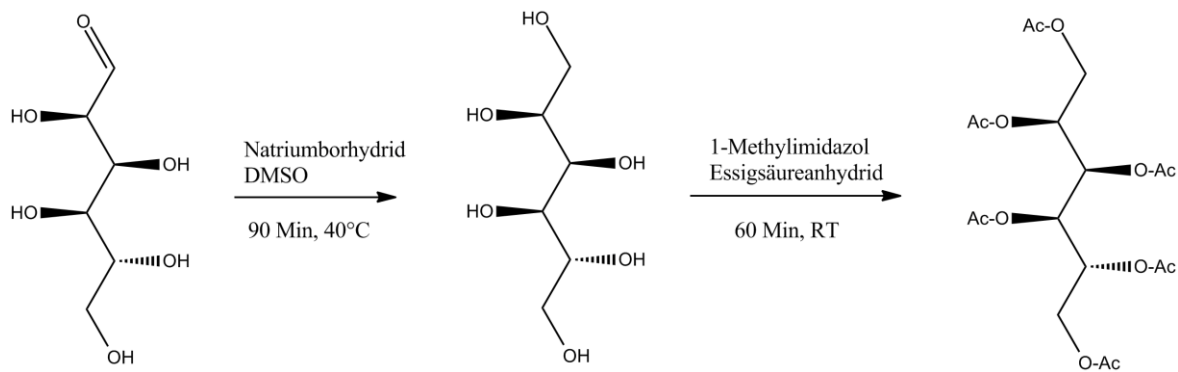
Arabinose: 0,8-8,1 mg/mL

Rhamnose: 0,6-6,0 mg/mL

Die jeweiligen Standardlösungen wurden 30 Minuten bei 80°C erwärmt. Jeweils 1 mL der Lösungen wurden anschließend mit 0,3 mL BSTFA/MSTFA (5:1) versetzt und 10 Minuten bei 80°C erhitzt. Danach wurden die Lösungen mit einem Spritzenfilter (0,45 µm) filtriert und analysiert.

### Alditolacetat-Bildung [173]

Die Reaktionen zur Alditolacetatbildung aus den Zuckern ist in Abbildung 105 dargestellt.



**Abbildung 105: Reaktionsschema zur Alditolacetat-Bildung von Monosacchariden [173]**

Zur Überprüfung der Methode wurden Kalibrierlösungen der jeweiligen Zucker verwendet. Dazu wurden 120,1 mg Xylose, 80,3 mg Mannose, 40,6 mg Glucose, 40,6 mg Galactose, 40,1 mg Arabinose und 30 mg Rhamnose eingewogen und in 5 mL dest. Wasser gelöst. Aus dieser Stammlösung wurden die Kalibrierlösungen zur Quantifizierung hergestellt. Aufgrund der unterschiedlichen Gehalte der Monosaccharide in der Sulfitablaue wurde der Kalibrierbereich für jeden Zucker anders gewählt:

Xylose: 2,4-24,0 mg/mL

Mannose: 1,6-16,0 mg/mL

Glucose: 0,7-7,4 mg/mL

Galactose: 0,8-8,1 mg/mL

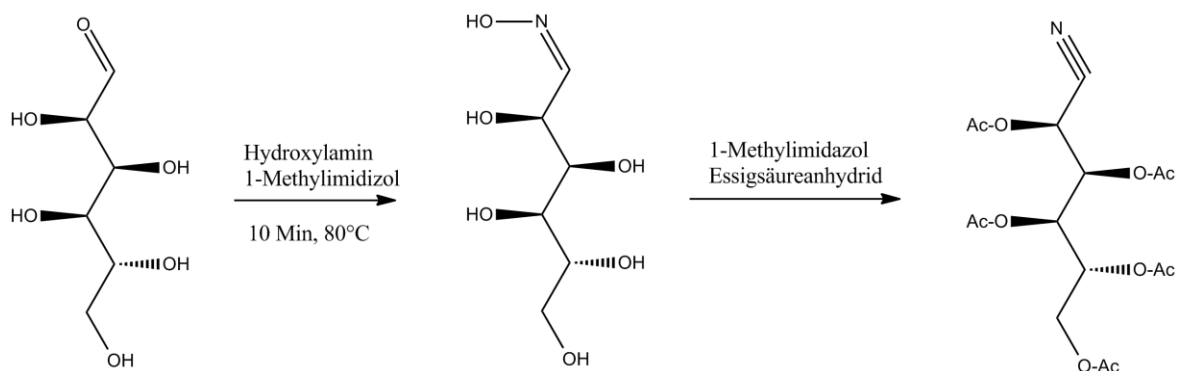
Arabinose: 0,7-7,2 mg/mL

Rhamnose: 0,6-6,0 mg/mL

Die jeweiligen Standardlösungen wurden mit 20  $\mu\text{L}$  Ammoniak-Lösung (15M) und 1 mL Natriumborhydrid-Lösung (0,5M) versetzt. Die Mischung wurde anschließend 90 Minuten bei 40°C erwärmt. Nach dem Abkühlen wurden tropfenweise 100  $\mu\text{L}$  Eisessig und anschließend 200  $\mu\text{L}$  1-Methylimidazol und 2 mL Essigsäureanhydrid zugegeben. Diese Mischung wurde eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 mL eiskaltem Wasser. Die Extraktion der derivatisierten Zucker erfolgte zweimal mit je 1 mL Dichlormethan. Die Dichlormethan-Phasen wurden vereinigt und eingedampft. Der erhaltene Rückstand wurde in 2 mL Dichlormethan gelöst. Danach wurde die Lösung mit einem Spritzenfilter (0,45  $\mu\text{m}$ ) filtriert und analysiert.

### Aldonitrilacetat-Bildung [144]

Die Bildung der Aldonitrilacetate aus den Zuckern erfolgte nach folgendem Schema (Abbildung 106).



**Abbildung 106: Reaktionsschema zur Aldonitrilacetat-Bildung von Monosacchariden [144]**

Die Konzentrationsbestimmung der Zucker in der Sulfitablauge sowie der Fermentationslösungen erfolgte mittels externer Kalibrierung. Dazu wurden 990,3 mg Xylose, 652,2 mg Mannose, 400,9 mg Glucose, 350,9 mg Galactose und 300,8 mg Arabinose eingewogen und in 10 mL dest. Wasser gelöst. Aus dieser Stammlösung wurden die Kalibrierlösungen zur Quantifizierung hergestellt. Aufgrund des unterschiedlichen Gehalts der Monosaccharide in der Sulfitablauge wurde der Kalibrierbereich für jeden Zucker anders gewählt:

Xylose: 1,98-7,92 mg/mL

Mannose: 1,30-5,22 mg/mL

Glucose: 0,73-2,92 mg/mL

Galactose: 0,70-2,81 mg/mL

Arabinose: 0,54-2,14 mg/mL

Die jeweiligen Standardlösungen, die verdünnte Sulfitablaue bzw. die entnommenen Proben aus der Fermentationslösung wurden mit 100 µL Lactose-Lösung (20 mg/mL) als interner Standard versetzt. Anschließend wurden 0,4 mL Hydroxylamin/1-Methylimidazol-Lösung (1,25 mg Hydroxylamin auf 50 mL 1-Methylimidazol) zugesetzt. Die Mischung wurde 10 Minuten bei 80°C erwärmt. Nach dem Abkühlen wurden tropfenweise 1 mL Essigsäureanhydrid zugegeben. Die Extraktion der derivatisierten Zucker erfolgte durch die Zugabe von 1,5 mL Dichlormethan und 1 mL Wasser. Die Extraktion wurde zweimal durchgeführt. Die Dichlormethan-Phasen wurden vereinigt, mit einem Spritzenfilter (0,45 µm) filtriert und analysiert.

### **7.2.2 Fermentationsversuche**

Für die Fermentationsversuche in dieser Arbeit wurden folgende Hefen verwendet:

*Pachysolen tannophilus*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia stipitis*.

#### Anzucht der Hefen im Flüssignährmedium

Bei der Untersuchung der Fermentation von Zuckern mittels folgender Hefen wurden verschiedene Flüssigmedien für verschiedene Versuchsteile verwendet. In ist eine Übersicht der verwendeten Flüssignährmedien gezeigt. Das verwendete Flüssigmedium enthielt folgende Komponenten: 3 g/L Hefeextrakt, 3 g/L Malzextrakt und 5g/L Pepton. Vor dem Animpfen der Nährmedien mit der Hefe (pro Hefe 100 mL) wurden die Lösungen autoklaviert (121°C, 25 Minuten). Die Kultivierung erfolgte bei 25 °C unter Lichtausschluss.

**Tabelle 48: Zusammensetzung der Nährmedien zur Anzucht der Hefen**

Medium	Einwaagen	Zusatz Sulfitablauge	Zusatz Flüssigmedium
Optimiertes Medium [145]	<u>Lösung I:</u> 8,06 g Glucose 1,23 g Hefeextrakt 1,736 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	400 mL (Wasser)
	<u>Lösung II:</u> 1,44 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 3 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,04 g ZnSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O 0,4 g MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O 0,4 ml Biotin- Lösung (50 µg/L in Sulfitablauge)	400 mL	-
	Lösung I und Lösung II 1:1 (v/v) mischen		

### Fermentation

50%ige Sulfitablauge (verdünnt in Wasser) wurden mit je 10 mL der Anzuchtlösung der Hefe versetzt (Erlenmeyerkolben mit Schliff). Auf den Erlenmeyerkolben wurde ein Aufsatz mit Gährröhrchen aufgesetzt. Das Gährröhrchen wurde mit Wasser gefüllt. Die Fermentation erfolgte bei 30 °C im Trockenschrank. In festgelegten Intervallen (24h Werte; außer Wochenende) wurden Proben zur Analyse entnommen (2-3 mL je Probe).

### **7.2.3 Ethanolbestimmung mittels HS-GC-FID**

Zur gaschromatographischen Analyse des Ethanols in den Fermentationslösungen wurden diese unverdünnt mit den in Tabelle 46 gezeigten Parametern gemessen.

**Tabelle 49: Gaschromatographische Einstellung zur Analytik des bei der Fermentation gebildeten Ethanols (HS-GC-FID)**

Komponente	Daten
GC-System	CP-3800 Varian, Palo Alto, USA
Autosampler	Combi PAL CTC Analytics, Zwingen, Schweiz
Detektor	Flammenionisationsdetektor

Temperatur Agigator	45 °C
Temperierzeit	10 Min
Temperatur Spritze	65 °C
Split	1:10
Injektortemperatur	250 °C
Injektionsvolumen	500 µl
Trägergas	Helium
Trägerfluss	1,4 ml/Min
GC-Kapillare	HP-5 (30mx0,25mmx0,25µm) Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Temperaturprogramm	30 °C (5 Minute halten) 20°C/Min auf 100 °C 50°C/Min auf 200 °C (2 Minuten halten)
FID-Temperatur	250 °C
Gasflüsse für FID	Wasserstoff: 30 mL/min Synthetische Luft: 300 mL/min

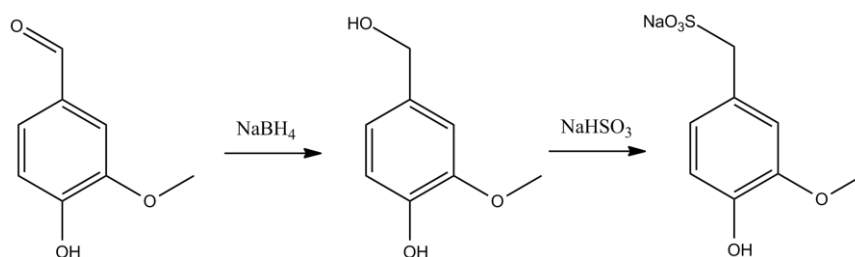
Die Kalibrierung mit Ethanol-Lösungen erfolgte im Bereich von 2 bis 25 mg/mL. Die zu messenden Fermentationslösungen wurden 1:10 verdünnt, in ein Headspace-Vial umgefüllt und vermessen.

### 7.3 Synthese der Modellsubstanzen

Zur Reaktionskontrolle der Syntheseschritte wurden <sup>1</sup>H-NMR-Spektren aufgenommen. Dazu wurde das Bruker Advance 400 MHz sowie das Bruker Advance III 600 MHz verwendet. Als Lösungsmittel und interner Standard diente deuteriertes Dimethylsulfoxid (DMSO-d<sub>6</sub>), deuteriertes Wasser (D<sub>2</sub>O) oder Deuteriochloroform (CDCl<sub>3</sub>). Die chemischen Verschiebungen sind in δ-Werten (ppm) relativ zum internen Lösungsmittelpeak angegeben. In Klammern sind die Kopplungskonstanten (J) in Hertz [Hz], die durch elektronische Integration ermittelte Protonenzahl und die betrachteten Protonen durch kursive Zahlen vermerkt. Die Multiplizitäten sind wie folgt gekennzeichnet: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett).

### 7.3.1 Sulfonierte Modellsubstanz (Natrium-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-methan-sulfonat

Die sulfonierte Modellsubstanz wurde nach den Methoden von Lecher *et al.* [174] und Schroeter *et al.* [175] synthetisiert (Abbildung 107).



**Abbildung 107: Synthese der sulfonierten Modellsubstanz (Natrium-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-methansulfonat [174,175]**

Die Synthese des Vanillylalkohols wurde leicht modifiziert nach Lecher [42] durchgeführt. Eine Lösung aus 1,00 g (6,6mmol) Vanillin in 3 ml Ethanol wurde bei 0 °C tropfenweise mit 0,25 g (6,6 mmol) Natriumborhydrid in 3ml 1M NaOH versetzt. Nach 3 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung mit 3M HCl versetzt, bis keine Wasserstoffbildung mehr auftrat. Anschließend wurde das Produkt mehrfach mit Diethylether extrahiert, die vereinigte organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz):

δ (ppm) = 8,73 (s, 1H, OH), 6,88 (m, 1H, arom. -CH), 6,70-6,69 (m, 2H, arom. -CH), 4,97-4,95 (t, 1H, CH<sub>2</sub>-OH, J = 5,7), 4,38-4,36 (d, 2H, CH<sub>2</sub>, J = 5,6), 3,75 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

Die Synthese von Natrium(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methansulfonat wurde nach einer leicht modifizierten Vorschrift von Schroeter et al. [43] durchgeführt. 0,30 g (1,9mmol) Vanillylalkohol und 0,20 g (1,9 mmol) Natriumhydrogensulfit wurden in 20 ml Wasser gelöst und die Lösung über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung wurde diese mit Chloroform extrahiert, um nicht umgesetzten Benzylalkohol zu entfernen. Das Lösungsmittel wurde dann im Vakuum bis zur Trockne entfernt. Der Rückstand wurde mit 30 ml heißem Ethanol extrahiert, die Lösung filtriert und das Ethanol ebenfalls im Vakuum entfernt.



Weißes Pulver

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz):

$\delta$  (ppm) = 7,06 (m, 1H, arom. -CH), 6,91 (m, 2H, arom. -CH), 4,09 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,88 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

### 7.3.2 Dehydrodivanillin

Die Synthese des Dehydrodivanillins erfolgte durch eine Kombination der Synthesevorschriften von Elbs *et al.* und Drumond *et al.* (Abbildung 108) [176,177].

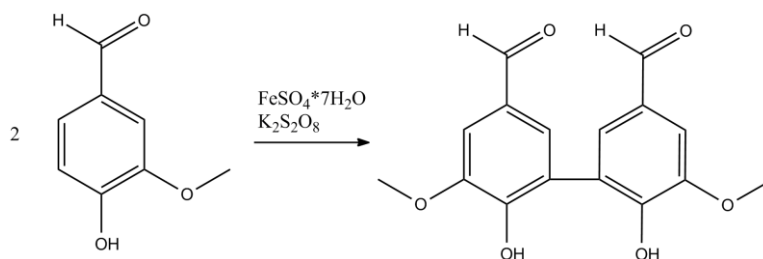


Abbildung 108: Synthese von Dehydrodivanillin nach Elbs *et al.* [176]

Dazu wurden 15 g Vanillin (99 mmol) in 500 mL destilliertem Wasser unter leichtem Erwärmen suspendiert. Unter starkem Rühren wurden anschließend 0,5 g Eisen(II)-sulfat Heptahydrat ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 2 mmol) und 13,5 g Kaliumperoxodisulfat ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ , 50 mmol) langsam zugegeben. Nach 30-minütigem Rühren wurde der gebildete Niederschlag abgenutscht und in ca. 100 mL 1M KOH gelöst. Eine erneute Fällung des Dehydrodivanillins erfolgt durch langsame Zugabe von 1M HCl. Der Niederschlag wird erneut abgenutscht und getrocknet. Zur weiteren Aufreinigung wurde das Dehydrodivanillin in Methanol suspendiert und anschließend wieder abgenutscht und im Hochvakuum getrocknet.

Beiges Pulver, 9,15 g (61%)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 600 MHz):

$\delta$  (ppm) = 3,67 (s, 6H, -O-CH<sub>3</sub>), 7,06 (m, 4H, arom. -CH), 9,00 (s, 2H, -C(O)H).

### 7.3.3 4'-O-[ $\alpha$ -(3,4-Dimethoxyphenyl)- $\alpha$ -oxoethyl]dehydrodivanillin (Trimer)

Das Schema zur Synthese des Trimers ist in Abbildung 109 dargestellt.

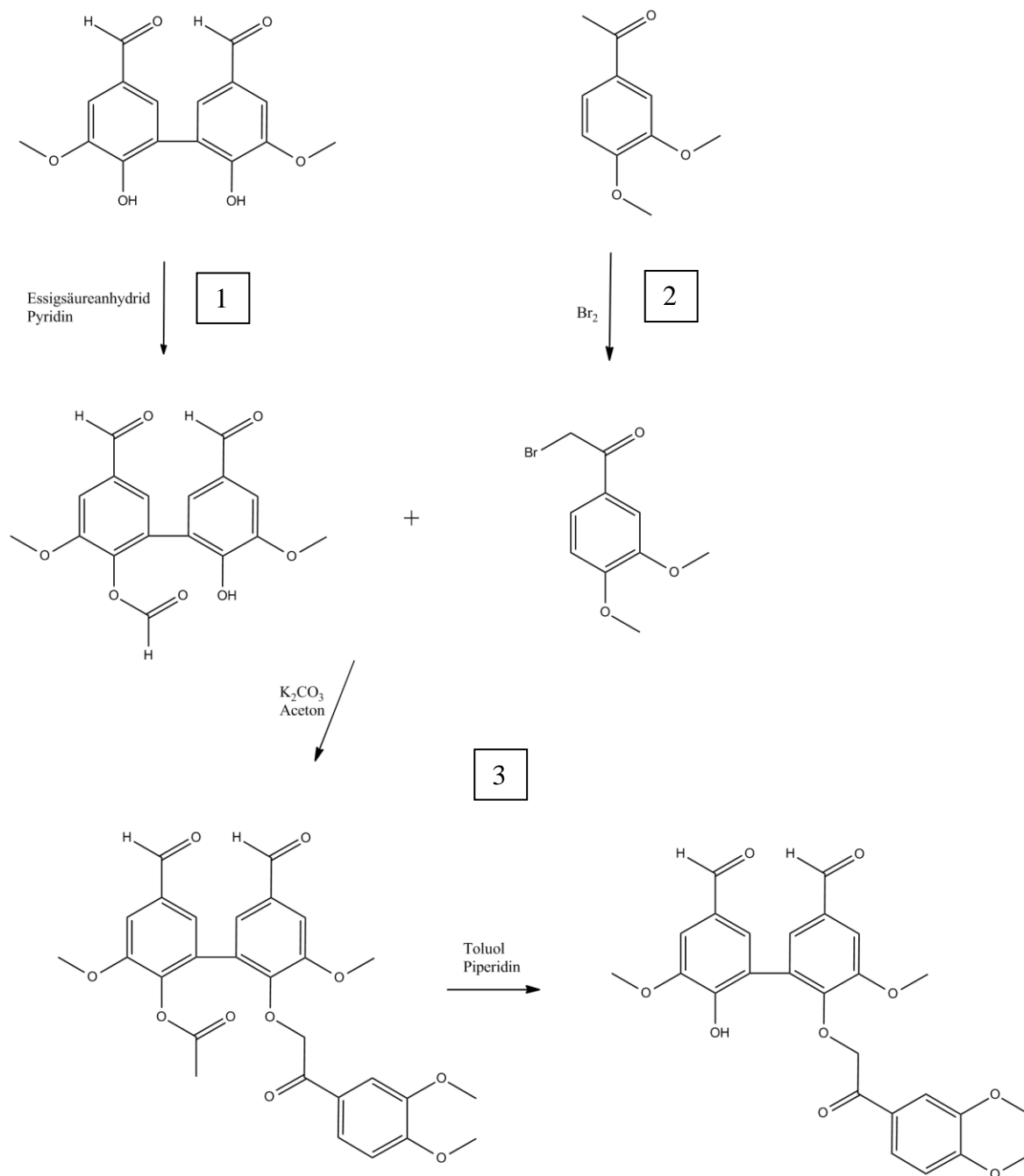


Abbildung 109: Synthese des Trimers nach [177–179]

Schritt 1: Synthese des 4-O-Acetyldehydrodivanillins [177]

8,9 g des Dehydrodivanillins (30 mmol) wurden in einem Gemisch aus 2,8 mL Essigsäureanhydrid (30 mmol) und 45 ml Pyridin 20 Minuten unter Rühren gelöst. Anschließend wurde die Lösung in destilliertes Wasser getropft. Der dabei gebildete hellbeige Niederschlag wurde abgenutscht und erst mit 0,1M HCl und im Folgenden mit destilliertem Wasser gewaschen, bis das Filtrat einen neutralen pH-Wert hatte. Da sich bei der Reaktion neben dem einfach acetylierten Dehydrodivanillin ebenfalls die zweifach acetylierte Verbindung bildete, wurde eine Säulenchromatographie durchgeführt. Dabei konnte das gewünschte Produkt vom Nebenprodukt isoliert und mittels H-NMR identifiziert werden. Die Elution bei der Säulenchromatographie erfolgte mit Chloroform/Ethylacetat (2:1 v/v).

Beiges Pulver, 0,7 g (14%)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz):

δ (ppm) = 2,13 (s, 3H, -O-C(O)-CH<sub>3</sub>), 3,96 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 4,04 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 6,37 (s, 1H, -OH), 7,39 (s, 1H, arom. -CH), 7,49 (s, 1H, arom. -CH), 7,56 (s, 2H, arom. -CH), 9,85 (s, 1H, -C(O)H), 9,99 (s, 1H, -C(O)H).

Schritt 2: Synthese des 2-Bromo-1-(3,4-dimethoxyphenyl)ethanon [178]

9g 1-(3,4-Dimethoxyphenyl)ethanon (50 mmol) wurden in 250 mL Diethylether und 100 mL Chloroform unter Rühren gelöst. Anschließend wurde innerhalb von 1,5 h unter ständiger Kühlung mit Eis eine Bromlösung (8 g Br<sub>2</sub> in 50 mL Chloroform; 50 mmol) zugetropft und danach weitere 60 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Zur Isolierung des Produkts wurde die Reaktionslösung mit 50 mL kaltem Wasser, mit einigen mL kalter 5%iger NaOH und erneut mit kaltem Wasser extrahiert. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und einrotiert. Durch Umkristallisation dieses Produkts mit 80 mL Ethylacetat/Hexan (3:5 v/v) wurde das reine 2-Bromo-1-(3,4-dimethoxyphenyl)ethanon erhalten.

Weißes Pulver, 6,9 g (53%)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz):

δ (ppm) = 3,94 (m, 6H, -C(O)-CH<sub>3</sub>), 4,40 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-Br), 6,90 (d, 1H, J=6.0, arom. -CH), 7,52 (d, 1H, J=6.0, arom. -CH), 7,60 (d, 1H, J=6.0, arom. -CH).

Schritt 3: Synthese des 4'-O-[ $\alpha$ -(3,4-Dimethoxyphenyl)- $\alpha$ -oxoethyl]dehydrodivanillin (Trimer) [179]

Zu einer Lösung des 2-Bromo-1-(3,4-dimethoxyphenyl)-ethanons (0,19 g; 0,72 mmol) und des 4-O-Acetyldehydrodivanillins (0,25 g; 0,72 mmol) in 15 mL Aceton wurden 0,2 g Kaliumcarbonat (2 mmol) hinzugegeben. Das Gemisch wurde 1h unter Rückfluss gekocht. Der Niederschlag wurde abfiltriert und die dunkelgelbe Lösung einrotiert. Der Rückstand wurde anschließend in Chloroform gelöst und mit 0,5M NaOH gewaschen. Danach wurde die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und einrotiert. Das 4-O-4'-O-[ $\alpha$ -(3,4-Dimethoxyphenyl)- $\alpha$ -oxoethyl]dehydrodivanillin wurde durch Zugabe von THF/Hexan (1/1) aus dem Rückstand ausgefällt.

Gelbes Pulver, 0,288 g (76%)

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 600 MHz):

$\delta$  (ppm) = 2,08 (s, 3H, -C-O-C(O)-CH<sub>3</sub>), 3,77-3,87 (m, 12H, -C-O-CH<sub>3</sub>), 5,32 (s, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-C(O)-), 6,98 (d, 1H, J=6.0, arom. -CH), 7,31 (d, 1H, J=6.0, arom. -CH), 7,36 (d, 1H, J=6.0, arom. -CH), 7,48 (dd, 1H, J=12.0, arom. -CH), 7,54 (d, 1H, J=6.0, arom. -CH), 7,56 (d, 1H, J=6.0, arom. -CH), 7,59 (d, 1H, J=6.0, arom. -CH), 9,92 (d, 2H, J=12.0, -C(O)H).

Die Entfernung des Schutzgruppe (Acetylgruppe) erfolgte durch die Zugabe von Toluol (170  $\mu$ L) Piperidin (85  $\mu$ L) und Ethanol (855  $\mu$ L) zum 4-O-4'-O-[ $\alpha$ -(3,4-Dimethoxyphenyl)- $\alpha$ -oxoethyl]dehydrodivanillin. Dieses Gemisch wurde 30 Minuten unter Rückfluss gekocht. Anschließend wurde die Lösung mit Essigsäure neutralisiert und 5 mL Wasser hinzugefügt. Die wässrige Phase wurde mit Chloroform extrahiert und die organische Phase anschließend mit Natriumsulfat getrocknet und unter Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde durch die Zugabe von Petrolether zum Rückstand gefällt.

Orange-Braunes Pulver

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz):

$\delta$  (ppm) = 3,67-3,97 (m, 18H, -C-O-CH<sub>3</sub>), 5,49 (s, 4H, -O-CH<sub>2</sub>-C(O)-), 6,86 (d, 1H, J=6.0, arom. -CH), 7,46-7,51 (m, 7H, arom. -CH), 9,86 (s, 1H, -C(O)H), 9,94 (s, 1H, -C(O)H).

### 7.3.4 2-[(3,4-Dimethoxyphenyl)- $\alpha$ -oxoethyl]dehydrodivanillin (Tetramer)

Ausgehend von diesem Syntheseweg wurde das Tetramer hergestellt, indem die Reaktion ohne Schutzgruppe durchgeführt wurde. Somit wurden beide Hydroxylgruppen des Dehydrodivanillins umgesetzt (Abbildung 110).

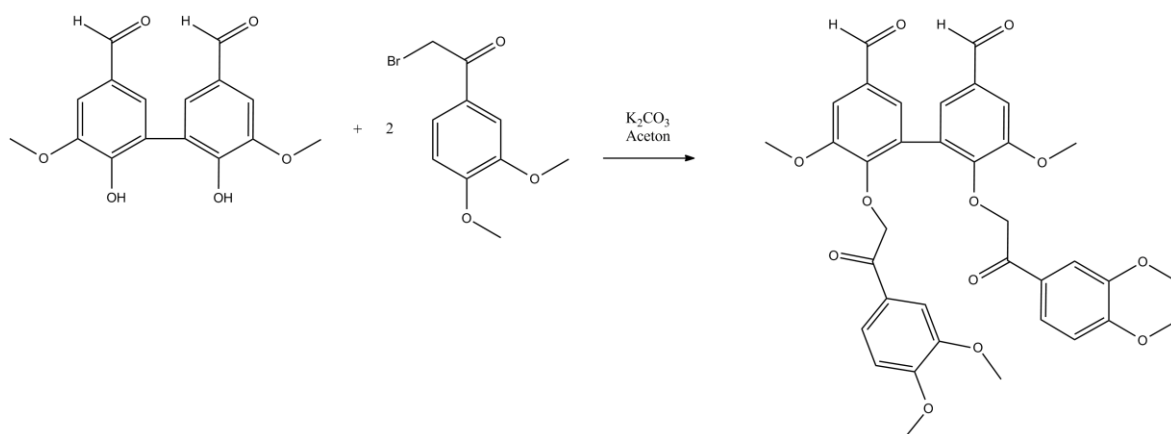


Abbildung 110: Synthese des Tetramers

Für diese Synthese wurden 604 mg Dehydrodivanillin (2 mmol) und 1 g 2-Bromo-1-(3,4-dimethoxyphenyl)-ethanon (4 mmol) in 30ml Aceton suspendiert und 1 g Kaliumcarbonat (8 mmol) hinzugegeben. Der unlösliche Anteil wurde abfiltriert und die Lösung einrotiert. Der Rückstand wurde anschließend in Chloroform gelöst und mit 0,5M NaOH gewaschen. Danach wurde die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und einrotiert. Das Tetramer wird durch Zugabe von THF/Hexan (1/1) aus dem Rückstand ausgefällt.

Beiges Pulver, 0,3 g (23%)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz):

$\delta$  (ppm) = 3,86-3,93 (*m*, 18H,  $-\text{C}-\text{O}-\underline{\text{CH}}_3$ ), 5,27 (*s*, 4H,  $-\text{O}-\underline{\text{CH}}_2-\text{C}(\text{O})-$ ), 6,78-6,80 (*m*, 2H, *arom.*  $-\underline{\text{CH}}$ ), 7,43-7,51 (*m*, 8H, *arom.*  $-\underline{\text{CH}}$ ), 9,87 (*s*, 2H,  $-\text{C}(\text{O})\underline{\text{H}}$ ).

## 7.4 Isolierung und Fraktionierung der Ligninabbauprodukte

### 7.4.1 Isolierung der Ligninabbauprodukte aus den Ablaugen

Die verwendete Schwarzlaugel stammt aus dem Kraft-Verfahren der Zellstoff- und Papierfabrik Rosenthal. Ca. 300 ml der Schwarzlaugel wurden abfiltriert und das Filtrat unter Rühren bis zu einem pH-Wert von 2,0 tropfenweise mit 6M HCl versetzt. Der entstandene Niederschlag wurde abgenutscht und solange mit einer salzsauren Lösung (pH 2,0) nachgewaschen bis das Filtrat klar war. Der Feststoff wurde bei 105 °C im Trockenschrank getrocknet, gemörsert und erneut bei 105 °C getrocknet.

Für die fraktionierte Fällung wurde der oben beschriebene Vorgang bis zu einem pH-Wert von 10 durchgeführt. Anschließend wurde das Filtrat dieser Fällung bis zu einem pH-Wert von 8 angesäuert und der Niederschlag vom Filtrat abgetrennt. Diese Schritte wurden ebenso für die pH-Werte 6, 4 und 2 durchgeführt.

Die getrockneten Niederschläge der fraktionierten Fällung wurden anschließend, soweit möglich, in Wasser gelöst und zur Aufreinigung bis pH 2 angesäuert. Die dabei entstandene Suspension wurde zentrifugiert. Der erhaltene Niederschlag wurde nachgewaschen und anschließend getrocknet.

Zur Isolierung der Ligninsulfonate wurden zunächst 200 g der getrockneten Sulfitablaugel in 100 mL Reinstwasser gelöst. Die Lösung wurde über einen Kationentauscher gegeben, um die  $Mg^{2+}$ -Ionen gegen  $H^+$ -Ionen auszutauschen und so die Ligninsulfonsäuren zu bilden. Zur Freisetzung der leicht an die Ligninabbauprodukte und an die Kohlenhydrate gebundenen Sulfonatgruppen wurde die Lösung mit 1M NaOH auf pH 12 eingestellt und zwei Stunden bei 40 °C gerührt. Anschließend wurde zur Entfernung des  $SO_2$  die Lösung am Rotationsverdampfer eingeeengt und mit einer gesättigten 0,4 %igen  $Ba(OH)_2$ -Lösung (8 g  $Ba(OH)_2 \cdot 8 H_2O$  auf 2 L Reinst- $H_2O$ ) versetzt, bis ein pH Wert von 3 erreicht war. Dadurch wurden die enthaltenen Sulfationen als Bariumsulfat gefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Die Entfernung der Bariumionen aus der Lösung erfolgte durch die Aufgabe auf den Ionenaustauscher. Die Ligninsulfonsäuren wurden dann um ca. 1/3 des Gesamtvolumens am Rotationsverdampfer eingeeengt und in einen Scheidetrichter überführt. Zu der Lösung wurden 25 ml Dicyclohexylamin in 200 ml n-Butanol gegeben und geschüttelt. Es bildete sich eine hellbraune, undurchsichtige Phase, die sich auch nach mehrstündigem Stehenlassen nicht entmischte. Deswegen wurden die wässrige Phase sowie die Mischphase abgenommen.

Die Ligninsulfonsäuren befinden sich als Aminkomplex in der organischen Phase. Um die restlichen Kohlenhydrate aus der organischen Phase zu entfernen, wurde nochmals mit 200 ml Reinstwasser ausgeschüttelt. Zur Überführung des Ligninsulfonat-Dicyclohexylamin-Komplexes in wasserlösliche Natrium-Ligninsulfonate wird die organische Phase mit 100 ml 1M NaOH ausgeschüttelt. Zur Reinigung der wässrigen Phase mit den Natrium-Ligninsulfonaten wird erneut mit 100 ml Diethylether extrahiert. Die erhaltene Lösung wurde zur Bildung der Ligninsulfonsäuren über den Kationentauscher gegeben. Das Eluat wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingedampft und lyophilisiert.

#### 7.4.2 Fraktionierung der Ligninabbauprodukte mittels Soxhlet-Extraktionen

Für die Soxhlet-Extraktionen wurde die jeweilige Probe in eine Soxhlet-Hülse überführt. Die Extraktion wurde so lange durchgeführt, bis der Überstand im Soxhlet-Aufsatz farblos war bzw. über mehrere Stunden nur eine sehr geringfügige Färbung aufwies. Zur Bestimmung des extrahierten Anteils wurde das Lösungsmittel, das zur Extraktion verwendet worden ist, am Rotationsverdampfer entfernt und der Feststoff für mehrere Stunden im Hochvakuum getrocknet. Der berechnete Anteil der extrahierten Substanz ist bezogen auf den eingesetzten Feststoff für die Extraktion.

### 7.5 Untersuchung der isolierten und fraktionierten Ligninabbauprodukte

#### 7.5.1 Gaschromatographische Methoden

Die Daten zum GCxGC-(TOF)MS-System sowie die verwendete Methode zur Analytik der Ligninabbauprodukte ist in Tabelle 50 gezeigt.

**Tabelle 50: Geräteparameter zum GCxGC-(TOF)-MS-System zur Analytik der Ligninabbauprodukte**

<b>Komponente</b>	<b>Daten</b>
GC-System	6890 N; Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Detektor	Flugzeitmassenspektrometer; LECO®Corporation, St. Joseph, USA
Split	1:10 bei Realproben; 1:100 bei Modellsubstanzen
Injektortemperatur	320 °C
Injektionsvolumen	1 µl

## Experimenteller Teil

Trägergas	Helium		
Trägerfluss	1,4 ml/Min		
GC-Kapillaren 1.Dimension	Factor Four VF-5ms (30mx0,25mmx0,25µm) Varian, Darmstadt,Deutschland	Optima 1 (30mx0,25mmx0,25µm) Macherey Nagel, Düren,Deutschland	Optima 5 - HT (30mx0,25mmx0,25µm) Macherey Nagel, Düren,Deutschland
GC-Kapillare 2.Dimension	BPX50 (1mx0,1mmx0,1µm) SGE, Darmstadt,Deutschland		
Temperatur- programm	<u>1.Ofen:</u> 75 °C (1 Minute halten) 5°C/Min auf 320 °C (10 Minuten halten) <u>2.Ofen:</u> 95 °C (1 Minute halten) 5 °C/Min auf 340 °C (10 Minuten halten)	<u>1.Ofen:</u> 75 °C (1 Minute halten) 5°C/Min auf 320 °C (10 Minuten halten) <u>2.Ofen:</u> 95 °C (1 Minute halten) 5 °C/Min auf 340 °C (10 Minuten halten)	<u>1.Ofen:</u> 75 °C (1 Minute halten) 5°C/Min auf 370 °C (10 Minuten halten) <u>2.Ofen:</u> 95 °C (1 Minute halten) 5 °C/Min auf 390 °C (10 Minuten halten)
Messmodus MS	EI, 70 eV	Modulationszeit	3,0 s; Hot Jet: 0,9 s; Cold Jet: 0,6 s
Messbereich	45 - 500 u	Detektorspannung (MCP)	1700 V
Transferline- Temperatur	300 °C	Aufnahmerate	200 Spektren/s
Ionenquellen- Temperatur	200 °C	Solvent Delay	350 s

### Probenvorbereitung ohne Derivatisierung

2 mg der Proben wurden in ein GC-Vial eingewogen und in 1 mL Aceton gelöst. Dazu wurde das Vial auf dem Vortexer gut geschüttelt. Die Lösungen wurden vor der Analyse filtriert (PTFE-Spritzenfilter 0,45 µm).

### Silylierung

Zur Derivatisierung der Proben mittels Silylierungsmittel wurden 5-10 mg der Proben in ein GC-Vial eingewogen und mit 100 µL Pyridin und 300 µL MSTFA versetzt. Anschließend wird das Vial geschüttelt und 1 Stunde bei 80°C im Trockenschrank erwärmt. Die Lösungen wurden vor der Analyse filtriert (PTFE-Spritzenfilter 0,45 µm).

### Protonierung und anschließende Silylierung

Die Silylierung der Ligninsulfonate erfolgte nach vorhergehender Protonierung. Dazu wurde 5 mg der Probe eingewogen und mit 1 mL 1M HCl 20 Minuten bei 80°C erwärmt.



Nach Abkühlen des Vials wurde das Lösungsmittel im Stickstoffstrom abgedampft. Anschließend folgte die Silylierung, wie oben beschrieben.

### 7.5.2 Flüssigchromatographische Methoden

1290 Infinity UHPLC, Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG, Waldbronn, Deutschland

**Tabelle 51: Daten zum Agilent-System**

<b>Komponente</b>	<b>Daten</b>
Pumpe	G4220A
Autosampler	G4226A
Thermostat	G1330B
Detektor (DAD)	G4212A
PC-System	Intel® Xeon® W3520 2,66GHz, 8,0 GB RAM
Software	MassHunter Workstation Software Version: B05.01

Shimadzu Prominence 20 xr, Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Deutschland

**Tabelle 52: Daten zum Shimadzu-System**

<b>Komponente</b>	<b>Daten</b>
Degasser	Prominence Degasser DGU – 10AS
Pumpen	3mal Prominence LC – 20AD xr
Autosampler	Prominence Autosampler SIL – 20 <sup>a</sup> XR
Säulenofen	Prominence Column Oven CTO – 20A
Detektor	Prominence DAD SPD – M20A
Fraktionssammler	Prominence Fraction Collector FRC-10 A
Kommunikationsmodul	Prominence Communications Module CBM – 20A
PC-System	

Steuerungs- und Auswertesoftware	Shimadzu LC-Solution 1.24
----------------------------------	---------------------------

Zur Equilibrierung der Säulen wurde zusätzlich zu der im Gradienten angegebenen Zeit zwischen den Analyseläufen für weitere fünf Minuten mit der Ausgangszusammensetzung des Eluenten gespült.

#### Vergleich verschiedener Phasen mittels Modellsubstanzen (Teil 1)

Der Vergleich der RP18- und der Phenylphase erfolgte am Agilent-System (1290 Infinity). Dazu wurden zunächst Stammlösungen der jeweiligen Modellsubstanzen mit einer Konzentration von 1 mg/mL in DMSO erstellt. Diese wurde 1:20 mit 10 mM Ammoniumacetat-Lösung verdünnt. Somit ergibt sich für die Einzelstandard-Lösungen eine Konzentration von 0,05 mg/mL. Zur Herstellung des Gemischs aus Modellsubstanzen wurden diese Lösungen verwendet. In der gemessenen Probe betrug die Konzentration jedes Analyten 5 µg/mL in 10 mM Ammoniumacetat/DMSO (95:5). Die Lösungen wurden vor der Analyse filtriert (PTFE-Spritzenfilter 0,45 µm).

**Tabelle 53: HPLC-Methode zum Vergleich der Säulen**

Parameter	
Injektionslösemittel	10 mM Ammoniumacetat/DMSO (95/5)
Konzentration der Proben	5 µg/mL
Injektionsvolumen	5 µL
Eluent A	10 mM Ammoniumacetat
Eluent B	Methanol
Fluss	0,4 mL/min
Temperatur	Raumtemperatur
Säule 1	Reposil-Pur Basic C18-HD 5µm 250 mm x 4,6 mm Dr. Maisch, Ammerbuch- Entringen, Deutschland
Säule 2	Reposil-Pur Phenyl 5 µm 250 mm x 4,6 mm Dr. Maisch, Ammerbuch- Entringen, Deutschland
Wellenlänge DAD	280 nm

Die optimierten Gradienten für die RP18-Säule und die Phenylsäule sind in Tabelle 54 und Tabelle 55 aufgeführt.

**Tabelle 54: Optimierter Gradient für die Analytik von Modellsubstanzen mit der RP18-Phase**

Zeit [Minuten]	Ammoniumacetat 10mM [%]	Methanol [%]
0	95	5
2	95	5
25	50	50
32	15	85
39	15	85
46	95	5
61	95	5

**Tabelle 55: Optimierter Gradient für die Analytik von Modellsubstanzen mit der Phenyl-Phase**

Zeit [Minuten]	Ammoniumacetat 10mM [%]	Methanol [%]
0	95	5
2	95	5
11	50	50
15	50	50
33	15	85
40	15	85
47	95	5
62	95	5

### Vergleich verschiedener Phasen mittels Modellsubstanzen (Teil 2)

Um die Löslichkeit der Analyten im Injektionslösmittel zu verbessern, wurde eine Methode für die Analytik der wasserlöslichen Modellsubstanzen und eine Methode für die wasserunlöslichen Modellsubstanzen entwickelt.

1. Methodenentwicklung im basischen Milieu

Die Entwicklung der chromatographischen Methode bei einem pH-Wert von 10,7 wurde an der Shimadzu-Anlage (Tabelle 52) durchgeführt. Die Parameter sowie der verwendete Gradient sind in Tabelle 56 und Tabelle 57 gezeigt. Die erstellten Lösungen wurden vor der Analyse filtriert (PTFE-Spritzenfilter 0,45 µm).

**Tabelle 56: HPLC-Methode zur Analytik bei pH 10,7**

Parameter	
Injektionslösemittel	10mM NH <sub>3</sub> /ACN(NH <sub>3</sub> ) (97/3)
Konzentration der Proben	50 µg/mL
Injektionsvolumen	10 µL
Eluent A	10 mM Ammoniak pH 10,7
Eluent B	Acetonitril/Wasser (90/10) (mit NH <sub>3</sub> auf pH 10,7)
Fluss	0,8 mL/min
Temperatur	Raumtemperatur
Säule	ACE Excel 5 Super C18 5µm 150 mm x 4,6 mm Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, Scotland
Wellenlänge DAD	280 nm

**Tabelle 57: Optimierter Gradient für die Analytik von Modellsubstanzen mit der ACE-C18-Phase**

Zeit [Minuten]	ACN/Wasser (90/10) (pH 10,7) [%]	10 mM NH <sub>3</sub> (pH 10,7) [%]
0	3	97
2	3	97
32	100	0
39	100	0
46	3	97
61	3	97

## 2. Methodenentwicklung für wasserlösliche Modellsubstanzen

Die Methodenentwicklung für die wasserlöslichen Analyten erfolgte am Agilent-System (Tabelle 51). Zu diesen Modellsubstanzen gehörten die sulfonierte Substanz, Vanillin, Veratrylalkohol und Eugenol. Die erstellten Lösungen wurden vor der Analyse filtriert (PTFE-Spritzenfilter 0,45 µm).

**Tabelle 58: HPLC-Methode zum Analytik der wasserlöslichen Modellsubstanzen**

Parameter	
Injektionslösemittel	10 mM Ammoniumacetat/MeOH (95/5)
Konzentration der Proben	5 µg/mL
Injektionsvolumen	10 µL
Eluent A	10 mM Ammoniumacetat
Eluent B	Methanol
Fluss	0,8 mL/min
Temperatur	Raumtemperatur
Säule	Supelco Discovery C18 5µm 150 mm x 4,6 mm Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Wellenlänge DAD	280 nm

Zur Elution wurde der in Tabelle 54 gezeigte Gradient verwendet.

### Untersuchung der isolierten Ligninabbauprodukte

Die Konzentration der injizierten Realproben betrug bei beiden HPLC-Systemen 1 mg/mL. Die Analytik der Ligninsulfonate wurde am Agilent-System durchgeführt. Die genutzten Gradienten sind in den folgenden Tabellen gezeigt.

**Tabelle 59: Linearer Gradient zur Analyse der Ligninsulfonate**

Zeit [Minuten]	Ammoniumacetat 10mM [%]	Methanol [%]
0	95	5
2	95	5
41	20	80
52	20	80
64	95	5
74	95	5

**Tabelle 60: Stufengradient zur Analyse der Ligninsulfonate**

Zeit [Minuten]	Ammoniumacetat 10mM [%]	Methanol [%]
0	95	5
2	95	5
20	65	35
24	65	35
26	60	40
30	60	40
32	55	45
36	55	45
38	50	50
42	50	50
44	45	55
48	45	55
50	40	60
54	40	60
56	35	65
60	35	65
70	20	80
82	95	5

92

95

5

Die Analytik des Kraftlignins wurde am Shimadzu-System durchgeführt (Gradienten in Tabelle 61 und Tabelle 62).

**Tabelle 61: Linearer Gradient zur Analyse des Kraftlignins**

Zeit [Minuten]	ACN/Wasser (90/10) (pH 10,7) [%]	10 mM NH <sub>3</sub> (pH 10,7) [%]
0	3	97
2	3	97
32	100	0
39	100	0
46	3	97
61	3	97

**Tabelle 62: Stufengradient zur Analyse des Kraftlignins**

Zeit [Minuten]	ACN/Wasser (90/10) (pH 10,7) [%]	10 mM NH <sub>3</sub> (pH 10,7) [%]
2	3	97
5	13	87
15	13	87
18	23	77
23	23	77
26	33	67
31	33	67
34	43	57
39	43	57
54	100	0
59	100	0
66	3	97
81	3	97

Entwicklung einer offline LCxLC-Analytik

Für den Ansatz der offline LCxLC-Analytik wurden die Analyten in den isolierten Ligninsulfonaten zunächst mit einer RP18-Phase getrennt. Der Bereich, der einer zweiten Methode zugänglich gemacht werden soll, wurde mit dem Fraktionssammler aufgefangen. Das Eluat wurde eingedampft und anschließend in dem jeweiligen Eluenten für die HILIC-Analyse wieder gelöst. Die Parameter für die RP18- sowie die HILIC-Trennung sind in Tabelle 63 und Tabelle 64 aufgeführt. Der in Tabelle 59 gezeigte Gradient wurde für die RP18-Analyse verwendet.

**Tabelle 63: HPLC-Methode zur Fraktionierung der Ligninsulfonate**

<b>Parameter</b>	
Injektionslösemittel	10 mM Ammoniumacetat/MeOH (95/5)
Konzentration der Proben	10 mg/mL
Injektionsvolumen	50 µL
Eluent A	10 mM Ammoniumacetat
Eluent B	Methanol
Fluss	0,2 mL/min
Temperatur	Raumtemperatur
Vorsäule	Security Guard, RP 18
Säule	Supelco Discovery C18 5µm 150 mm x 4,6 mm Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Wellenlänge DAD	280 nm

**Tabelle 64: isokratische HPLC-Methoden zur Analytik der HPLC-Fraktion (Versuche 1-3)**

<b>Parameter</b>	
Injektionslösemittel	Siehe Eluent
Injektionsvolumen	10 µL
Eluent Versuch 1	ACN/10 mM Ammoniumacetat (90/10)
Eluent Versuch 2	ACN/10 mM Ammoniumacetat (95/5)



Eluent Versuch 3	ACN/10 mM Ammoniumacetat (97/3)
Fluss	0,8 mL/min
Temperatur	Raumtemperatur
Säule	Reprospher HILIC-P 5µm 250 mm x 4,6 mm Dr. Maisch, Ammerbuch-Entringen, Deutschland
Wellenlänge DAD	280 nm

#### 7.5.2.1 Festphasenextraktion

Für die Festphasenextraktion wurde eine SPE-Kammer von STRATA® (Phenomenex) verwendet. Für die Aktivierung, Konditionierung, Equilibrierung und den Waschvorgang galt ein Einsatzvolumen von 1 ml/100 mg Sorbent.

#### Verwendete Lösungen

Dehydrodivanillin (Stammlösung):

48,6 µg/mL in 5% DMSO/ 95 % 10 mM Ammoniumacetat

Dehydrodivanillin (Kalibrierstandards):

Aus der Stammlösung wurden Kalibrierlösungen im Bereich von 1 bis 38,9 µg/ml hergestellt.

Gemisch der Modellsubstanzen:

0,8 mg Vanillin, 15,8 mg Eugenol, 11,8 mg Veratrylalkohol, 11,2 mg Dehydrodivanillin, 10,2 mg Dimer 2 und 10,9 mg Dimer 1 wurden eingewogen und in 1 mL DMSO gelöst. Anschließend wurde die Lösung 1:10 verdünnt. Aus dieser Stammlösung (ca. 1 mg/mL je Modellsubstanz) wurden die Kalibrierlösungen zur Quantifizierung hergestellt. Der Kalibrierbereich lag zwischen 1,25 und 250 µg/mL.

#### Quantifizierung mittels HPLC-DAD

Zur Quantifizierung des Dehydrodivanillins wurde eine isokratische Messmethode verwendet (Tabelle 65).

**Tabelle 65: Isokratische Methode zur Quantifizierung des Deyhydrodivanillins**

Parameter	
Injektionslösemittel	10 mM Ammoniumacetat/MeOH (95/5)
Konzentration der Proben	5 µg/mL
Injektionsvolumen	10 µL
Eluent	Methanol/ 10 mM Ammoniumacetat (25/75)
Fluss	0,7 mL/min
Temperatur	Raumtemperatur
Vorsäule	C18 ec Macherey Nagel, Düren, Deutschland
Säule	OASIS µBondaPak C-18 10µm; 150 mm x 4,6 mm Waters GmbH , Kerpen, Deutschland
Wellenlänge DAD	280 nm

Um das Gemisch der Modellsubstanzen zu analysieren wurde ein Gradient verwendet. Zudem wurde der Fluss auf 0,4 mL/min verringert, um eine ausreichende Trennung zu gewährleisten (Tabelle 66).

**Tabelle 66: Gradient zur Quantifizierung des Gemisches aus Modellsubstanzen**

Zeit [Minuten]	MeOH [%]	10 mM NH <sub>4</sub> OAc [%]
2	5	95
22	50	50
28	50	50
30	65	35
36	65	35
41	85	15
45	85	15
47	5	95
57	5	95

Im Folgenden ist für die gezeigten Untersuchungen jeweils eine tabellarische Übersicht der verwendeten Materialien, Lösungen und Volumina gezeigt.

#### Vergleich der Sorbentien

<b>Parameter</b>	
C 18	OASIS 500mg Waters GmbH , Kerpen, Deutschland
C18ec	Chromabond 200 mg Macherey Nagel, Düren, Deutschland
C18 Hydra	Chromabond 200 mg Macherey Nagel, Düren, Deutschland
Phenyl	STRATA 500 mg Phenomenex Inc., Aschaffenburg, Deutschland
Aktivierung	MeOH
Equilibrierung	DMSO/NH <sub>4</sub> OAc (1:20)
Beladung	1 mL Stammlösung Dehydrodivanillin (48,6 µg/mL)
Waschen	Reinstwasser
Elution	3x 2 mL MeOH

#### Vergleich der Elutionsmittel

<b>Parameter</b>	
Sorbent	C18 OASIS 500mg Waters GmbH , Kerpen, Deutschland
Aktivierung	MeOH
Equilibrierung	DMSO/NH <sub>4</sub> OAc (1:20)
Beladung	1 mL Stammlösung Dehydrodivanillin (48,6 µg/mL)
Waschen	Reinstwasser
Elution	3x 2 mL Lösungsmittel
Lösungsmittel 1	Acetonitril
Lösungsmittel 2	Dimethylformamid
Lösungsmittel 3	Dimethylsulfoxid
Lösungsmittel 4	Methanol

## Experimenteller Teil

Lösungsmittel 5	ACN/MeOH (1:1)
Lösungsmittel 6	ACN/MeOH (3:1)
Lösungsmittel 7	ACN/MeOH (1:3) Ebenfalls mit C18ec und C18 Hydra

### Anreicherung des Dehydrodivanillins

Parameter	Reduktion des Elutionsvolumens	Reduktion des Resuspensionsvolumens I	Reduktion des Resuspensionsvolumens II
Sorbent	C18 Bond Elut, 100 mg, Varian Inc., Agilent Technologies, Santa Clara, USA		
Aktivierung	MeOH		
Equilibrierung	DMSO/NH <sub>4</sub> OAc (1:20)		
Beladung	1 mL Stammlösung Dehydrodivanillin (48,6 µg/mL)		
Waschen	Reinstwasser		
Elution	1 mL ACN/MeOH (1:3)	2 mL ACN/MeOH (1:3)	2 mL ACN/MeOH (1:3)
Eindampfen	60 °C		
Resuspension	1 mL DMSO/NH <sub>4</sub> OAc (1:20)	650 µL DMSO/NH <sub>4</sub> OAc (1:20)	500 µL DMSO/NH <sub>4</sub> OAc (1:1)

### SPE des Gemisches der Modellsubstanzen

Parameter	Ohne Anreicherung	Reduktion des Resuspensionsvolumens I
Sorbent	C18 Bond Elut, 100 mg Varian Inc., Agilent Technologies, Santa Clara, USA	
Aktivierung	MeOH	
Equilibrierung	DMSO/NH <sub>4</sub> OAc (1:20)	
Beladung	1 mL Stammlösung Modellsubstanzen ( je ca. 50 µg/mL)	
Waschen	Reinstwasser	
Elution	1 mL ACN/MeOH (1:3)	1 mL ACN/MeOH (1:3)
Eindampfen	60 °C	32 °C
Resuspension	1 mL DMSO/NH <sub>4</sub> OAc (1:1)	500 µL DMSO/NH <sub>4</sub> OAc (1:1)

### 7.5.3 Massenspektrometrische Untersuchungen

Alle massenspektrometrischen Daten wurden mit dem folgenden HPLC-(QTOF)MS-System erfasst.

**Tabelle 67: Daten zum HPLC-(QTOF)-MS-System**

<b>Komponente</b>	<b>Daten</b>
HPLC-System	1290 Infinity UHPLC Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Q-TOF-MS-System	6538 UHD Accurate-Mass Q-TOF Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Kompressor	SF2FF Atlas Copco, Stockholm, Schweden
Stickstoff-Generator	NGM cmc Instruments, Eschborn, Deutschland
PC-System	Intel® Xeon® W3520 2,66GHz, 8,0 GB RAM
Software	MassHunter Workstation Software Version: B05.01

In Tabelle 68 und Tabelle 69 sind die optimierten ESI- und APCI-Methoden gezeigt, die zum Vergleich der beiden Ionisierungsmethoden genutzt wurden. Die dargestellte APCI-Methode wurde ebenso für die gesamte massenspektrometrische Analytik der Ligninabbauprodukte verwendet. Bei allen Untersuchungen wurde die HPLC-Einheit ohne Säule betrieben, sodass die Substanz in den Eluenten injiziert wurde und direkt ins Massenspektrometer geleitet wurde. Weiterhin wurde während der gesamten Messzeit zur Gewährleistung der Massengenauigkeit eine Referenzlösung über ein separates Inlet in die Ionenquelle geleitet. Die Referenzlösung enthielt 10  $\mu\text{M}$  Purin und 2  $\mu\text{M}$  Hexakis(1H,1H,3H-tetrafluoropropoxy)phosphazin in Acetonitril/Wasser (95/5 v/v). Es wurden Spektren im positiven und im negativen Modus aufgenommen. Für jedes Lösungsmittelgemisch wurde zudem in beiden Modi ein Hintergrundspektrum bestimmt.

Bei der Probenvorbereitung wurden 10 mg der jeweiligen Reinsubstanzen, Ligninabbauprodukte sowie deren Fraktionen eingewogen und anschließend in 1 mL des Lösungsmittels gelöst. Gegebenenfalls wurde die Lösung zentrifugiert und ausschließlich der klare Überstand für die Analyse verwendet. Nach dem Lösungsvorgang wurde die Lösung je nach Endkonzentration verdünnt.

**Tabelle 68: Messparameter für die massenspektrometrische Analyse (ESI)**

<b>Parameter</b>	<b>ESI</b>	
Injektionslösemittel für wasserunlösliche Proben	MeOH/NH <sub>3</sub> (10mM) (50/50)	
Injektionslösemittel für wasserlösliche Proben	MeOH/H <sub>2</sub> O (50/50)	
Konzentration der Proben	10 µg/mL bei Modellsubstanzen 100 µg/mL bei Realproben	
Injektionsvolumen	10 µL	
Eluent	MeOH/H <sub>2</sub> O (50/50)	
Fluss	0,5 mL/min	
	<b>positiv</b>	<b>negativ</b>
Gastemperatur	300 °C	300 °C
Fluss Trocknungsgas (N <sub>2</sub> )	8 L/min	8 L/min
Zerstäuberdruck	35 psig	35 psig
Kapillarspannung	3500 V	3500 V
Fragmentierungsspannung	125 V	125 V
Skimmer Spannung	65 V	65 V
Octapol Spannung	750 V	750 V
Scanrate	1 spectra/s	1 spectra/s

**Tabelle 69: Messparameter für die massenspektrometrische Analyse (APCI)**

<b>Parameter</b>	<b>APCI</b>	
Injektionslösemittel für wasserunlösliche Proben	MeOH/NH <sub>3</sub> (10mM) (50/50)	
Injektionslösemittel für wasserlösliche Proben	MeOH/H <sub>2</sub> O (50/50)	
Konzentration der Proben	10 µg/mL bei Modellsubstanzen 100 µg/mL bei Realproben	
Injektionsvolumen	10 µL	
Eluent	MeOH/H <sub>2</sub> O (50/50)	
Fluss	0,5 mL/min	
	<b>positiv</b>	<b>negativ</b>
Gastemperatur	300 °C	300 °C

Verdampfungstemperatur	325 °C	350 °C
Fluss Trocknungsgas (N <sub>2</sub> )	6 L/min	4 L/min
Zerstäubedruck	20 psig	20 psig
Corona-Ladung	4 µA	20 µA
Kapillarspannung	3500 V	3500 V
Fragmentierungsspannung	125 V	125 V
Skimmer Spannung	65 V	65 V
Octapol Spannung	750 V	750 V
Scanrate	1 spectra/s	1 spectra/s

Die MS/MS-Experimente wurden mit Stickstoff als Kollisionsgas und mit Kollisionsenergien zwischen 1 und 30V durchgeführt. Die Einstellungen des Massenspektrometers und der Ionenquelle waren identisch mit denen der Direktinjektion.

#### HPLC-MS

Für die HPLC-MS Untersuchung wurde die Soxhlet-Fraktion nach Extraktion der Ligninsulfonate mit 100% Isopropanol verwendet. Die Probenkonzentration betrug 1 mg/mL. Zur Analyse wurde das Agilent-System (Tabelle 51) mit den in Tabelle 59 dargestellten Gradienten verwendet. Die massenspektrometrischen Einstellungen stimmten mit denen der Direktinjektion überein (Tabelle 69).

## 7.6 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien mit deren Hersteller bzw. Lieferanten sind in Tabelle 70 dargestellt.

**Tabelle 70: Chemikalienliste**

<b>Chemikalie/Reinheit</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
1,4-Dioxan $\geq 99,0\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
1-Methylimidazol 99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
1-Propanol HPLC-grade	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aceton HPLC-grade	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Acetonitril LC-MS grade	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ammoniak, 25 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumacetat $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ammoniumsulfat $\geq 99,0\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Anthron 97%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
API-TOF Reference Mass Solution Kit G1969-85001	Purin; Hexakis(1H,1H,3H-tetrafluoropropoxy)phosphazin), Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Arabinose (L+)- $\geq 99,0\%$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ba(OH) <sub>2</sub> *8 H <sub>2</sub> O $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Biotin $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA) $\geq 98\%$	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Brom reagent grade	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Chloroform Lichrosolv	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Deuteriertes Wasser	Deutero GmbH, Kastellaun, Deutschland
Deuteriochloroform	Deutero GmbH, Kastellaun, Deutschland
Dichlormethan HPLC-grade	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dicyclohexylamin 99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Diethylether	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dimethylformamid 99,8%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland



Dimethylsulfoxid $\geq 99,5\%$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid-d <sub>6</sub>	Deutero GmbH, Kastellaun, Deutschland
Eisen(II)-sulfat Heptahydrat $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Essigsäure 96%	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Essigsäureanhydrid $\geq 99\%$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol $\geq 99,8\%$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylacetat $\geq 99,5\%$	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Eugenol $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Galactose D(+) $\geq 98\%$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glucose Monohydrat D(+) $\geq 99,5\%$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Helium 5.0	Messer Industriegase GmbH, Bad Soden, Deutschland
Hexan	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Hydroxylamin Hydrochlorid 98%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
ICP Mehrelementstandardösung IV (1 g/L)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kaliumcarbonat 98%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat 98%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydroxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Kaliumperoxodisulfat $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Kationenaustauscher (Lewatit SP112)	Lanxess GmbH, Leverkusen, Deutschland
Lactose Monohydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumsulfat*7 H <sub>2</sub> O $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Malzextrakt	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mannose D(+) $\geq 99,5\%$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Methanol HPLC-grade	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Methanol MS-grade	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

## Experimenteller Teil

MSTFA (N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumborhydrid $\geq 97\%$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogensulfit 40%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumhydroxid $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumsulfat p.a.	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
n-Butanol $\geq 99,5\%$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pepton	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Petrolether	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Piperidin $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Pyridin wasserfrei	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Rhamnose $\geq 99\%$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Salpetersäure	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure 37%	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure, 96%	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Stickstoff	Messer Industriegase GmbH, Bad Soden, Deutschland
Stickstoff, flüssig	PRAXAIR GmbH Co. KG, Düsseldorf, Deutschland
Synthetische Luft 5.0	Messer Industriegase GmbH, Bad Soden, Deutschland
Tetrahydrofuran	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Toluol	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Vanillin 99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Veratrylalkohol 96%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Wasserstoff 5.0	Messer Industriegase GmbH, Bad Soden, Deutschland
Xylose (D+) $\geq 99\%$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zinksulfat*7 H <sub>2</sub> O $\geq 97\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Verwendete Kleingeräte und Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 71 aufgeführt.

**Tabelle 71: Verbrauchsmaterialien und Kleingeräte**

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	
Einmalspritzen Einmalinjektionskanüle	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter (Cellulose, 0,2 µm) (PTFE, 0,45 µm)	A-Z Analytik Zubehör GmbH, Langen, Deutschland
Faltenfilter (Typ 615)	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Einmalküvetten (1,5 mL)	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, Deutschland
Vials (1,5 mL) Deckel für Vials (PTFE)	A-Z Analytik Zubehör GmbH, Langen, Deutschland
Probefläschchen (4 mL) Schraubkappen Septen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NMR-Röhrchen Wilmad 507-PP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Eppis (Reaktionsgefäße 2 mL)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifugentubes 15 ml, 50 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Transferpipetten	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Extraktionshülsen (Cellulose) 22x80mm	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
<b>Kleingeräte</b>	
Grobwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Feinwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Pipetten	ABIMED GmbH, Langenfeld, Deutschland
Trockenschrank I	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Trockenschrank II	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SPE-Kammer	Phenomenex-STRATA
Reinstwasseranlage	TKA GenPure

# 8 Anhang

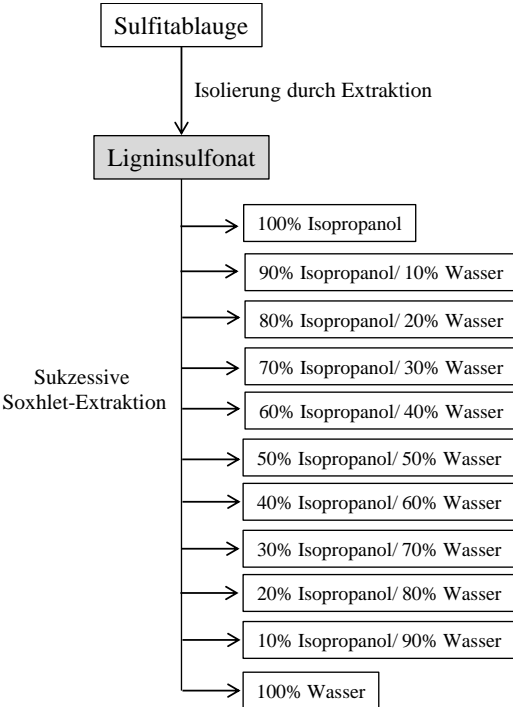


Abbildung 111: Übersicht über die Proben der Ligninsulfonate

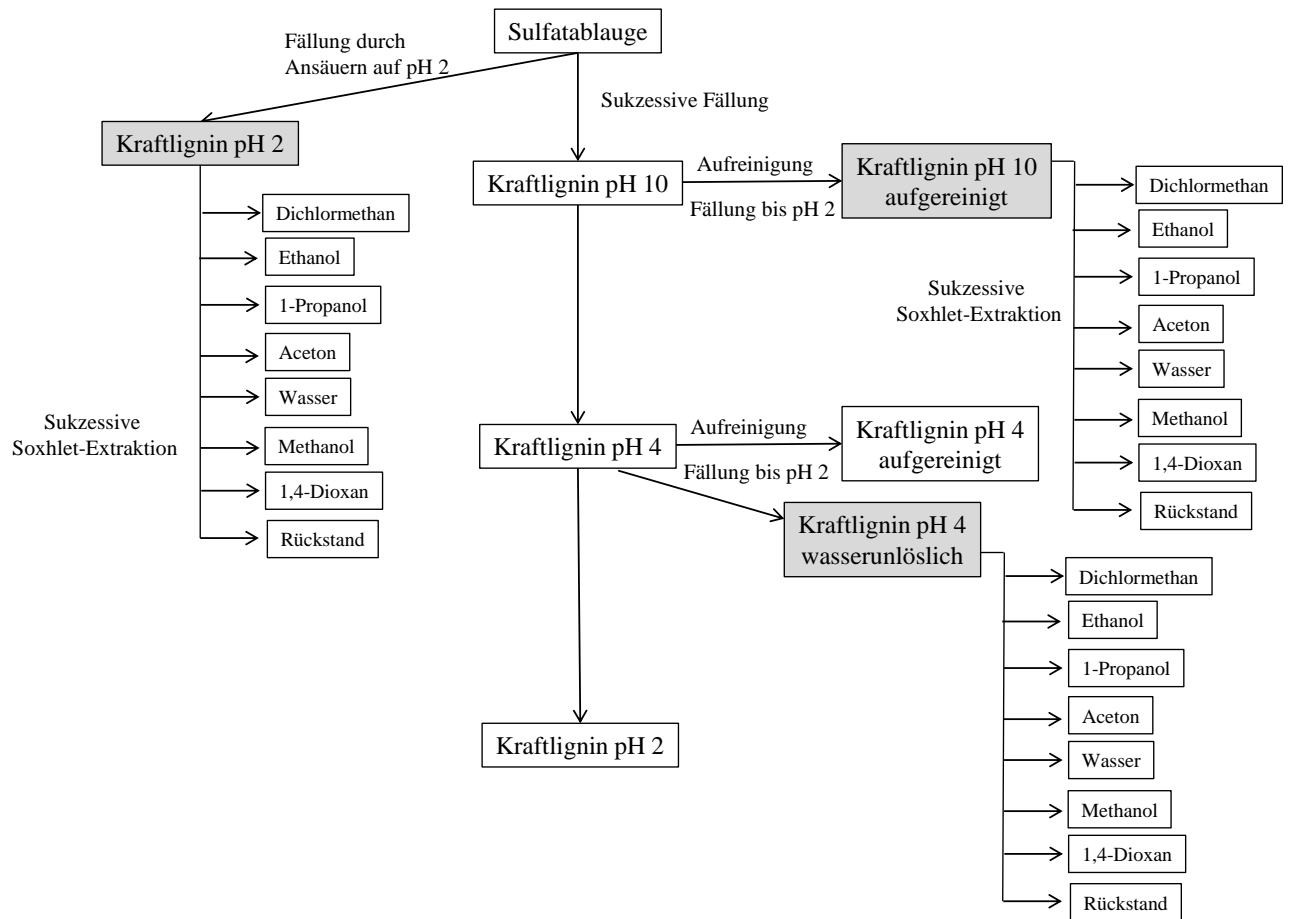


Abbildung 112: Übersicht über die Proben des Kraftlignins

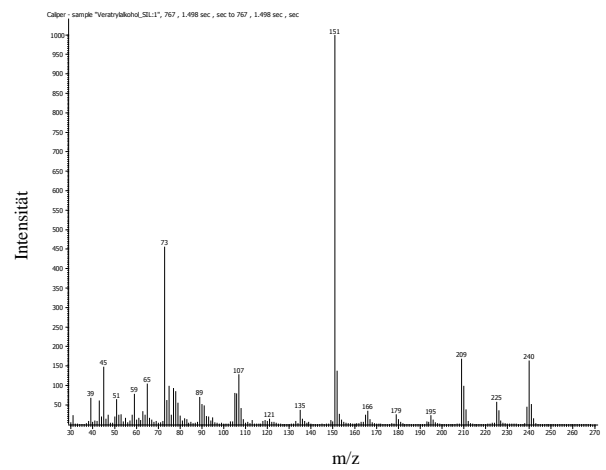
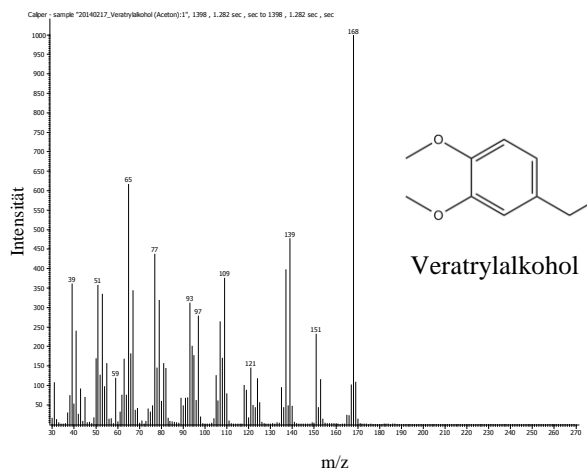
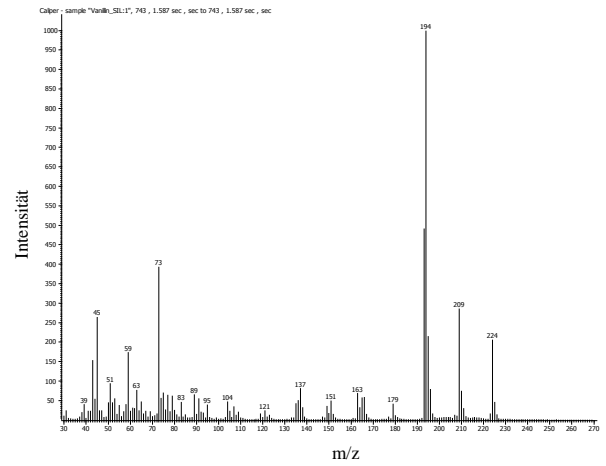
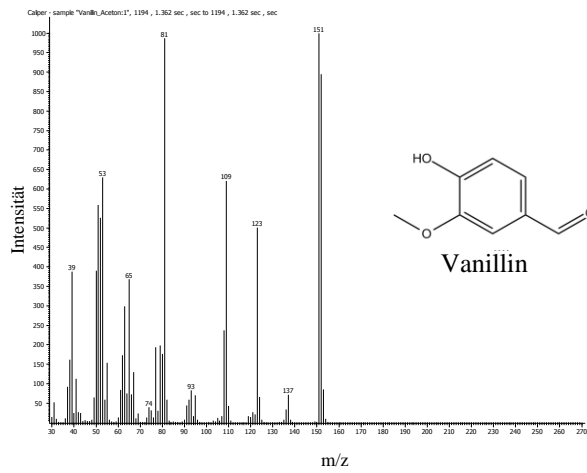
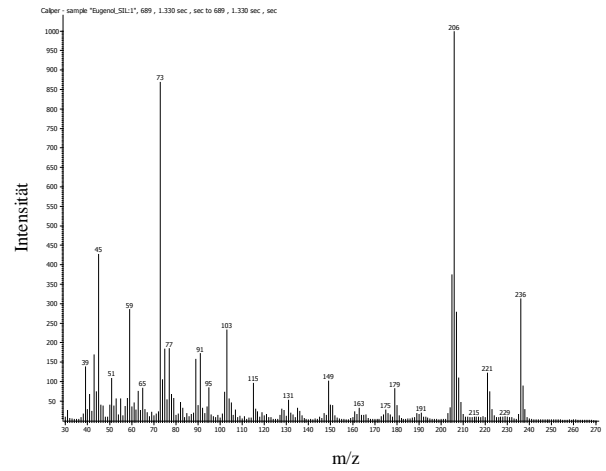
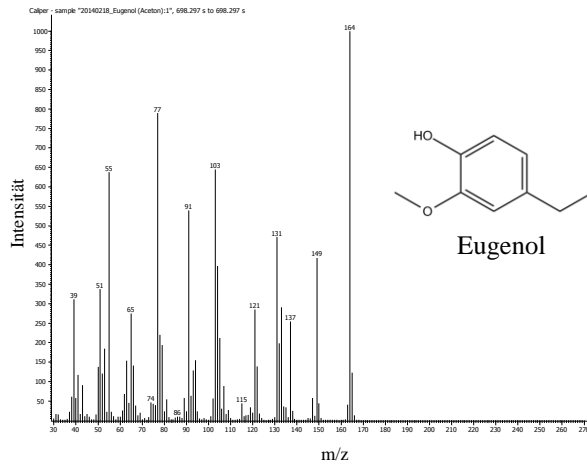
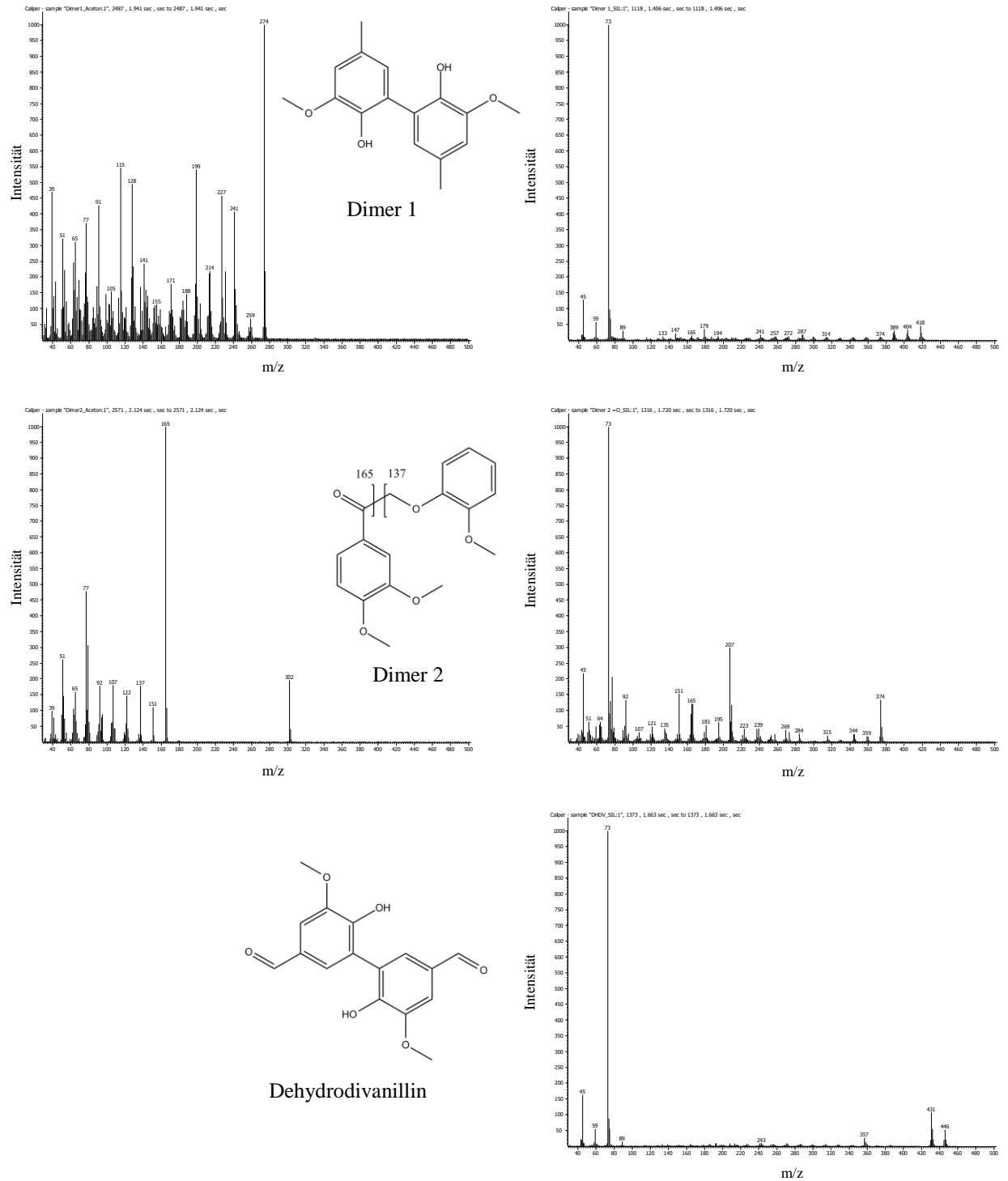


Abbildung 113: EI-Massenspektren der underivatisierten (links) und silylierten (rechts) monomeren Modellsubstanzen



**Abbildung 114: EI-Massenspektren der underivatisierten (links) und silylierten (rechts) dimeren Modellsubstanzen**

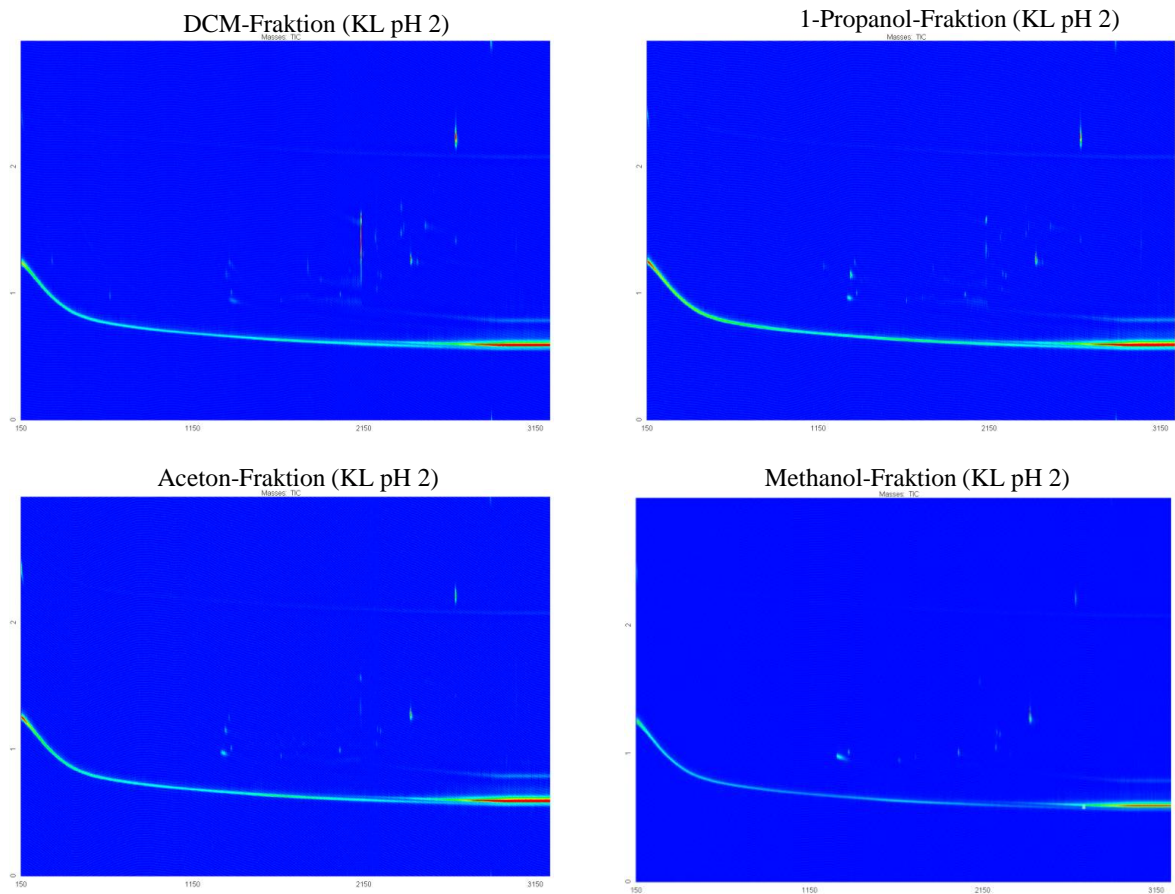


Abbildung 115: GCxGC-(TOF)MS-Chromatogramme ausgewählter Soxhlet-Extrakte des Kraftlignins



Tabelle 72: Übersicht über die detektierten Massen in den jeweiligen Soxhlet-Fractionen

m/z	Fraktion 1 (DCM)	Fraktion 2 (Ethanol)	Fraktion 3 (1- Propanol)	Fraktion 4 (Aceton)	Fraktion 6 (Methanol)	Fraktion 7 (1,4- Dioxan)
128 Da						
140 Da						
153 Da						
166 Da						
168 Da						
180 Da						
182 Da						
206 Da						
220 Da						
228 Da						
236 Da						
254 Da						
256 Da						
264 Da						
272 Da						
274 Da						
284 Da						
300 Da						
316 Da						
344 Da						

**Tabelle 73: Signale der isolierten Ligninsulfonate und ihre Zuordnung zu Summenformeln (Positiv-Modus)**

<b>m/z</b>	<b>Spezies</b>	<b>Mögliche Summenformel</b>	<b>Abweichung [ppm]</b>	<b>DBA</b>
137,0598	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	-0,69	5
163,0867	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	-1,51	6
167,0705	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	-1,38	5
179,0710	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	-4,1	6
193,0867	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	-4,06	6
195,1020	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	-2,21	5
209,0814	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	-2,71	6
247,0971	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	-2,5	8
341,1387	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	-1,03	11
401,1600	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub>	-1,3	11
417,1550	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> O <sub>8</sub>	-1,46	11

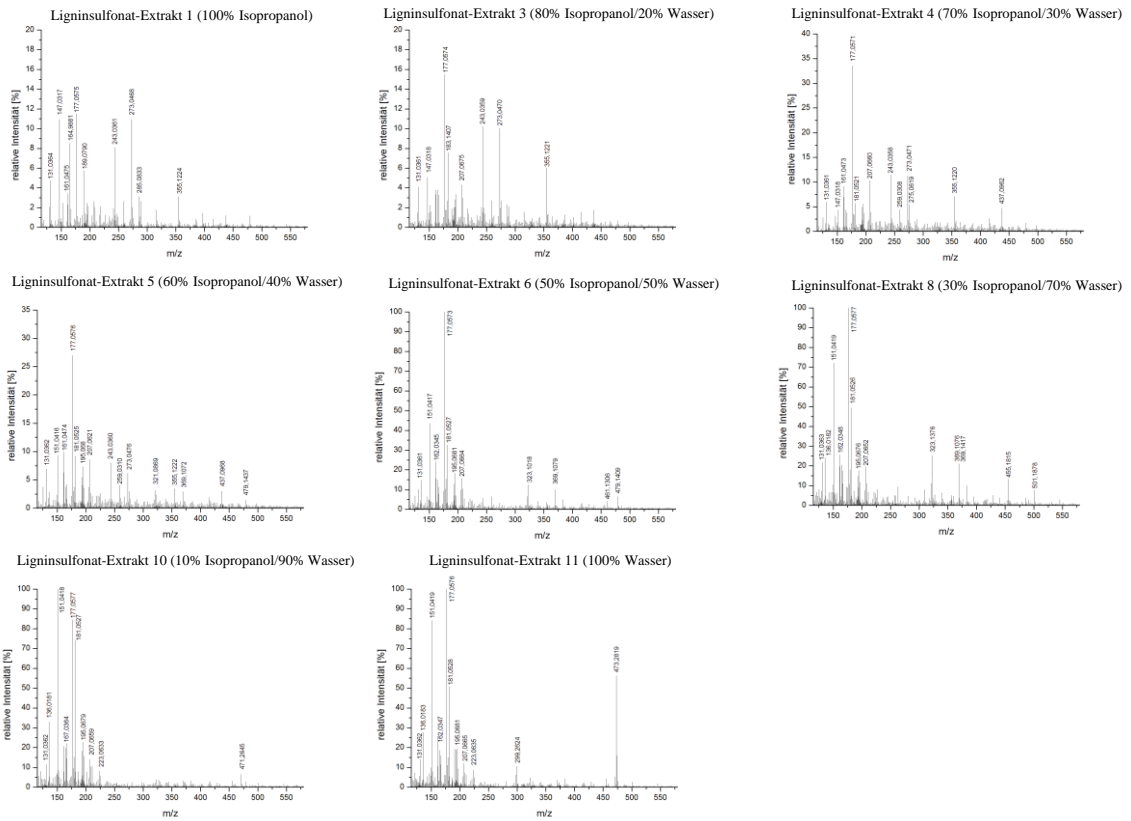


Abbildung 116: (-)APCI-Massenspektren der fraktionierten Ligninsulfonate

Tabelle 74: Signale der Soxhlet-Fractionen der isolierten Ligninsulfonate und ihre Zuordnung zu Summenformeln (Negativ-Modus)

m/z	Spezies	Mögliche Summenformel	Abweichung [ppm]	DBA
179,0724	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	-5,73	5
197,0474	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	-9,36	5
211,0632	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	-9,44	5
217,0895	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	-11,38	7
219,1031	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	-1,96	6
285,0833	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub> S	-10,77	5
315,0942	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub> S	-10,81	5
369,1417	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub> S	-10,72	6
397,1696	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub> S	-1,42	6
437,0956	[M-Na] <sup>-</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub> SO <sub>3</sub>	-10,1	10
471,2645	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>9</sub>	-9,62	5
473,2819	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>35</sub> H <sub>38</sub> O	6,51	17
487,2965	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>36</sub> H <sub>40</sub> O	8,48	17
693,5031	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>51</sub> H <sub>66</sub> O	1,43	19
767,5398	[M-Na] <sup>-</sup>	C <sub>51</sub> H <sub>76</sub> SO <sub>3</sub>	5,78	14
	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>54</sub> H <sub>72</sub> O <sub>3</sub>	1,39	19

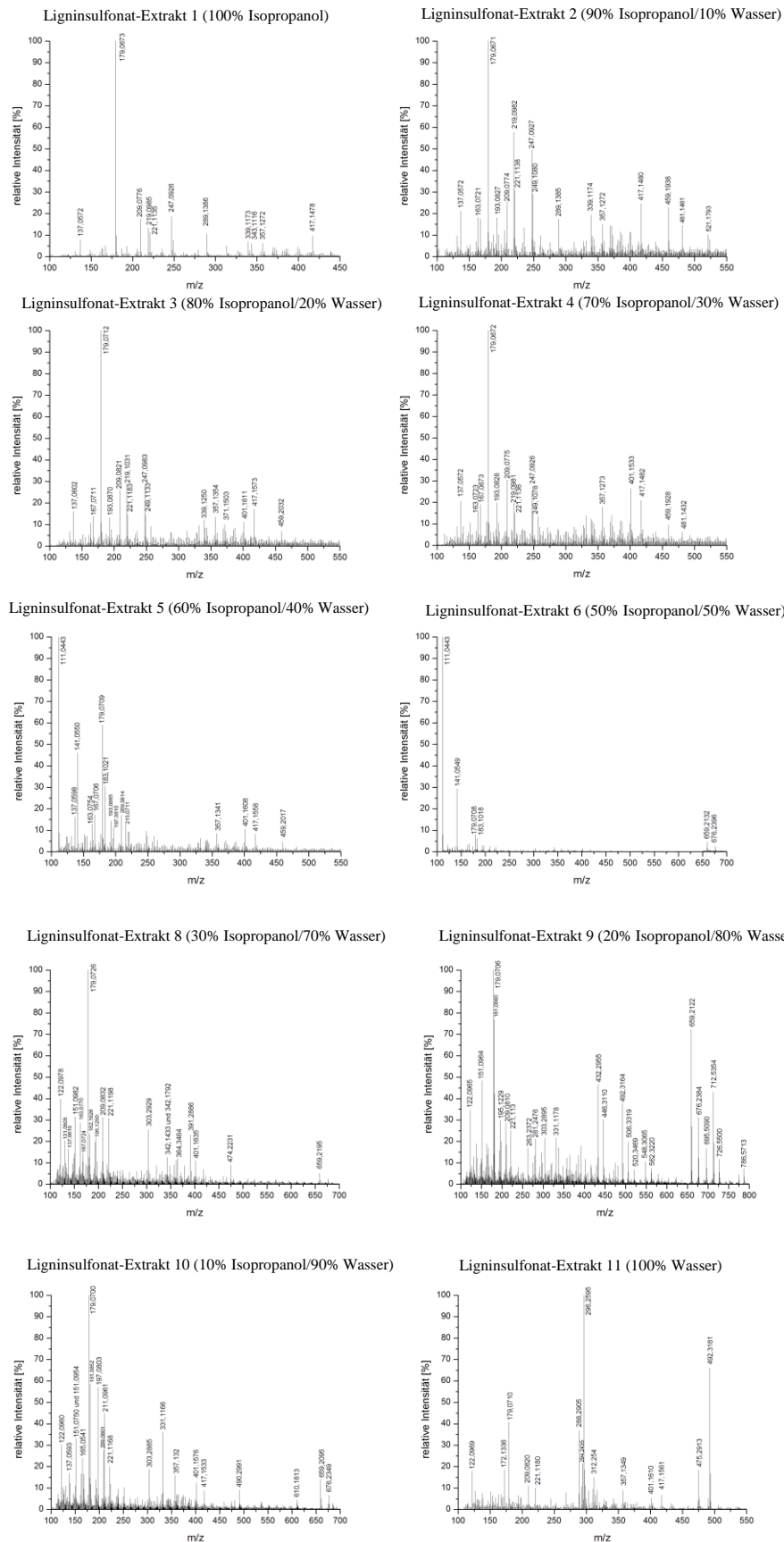


Abbildung 117: (+)APCI-Massenspektren der fraktionierten Ligninsulfonate

**Tabelle 75: Signale der Soxhlet-Fractionen der isolierten Ligninsulfonate und ihre Zuordnung zu Summenformeln (Positiv-Modus)**

<b>m/z</b>	<b>Spezies</b>	<b>Mögliche Summenformel</b>	<b>Abweichung [ppm]</b>	<b>DBA</b>
111,0443	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	-2,22	4
122,0965	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub>	-0,71	5
131,0505	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O	-10,45	7
139,0755	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	-1,04	4
141,0550	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	-2,71	4
149,0249	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	-10,67	7
151,0753	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	0,37	5
165,0541	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	3,17	6
181,086	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	-0,44	5
183,1021	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	-2,91	4
197,081	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	-0,84	5
208,1361	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	-15,23	6
211,0967	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	-1,02	5
215,0711	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	-3,87	9
219,1031	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	-7,01	7
221,1183	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	-4,9	6
223,0958	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	3,09	6
249,1133	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	-4,69	7
251,1271	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	2,74	6
331,1178	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	-0,56	10
339,125	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	-6,8	12
357,1272	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>16</sub> O	0,54	20
357,1354	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	-6	11
369,1276	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>28</sub> H <sub>16</sub> O	-0,57	21
371,1421	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>28</sub> H <sub>18</sub> O	2,54	20
371,1503	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	-3,74	11
385,1562	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>20</sub> O	6,49	20

387,1369	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>28</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	2,74	20
391,2843	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	-0,04	6
399,1714	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>22</sub> O	7,39	20
401,1524	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	3,01	20
401,1611	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub>	-4,05	11
432,2955	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>38</sub> O <sub>7</sub>	0,19	4
459,1938	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>32</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	3,65	20
481,1461	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub> S	1,47	19
492,3164	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>24</sub> H <sub>42</sub> O <sub>9</sub>	0,65	4
521,1793	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>28</sub> O <sub>9</sub>	2,52	16
659,2122	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>36</sub> H <sub>34</sub> O <sub>12</sub>	0,16	20
676,2384	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>		0,69	
695,5090	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>40</sub> H <sub>70</sub> O <sub>9</sub>	0,37	6
712,5299	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>		0,59	
786,5713	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>43</sub> H <sub>76</sub> O <sub>11</sub>	1,68	6
	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>50</sub> H <sub>72</sub> O <sub>6</sub>	-5,97	15

Tabelle 76: Signale des isolierten Kraftlignins und ihre Zuordnung zu Summenformeln (Negativ-Modus)

m/z	Spezies	Mögliche Summenformel	Abweichung [ppm]	DBA
103,0406	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	-5,12	1
121,0300	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	-4,07	5
133,051	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	-2,74	1
149,0608	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	0,02	5
150,0331	[M-CH <sub>3</sub> -H] <sup>-</sup>	siehe 165,0546		
151,0402	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	-0,87	5
161,0466	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	-6,5	2
165,0546	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	6,73	5
177,0563	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	-3,27	6
179,0696	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	9,82	5
299,2022	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	-1,82	7
301,2178	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	-1,64	6



Tabelle 77: Signale des isolierten Kraftlignins und ihre Zuordnung zu Summenformeln (Positiv-Modus)

m/z	Spezies	Mögliche Summenformel	Abweichung [ppm]	DBA
131,0500	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O	-6,6	7
134,0818	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	-5,43	2
137,0606	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	-6,57	5
151,0764	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	-6,96	5
152,0724	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	-13,39	6
163,0765	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	-7,06	6
166,0877	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	-9,76	6
167,0826	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub>	17,62	9
175,0769	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	-8,87	7
202,0879	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	-8,94	9
233,1172	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	-7,23	7
274,1096	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	-8,65	10
302,1054	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	-10,92	11
324,1251	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	-6,75	13
344,1515	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	-6,9	11
362,1623	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	-7,22	10
374,1619	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	-5,86	11

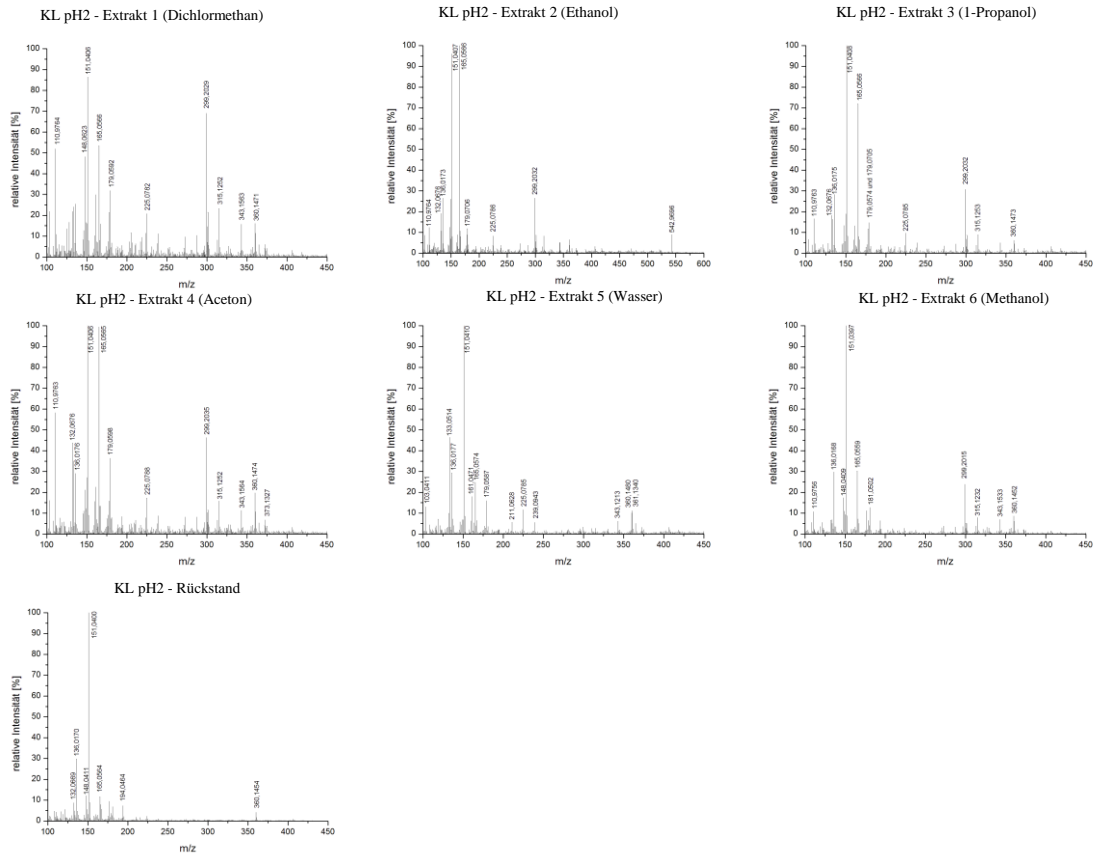


Abbildung 118: (-)APCI-Massenspektren des fraktionierten Kraftlignins (pH2)

**Tabelle 78: Signale der Soxhlet-Fractionen des isolierten Kraftlignins und ihre Zuordnung zu Summenformeln (Negativ-Modus)**

<b>m/z</b>	<b>Spezies</b>	<b>Mögliche Summenformel</b>	<b>Abweichung [ppm]</b>	<b>DBA</b>
119,0363	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	-10,98	1
167,0362	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	-7,25	5
181,0502	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	2,37	5
225,0782	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	-5,98	5
235,1711	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	-3,16	4
315,1252	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	-4,44	9
343,1563	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>	-3,49	9
361,1654	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub>	0,72	8
373,1327	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	-9,15	10
542,9696	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>8</sub> O <sub>17</sub>	-1,34	19

**Tabelle 79: Signale der Soxhlet-Fractionen des isolierten Kraftlignins und ihre Zuordnung zu Summenformeln (Positiv-Modus)**

<b>m/z</b>	<b>Spezies</b>	<b>Mögliche Summenformel</b>	<b>Abweichung [ppm]</b>	<b>DBA</b>
112,0755	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O	2,02	4
114,0555	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	-5,68	4
130,0502	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	-2,95	4
142,0506	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	-5,89	5
144,0660	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	-3,81	4
178,0866	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	-2,16	7
179,0726	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	-13,08	6
182,0819	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	-4,45	6
189,0915	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	-2,63	7
194,0822	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	-5,85	7
195,1192	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub>	-12,23	9
196,097	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	-1,01	6
217,0835	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	11,2	8
220,0983	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	-7,33	8
259,0983	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	-7,03	9
287,0917	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	-1,05	10
294,2427	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	0,2	5
296,2586	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	-0,7	4
317,1393	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	-3	9
325,1276	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	1,79	7
329,1405	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	-6,55	10
341,1399	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	-4,56	11
363,1628	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	-10,26	13
376,1746	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	2,41	10
512,2271	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>28</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	1,61	14

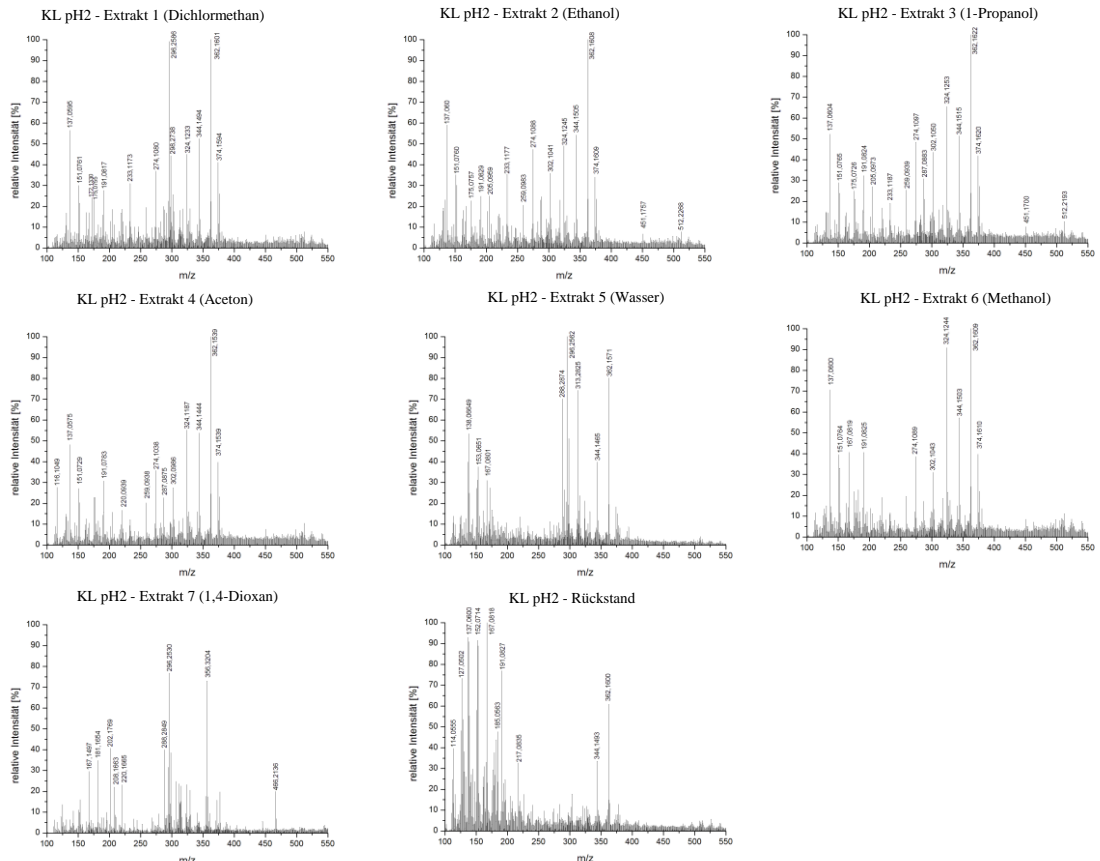


Abbildung 119: (+)APCI-Massenspektren des fraktionierten Kraftlignins (pH2)

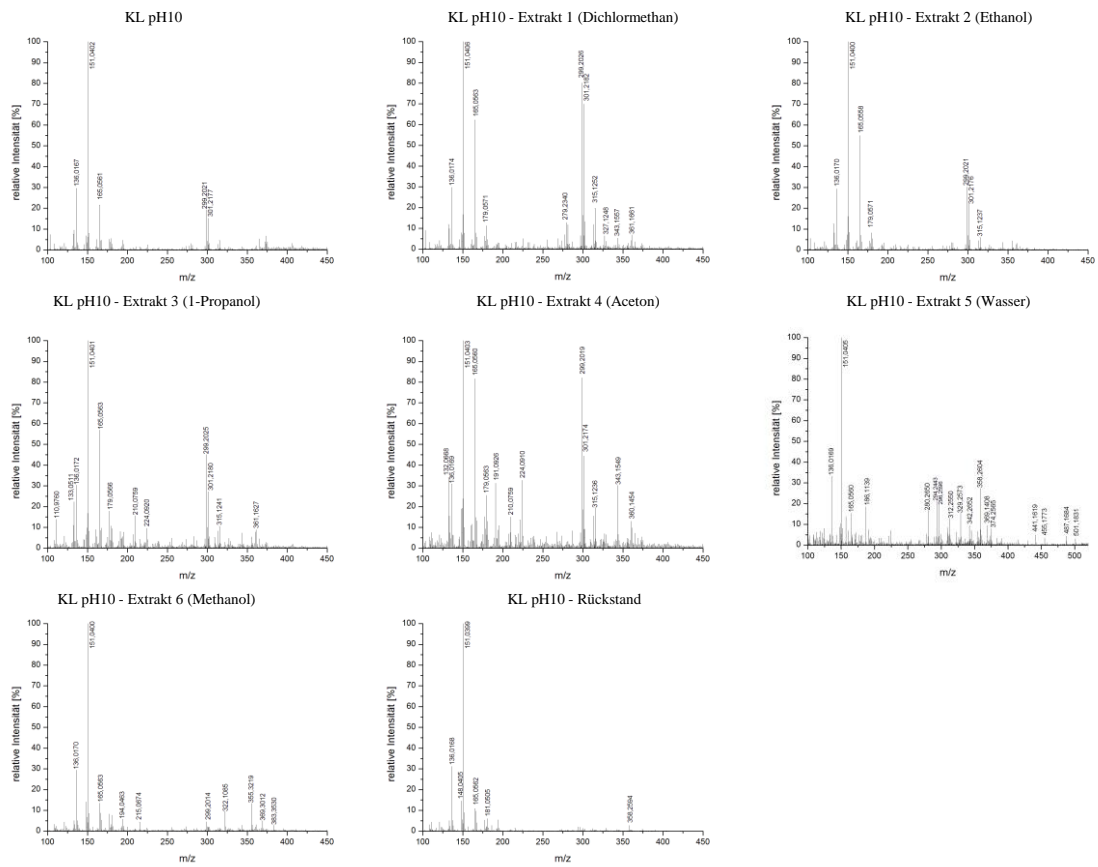


Abbildung 120: (-)APCI-Massenspektren des fraktionierten Kraftlignins (pH10)

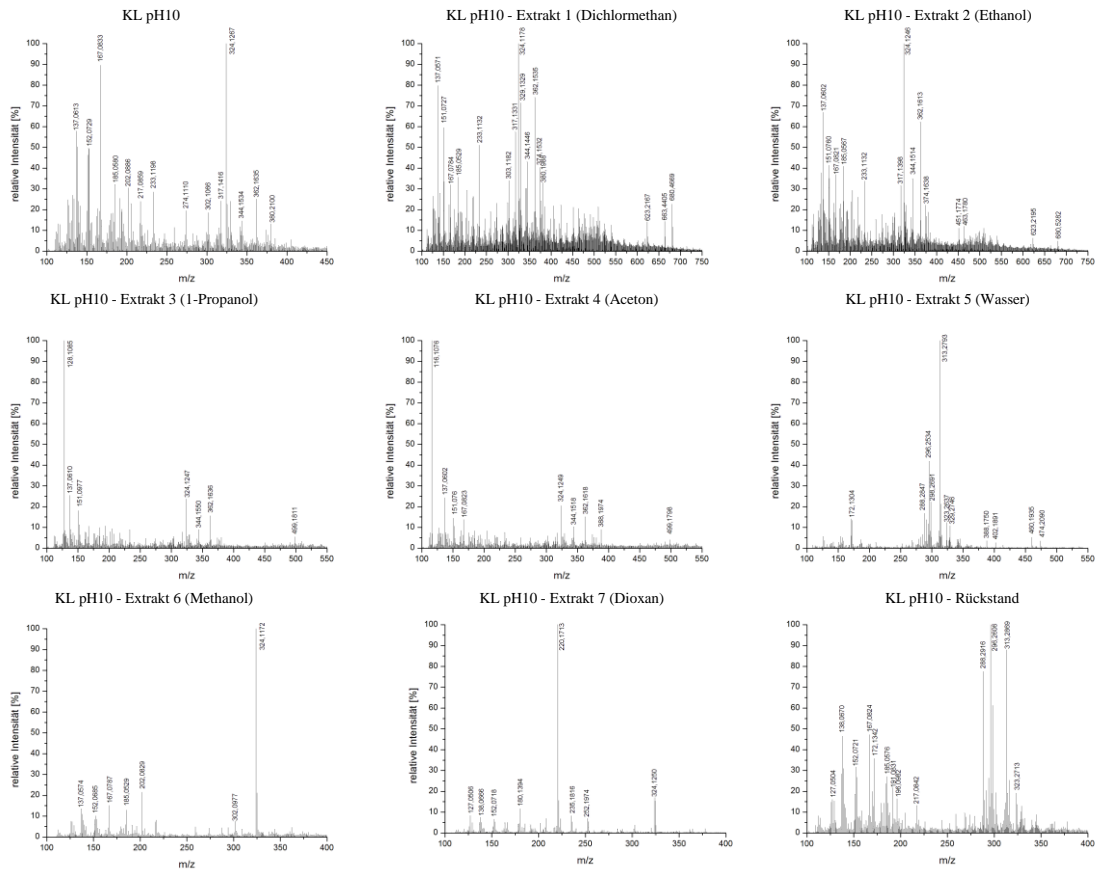


Abbildung 121: (+)APCI-Massenspektren des fraktionierten Kraftlignins (pH10)

**Tabelle 80: Signale der Soxhlet-Extrakte von KL pH 10 und KL pH 4 und ihre Zuordnung zu Summenformeln (Negativ-Modus)**

<b>m/z</b>	<b>Spezies</b>	<b>Mögliche Summenformel</b>	<b>Abweichung [ppm]</b>	<b>DBA</b>
181,0868	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	1,2	4
195,0662	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	0,42	5
203,0707	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	3,27	7
217,0866	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	1,92	7
219,1755	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	-0,28	4
231,1020	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	2,88	7
233,0274	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub>	12,35	4
233,1566	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	-8,1	5
235,1713	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	-4,01	4
249,1867	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	-2,78	4
251,1659	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	-2,51	4
255,2328	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	0,6	1
283,2629	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	4,76	1
297,1851	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	3,03	8
301,0710	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	2,52	10
301,1070	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	3,8	9
313,1826	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	-5,35	8
315,1980	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	-4,53	7
317,2112	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	3,2	6
343,1179	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	2,36	10
355,1178	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	2,56	11
357,1335	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	2,41	10
365,1028	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	0,72	13
423,3282	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	-3,17	8



Tabelle 81: Signale der Soxhlet-Extrakte von KL pH 10 und KL pH 4 und ihre Zuordnung zu Summenformeln (Positiv-Modus)

m/z	Spezies	Mögliche Summenformel	Abweichung [ppm]	DBA
126,0888	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O	23,51	4
128,1085	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O	-13,71	3
149,0239	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	-3,92	7
151,0369	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	13,8	6
155,1039	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	17,89	3
164,1080	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O	-6,91	6
168,0668	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	-8,53	6
170,1185	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	-6,21	4
177,0885	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	14,23	6
180,0647	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	5,06	7
180,1395	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O	-7,46	5
185,0580	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	9,27	9
205,0986	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub>	12,63	11
219,0986	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	13,62	7
219,1758	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	-6,68	5
220,1710	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O	-6,97	6
222,1859	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O	-3,23	5
278,249	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> O	-4,45	5
279,2287	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	11,35	4
301,1107	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>	-12,16	10
316,1145	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	11,57	11
331,1139	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	11,25	10
343,1546	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	-1,75	10
345,1362	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	-8,53	10
357,1309	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	6,64	11

## Anhang

375,1558	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	8,78	14
380,2100	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub>	-8,93	8
383,1450	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	10,24	12
391,2859	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	-4,14	6
411,3627	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>46</sub> O	-1,36	7
413,3777	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	0,22	6
430,4042	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>		0,34	
441,3735	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	-1,8	7
446,3997	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	-1,04	6
460,1935	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub>	7,00	12
499,1798	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> O <sub>12</sub>	2,41	9
505,1787	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	-4,74	3
524,2157	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>16</sub>	5,55	2
554,2272	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>17</sub>	3,5	2
623,2167	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>26</sub> H <sub>38</sub> O <sub>17</sub>	2,37	8
663,4405	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>45</sub> H <sub>58</sub> O <sub>4</sub>	0,43	17
680,4669	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>		0,66	

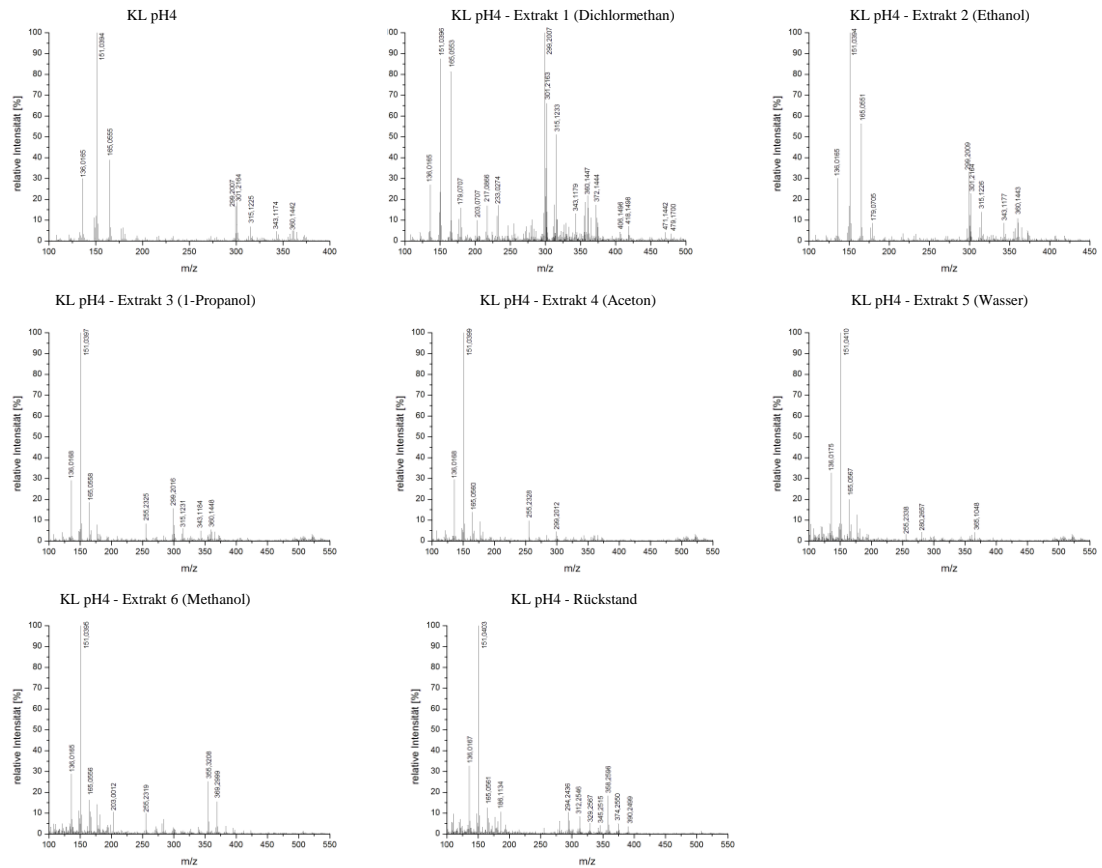


Abbildung 122: (-)APCI-Massenspektren des fraktionierten Kraftlignins (pH4)

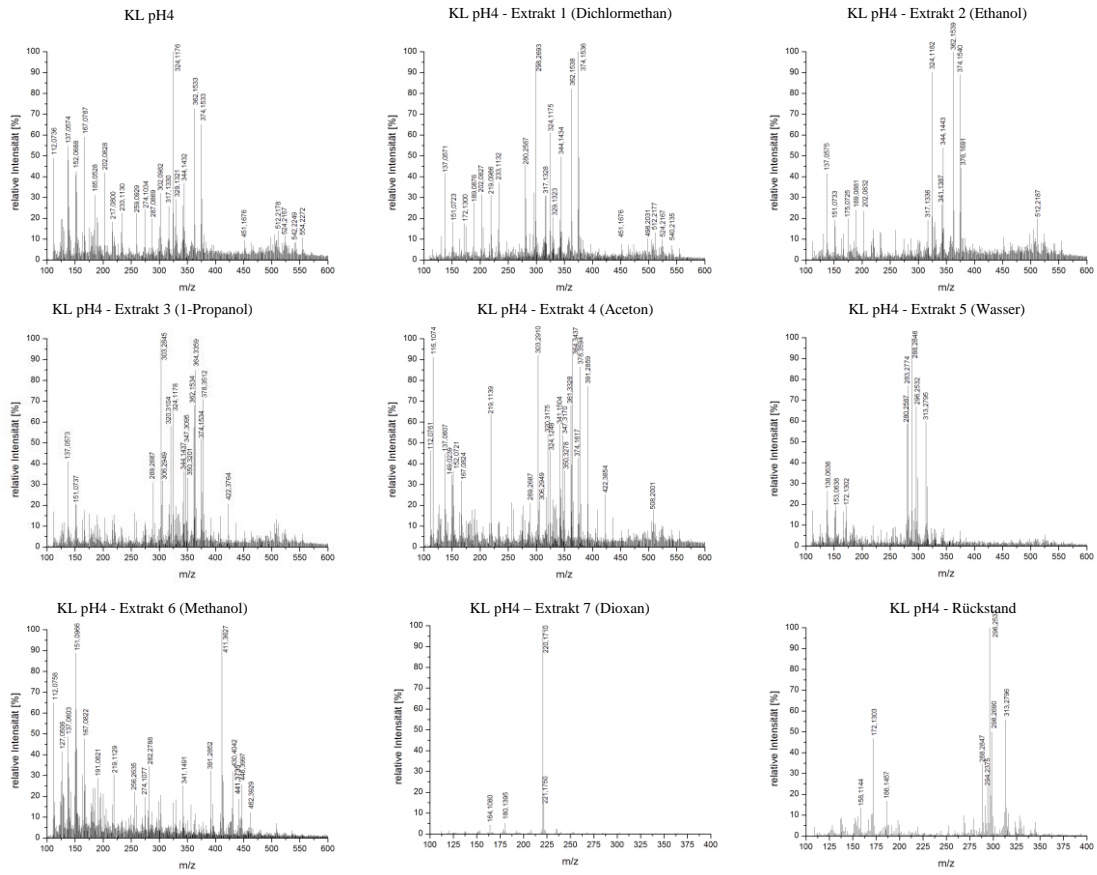


Abbildung 123: (+)APCI-Massenspektren des fraktionierten Kraftlignins (pH4)

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ausschnitt aus dem Cellulosepolymer (1,4-verknüpfte $\beta$ -D-Glucopyranose) [13].....	5
Abbildung 2: Bildung des resonanzstabilisierten Radikals zur Polymerisierung der Monolignole bei der Ligninbiosynthese [24] .....	6
Abbildung 3: Struktur des Catechols und der Protocatechusäure [14].....	7
Abbildung 4: Struktur der Monolignole (p-Cumarylalkohol, Coniferylalkohol, Sinapylalkohol) [11,14,25].....	8
Abbildung 5: Strukturmodell für Lignin (von Nimz) [34] .....	9
Abbildung 6: Schematische Darstellung der linearen Ligninstruktur (Milled Wood Lignin) Teil 1 [35].....	10
Abbildung 7: Schematische Darstellung der linearen Ligninstruktur (Milled Wood Lignin) Teil 2[35].....	11
Abbildung 8: Nomenklatur für monomere und dimere Struktureinheiten des Lignins [24].....	11
Abbildung 9: Verknüpfungsmöglichkeiten der Struktureinheiten im nativen Lignin [38,41] .....	12
Abbildung 10: Kombination der oben gezeigten Bindungsarten [42,43].....	13
Abbildung 11: Schematischer Ablauf des Sulfitverfahrens [15].....	18
Abbildung 12: Bildung des Benzylum-Kations bei dem sauren Sulfitaufschluss und anschließender Sulfonierung (R= Alkyl, Aryl, H) [55].....	19
Abbildung 13: Reaktion von $\beta$ -O-4'-Strukturen bei dem Sulfitaufschluss mit der Möglichkeit der Sulfonierung und Kondensation [56,57].....	19
Abbildung 14: Kondensationsreaktionen des reaktiven Benzylum-Kations [56].....	20
Abbildung 15: Spaltung der $\beta$ -O-4'-Bindung bei dem Sulfitaufschluss [55,56].....	20
Abbildung 16: Sulfonierung von Coniferyleinheiten (Aldehydstruktur) [55].....	21
Abbildung 17: Abbau von Pentosen und Hexosen unter sauren Bedingungen.....	21
Abbildung 18: Kondensation der Abbauprodukte der Zucker mit Lignineinheiten.....	21
Abbildung 19: Aromatische Verbindungen als Abbauprodukte der Zucker [63] .....	22
Abbildung 20: Reaktion von Hexuronsäuren bei dem Sulfatverfahren [37].....	22
Abbildung 21: Schema zum Sulfataufschluss [15,68] .....	24
Abbildung 22: Bildung des Quinonmethid-Intermediates [57].....	26

Abbildung 23: $\beta$ -O-4'-Spaltung durch Addition von Nucleophilen (Hydrogensulfid) [56,57,69] .....	27
Abbildung 24: Eliminierungsreaktionen am Intermediat [56,57] .....	27
Abbildung 25: Primäre Kondensationsreaktion bei dem Sulfataufschluss [69] .....	28
Abbildung 26: Sekundäre Kondensationsreaktion bei dem Sulfataufschluss [69] .....	28
Abbildung 27: Kondensationsprodukte bei dem Sulfataufschluss [69] .....	29
Abbildung 28: Demethylierung an Methoxygruppen [56,57] .....	29
Abbildung 29: Elektronentransfer und Reduktion [74] .....	30
Abbildung 30: $\beta$ -O-4'-Spaltung an nichtphenolischen Struktureinheiten [56,69] .....	30
Abbildung 31: $\beta$ -O-4'-Spaltung an $\alpha$ -Carbonyl-Verbindungen [55,56,69] .....	30
Abbildung 32: Mittels GC-MS nachgewiesene Hauptmonomere [128,129] .....	38
Abbildung 33: Struktur einer von Hauptert et al. identifizierten Substanz [134] .....	39
Abbildung 34: Struktur eines von Evtuguin et al. postulierte Trimers [137] .....	40
Abbildung 35: Haupt- und Nebenprodukte der Derivatisierung von Glucose zum Aldonitrilacetat [144] .....	46
Abbildung 36: GC-FID Chromatogramm von Monosacchariden nach Derivatisierung zu den Aldonitrilacetaten .....	46
Abbildung 37: Verlauf der Zucker- und Ethanolkonzentration der Fermentation von Glucose ( <i>S. cerevisiae</i> ) .....	48
Abbildung 38: Vergleich der Ethanolbildung und des Glucoseabbaus bei der Fermentation der Ablauge (50%ig) .....	49
Abbildung 39: GCxGC-Chromatogramm ausgewählter Modellsubstanzen (silyliert); 1=Eugenol, 2 und 4= Vanillinderivate, 3= Veratrylalkohol, 5= Dimer 1, 6= Dimer 2, 7 und 8 = Dehydrodivanillin-Derivate .....	56
Abbildung 40: EI-Massenspektren der underivatisierten (links) und silylierten (rechts) Vanillins .....	57
Abbildung 41: Fragmentbildung des Vanillins (EI-Spektrum) .....	57
Abbildung 42: EI-Massenspektren der underivatisierten (links) und silylierten (rechts) Dimer 1 und Dimer 2 .....	58
Abbildung 43: Reaktionsschema zur Protonierung und Silylierung einer sulfonierten Verbindung .....	59
Abbildung 44: GCxGC-Chromatogramm der silylierten Ligninsulfonate .....	60
Abbildung 45: GCxGC-Chromatogramm der protonierten und silylierten Ligninsulfonate .....	60

---

Abbildung 46: Identifizierte Struktur zu $m/z=194$ Da im Ligninsulfonat (GCxGC-MS).....	63
Abbildung 47: GCxGC-Chromatogramm des underivatisierten und silylierten Kraftlignins.....	63
Abbildung 48: GCxGC-Chromatogramme (nicht derivatisiert) der Ethanol-Fraktion und der 1,4-Dioxan-Fraktion aus der stufenweisen Extraktion vom gefällten Kraftlignin (pH 2).....	68
Abbildung 49: EI-Massenspektren von Vanillin.....	69
Abbildung 50: EI-Massenspektren von Peak 1 der Ethanol-Fraktion (underivatisiert).....	69
Abbildung 51: EI-Massenspektrum von Peak 5 der Ethanol-Fraktion (underivatisiert).....	70
Abbildung 52: LC-Chromatogramme ausgewählter Modellsubstanzen (Fluss= 0,4mL/min); Links: RP18-Phase (Reprosil-Pur Basic C18-HD 5 $\mu$ m, 250mmx4,6mm ID); Rechts: Phenyl-Phase (Reprosil-Pur Phenyl 5 $\mu$ m, 250mmx4,6mm ID).....	73
Abbildung 53: LC-Chromatogramm ausgewählter Modellsubstanzen (ACE Excel 5 Super C18 5 $\mu$ m, 150mmx4,6mm ID; Fluss= 0,8mL/min).....	75
Abbildung 54: LC-Chromatogramm ausgewählter Modellsubstanzen (Supelco Discovery C18 5 $\mu$ m, 150mmx4,6mm ID; Fluss 0,8mL/min).....	75
Abbildung 55: LC-Chromatogramm der isolierten Ligninsulfonate (Supelco Discovery C18 5 $\mu$ m, 150mmx4,6mm ID; Fluss 0,8mL/min).....	76
Abbildung 56: LC-Chromatogramme der Ligninsulfonate und dessen Fraktionen (Supelco Discovery C18 5 $\mu$ m, 150mmx4,6mm ID; Fluss 0,8mL/min; 10 $\mu$ L Injektionsvolumen).....	78
Abbildung 57: LC-Chromatogramm der isolierten Ligninsulfonate (Supelco Discovery C18 5 $\mu$ m, 150mmx4,6mm ID; Fluss 0,8mL/min; Stufengradient).....	79
Abbildung 58: Versuchsaufbau zur offline LCxLC-Analytik.....	80
Abbildung 59: LC-Chromatogramm der isolierten Ligninsulfonate (Supelco Discovery C18 5 $\mu$ m, 150mmx4,6mm ID; Fluss 0,8mL/min); Die gesammelte Fraktion ist in rot markiert.....	80
Abbildung 60: LC-Chromatogramme der Fraktion mit verschiedenen Eluentenzusammensetzungen (Dr. Maisch Reprospher HILIC-P, 5 $\mu$ m, 250x4,6mm ID).....	81
Abbildung 61: LC-Chromatogramme des isolierten Kraftlignins nach vollständiger Fällung bis pH 2; (ACE Excel 5 Super C18, 5 $\mu$ m, 150mmx4,6mm ID).....	83

Abbildung 62: LC-Chromatogramm des isolierten Kraftlignins (Fluss 0,8mL/min; Stufengradient); (ACE Excel 5 Super C18, 5µm, 150mmx4,6mm ID).....	83
Abbildung 63: Chromatogramme der isolierten und fraktionierten Ligninsulfonate (Fraktion: 100% Isopropanol) mit Detektion mittels DAD und mittels massenspektrometrischer Detektion im Positiv-Modus.....	85
Abbildung 64: Übersicht über die allgemeine Vorgehensweise der Festphasenextraktion und Probenahme.....	86
Abbildung 65: Vergleich verschiedener Sorbentien zur Festphasenextraktion von Dehydrodivanillin .....	88
Abbildung 66: Vergleich verschiedener Elutionsmittel zur Festphasenextraktion von Dehydrodivanillin .....	89
Abbildung 67: Vergleich verschiedener Elutionsmittel-Gemische zur Festphasenextraktion von Dehydrodivanillin .....	90
Abbildung 68: Wiederfindungsrate bei Verringerung des Elutionsvolumens (n=aufgegebenes Probevolumen).....	92
Abbildung 69: Wiederfindung bei der Anreicherung über die Verringerung des Resuspensions-volumens .....	93
Abbildung 70: Festphasenextraktion eines Gemisches aus Modellsubstanzen (ohne Anreicherung) .....	94
Abbildung 71: Festphasenextraktion eines Gemisches aus Modellsubstanzen (mit Anreicherung) .....	95
Abbildung 72: Übersicht über Ionisationsmethoden in Abhängigkeit von der Molaren Masse und der Polarität der Analyten nach [157].....	97
Abbildung 73: Methodenoptimierung der Ionisierung mittels APCI (Negativ-Modus) durch Änderung verschiedener Parameter (Gastemperatur, Verdampfertemperatur, Gasfluss).....	98
Abbildung 74: Fragmentierung des Trimers und Tetramers bei der massenspektrometrischen Analyse.....	102
Abbildung 75: MS/MS-Spektren von Dimer 2 (Positiv-Modus, 1V) und von der sulfonierten Modell-substanz (Negativ-Modus, 15V) .....	105
Abbildung 76: Fragmentierung von Dimer 2.....	106
Abbildung 77: Massenspektren (Negativ- und Positiv-Modus) von Gemischen der Modellsubstanzen.....	107



---

Abbildung 78: Massenspektren (Negativ- und Positiv-Modus) der isolierten Ligninsulfonate.....	109
Abbildung 79: Chinon-Methid-Umlagerung an einer phenolischen Substanz [131].....	111
Abbildung 80: MS/MS-Spektren von $m/z=245$ und $m/z=275$ aus den isolierten Ligninsulfonaten (Negativ-Modus, 15V).....	112
Abbildung 81: MS/MS-Spektren von $m/z=415$ aus den isolierten Ligninsulfonaten (Negativ-Modus, 20V).....	112
Abbildung 82: Massenspektren (Negativ-Modus) der isolierten und fraktionierten Ligninsulfonate (Extrakt 2 (links) und Extrakt 9 (rechts)).....	113
Abbildung 83: Negative mode ESI-MS spectrum of Black Liquor Lignin isolated from black liquor after 94.4% delignification of eucalypt wood, mit Genehmigung von P.C. Pinto et al. (2002). Copyright 2002 by Marcel Dekker. Inc. All rights reserved [135].....	115
Abbildung 84: Strukturvorschläge für die Summenformeln mit vier Doppelbindungsäquivalenten.....	116
Abbildung 85: Strukturvorschläge für die Summenformeln mit fünf bis sieben Doppelbindungsäquivalenten.....	117
Abbildung 86: Strukturvorschläge für die Summenformeln mit Sulfonsäuregruppe.....	118
Abbildung 87: Strukturvorschläge für die Summenformeln von dimeren Verbindungen.....	119
Abbildung 88: Massenspektren (Negativ- und Positiv-Modus) des isolierten Kraftlignins (pH 2).....	120
Abbildung 89: Strukturen der Dehydroabietinsäure und der Abietinsäure.....	121
Abbildung 90: Massenspektrum (Negativ-Modus) der Abietinsäure.....	121
Abbildung 91: Massenspektren (Negativ-Modus) der 1,4-Dioxan-Fraktion von KL pH 2, KL pH 10 und KL pH 4.....	122
Abbildung 92: Mögliche Struktur für die Substanz mit $m/z= 219$ Da (2,4-Di-tert-butyl-m-Cresol).....	123
Abbildung 93: Beispielstruktur für ein substituiertes Phenanthrendion.....	124
Abbildung 94: Beispielstrukturen für ein carboxyliertes Phenanthren (links) und ein Steroidderivat (rechts).....	124
Abbildung 95: Phthalat-Grundstruktur.....	124
Abbildung 96: Strukturvorschläge für die bestimmten Summenformeln mit ein bis zwei Doppelbindungsäquivalenten.....	125
Abbildung 97: Strukturvorschläge für Furanderivate (vier Doppelbindungsäquivalente).....	125

Abbildung 98: Strukturvorschläge für Monomerverbindungen (fünf bis sieben Doppelbindungsäquivalente).....	127
Abbildung 99: Strukturvorschläge für Dimere (acht bis elf Doppelbindungsäquivalente) .....	128
Abbildung 100: Strukturvorschläge für Trimere (12 bis 14 Doppelbindungsäquivalente) .....	129
Abbildung 101: Strukturvorschläge für kondensierte Aromaten .....	130
Abbildung 102: Allgemeine Struktur der qualifizierten Ligninabbauprodukte .....	131
Abbildung 103: Uniformierung von Ligninabbauprodukten mittels Hydrierung .....	133
Abbildung 104: Reaktionsschema zur Silylierung von Monosacchariden [172].....	144
Abbildung 105: Reaktionsschema zur Alditolacetat-Bildung von Monosacchariden [173] .....	145
Abbildung 106: Reaktionsschema zur Aldonitrilacetat-Bildung von Monosacchariden.....	146
Abbildung 107: Synthese der sulfonierten Modellsubstanz (Natrium-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-methansulfonat [174,175] .....	150
Abbildung 108: Synthese von Dehydrodivanillin nach Elbs <i>et al.</i> [176].....	151
Abbildung 109: Synthese des Trimers nach [177–179] .....	152
Abbildung 110: Synthese des Tetramers.....	155
Abbildung 111: Übersicht über die Proben der Ligninsulfonate .....	178
Abbildung 112: Übersicht über die Proben des Kraftlignins .....	179
Abbildung 113: EI-Massenspektren der underivatisierten (links) und silylierten (rechts) monomeren Modellsubstanzen.....	180
Abbildung 114: EI-Massenspektren der underivatisierten (links) und silylierten (rechts) dimeren Modellsubstanzen.....	181
Abbildung 115: GCxGC-(TOF)MS-Chromatogramme ausgewählter Soxhlet-Extrakte des Kraftlignins .....	182
Abbildung 116: (-)APCI-Massenspektren der fraktionierten Ligninsulfonate .....	185
Abbildung 117: (+)APCI-Massenspektren der fraktionierten Ligninsulfonate .....	187
Abbildung 118: (-)APCI-Massenspektren der fraktionierten Kraftlignins (pH2).....	192
Abbildung 119: (+)APCI-Massenspektren der fraktionierten Kraftlignins (pH2).....	195
Abbildung 120: (-)APCI-Massenspektren der fraktionierten Kraftlignins (pH10).....	196
Abbildung 121: (+)APCI-Massenspektren der fraktionierten Kraftlignins (pH10).....	197
Abbildung 122: (-)APCI-Massenspektren der fraktionierten Kraftlignins (pH4).....	201
Abbildung 123: (+)APCI-Massenspektren der fraktionierten Kraftlignins (pH4).....	202

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung verschiedener Hölzer [2] .....	4
Tabelle 2: Anteile der nichtglucosidischen Monosaccharide in verschiedenen Hölzern (Man= Mannose, Xyl= Xylose, Gal= Galactose, Ara= Arabinose, Rha= Rhamnose) [17,18] .....	5
Tabelle 3: Anteile der Monolignole in Nadelholz, Laubholz und Gras [24].....	8
Tabelle 4: Häufigkeit der Verknüpfungen im Lignin von Nadel- und Laubholz [24,34,38,41] .....	12
Tabelle 5: Globale Zellstoffproduktion der verschiedenen Aufschlussarten bei der Zellstoffproduktion (Stand: 2000) [37] .....	13
Tabelle 6: Nutzung der verschiedenen Zellstoffarten zur Papierherstellung in Deutschland (Stand: 2013) [47].....	14
Tabelle 7: Einteilung der verschiedenen Sulfitverfahren nach ihrem pH-Wert [15,37] .....	17
Tabelle 8: Zusammensetzung von Ablaugen aus dem Sulfitverfahren (% bezogen auf Trocken-substanz) [2,15,65].....	23
Tabelle 9: Zusammensetzung der Harzsäuren im Nadelholz und im Tallharz [2] .....	25
Tabelle 10: Zusammensetzung der Sulfatablauge (mit Kiefer als Ausgangsholz) [65] .....	31
Tabelle 11: Nutzungsmöglichkeiten von Lignin und dessen Abbauprodukten [1,15,51,79–83,85,88] .....	33
Tabelle 12: Eigenschaften der Sulfit- und Sulfatablauge (TS = bezogen auf Trockensubstanz).....	43
Tabelle 13: Leichtflüchtige Substanzen in Sulfit- und Sulfatablauge .....	44
Tabelle 14: Vergleich verschiedener Derivatisierungsmethoden zur gaschromatographischen Analytik der Monosaccharide.....	45
Tabelle 15: Monosaccharidzusammensetzung in der Sulfatablauge.....	47
Tabelle 16: Peakanzahl in den Chromatogrammen nach Extraktion der Ablaugen mit Ethylacetat und Diethylether .....	50
Tabelle 17: Extraktstoffe in Sulfit- und Sulfatablauge n=1-2 .....	51
Tabelle 18: Übersicht über die monomeren Modellsubstanzen .....	53
Tabelle 19: Übersicht über die dimeren Modellsubstanzen .....	54
Tabelle 20: Übersicht über die trimere und tetramere Modellsubstanz.....	54

Tabelle 21: Gravimetrische Bestimmung und visuelle Beurteilung der Soxhlet-Extrakte der Ligninsulfonate (sukzessive Extraktion).....	61
Tabelle 22: Ausbeuten bei der fraktionierten Fällung des Kraftlignins aus der Sulfatablauge (ohne Aufreinigung).....	65
Tabelle 23: Übersicht über die verwendeten Bezeichnungen bei der Analytik der Proben.....	65
Tabelle 24: Einzelextraktionen des isolierten Kraftlignins (KL pH 2) .....	66
Tabelle 25: Gravimetrische Bestimmung und visuelle Beurteilung der Soxhlet-Extrakte der Kraftlignin-Fractionen (sukzessive Extraktion).....	67
Tabelle 26: Peakzuordnung der Ethanol-Fraktion und 1,4-Dioxan-Fraktion aus der stufenweisen Extraktion vom gefällten Kraftlignin (pH 2).....	68
Tabelle 27: Übersicht über die identifizierten Ligninabbauprodukte mittels GCxGC-(TOF)MS (Kraftlignin) .....	71
Tabelle 28: Reproduzierbarkeit der Quantifizierung mittels HPLC-DAD (ohne Festphasenextraktion) .....	87
Tabelle 29: Reproduzierbarkeit der Festphasenextraktion und anschließender Probenaufarbeitung .....	87
Tabelle 30: Reproduzierbarkeit der optimierten Methode zur Festphasenextraktion .....	91
Tabelle 31: Optimierte APCI und ESI-Methoden (Positiv- und Negativ-Modus).....	99
Tabelle 32: Vergleich der Ionisationsmodi anhand von Dehydrodivanillin mittels ESI und APCI.....	99
Tabelle 33: Vergleich der Ionisierung von Vanillin und Dehydrodivanillin mittels ESI und APCI (Negativ-Modus).....	100
Tabelle 34: Vergleich der kleinsten Konzentrationen von Vanillin und Dehydrodivanillin, die mittels APCI-MS bestimmt werden kann .....	100
Tabelle 35: Massenspektrometrische Analyse der Modellsubstanzen (APCI- positiv und negativ).....	101
Tabelle 36: Abweichungen der Präzisionsmassen der Modellsubstanzen (DBA= Doppelbindungs-äquivalente) .....	103
Tabelle 37: MS/MS-Untersuchungen der Modellsubstanzen .....	104
Tabelle 38: Prozentuale Signalintensität des Trimers (bezogen auf das höchste Signal) in den gespikten Realproben .....	107
Tabelle 39: Signale der isolierten Ligninsulfonate und ihre Zuordnung zu Summenformeln (Negativ-Modus) .....	110

Tabelle 40: Signale der Soxhlet-Fractionen der isolierten Ligninsulfonate und ihre Zuordnung zu Summenformeln (Negativ-Modus).....	114
Tabelle 41: Signale der Soxhlet-Fractionen der isolierten Ligninsulfonate und ihre Zuordnung zu Summenformeln (Positiv-Modus) .....	114
Tabelle 42: Anzahl der identifizierten Verbindungsklassen in den Ligninsulfonaten und im Kraftlignin .....	131
Tabelle 43: Nutzungsmöglichkeiten der Endprodukte aus der petrochemischen Industrie [170] .....	134
Tabelle 44: Kationenbestimmung mittels ICP-OES.....	141
Tabelle 45: Geräteparameter zum GCxGC-(TOF)-MS-System zur Analytik der Extraktstoffe in den Ablaugen.....	142
Tabelle 46: HS-GC-MS-Analytik der Ablaugen .....	143
Tabelle 47: Gaschromatographische Einstellung zur Analytik der Monosaccharide (GC- FID) .....	143
Tabelle 48: Zusammensetzung der Nährmedien zur Anzucht der Hefen.....	148
Tabelle 49: Gaschromatographische Einstellung zur Analytik des bei der Fermentation gebildeten Ethanol (HS-GC-FID) .....	148
Tabelle 50: Geräteparameter zum GCxGC-(TOF)-MS-System zur Analytik der Ligninabbauprodukte.....	157
Tabelle 51: Daten zum Agilent-System .....	159
Tabelle 52: Daten zum Shimadzu-System.....	159
Tabelle 53: HPLC-Methode zum Vergleich der Säulen.....	160
Tabelle 54: Optimierter Gradient für die Analytik von Modellsubstanzen mit der RP18- Phase.....	161
Tabelle 55: Optimierter Gradient für die Analytik von Modellsubstanzen mit der Phenyl- Phase.....	161
Tabelle 56: HPLC-Methode zur Analytik bei pH 10,7 .....	162
Tabelle 57: Optimierter Gradient für die Analytik von Modellsubstanzen mit der ACE- C18-Phase.....	162
Tabelle 58: HPLC-Methode zum Analytik der wasserlöslichen Modellsubstanzen .....	163
Tabelle 59: Linearer Gradient zur Analyse der Ligninsulfonate .....	164
Tabelle 60: Stufengradient zur Analyse der Ligninsulfonate .....	164
Tabelle 61: Linearer Gradient zur Analyse des Kraftlignins.....	165
Tabelle 62: Stufengradient zur Analyse des Kraftlignins.....	165

Tabelle 63: HPLC-Methode zur Fraktionierung der Ligninsulfonate.....	166
Tabelle 64: isokratische HPLC-Methoden zur Analyik der HPLC-Fraktion (Versuche 1-3) .....	166
Tabelle 65: Isokratische Methode zur Quantifizierung des Deyhydrodivanillins.....	168
Tabelle 66: Gradient zur Quantifizierung des Gemisches aus Modellsubstanzen .....	168
Tabelle 67: Daten zum HPLC-(QTOF)-MS-System .....	171
Tabelle 68: Messparameter für die massenspektrometrische Analyse (ESI).....	172
Tabelle 69: Messparameter für die massenspektrometrische Analyse (APCI).....	172
Tabelle 70: Chemikalienliste.....	174
Tabelle 71: Verbrauchsmaterialien und Kleingeräte.....	177
Tabelle 72: Übersicht über die detektierten Massen in den jeweiligen Soxhlet-Fractionen....	183
Tabelle 73: Signale der isolierten Ligninsulfonate und ihre Zuordnung zu Summenformeln (Positiv-Modus).....	184
Tabelle 74: Signale der Soxhlet-Fractionen der isolierten Ligninsulfonate und ihre Zuordnung zu Summenformeln (Negativ-Modus).....	186
Tabelle 75: Signale der Soxhlet-Fractionen der isolierten Ligninsulfonate und ihre Zuordnung zu Summenformeln (Positiv-Modus) .....	188
Tabelle 76: Signale des isolierten Kraftlignins und ihre Zuordnung zu Summenformeln (Negativ-Modus) .....	190
Tabelle 77: Signale des isolierten Kraftlignins und ihre Zuordnung zu Summenformeln (Positiv-Modus).....	191
Tabelle 78: Signale der Soxhlet-Fractionen des isolierten Kraftlignins und ihre Zuordnung zu Summenformeln (Negativ-Modus).....	193
Tabelle 79: Signale der Soxhlet-Fractionen des isolierten Kraftlignins und ihre Zuordnung zu Summenformeln (Positiv-Modus) .....	194
Tabelle 80: Signale der Soxhlet-Extrakte von KL pH 10 und KL pH 4 und ihre Zuordnung zu Summenformeln (Negativ-Modus).....	198
Tabelle 81: Signale der Soxhlet-Extrakte von KL pH 10 und KL pH 4 und ihre Zuordnung zu Summenformeln (Positiv-Modus) .....	199

---

## 11 Literaturverzeichnis

- [1] O. Türk, Stoffliche Nutzung nachwachsender Rohstoffe: Grundlagen - Werkstoffe - Anwendungen, Springer, Wiesbaden, **2014**.
- [2] E. Sjöström, Wood chemistry: Fundamentals and applications, 2. Aufl., Academic Press, San Diego, **1993**.
- [3] T. Hirth, Lignin als Aromatenquelle in Gülzower Fachgespräche (Hrsg.: Fachagentur Nachwachsender Rohstoffe e.V), Gülzow, **2009**, 197–223.
- [4] W. O. Doherty, P. Mousavioun; Fellows, Christopher M., Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers, *Industrial Crops and Products*, **2011**, 33(2), 259–276.
- [5] D. Thrän, D. Pfeiffer, S. Narra (Hrsg.) Energetische Biomassenutzung-Neue Technologien und Konzepte für die Bioenergie der Zukunft, Erzeugung von Bioagglomeraten auf der Basis ligninhaltiger Ablaugen der Papier und Zellstoffindustrie, **2012**.
- [6] J. Puls, Lignin - Verfügbarkeit, Markt und Verwendung: Perspektiven für schwefelfreie Lignine in Gülzower Fachgespräche (Hrsg.: Fachagentur Nachwachsender Rohstoffe e.V), Gülzow, **2009**, 18–42.
- [7] J. E. Holladay, Top Value-Added Chemicals from Biomass - Volume II-Results of Screening for Potential Candidates from Biorefinery Lignin, Pacific Northwest National Laboratory, **2007**.
- [8] GDCH, DECHEMA; DGMK; VCI, Positionspapier: Rohstoffbasis im Wandel, **2010**.
- [9] T. Hirth, Prozesszentrum für die stoffliche Nutzung nachwachsender Rohstoffe, Fraunhofer-Zentrum für chemisch-biotechnologische Prozesse CBP.
- [10] S. A. Rydholm, Pulping processes, R.E. Krieger, Malabar, **1965**.
- [11] G. Krüger, Lignin- seine Bedeutung und Biogenese, *Chemie in unserer Zeit*, **1976**, 10(1), 21–29.
- [12] D. Dimmel, Overview in Lignin and lignans: Advances in chemistry (Hrsg.: C. Heitner, D. Dimmel, J. A. Schmidt), Taylor & Francis, Boca Raton, **2010**, 1–10.
- [13] E. Sjöström, U. Westermark, Chemical Composition of Wood and Pulps: Basic Constituents and their Distribution in Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping, and Papermaking (Hrsg.: E. Sjöström, R. Alèn), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, **1999**.

- [14] E. Adler, Lignin Chemistry - Past, Present and Future, *Wood Science and Technology*, **1977**, *11*(3), 169–218.
- [15] J. Blechschmidt, Taschenbuch der Papiertechnik, Carl Hanser Verlag, Leipzig, **2010**.
- [16] K. G. Forss, K.-E. Fremer, The nature and reactions of lignin - a new paradigm, Oy Nord Print Ab, Helsinki, **2003**.
- [17] D. Fengel, Polyoses (Hemicelluloses) in Wood-Chemistry, Ultrastructure, Reactions (Hrsg.: D. Fengel, G. Wegener), Walter de Gruyter, Berlin, New York, **1989**, 106–131.
- [18] D. Fengel, G. Wegener; Heizmann, A.; Przyklenk, M., Analysis of wood and cellulose by total hydrolysis with trifluoroacetic acid, *Cellul. Chem. Technol.*, **1978**, *12*(1), 31–7.
- [19] K. S. Ritter, Lignocellulose: A complex biomaterial, *Chemical and Engineering News*, **2008**, *86*(49), 15.
- [20] H. Erdtman, Lignins: Occurrence, formation, structure and reactions, *J. Polym. Sci. B Polym. Lett.*, **1972**, *10*(3), 228–230.
- [21] K.-E. L. Eriksson, Lignin Biodegradation in Lignin and lignans: Advances in chemistry (Hrsg.: C. Heitner, D. Dimmel, J. A. Schmidt), Taylor & Francis, Boca Raton, **2010**, 495–520.
- [22] T. Higuchi, Biochemistry and molecular biology of wood, Springer, Berlin, **1997**.
- [23] M. Hofrichter (Hrsg.) Biopolymers, *Vol. 1*, Lignin, humic substances and coal, **2001**, Wiley-VCH, Weinheim.
- [24] G. Henriksson, Lignin in Pulp and paper chemistry and technology, *Vol. 1* (Hrsg.: M. Ek, G. Gellerstedt, G. Henriksson), de Gruyter, Stockholm, **2009**.
- [25] K. Freudenberg, A. C. Neish, Constitution and biosynthesis of lignin, Springer, New York, **1968**.
- [26] W. J. Schubert, Lignin Biochemistry, Academic Press, New York, London, **1965**.
- [27] K. Freudenberg, Biosynthesis and Constitution of Lignin, *Nature*, **1959**, *183*(4669), 1152–1155.
- [28] K. V. Sarkanen, Lignin precursors and their polymerization in Lignins: Occurrence, Formation and Reactions (Hrsg.: K. V. Sarkanen, C. W. Ludwig), Wiley Interscience, New York, **1971**, 95–163.
- [29] S. Reale, A. Di Tullio; Spreti, N.; Angelis, F. de, Mass spectrometry in the biosynthetic and structural investigation of lignins, *Mass Spectrometry Reviews*, **2004**, *23*(2), 87–126.



- [30] V. Burlat, M. Kwon; Davin, Laurence B.; Lewis, Norman G., Dirigent proteins and dirigent sites in lignifying tissues, *Phytochemistry*, **2001**, 57(6), 883–897.
- [31] D. R. Gang, M. A. Costa; Fujita, Masayuki; Dinkova-Kostova, Albena T.; Wang, Huai-Bin; Burlat, Vincent; Martin, William; Sarkanen, Simo; Davin, Laurence B.; Lewis, Norman G., Regiochemical control of monolignol radical coupling: A new paradigm for lignin and lignan biosynthesis, *Chemistry & Biology*, **1999**, 6(3), 143–151.
- [32] L. B. Davin, N. G. Lewis, Lignin primary structures and dirigent sites, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2005**, 16(4), 407–415.
- [33] R. Vanholme, B. Demedts; Morreel, Kris; Ralph, John; Boerjan, Wout, Update on Lignin biosynthesis and structure, *Plant Physiol.*, **2010**, 153(3), 895–905.
- [34] H. Nimz, Beech Lignin - Proposal of A Constitutional Scheme, *Angewandte Chemie-International Edition in English*, **1974**, 13(5), 313–321.
- [35] C. Crestini, Milled Wood Lignin: A linear Oligomer, *Biomacromolecules*, **2011**, 12, 3928–3935.
- [36] J. Banoub, G.-H. Delmas; Joly, Nicolas; Mackenzie, Grahame; Cachet, Nadja; Benjelloun-Mlayah, Bouchra; Delmas, Michel, A critique on the structural analysis of lignins and application of novel tandem mass spectrometric strategies to determine lignin sequencing, *J Mass Spectrom*, **2015**, 50(1), 5–48.
- [37] H. Sixta, Handbook of Pulp, I, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
- [38] M. Erickson, S. Larsson; Miksche, G. E., Analysis Using Gas-Chromatography of Lignin Oxidation-Products .8. Structure of Spruce Lignin, *Acta Chemica Scandinavica*, **1973**, 27(3), 903–914.
- [39] M. Ek, G. Gellerstedt, G. Henriksson (Hrsg.) Pulp and paper chemistry and technology, Vol. 1, Wood Chemistry and Wood Biotechnology, **2009**, de Gruyter, Stockholm.
- [40] P. Azadi, O. R. Inderwildi; Farnood, Ramin; King, David A., Liquid fuels, hydrogen and chemicals from lignin: A critical review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **2013**, 21, 506–523.
- [41] M. P. Pandey, C. S. Kim, Lignin Depolymerization and Conversion: A Review of Thermochemical Methods, *Chem. Eng. Technol.*, **2011**, 34(1), 29–41.
- [42] C. Lapierre, Determining Lignin Structure by Chemical Degradations in Lignin and lignans: Advances in chemistry (Hrsg.: C. Heitner, D. Dimmel, J. A. Schmidt), Taylor & Francis, Boca Raton, **2010**, 11–48.

- [43] J. Ralph, K. Lundquist; Brunow, Gösta, Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids, *Phytochemistry Reviews*, **2004**, 3(1/2), 29–60.
- [44] O. V. Ingruber, Sulfite science & technology, v. 4, Joint Textbook Committee of the Paper Industry, TAPPI, Atlanta, GA, **1985**.
- [45] M. Arppe, Holzstoff-Zukunfts-oder Auslaufmodell?, *Das Papier*, **2001**(10), 45–50.
- [46] J. E. Atchison, Twenty-five years of global progress in nonwood plant fiber repulping, *Tappi J.*, **1996**, 79(10), 87–96.
- [47] Verband deutscher Papierfabriken e. V., Papier 2014 - Ein Leistungsbericht, **2014**.
- [48] W. Diepenbrock, Nachwachsende Rohstoffe, UTB, Stuttgart, **2014**.
- [49] G. Annergren, S. Rydholm; Vardheim, Steinar., Influence of raw material and pulping process on the chemical composition and physical properties of paper pulps, *Sven. Papperstidn.*, **1963**, 66, 196–210.
- [50] T. Hirth, Stoffliche Nutzung von Lignin:Teil 1 Hintergrund, Rohstoffe, Gewinnung und Nutzung unter Erhalt der polymeren Struktur, *Holztechnologie*, **2012**, 53(1), 47–51.
- [51] J. H. Lora, W. G. Glasser, Recent industrial applications of lignin: A sustainable alternative to nonrenewable materials, *Journal of Polymers and the Environment*, **2002**, 10(1-2), 39–48.
- [52] B. C. Tilghman, Improved method of treating vegetable substances for making paper-pulp, **1867**.
- [53] W. Sandermann, Naturharze Terpentinöl · Tallöl:Chemie und Technologie, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **1960**.
- [54] E. Sjöström, Changes in cooking liquor composition during sulfite pulping, *Svensk Papperstidning*, **1962**, 65, 855–869.
- [55] G. Gellerstedt, Reactions of Lignin During Sulfite Pulping, *Svensk Papperstidning-Nordisk Cellulosa*, **1976**, 79(16), 537–543.
- [56] J. Gierer, Reactions of lignin during pulping. Description and comparison of conventional pulping processes, *Sv. Papperstidn.*, **1970**, 73(18), 571–96.
- [57] J. Gierer, Chemistry of delignification. Part 1: General concept and reactions during pulping, *Wood Sci. Technol.*, **1985**, 19(4), 289–312.
- [58] B. O. Lindgren, Substituted Benzyl Alcohols As Lignin Models .2, *Acta Chemica Scandinavica*, **1949**, 3(8), 1011–1020.

- [59] G. Gellerstedt, J. Gierer, Reactions of Lignin During Neutral Sulphite Cooking .I. Behaviour of Beta-Arylether Structures, *Acta Chemica Scandinavica*, **1968**, 22(8), 2510–2518.
- [60] K. Pfister, E. Sjoström, Formation of Monosaccharides and Aldonic and Uronic-Acids During Sulfite Cooking, *Paperi Ja Puu-Paper and Timber*, **1977**, 59(11), 711–720.
- [61] H. Pereira, R. Patt, Investigations on Behavior of Hemicelluloses During Pulping of Spruce and Beech with Magnesium and Sodium Bisulfite Solutions .2. Pulping of Beech Wood, *Holzforschung*, **1976**, 30(6), 191–196.
- [62] O. Theander, T. Popoff, Formation of aromatic compounds from D-glucuronic acid and D-xylose under slightly acidic conditions, *J. Chem. Soc. D*, **1970**(22), 1576.
- [63] T. Popoff, O. Theander, Formation of aromatic compounds from carbohydrates. Part III. Reaction of D-glucose and D-fructose in slightly acidic, aqueous solution, *Acta Chem. Scand., Ser. B*, **1976**, B30(5), 397–402.
- [64] T. Popoff, O. Theander, Formation of Aromatic Compounds from Carbohydrates, *Carbohydrate Research*, **1972**, 22(1), 135–149.
- [65] K. Niemelä, R. Alén, Characterization of Pulping Liquors in Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping, and Papermaking (Hrsg.: E. Sjöström, R. Alén), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, **1999**, 193–231.
- [66] C. F. Dahl, Process of manufacturing cellulose from wood, **Patent von 1984**.
- [67] C. J. Biermann, Handbook of pulping and papermaking, 2. Aufl., Academic Press, San Diego, **1996**.
- [68] Zellstoff- und Papierfabrik Rosenthal GmbH, "Produktionsprozesse", zu finden unter <http://www.zpr.de/ProductionProcesses.aspx>.
- [69] J. Gierer, Chemical aspects of kraft pulping, *Wood Sci. Technol.*, **1980**, 14(4), 241–266.
- [70] V. L. Chiang, M. Funaoka, The Formation and Quantity of Diphenylmethane Type Structures in Residual Lignin during Kraft Delignification of Douglas-Fir, *Holzforschung*, **1988**, 42(6), 385–391.
- [71] Gellerstedt, On the formation of enol ether structures in lignin during kraft cooking, *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, **1987**, 2, 71–75.
- [72] F. Berthold, E.-L. Lindfors; Gellerstedt, Goeran., Degradation of guaiacylglycerol- $\beta$ -guaiacyl ether in the presence of HS- or polysulfide at various alkalinities. Part 1.

- Degradation rate and the formation of enol ether, *Holzforschung*, **1998**, 52(4), 398–404.
- [73] P. Axelsson, G. Gellerstedt; Lindström, M. E., Condensation reactions of lignin during birch kraft pulping as studied by thioacidolysis, *Journal of pulp and paper science*, **2004**, 30(12), 317–322.
- [74] D. Dimmel, L. Bovee; Brogdon, Brian, Electron Transfer Reactions in Pulping Systems (VII): Degradation Reactions of  $\beta$ -Methoxy Lignin Models, *J. of Wood Chem. & Tech.*, **1994**, 14(1), 1–15.
- [75] K. Niemela, The formation of 2-hydroxy-2-cyclopenten-1-ones from polysaccharides during kraft pulping of pine wood, *Carbohydrate Research*, **1988**, 184, 131–137.
- [76] R. Alen, M. Lahtela; Niemela, K.; Sjostrom, E., Formation of Hydroxy Carboxylic-Acids from Softwood Polysaccharides During Alkaline Pulping, *Holzforschung*, **1985**, 39(4), 235–238.
- [77] L. Löwendahl, G. Petersson; Samuelson, O., Formation of Carboxylic-Acids by Degradation of Carbohydrates During Kraft Cooking of Pine, *Tappi*, **1976**, 59(9), 118–121.
- [78] S. Sumathi, Treatment of pulp and paper mill wastes in Handbook of industrial and hazardous wastes treatment (Hrsg.: L. K. Wang), **2004**, 469–513.
- [79] Y. Park, W. Doherty; Halley, P. J., Developing lignin-based resin coatings and composites, *Industrial Crops and Products*, **2008**, 27(2), 163–167.
- [80] C. A. Cateto, M. F. Barreiro; Rodrigues, A. E., Monitoring of lignin-based polyurethane synthesis by FTIR-ATR, *Industrial Crops and Products*, **2008**, 27(2), 168–174.
- [81] G. Sena-Martins, E. Almeida-Vara; Duarte, J. C., Eco-friendly new products from enzymatically modified industrial lignins, *Industrial Crops and Products*, **2008**, 27(2), 189–195.
- [82] D. Stewart, Lignin as a base material for materials applications: Chemistry, application and economics, *Industrial Crops and Products*, **2008**, 27(2), 202–207.
- [83] J. Plank, Applications of biopolymers and other biotechnological products in building materials, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2004**, 66(1), 1–9.
- [84] TECNARO GmbH, zu finden unter <http://www.tecnaro.de/deutsch/willkommen.htm?section=we>. 2015.

- [85] R. Busch, T. Hirth; Liese, A.; Nordhoff, S.; Puls, J.; Pulz, O.; Sell, D.; Syldatk, C.; Ulber, R., Use of sustainable raw materials in industrial substance production, *Chemie Ingenieur Technik*, **2006**, 78(3), 219–228.
- [86] M. B. Hocking, Vanillin: Synthetic flavoring from spent sulfite liquor, *Journal of Chemical Education*, **1997**, 74(9), 1055–1059.
- [87] J. P. Lange, E. van der Heide; van Buijtenen, J.; Price, R., Furfural - A Promising Platform for Lignocellulosic Biofuels, *Chemsuschem*, **2012**, 5(1), 150–166.
- [88] A. Tejado, G. Kortaberria; Pena, C.; Labidi, J.; Echeverria, J. M.; Mondragon, I., Isocyanate curing of novolac-type ligno-phenol-formaldehyde resins, *Industrial Crops and Products*, **2008**, 27(2), 208–213.
- [89] H. Zoebelein, V. Böllert, Dictionary of renewable resources, 2. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, New York, ©**2001**.
- [90] P. C. Rodrigues Pinto, Borges da Silva, Eduardo A.; Rodrigues, Alírio Egídio, Insights into Oxidative Conversion of Lignin to High-Added-Value Phenolic Aldehydes, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2011**, 50(2), 741–748.
- [91] H. Sixta, Handbook of Pulp, 2, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
- [92] R. Gosselink, E. de Jong; Guran, B.; Abächerli, A., Co-ordination network for lignin—standardisation, production and applications adapted to market requirements (EUROLIGNIN), *Industrial Crops and Products*, **2004**, 20(2), 121–129.
- [93] W. G. Glasser, Retrospect and Prospect in Gülzower Fachgespräche (Hrsg.: Fachagentur Nachwachsender Rohstoffe e.V), Gülzow, **2009**, 42–63.
- [94] D. Peters, Carbohydrate as a fermentation raw material, *Chemie Ingenieur Technik*, **2006**, 78(3), 229–238.
- [95] E. Boles, Fokus Kraftstoffe der Zukunft: Verzuckert, *Energie*, **2011**, 107, 42–46.
- [96] K. Munk, Mikrobiologie:43 Tabellen, 1. Aufl., Thieme, Stuttgart [u.a.], **2008**.
- [97] S. S. Helle, T. Lin; Duff, Sheldon J.B., Optimization of spent sulfite liquor fermentation, *Enzyme and Microbial Technology*, **2008**, 42(3), 259–264.
- [98] J. P. Delgenes, Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*, *Enzyme and Microbial Technology*, **1996**, 19, 220–225.
- [99] U. Krauel, H. H. Krauel; Weide, H., Degradation of Mixed Substrates by Yeasts .2. Substrates of Waste Sulfite Liquor - Comparison of Industrial Strains, *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie*, **1984**, 24(1), 21–31.

- [100] U. Krauel, H. H. Krauel; Weide, H., Degradation of Mixed Substrates by Yeasts .1. Substrates of Waste Sulfite Liquor, *Zeitschrift fur Allgemeine Mikrobiologie*, **1982**, 22(8), 545–555.
- [101] J. N. Nigam, Ethanol production from hardwood spent sulfite liquor using an adapted strain of *Pichia stipitis*, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **2001**, 26(3), 145–150.
- [102] J. N. Nigam, Development of xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis* for ethanol production through adaptation on hardwood hemicellulose acid prehydrolysate, *Journal of Applied Microbiology*, **2001**, 90(2), 208–215.
- [103] D. L. A. Fernandes, Detoxification of sulphite spent liquors for bioethanol fermentation employing Ion Exchange Resins.
- [104] J. C. Du Preez, M. Bosch; Prior, B. A., Xylose Fermentation by *Candida-Shehatae* and *Pichia-Stipitis* - Effects of Ph, Temperature and Substrate Concentration, *Enzyme and Microbial Technology*, **1986**, 8(6), 360–364.
- [105] T. Bjorling, B. Lindman, Evaluation of Xylose-Fermenting Yeasts for Ethanol-Production from Spent Sulfite Liquor, *Enzyme and Microbial Technology*, **1989**, 11(4), 240–246.
- [106] P. K. Bajwa, T. Shireen; D'Aoust, Frédéric; Pinel, Dominic; Martin, Vincent J. J.; Trevors, Jack T.; Lee, Hung, Mutants of the pentose-fermenting yeast *Pichia stipitis* with improved tolerance to inhibitors in hardwood spent sulfite liquor, *Biotechnol. Bioeng.*, **2009**, 104(5), 892–900.
- [107] R. F. Buchholz, J. A. Neal; Mccarthy, J. L., Some Properties of Paucidisperse Gymnosperm Lignin Sulfonates of Different Molecular-Weights, *Journal of Wood Chemistry and Technology*, **1992**, 12(4), 447–469.
- [108] E. A. Kvasnicka, R. R. McLaughlin, IDENTIFICATION OF SPRUCE SULPHITE LIQUOR COMPONENTS, *Can. J. Chem.*, **1955**, 33(4), 637–645.
- [109] I. A. Pearl, The ether-insoluble, water-soluble components of several spent sulfite liquors, *Tappi*, **1964**, 47(12), 779–82.
- [110] I. A. Pearl, Studies on the Chemistry of Aspenwood. VIII. 1 An Investigation of the Neutral Extractives of Commercial Aspen Spent Sulfite Liquor 2, *J. Org. Chem.*, **1961**, 26(2), 550–552.
- [111] I. A. Pearl, Studies on the Chemistry of Aspenwood. VII. 1 Further Studies on the Ether Extractives of Commercial Aspen Spent Sulfite Liquor 2,3, *J. Org. Chem.*, **1961**, 26(2), 546–550.

- [112] I. A. Pearl, Studies on the Chemistry of Aspenwood. II. 1 Lignans from Aspen Spent Sulfite Liquor. 2,3, *J. Org. Chem.*, **1958**, 23(5), 705–706.
- [113] J.R. Parrish, Monomeric ligninsulfonic acids, *Tetrahedron Lett.*, **1964**(11-12), 555–558.
- [114] J.R. Parrish, Monomeric lignosulfonic acids. II, *J. Chem. Soc. C*, **1967**(12), 1145–1150.
- [115] J.-M. Hachey, T. van Bui; Tremblay, Yves; Houde, Danielle; Mihelich, Walter G., Physicochemical Analysis of a Spent Sulfite Liquor from a CMP Pulp, *Journal of Wood Chemistry and Technology*, **1986**, 6(3), 389–410.
- [116] K. Sakai, S.-P. Mun; Imamura, Hiroyuki, Monomeric Products Formed from the Lignin of Sugi Wood During Alcohol Sulfite Pulping, *Journal of Wood Chemistry and Technology*, **1986**, 6(4), 523–534.
- [117] L. Löwendahl, G. Petersson; Samuelson, Olof., Phenolic compounds in kraft black liquor, *Sven. Papperstidn.*, **1978**, 81(12), 392–6.
- [118] J. Gierer, O. Lindeberg, Reactions of lignin during sulfate pulping. Part XIX. Isolation and identification of new dimers from a spent sulfate liquor, *Acta Chem. Scand., Ser. B*, **1980**, B34(3), 161–70.
- [119] J. Gierer, S. Wännström, Formation of Alkali-Stable C-C-Bonds Between Lignin and Carbohydrate Fragments During Kraft Pulping, *Holzforschung*, **1984**, 38(4), 181–184.
- [120] G. H. van der Klashorst, H. F. Strauss, Properties and Potential Utilization of Industrial Soda Bagasse Lignin, *Holzforschung*, **1986**, 40(6), 375–382.
- [121] G. H. van der Klashorst, 1,1-Diarylethanes: Novel compounds from alkali spent liquors: Novel Compounds from Alkali Spent Liquors, *Journal of Wood Chemistry and Technology*, **1987**, 7(3), 325–331.
- [122] G. H. van der Klashorst, H. F. Strauss, Properties and Potential Utilization of Industrial Eucalyptus Soda/Anthraquinone Lignin - Part I. Isolation, Identification and Origin of the Low Molecular Mass Lignin Fragments Present in an Industrial Soda/Anthraquinone Spent Pulping Liquor, *Holzforschung*, **1987**, 41(2), 123–131.
- [123] G. H. van der Klashorst, Low molecular mass lignin fragments present in industrial kraft pine spent liquor, *Holzforschung*, **1988**, 42(1), 65–6.
- [124] K. Niemelä, Identification of  $\alpha$ -Hydroxy-Syringylalkanoic Acids in Birch Kraft Black Liquors, *Holzforschung*, **1985**, 39(6), 365–366.

- [125] K. Niemelä, E. Sjöström, Simultaneous Identification of Aromatic and Aliphatic Low Molecular Weight Compounds from Alkaline Pulping Liquor by Capillary Gas-Liquid Chromatography — Mass Spectrometry, *Holzforschung*, **1986**, *40*(6), 361–368.
- [126] K. Niemelä, GLC-MS Studies on Pine Kraft Black Liquors Part I. Identification of Monomeric Compounds, *Holzforschung*, **1988**, *42*(3), 169–173.
- [127] K. Niemelä, GLC-MS Studies on Pine Kraft Black Liquors Part V. Identification of Catechol Compounds, *Holzforschung*, **1989**, *43*(2), 99–103.
- [128] R. Alen, A. Vikkula, Formation of Lignin Monomers During Kraft Pulping of Birch Wood, *Cellulose Chemistry and Technology*, **1989**, *23*(5), 579–583.
- [129] R. Alen, A. Vikkula, Formation of Lignin Monomers During Alkaline Delignification of Softwood, *Holzforschung*, **1989**, *43*(6), 397–400.
- [130] O. Dahlman, K. Månsson, Analysis of Low Molecular Weight Lignin-Derived Sulphonates by Capillary Zone Electrophoresis, *Journal of Wood Chemistry and Technology*, **1996**, *16*(1), 47–60.
- [131] K. Morreel, O. Dima, Mass spectrometry-based sequencing of lignin oligomers, *Plant Physiol.*, **2010**, *153*(4), 1464–1478.
- [132] K. Morreel, H. Kim, Mass spectrometry-based fragmentation as an identification tool in lignomics, *Anal. Chem.*, **2010**, *82*(19), 8095–8105.
- [133] L. J. Hauptert, B. C. Owen, Characterization of model compounds of processed lignin and the lignome by using atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry, *Fuel*, **2012**, *95*, 634–641.
- [134] B. C. Owen, L. J. Hauptert; Jarrell, Tiffany M.; Marcum, Christopher L.; Parsell, Trenton H.; Abu-Omar, Mahdi M.; Bozell, Joseph J.; Black, Stuart K.; Kenttämaa, Hilikka I., High-performance liquid chromatography/high-resolution multiple stage tandem mass spectrometry using negative-ion-mode hydroxide-doped electrospray ionization for the characterization of lignin degradation products, *Anal. Chem.*, **2012**, *84*(14), 6000–6007.
- [135] P. C. Pinto, D. V. Evtuguin; Neto, Carlos Pascoal; Silvestre, Armando J. D.; Amado, Francisco M. L., Behavior of Eucalyptus Globulus Lignin during Kraft Pulping II. Analysis by NMR, ESI/MS and GPC, *Journal of Wood Chemistry and Technology*, **2002**, *22*(2-3), 109–125.
- [136] D. V. Evtuguin, C. P. Neto; Silva, Artur M. S.; Domingues, Pedro M.; Amado, Francisco M. L.; Robert, Danielle; Faix, Oskar, Comprehensive Study on the



- Chemical Structure of Dioxane Lignin from Plantation Eucalyptus globulus Wood, *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49(9), 4252–4261.
- [137] D. V. Evtuguin, F. M. L. Amado, Application of Electrospray Ionization Mass Spectrometry to the Elucidation of the Primary Structure of Lignin, *Macromol. Biosci.*, **2003**, 3(7), 339–343.
- [138] J. Banoub, Elucidation of the complex molecular structure of wheat straw lignin polymer by atmospheric pressure photoionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2007**, 21, 2867.
- [139] K. Yoshioka, A comparative study of matrix and nano LDI-TOF-MS of isolated and synthetic lignin, *Phytochem. Anal.*, **2011**, 23, 248.
- [140] P. Bocchini, Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of natural and synthetic lignin, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1996**, 10, 1144.
- [141] R. Bayerbach, D. Meier, Characterization of the water-insoluble fraction from fast pyrolysis liquids (pyrolytic lignin). Part IV: Structure elucidation of oligomeric molecules, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **2009**, 85(1-2), 98–107.
- [142] T. M. Jarrell, C. L. Marcum; Sheng, Huaming; Owen, Benjamin C.; O'Lenick, C. J.; Maraun, Hagen; Bozell, Joseph J.; Kenttämäa, Hilikka I., Characterization of organosolv switchgrass lignin by using high performance liquid chromatography/high resolution tandem mass spectrometry using hydroxide-doped negative-ion mode electrospray ionization, *Green Chem.*, **2014**, 16(5), 2713–2727.
- [143] Sappi Alfeld GmbH:  
Email, **2014**.
- [144] G. D. McGinnis, Analysis of Monosaccharides as per-O-Acetylated Aldonitrile (PAAN) derivatives by gas-liquid chromatography (GLC) in Analysis of carbohydrates by GLC and MS (Hrsg.: C. J. Biermann, G. D. McGinnis), CRC Press, Boca Raton, Fla., **1989**, 119–125.
- [145] E. Johansson, T. Brandberg; Larsson, Christer, Influence of cultivation procedure for *Saccharomyces cerevisiae* used as pitching agent in industrial spent sulphite liquor fermentations, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **2011**, 38(11), 1787–1792.
- [146] T. Vuorinen, Selective hydrolysis of hexenuronic acid groups and its application in ECF and TCF bleaching of kraft pulps, *Journal of pulp and paper science*, **1999**, 25(5), 155.

- [147] C. A. Leger, F. D. Chan; Schneider, Marc H., Fractionation and characterisation of technical ammonium lignosulphonate, *BioResources*, **2010**, 5(4), 2239–2247.
- [148] S. Wu, G. Lv; Lou, Rui, Applications of Chromatography Hyphenated Techniques in the Field of Lignin Pyrolysis in Applications of Gas Chromatography (Hrsg.: R. Davarnejad), InTech, **2012**.
- [149] Z. Rappoport, CRC handbook of tables for organic compound identification, 3. Aufl., CRC Press, Boca Raton, Fla., **1967**.
- [150] J. Zakzeski, P. C. A. Bruijninx; Jongerius, Anna L.; Weckhuysen, Bert M., The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals, *Chem. Rev.*, **2010**, 110(6), 3552–3599.
- [151] "Dr. Maisch GmbH HPLC", zu finden unter [http://www.dr-maisch.com/xedin.php?point=reprosil\\_pur\\_basic.html](http://www.dr-maisch.com/xedin.php?point=reprosil_pur_basic.html).
- [152] "Discovery C18 and C8 HPLC Columns", zu finden unter <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/hplc/columns/discovery-hplc/discovery-c18-c8-hplc-columns.html>.
- [153] V. R. Meyer, Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, 10. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, Bergstr, **2009**.
- [154] E. S. Grumbach, Comprehensive Guide to HILIC:Hydrophilic Interaction Chromatography, Waters Corporation, [s.l.], **2010**.
- [155] Merck KGaA, Sicherheitsdatenblatt: Eugenol zur Synthese.
- [156] Carl Roth GmbH & Co. KG, Sicherheitsdatenblatt: Vanillin.
- [157] S. Kromidas, Der HPLC-Experte:Möglichkeiten und Grenzen der modernen HPLC.
- [158] N. Sekine, S. Shibutani; Yatagai, Mitsuyoshi, Chemical composition of the terpenoids in wood and knots of Abies species, *Eur. J. Wood Prod.*, **2013**, 71(5), 679–682.
- [159] Doris de Guzman, "Vanillin squeezed by cost pressures". 2006.
- [160] M. Wayman, Struktur Oligomeres Lignin, *Can. J. Chem.*, **1974**, 52, 2102–2110.
- [161] T. Hirth, Stoffliche Nutzung von Lignin:Teil 2 Chemische und biochemische Spaltung von Lignin in Aromaten, *Holztechnologie*, **2012**, 53(2), 46–51.
- [162] T. Voith, P. R. v. Rohr, Demonstration of a Process for the Conversion of Kraft Lignin into Vanillin and Methyl Vanillate by Acidic Oxidation in Aqueous Methanol, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2010**, 49(2), 520–525.

- [163] D. J. Nowakowski, A. V. Bridgwater; Elliott, D. C.; Meier, D.; Wild, P. de, Lignin fast pyrolysis: Results from an international collaboration, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **2010**, 88(1), 53–72.
- [164] K. Okuda, M. Umetsu; Takami, Seiichi; Adschiri, Tadafumi, Disassembly of lignin and chemical recovery—rapid depolymerization of lignin without char formation in water–phenol mixtures, *Fuel Processing Technology*, **2004**, 85(8-10), 803–813.
- [165] M. Nagy, K. David; Britovsek, George J.P.; Ragauskas, Arthur J., Catalytic hydrogenolysis of ethanol organosolv lignin, *Holzforschung*, **2009**, 63(5), 513–520.
- [166] K. E. Hammel, D. Cullen, Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2008**, 11(3), 349–355.
- [167] H. P. Call, I. Mücke, History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process), *Journal of Biotechnology*, **1997**, 53(2-3), 163–202.
- [168] P. R. Robinson, Petroleum and its products in Handbook of industrial chemistry and biotechnology (Hrsg.: J. A. Kent), Springer, New York, **2012**, 699–747.
- [169] D. Oertel, Sachstandsbericht zum Monitoring "Nachwachsende Rohstoffe": Industrielle stoffliche Nutzung Nachwachsender Rohstoffe, **2007**.
- [170] Petrochemicals Europe, "Petrochemicals Flowchart - Petrochemicals make things happen", zu finden unter <http://www.petrochemistry.eu/flowchart.html>.
- [171] Z. Dische, E. Borenfreund, A new spectrometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses, *J Biol Chem*, **1951**, 192(2), 583–587.
- [172] C. J. Biermann, Analysis of carbohydrates by GLC and MS, CRC Press, **1989**.
- [173] A. Fox, Preparation of Alditol Acetates and their Analysis by gas chromatography (GC) and mass spectrometry (MS) in Analysis of carbohydrates by GLC and MS (Hrsg.: C. J. Biermann, G. D. McGinnis), CRC Press, Boca Raton, Fla., **1989**, 87–117.
- [174] C. Lecher, Sodium borohydride reduction of vanillin: A low solvent synthesis of vanillyl alcohol, **63**, **2007**, Green Chemistry at the University of Oregon.
- [175] L. C. Schroeter, Preparation of hydroxybenzylsulfonic acids, *Journal of pharmaceutical Science*, **1961**, 50.
- [176] K. Elbs, H. Lerch, Über Dehydrodivanillin, *J. Prakt. Chem. (Journal für Praktische Chemie)*, **1916**, 93(1), 1–9.
- [177] M. G. Drumond, D. P. Veloso; Santos Cota, Stela D.; Lemos de Moraes, Sergio A.; do Nascimento, Evandro A.; Chen, Chen-Loung, Biphenyl Type Lignin Model

- Compounds: Synthesis and  $^{13}\text{C}$  NMR Substituent Chemical Shift Additivity Rule, *Holzforschung*, **1992**, 46(2), 127–148.
- [178] T. FUJII, S. YOSHIFUJI; OHBA, MASASHI, Preparation of some ring-oxygenated phenacyl bromides, *Chem. Pharm. Bull.*, **1978**, 26(10), 3218–3222.
- [179] V. L. Alves, M. G. Drumond; Stefani, Guglielmo M.; Chen, Chen-Loung; Piló-Veloso, Dorila, Synthesis of new trimeric lignin model compounds containing 5-5' and beta-O-4' substructures, and their characterization by 1D and 2D NMR Techniques, *J. Braz. Chem. Soc.*, **2000**, 11(5), 467–473.