

## ZASTOSOWANIE SPEKTROFOTOMETRII REFLEKSYJNEJ DO BADANIA LIGNINY *IN SITU*

*Jan Polčín*

Instytut Badawczy Papieru i Celulozy w Bratysławie

Metody spektralne, łącznie ze spektrofotometrią elektronową, są bardzo ważnym narzędziem współczesnej chemii analitycznej i strukturalnej, także w badaniach składników drewna, a zwłaszcza ligniny i innych polifenoli. Ponieważ we wszystkich znanych dotychczas metodach izolacji dochodzi w różnym stopniu do zmiany struktury ligniny i jej chromoforów, dlatego zastąpienie spektrofotometrii transmisyjnej w ultrafiolecie (UV) i zakresie widzialnym spektrofotometrią refleksyjną nabiera wielkiego znaczenia w badaniu drewna i włókien drzewnych. Chodzi o tzw. spektrofotometrię *in situ*, tzn. bezpośredni pomiar widm ligniny w materiale rodzimym. Pomiaru te są tym bardziej ułatwione, że polisacharydy roślinne nie dają wyraźnego widma elektronowego w średnim i bliskim obszarze ultrafioletu, podczas gdy lignina, ze względu na swoją strukturę aromatyczną i zawartość niektórych podstawników o własnościach chromoforowych, wyróżnia się bardzo charakterystycznym widmem UV [5]. Interferencja od substancji ekstrakcyjnych w drewnie, z których wiele absorbuje promieniowanie w zakresie UV, zostaje wyeliminowana po przeprowadzeniu prostej ekstrakcji badanej próbki odpowiednią kombinacją rozpuszczalników. Jak wykazano dalej, można w sposób prosty udokumentować ilościowy wpływ substancji ekstrakcyjnych na zabarwienie drewna.

Ponieważ widmo refleksyjne obok absorpcji świetlnej  $k$  jest także funkcją rozproszenia światła  $s$ , dlatego aby uzyskać z widma refleksyjnego widmo absorpcyjne porównywalne z widmem uzyskanym w roztworach metodą transmisyjną, konieczne jest bądź ilościowe określenie składowego rozproszenia, bądź też jego wyeliminowanie.

Stosunek pomiędzy zdolnością odbijania powierzchni próbki tak grubej, że tło nie wywiera na nią wpływu (ten przypadek odbicia nazywa się refleksją  $R_{\infty}$ , a grubość — grubością krytyczną lub graniczną),

a składową absorpcji ewentualnie rozproszenia  $k$  i  $s$  (właściwy współczynnik absorpcji i rozproszenia) wyraża równanie (1) Kubelki-Munka [2, 3]:

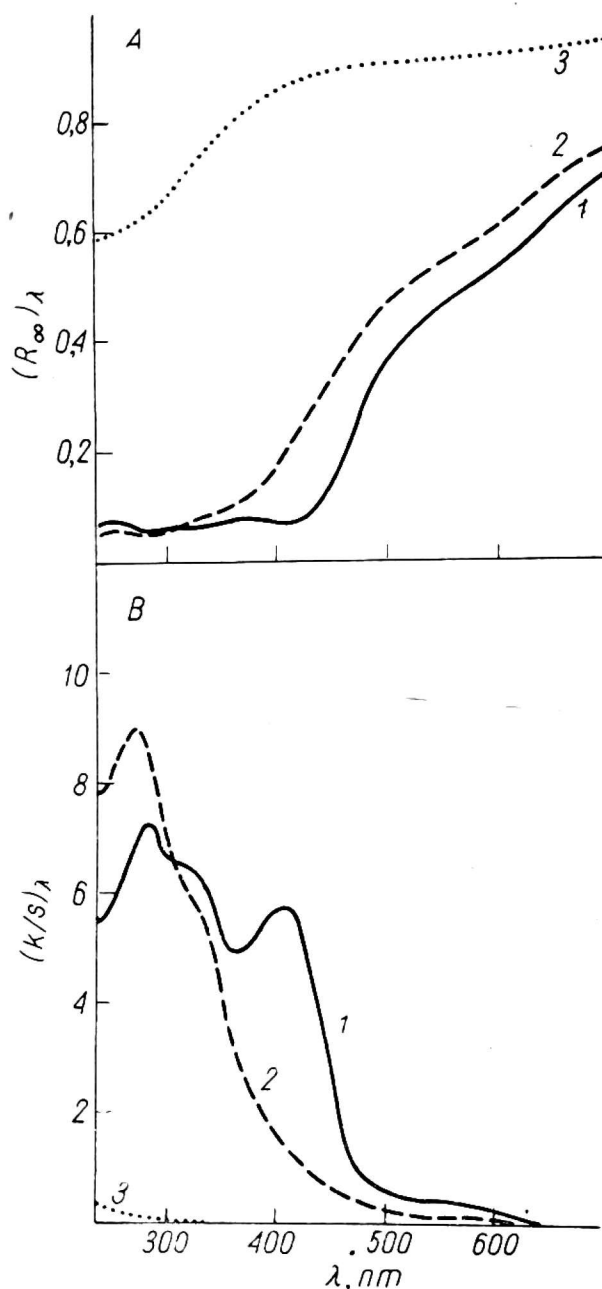
$$R_{\infty} = 1 + \frac{k}{s} - \sqrt{\frac{k^2}{s^2} + 2\frac{k}{s}}. \quad (1)$$

Z równania (1) można wydzielić wyrażenie  $k/s$ , które oznacza względny współczynnik absorpcji światła i rozproszenia substancji (2):

$$\frac{k}{s} = \frac{(1 - R_{\infty})^2}{2R_{\infty}}. \quad (2)$$

Wartości  $k/s$  powierzchni drewna lub drzewnego materiału włóknistego sporządzonego w formie płytki (arkusika), naniesione w formie zależności graficznej od długości fali  $\lambda$ , przedstawiają najprostszy sposób uzyskania zależności widmowej charakteryzującej ligninę [6] ewentualnie także składniki ekstrakcyjne [13]. Jest to możliwe dzięki stosunkowo równomiernemu przebiegowi zależności składowej  $s$  od długości fali [7], a także dlatego, że polisacharydy w tym zakresie widmowym mało absorbują. W celu obliczenia wartości  $k/s$  sporządzono wykres funkcyjny [14]. W VUPC w Bratysławie jest do dyspozycji spektrofotometr Beckman DBG, przystosowany do pomiaru widm refleksyjnych w zakresie widzialnym i UV (do około 230 nm), przyłączony do automatycznego perforatora danych, na podstawie których komputer oblicza wartości  $k/s$ , ewentualnie automatycznie wykreśla krzywe  $(k/s)_{\lambda}$ . Krzywe widmowe  $(R_{\infty})_{\lambda}$  i odpowiadające im krzywe  $(k/s)_{\lambda}$  drewna robinii akacjowej, przed i po ekstrakcji, przedstawione są na rysunku 1. Pierwsze maksimum  $(k/s)_{\lambda}$  w widmach obydwóch próbek odpowiada ligninie, przy czym szczyt przy 320 nm i maksimum przy ok. 400 nm odpowiada substancjom flawonowym, przede wszystkim robinetinie [15]. Położenie tego maksimum wskazuje na to, że z robinetina w badanej próbce związane są w formie kompleksu kationy metali, a zwłaszcza glinu. Jak widać, te proste widma dają ważne informacje, bez konieczności przeprowadzania skomplikowanych doświadczeń.

Pomimo tego, że krzywe  $(k/s)_{\lambda}$  są bardzo zbliżone do krzywych transmisyjnych, to jednak należy liczyć się tylko z wykorzystaniem składnika rozpraszającego światło  $s$ . Konkretnie widać to np. na maksimum ligniny  $(k/s)_{280}$  na rysunku 1, które w wyekstrahowanej próbce jest intensywniejsze, niż w nie ekstrahowanej, co jest pewną niezgodnością, spowodowaną zmianą rozproszenia światła próbki w następstwie ekstrakcji [4]. W takim przypadku należy określić składową rozproszenia  $s$ . Teoretycznie jest to możliwe przeprowadzając uzupełniający pomiar zdolności odbicia próbki o grubości mniejszej od grubości krytycznej (wyrażonej ciężarem powierzchniowym  $W$ ), pod którą podkłada się tło o znanej zdolności od-



Rys. 1. Krzywe widmowe drewna twardego robiniu akacjowej (*Robinia pseudo-acacia*, przekrój poprzeczny): 1 — przed ekstrakcją 2 — po ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi; 3 — widmo celulozy; A — krzywe odbicia (reflektancja) —  $(R_\infty)_\lambda$ , B — krzywe  $(k/s)_\lambda$

bicia. Ze względów praktycznych najczęściej używa się tła czarnego o  $R = 0$ . Jeżeli oznaczymy zdolność odbicia substancji oznaczoną w takich warunkach przez  $R_0$ , to zgodnie z teorią Kubelki-Munka obowiązuje następująca zależność pomiędzy  $s$ ,  $W$ ,  $R_\infty$  i  $R_0$ :

$$sW = \frac{R_\infty}{1 - R_\infty^2} \ln \frac{R_\infty(1 - R_0 R_\infty)}{R_\infty - R_0}. \quad (3)$$

Jeżeli dokona się pomiaru badanej próbki o grubości krytycznej odpowiadającej ciężarowi powierzchniowemu  $W$  (wyrażonemu w  $\text{g}/\text{cm}^2$ ), pod którą podłożono czarne tło  $R_0$ , można za pomocą równania (3) obliczyć wartość  $s$  ( $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ ). Przez pomnożenie wyznaczonego współczynnika (ustalonego w równaniu (2)) przez wartość  $s$ , odpowiadającą określonej długości fal  $\lambda$ , otrzyma się właściwy współczynnik absorpcji  $k$ , ( $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ ):

$$k_{\lambda} = \frac{(k/s)\lambda}{s_{\lambda}}. \quad (4)$$

Właściwy współczynnik absorpcji  $k$  jest proporcjonalny do współczynnika absorpcji  $\alpha$  [8, 9]:

$$\alpha = 2 k. \quad (5)$$

W powyższym równaniu współczynnik  $\alpha$  zdefiniowany jest prawem Bougouera-Lamberta-Beera:

$$T = e^{-\alpha c x}; \quad (6)$$

gdzie:  $T$  — transmitancja

W fotometrii spektralnej używany jest częściej termin absorpcja  $A$ , niż transmitacja  $T$ , pomiędzy którymi istnieje zależność (7):

$$A = \log \frac{1}{T} = \alpha c x; \quad (7)$$

gdzie:

$\alpha$  — współczynnik ekstynkcji,

$c$  — stężenie substancji w roztworze ( $\text{g cm}^{-3}$ ),

$x$  — grubość mierzonej warstwy,

Z porównania równań (6) i (7) wynika, że:

$$a = \alpha \log e \quad (8a)$$

$$\text{wówczas: } a = 2 k \log e \quad (8b)$$

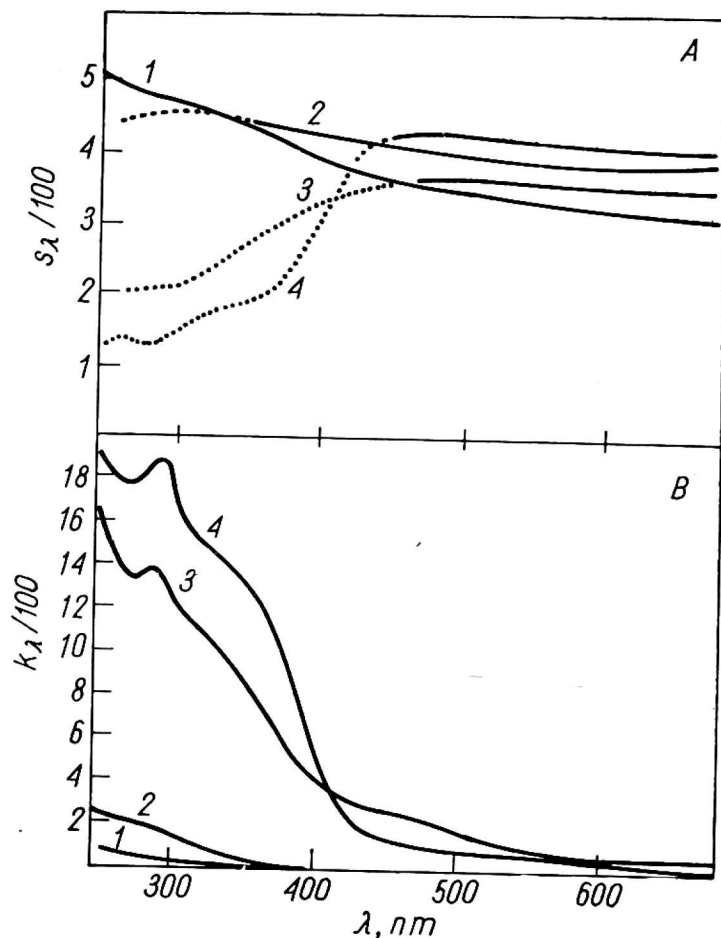
lub

$$a = 0,8686 k. \quad (8c)$$

Trzeba jednak zaznaczyć, że przyjęta w równaniach (5) i (8b) wartość 2 dla współczynnika proporcjonalności zależy w dużym stopniu od geometrii spektralnego fotometru [3, 1] i jest z reguły niższa.

Wykorzystując podane zależności można zatem teoretycznie obliczyć ekstynkcyjne krzywe widmowe  $a_{\lambda}$  (z widm refleksyjnych). Sprawdzenie doświadczalne obliczeń wykazało [4, 8], że odpowiadają one zupełnie dobrze tym przypadkom, kiedy całkowity iloczyn absorpcji, a więc  $c k$  jest niezbyt wysoki. Warunek ten obowiązuje dla całego widzialnego oraz bliskiego i średniego zakresu UV w przypadku materiałów nisko lignifikowanych, jakimi są np. masy celulozowe (rys. 2). W przypadku materiałów wysoko lignifikowanych, jakimi są drewno natywne, ścier, masy celulozowe wysokowydajne, warunek ten ma zastosowanie jedy-

Rys. 2. Krzywe widmowe; A —  $s_\lambda$ , B —  $k_\lambda$ ; 1 — bawełna bielona, 2 — bielona świerkowa celuloza siarczana, 3 — nie bielona celuloza siarczana, 4 — ścier świerkowy nie bielony. W części kropkowanej krzywych uwzględnia się w różnym stopniu efekt nadstężenia



nie w zakresie widzialnym, a nie w zakresie UV, gdzie absorpcja ligniny jest bardzo intensywna. W tym przypadku pojawia się ujemne odchylenie podczas obliczania współczynników  $k$  i  $s$  według równań (3), (4) (rys. 2). Chodzi tutaj o tzw. efekt nadstężenia [4, 8], analogiczny do efektu nadstężenia substancji mierzonych w roztworach, który powoduje ujemne odchylenie od prawa Beera. Ponieważ efekt nadstężenia usuwa się rozcieńczając roztwór rozpuszczalnikiem, zdecydowano w przypadku spektrofotometrii refleksyjnej rozwiązać ten problem analogicznie, przy czym jako „rozpuszczalnika” użyto bielonej bawełny, która posiada wyjątkowe własności rozpraszania światła, sama zaś tylko nieznacznie absorbuje światło [8]. „Rozcieńczanie” przeprowadza się w taki sposób, ażeby w mieszaninie znajdowało się około 1% ligniny. Próbkę przygotowuje się na mokro w formie krążka o grubości 2 mm [8]. Technika ta ogólnie upraszcza zarówno sam pomiar, jak i obliczenia, ponieważ składnikiem rozpraszającym światło jest przede wszystkim bawełna, a składnikiem absorbującym — zlignifikowany materiał. Pomiedzy zmierzonym  $R_\infty$ , a współczynnikami  $k$  i  $s$  obowiązować będzie dla tego przypadku wzór:

$$\frac{(1 - R_\infty)^2}{2R_\infty} = \frac{k_o c_o + k_p c_p + k_l c_l}{s_o c_o + s_p c_p + s_l c_l} = \frac{k}{s} \quad (9)$$

gdzie:

- $k/s$  — stosunek współczynników obliczany ze zmierzonej wartości  $R_\infty$  próbki zmieszanej z bawełną;
- $k_o, k_p, k_l$  — specyficzne współczynniki absorpcji bawełny  $o$ , polisacharydów w próbce pomiarowej  $p$  i ligniny w próbce pomiarowej  $l$ ;
- $s_o, s_p, s_l$  — odpowiednie specyficzne współczynniki rozproszenia światła;
- $c_o, c_p, c_l$  — stężenie poszczególnych składników w mieszaninie.

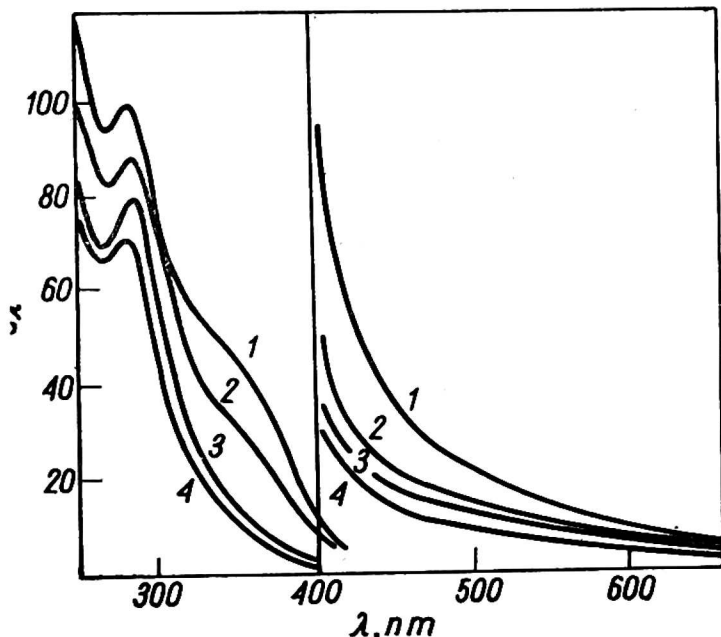
Jeżeli weźmiemy pod uwagę, że rozproszenie światła ma miejsce przede wszystkim w bawełnie, wówczas  $c_o = c_p + c_l$ , a zależność przybiera postać:

$$s_o c_o + s_p c_p + s_l c_l = s_o \quad (10)$$

Po podstawieniu równania (10) do równania (9) i wydzieleniu  $k_l$  otrzyma się równanie (11), służące do obliczenia współczynnika absorpcji ligniny w próbce.

$$(k_l)_\lambda = \left( \frac{k}{s} s_o - k_p c_p - k_o c_o \right)_\lambda \cdot \frac{1}{c_l} \quad (11)$$

Z tego wzoru wynika, że wartość współczynnika rozproszenia światła, według równania (3), należy określić tylko dla bawełny użytej do „rozcieńczania”, przygotowywanej jednorazowo dla kilkunastu pomiarów. W VUPC zapis wyników pomiarów prowadzony jest automatycznie, a obliczenia wykonywane są z pomocą komputera.



Rys. 3. Krzywe widmowe  $a_\lambda$  ścieru drzewnego określone metodą „rozcieńczania”: 1 — ścier wyjściowy, 2 — po redukcji  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ , 3 — po redukcji borowodorkiem sodu  $\text{NaBH}_4$ , 4 — po redukcji trójwartościowym uranem  $\text{U}^{3+}$ . W obszarze widzialnym podziałka jest 10-krotnie rozszerzona

Rysunek 3 jest przykładem widm ligniny otrzymanych tą metodą dla ściery świerkowego poddanego redukcji różnymi środkami redukującymi. Widać, że poszczególne odczynniki wywołują różne zmiany w widmie, zwłaszcza w bliskim obszarze UV (330–380 nm), który jest charakterystyczny dla poszczególnych chromoforowych układów ligniny.

Największa wartość niniejszej metody polega na tym, że po poddaniu ligniny *in situ* działaniu specyficznych odczynników i porównaniu z substancjami modelowymi o znanej strukturze i własnościach można wyciągnąć odpowiednie wnioski o chemiczno-strukturalnych zmianach w cząsteczce ligniny [10–12, 15].

Następny sposób wykorzystania i interpretowania wyników spektralnej fotometrii refleksyjnej oparty jest na widmach różnicowych. Chodzi tu przede wszystkim o porównanie zmian w widmach, zachodzących w czasie chemicznej obróbki lignifikowanych materiałów, podczas której zmienia się składowa absorpcji  $k$ , ale nie dochodzi do istotniejszej zmiany składowej rozproszenia światła  $s$ . Takim przypadkiem jest np. niedestrukcyjne bielenie ściery, badania starzenia materiałów włóknistych metodami termiczną lub świetlną itp. Wówczas zwykła krzywa obrazuje zmiany w barwie, a zatem także w składzie układu chromoforowego. Dlatego takie krzywe widmowe nazwano „krzywami odbarwienia” (Decoloration Curves)  $DC$ , a poszczególne punkty na krzywej odpowiadające określonym długościom fali — „liczbami odbarwienia” (Decoloration Numbers) [6, 9, 17].

Z definicji wiadomo, że:

$$DC_{\lambda} = {}^0\left(\frac{k}{s}\right)_{\lambda} - {}^a\left(\frac{k}{s}\right)_{\lambda}; \quad (12)$$

gdzie:

indeks 0 — wartość próbki pierwotnej,

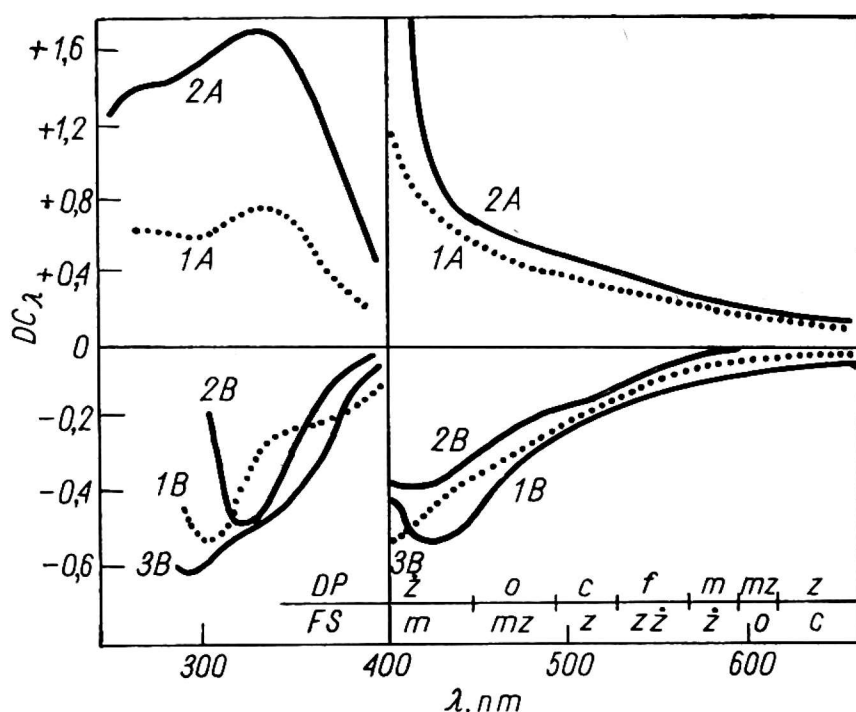
indeks  $a$  — wartość próbki badanej.

Biorąc pod uwagę podaną wyżej zależność, że wartości  ${}^0s_{\lambda} \cong {}^as_{\lambda} = s_{\lambda}$ :

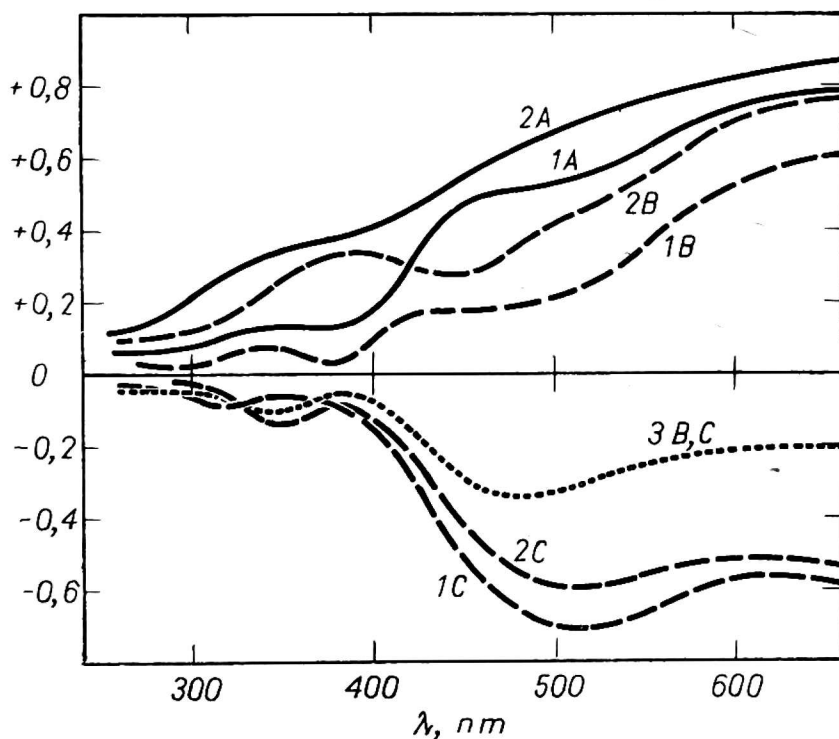
$$DC_{\lambda} = \frac{\Delta k_{\lambda}}{s_{\lambda}}. \quad (13)$$

Z tego stosunku widać, że  $DC_{\lambda}$  jest miarą zmiany absorpcji substancji spowodowanej odpowiednim działaniem na układ chromoforowy. Aczkolwiek wynik obliczenia zależy także od współczynnika  $s_{\lambda}$  nie wpływa on jednak w istotny sposób na kształt krzywej.

Dążąc do wyeliminowania wpływu  $s_{\lambda}$ , wprowadzono dodatkowe wyrażenia „względna liczba odbarwienia” (Relative Decoloration Number)



Rys. 4. Krzywe widmowe  $DC_\lambda$  ścieru świerkowego: A — próbki bielone 1% odczynnikami: 1 — pierwotna, bielona  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ; 2 — pierwotna, bielona nadtlakiem; B — próbki starzone ciepnie, 18 godz w  $105^\circ$ : 1 — próbka bielona  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ , przed i po starzeniu, 2 — próbka bielona nadtlakiem, przed i po starzeniu; FS — kolor odcinka widmowego, DP — kolor uzupełniający, M — niebieski, MZ — niebieskozielony, Z — zielony, ZZ — żółtozielony, Z — żółty, O — pomarańczowy, C — czerwony, F — fioletowy. Uwaga: w obszarze widzialnym podziałka  $DC_\lambda$  jest 10-krotnie poszerzona



Rys. 5. Krzywe widmowe  $[DC_\lambda]$  ścieru świerkowego: A — próbki bielone 1% odczynnikami: 1 — próbka bielona  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  w stosunku do próbki pierwotnej, 2 — próbka bielona nadtlakiem w stosunku do próbki pierwotnej; B — próbki starzone ciepnie 18 godz w  $105^\circ\text{C}$  w stosunku do pierwotnej próbki nie bielonej: 1 — próbka bielona  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ , 2 — nadtlakiem, 3 — nie bielona; C — próbki starzone ciepnie w stosunku do identycznych próbek nie starzonych: 1 — próbka bielona  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ , 2 — nadtlakiem, 3 — próba nie bielona



i „względne krzywe odbarwienia”  $[DC_\lambda]$ . Wyrażają one zmiany zabarwienia, zależne od zawartości chromoforów w ligninie, w stosunku do wartości  $k/s$  próbki pierwotnej, wskutek czego wartość  $s_\lambda$ , zostaje wyeliminowana matematycznie:

$$[DC_\lambda] = \frac{DC_\lambda}{\left(\frac{k}{s}\right)_\lambda} = \frac{{}^0\left(\frac{k}{s}\right)_\lambda - {}^a\left(\frac{k}{s}\right)_\lambda}{{}^0\left(\frac{k}{s}\right)_\lambda} \quad (14)$$

ponieważ  ${}^0s_\lambda \cong {}^as_\lambda = s_\lambda$ , zatem:

$$[DC_\lambda] = 1 - \frac{{}^a(k_\lambda)}{{}^0(k_\lambda)}. \quad (15)$$

Także w tym zakresie mamy w VUPC w Bratysławie spektrofotometr wyposażony tak, że krzywe  $DC_\lambda$  i  $[DC_\lambda]$  oblicza komputer.

Należy jeszcze dodać, że każde działanie na układ zawierający ligninę, które powoduje wybielanie, daje wartości  $DC_\lambda$  i  $[DC_\lambda]$  dodatnie (= dodatnie liczby odbarwienia, ewentualnie krzywe). Działania, które powodują efekt przeciwny, tj. ciemnienie, dają ujemne wartości  $DC_\lambda$  i  $[DC_\lambda]$  (ujemne liczby odbarwienia, ewentualnie krzywe).

Przykłady spektralnych krzywych dodatnich i ujemnych  $DC_\lambda$  i  $[DC_\lambda]$  przedstawione są na rysunkach 4 i 5. Sposób interpretacji tych krzywych został opisany szczegółowo w niedawno wydanej publikacji [17].

Na zakończenie można stwierdzić, że elektronowa spektroskopia refleksyjna *in situ* w obszarze widzialnym i UV, uzupełniana spektrofotometrią *in situ* w podczerwieni, stała się użyteczną metodą w badaniach materiałów zawierających ligninę, a zwłaszcza ich układów chromoforowych podczas bielenia niedestrukcyjnego. Jest to jednak zasługą odpowiednio wysokiego poziomu techniki pomiarowej oraz efektywnego wykorzystania techniki obliczeniowej. W VUPC w Bratysławie w dalszym ciągu pracuje się nad ulepszeniem tych metod, zarówno pod względem dalszego podnoszenia dokładności pomiarów, jak i pod względem interpretacji.

#### LITERATURA

1. Van den Akker J.: Tappi 22, 498, 1949.
2. Kubelka P., Munk F.: Z. Techn. Physik 12, 593, 1931.
3. Kubelka P.: J. Opt. Soc. Amer.: 33, 448, 1948; 44, 330, 1954.
4. Polčín J., Rapson W. H.: Pulp Paper Mag. Can. 70, T. 410, 1969.
5. Polčín J., Rapson W. H.: Pulp Paper Mag. Can. 70, T. 755, 1969.
6. Polčín J., Rapson W. H.: Tappi 52, 1960, 1969.
7. Polčín J., Rapson W. H.: Tappi 52, 1965, 1969.

8. Polčín J., Rapson W. H.: Tappi 52, 1970, 1969.
9. Polčín J., Metody badania chromoforów drzewnych. Sprawozdanie badawcze VUPC, Bratislava 1971.
10. Polčín J., Rapson W. H.: Pulp Paper Mag. Can. 72, 3, T. 103, 1971; 72, 3, T. 114, 1971.
11. Polčín J.: Mechanizm odbarwiania drewna. Referat wygłoszony na V Międzynarodowej Konferencji Papierniczej SITPP, Kraków 1972.
12. Polčín J.: Zellstoff Papier 22, 8, 226, 1973.
13. Polčín J.: *Robinia pseudoacacia* as Raw Material for Pulp., International EU-CEPA Symposium, Madrid 1974, Reprint Nr 18.
14. Polčín J.: Wykres do określenia wartości  $k/s$  z refleksancji  $R_{\infty}$ . Papir Celuloza 29, 10 (kartka zewnętrzna), 1974.
15. Polčín J., Samková M., Tomašovičova E.: Podstawowe własności gatunków liściastych drewna. Sprawozdanie z pracy badawczej VUPC, Bratislava, 1974.
16. Polčín J.: Wykresy do obliczania zdolności rozpraszania światła  $sW$ , Papir Celuloza 29, 11 (kartka zewnętrzna III), 1974; 30, 2 (kartka zewnętrzna II), 1975 i pozostałe numery.
17. Polčín J.: Papir Celuloza 30, 1, 7, 1975.

Я. Полчин

## ПРИМЕНЕНИЕ РЕФЛЕКСНОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ЛИГНИНА *IN SITU*

### Резюме

В то время как углеводы не дают точного электронного спектра в средней и близкой зонах ультрафиолетовой области, лигнин из-за ароматической структуры и присутствия некоторых хромофорных заместителей отличается характерным УФ-спектром. Так как в процессах изолирования лигнина происходят изменения его структуры и структуры хромофорных групп, рефлексная спектрофотометрия в УФ — области и видимой области оказалась пригодной для исследования материалов содержащих лигнин.

Рефлексный спектр является функцией дисперсии света и его поглощения. С целью получения из рефлексного спектра абсорбционного спектра сравнимого со спектром получаемым в растворах трансмиссионным методом, необходимым является исключение или определение величины составляющей дисперсии. В отборочном методе получают т.н. дифференциальные или релятивные кривые по спектру, которые дают информацию о изменениях хромофорной системы или о физико-химических эффектах воздействия на лигнин. При обозначении кривых поглощения *in situ*, кроме измерения рефлексного спектра определяют также спектр поглощения. С целью ускорения расчетов измерительные приборы оснастили читательным аппаратом, с последующей записью данных на перфоленте. Расчеты проводят с применением ЭВМ по различным вариантам программ. Представленный метод в сочетании и инфракрасными спектрами *in situ* дает ценную информацию о составе материалов содержащих лигнин.

J. Polčín

APPLICATION OF REFLECTION SPECTROMETRY FOR *IN SITU*  
LIGNIN EXAMINATION

Summary

While carbohydrates do not give distinct electron spectra in the middle and near UV range, lignin, because of its aromatic structure and the presence of certain chromophore substituents, is characteristic by specific UV spectrum. In processes of lignin isolation, its structure as well as the structure of its chromophore groups are undergoing some changes and, because of that, UV reflection spectrometry in visible range proved to be very useful in examination of lignin-containing materials.

Reflection spectrum is a function of light scattering and absorption. Therefore in order to obtain from reflection spectrum an absorption spectrum comparable to that obtained in solution by transmission method, elimination or quantitative determination of scattering component is necessary. In the elimination method, so called differential curves or spectral curves are obtained, which supply information relating changes in chromophore system or effects of physico-chemical action on lignin. In determining absorption curves *in situ*, apart from reflection spectrum measurement, also scattering spectrum must be determined. In order to speed-up necessary calculations, measuring devices were equipped with data reader and data recording on perforated tape.

Calculations are computerized according to different variants of calculation programs. This method, in combination with IR spectra *in situ*, gives valuable information about the composition of lignin-containing materials.