

**ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**  
**на диссертацию на соискание ученой степени**  
**кандидата химических наук Пиковского Ильи Ивановича**  
**на тему: «Анализ молекулярного состава природного лигнина методом**  
**масс-спектрометрии на основе орбитальной ионной ловушки с**  
**фотоионизацией при атмосферном давлении»**  
**по специальности 1.4.2 – «Аналитическая химия»**

**Актуальность.** Диссертационная работа Пиковского Ильи Ивановича посвящена анализу молекулярного состава природного лигнина методом масс-спектрометрии на основе орбитальной ионной ловушки (МС Орбитрэп) с фотоионизацией при атмосферном давлении (ФИАД). Тема работы весьма интересна и актуальна, так как, с одной стороны, МС Орбитрэп представляет собой один из наиболее интенсивно развивающихся методов анализа высокого разрешения, который активно осваивает все новые сферы применения в анализе сложных систем, с другой стороны, объект анализа - природный лигнин - представляет собой исключительную важность в качестве источника ароматических прекурсоров для химической промышленности, однако его практическое применение сдерживается из-за противоречивости сведений о молекулярном строении.

Особую красоту диссертационной работе придает весьма удачное сочетание не только метода анализа, но и способа ионизации - ФИАД, который учитывает специфику химической природы объекта анализа, а именно, способность полифенолов к фотоионизации. Данный способ ионизации используется гораздо реже, чем ионизация электрораспылением. Поэтому разработка методических основ применения МС Orbitrap в сочетании с ФИАД для анализа сложных полифенольных объектов весьма актуальна в контексте понимания возможностей и границ применимости метода масс-спектрометрии высокого разрешения, а так же для расширения аналитического инструментария лабораторий, контролирующих качество

природного полифенольного сырья. Новая достоверная информация о молекулярном составе и типе структурных компонентов лигнина из различных источников, в свою очередь, будет способствовать уточнению молекулярной систематики и накоплению новых данных для более глубокого понимания строения и механизмов биосинтеза лигнина.

В связи с изложенным, **целью настоящей работы** стала разработка комплекса методических решений для получения и анализа масс-спектров лигнина и характеристики его химического состава на молекулярном уровне с применением метода масс-спектрометрии Orbitrap с фотоионизацией при атмосферном давлении. Для достижения поставленной цели автором был подготовлен критический обзор литературы, тщательно спланирован эксперимент и получены и интерпретированы данные, обобщенные в виде представленного диссертационного исследования.

**Общая характеристика работы.** Диссертационная работа И.И.Пиковского содержит все необходимые разделы, отражающие суть проведенных исследований, но имеет не совсем традиционную структуру. Это связано с тем, что после разделов «Введение» и «Экспериментальная часть» вместо главы «Результаты и их обсуждение» следуют четыре отдельных независимых главы, каждая из которых имеет свое собственное заключение. В конце работы приводится общее заключение и даны выводы. Материал диссертации изложен на 163 страницах текста, содержит 53 рисунка, 27 таблиц и список цитируемой литературы из 199 наименований.

По результатам диссертации опубликовано 17 печатных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus, RSCI) и рекомендованных Диссертационным Советом МГУ по специальности 1.4.2 – «Аналитическая химия». Результаты работы прошли апробацию на девятнадцати международных и Всероссийских конференциях, что позволяет судить об их доступности для обсуждения международной и российской научной общественностью.

**Обзор литературы** посвящен описанию характеристики лигнина и особенностей его структуры, дан общий обзор аналитических методов исследования лигнина, включая спектральные методы, двумерную спектроскопию ЯМР, определение молекулярно-массовых характеристик с помощью эксклюзионной хроматографии. Отдельный раздел посвящен применению масс-спектрометрии высокого разрешения (МСВР) для анализа лигнинов и родственных соединений, включая подробное описание преимуществ и недостатков двух основных видов масс-анализаторов, используемых в МСВР - ионно-циклотронного резонанса (ИЦР) и орбитальной ловушки ионов (Orbitrap). Следует отметить и подробный разбор особенностей методов ионизации лигнина при атмосферном давлении, а так же существующих подходов к визуализации и математической обработке данных МСВР. В целом обзор литературы имеет критический характер, снабжен заключением, написан на хорошем уровне, содержит данные как основополагающих работ, так и последних обзорных и оригинальных публикаций по теме диссертации. Тем самым он выполняет свою задачу - дает читателю исчерпывающее представление о состоянии вопроса в данной области и служит добротным научным обоснованием постановки диссертационной работы. Единственным замечанием к обзору является его недостаточная иллюстративность, - хотелось бы больше рисунков, особенно в части описания методов визуализации данных.

**Экспериментальная часть.** Работа выполнена на высоком методическом уровне с привлечением целого ряда современных методов физико-химического и структурного анализа. Это наглядно демонстрирует раздел «Экспериментальная часть». Основные работы по МСВР выполнены с применением ВЭЖХ/МС системы, состоящей из гибридного масс-спектрометра QExactive Plus (Thermo Scientific, США) с масс-анализатором на основе орбитальной ионной ловушки. В работе использована пиролитическая газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ/МС), эксклюзионная хроматография, элементный

анализ, метод двумерной спектроскопии ЯМР (ЯМР спектрометр «AVANCE III» с рабочей частотой 600 МГц (Bruker, Германия).

Несомненным достоинством работы и одним из важных этапов на пути к достижению поставленной цели исследования стало формирование обширной выборки образцов диоксанлигнинов, выделенных по методу Пеппера из 30 различных источников, охватывающих структурно разные типы лигнинов: хвойных пород деревьев, лиственных пород, травянистых растений и моховидных растений. Все выделенные лигнины были охарактеризованы методами элементного анализа, эксклюзионной хроматографии и пиролизической ГХ/МС. Помимо столь обширной выборки природных лигнинов для отработки методик использовали десять модельных соединений лигнина, включая мономерные и димерные фенольные соединения. Наличие такой представительной выборки хорошо охарактеризованных лигнинов обусловило возможность получения экспериментальных результатов, направленных на достижение цели работы.

**Результаты и их обсуждение.** Изложение основных результатов автор начинает в **Главе 3**, которая называется «Совершенствование подхода к анализу природных лигнинов методом масс-спектрометрии высокого разрешения с фотохимической ионизацией при атмосферном давлении». Глава начинается с обсуждения экспериментов по изучению механизмов фотоионизации лигнина с помощью модельных соединений, затем рассматривается влияние допантов на эффективность фотоионизации лигнина. В качестве допантов использовали ацетон, диоксан и тетрагидрофуран. Было показано, что все три допанта применимы для работы в режиме ФИАД, как в режиме генерации отрицательно заряженных, так и положительно заряженных ионов. Данные исследования стали обоснование **первого научного положения** диссертации:

«Высокоосновные апротонные растворители, такие как ацетон, 1,4-диоксан и тетрагидрофуран, обеспечивают эффективную ионизацию лигнина

в условиях ФИАД-МС с генерированием протонированных и депротонированных молекул лигнинных олигомеров».

Следующий раздел главы 3 посвящен оптимизации параметров ионного источника для анализа лигнина. Эксперименты проводили на образцах диоксанлигнина, выделенных из древесины ели и березы. Исследовали зависимости от температуры ионного источника и скорости потока растворителя в источник. Были получены результаты, которые отражены во **втором положении**, выносимом на защиту:

«Максимумы зависимостей эффективности ионизации лигнина в условиях ФИАД-МС достигаются при температуре ионного источника равной 500 °С и диапазона скоростей потока подачи растворителя 0,20–0,25 мл/мин».

Затем автор поставил задачу определить оптимальную величину разрешающей способности масс-анализатора Orbitrap для анализа лигнина и изучить процессы фрагментации лигнина в выбранных режимах. Эксперименты по определению разрешающей способности были проведены только на одном образце лигнина древесины хвойных пород - кедра. Автор не приводит обоснования выбору именно данного типа лигнина для проведения экспериментов по разрешающей способности. Автор приводит результаты по распределению ионов, детектируемых при различной разрешающей способности масс-анализатора на основе орбитальной ионной ловушки, по интенсивности и по числу сигналов в масс-спектре лигнина и делает вывод о том, что для наиболее интенсивных пиков в масс-спектре ( $I > 10\%$ ) адекватные брутто-формулы соответствующих ионов в диапазоне  $m/z$  300–1200 могут быть получены с использованием  $R \geq 70\ 000$ . При этом увеличение спектрального разрешения приводит к линейному возрастанию общего количества детектируемых пиков в области высоких молекулярных масс –при  $m/z > 1\ 000$ . Несмотря на тщательность поставленных экспериментов, они не снимают вопрос по категоричности **третьего**

**научного положения**, сформулированного на основании приведенных выше данных по одному образцу лигнина:

«Величина разрешающей способности масс-анализатора на основе орбитальной ионной ловушки, равная 70 000, позволяет проводить скрининговые исследования лигнина и достоверно определять элементные составы низкомолекулярной фракции лигнина. Разрешающая способность на уровне 280 000 обеспечивает наиболее полную характеристику элементных составов лигнинных олигомеров с молекулярными массами до 1 кДа».

Результаты следующего блока экспериментов изложены в разделе 3.4 и посвящены изучению процессов фрагментации макромолекул лигнина в ионном источнике с целью оценки применимости метода ФИАД-МСВР для структурного анализа лигнинов. Исследование проведено на обширной выборке модельных соединений, что позволило впервые установить основные пути деградации лигнина в источнике ФИАД: деметилирование, конденсация, отщепление метанола или формальдегида от структурных фрагментов, содержащих алифатические гидроксильные группы. Наименьшей устойчивостью в ФИАД характеризуются простые эфирные связи, тогда как С-С связи слабо подвержены деструкции. В целом автор делает очень важный вывод о неглубокой деградации лигнинного ансамбля в источнике ФИАД, что позволяет его использовать для анализа лигнинов.

**Четвертая глава** посвящена использованию найденных оптимальных условий MS-Orbitrap ФИАД для разработки подхода к экспрессной характеристике состава мономерных фрагментов макромолекул лигнина методом диссоциации, активированной соударениями (ДАС). Применение тандемной масс-спектрометрии требует понимания путей фрагментации лигнина в процессе ДАС, которое может быть достигнуто при проведении исследований на модельных соединениях. В связи с тем, что простая эфирная связь является одной из самых распространённых в лигнинах и характеризуется наименьшей энергией, то ее расщепление является основной реакцией в процессах деполимеризации биополимера. Для моделирования

этого процесса автором был выбран типичный представитель димерных структур с  $\beta$ -O-4 связью - гваяциловый эфир гваяцилглицерина (ГЭГГ), который показал существенный распад  $\beta$ -O-4 связей при энергиях ионизации свыше 10 эВ.

Следующий этап работы автор посвятил применению метода тандемной МС с широкополосной ДАС для определения количества характеристических звеньев (сирингильных, S, гваяцильных, G, и кумарильных (H) единиц), так называемых S/G/H соотношений, в различных образцах лигнина. Для этой цели был проведен анализ всей выборки образцов лигнина различного происхождения. Для проверки правильности полученных результатов было выполнено сопоставление полученных результатов с данными двух независимых методов: пиролитической ГХ/МС и нитробензольного окисления. Были поставлены эксперименты по воспроизводимости определения S/G/H соотношений методом МС-Orbitrap-ФИАД с широкополосной ДАС. Полученные результаты стали надежным обоснованием **четвертого научного положения**:

«Применение диссоциации, активированной соударениями, в широком диапазоне молекулярных масс лигнинных олигомеров при энергии соударения 10 эВ обеспечивает получение широкого набора низкомолекулярных продукт-ионов для экспрессного определения содержания гваяцильных, сирингильных и *p*-гидроксифенильных структурных единиц лигнина.»

Две заключительных главы «Результатов и их обсуждения» посвящены методам визуализации данных, полученных методом МСВР Orbitrap ФИАД для лигнина, и их применению для классификационного анализа лигнина (Глава 5 «Визуализация химического состава лигнинов как сложных объектов и их классификация с применением хемометрических методов»), и установлению структуры мало изученных природных лигнинов, в частности, травянистых растений и лигнина флоэмы и ксилеммы березы (Глава 6 «Молекулярный анализ и характеристика структуры природных лигнинов»).

В **Главе 5** показано, что ввиду ограниченной точности определения масс ионов методом MS-Orbitrap, особенно в области высокомолекулярных олигомеров) (1- 3 ppm), использование масс-листа для классификации лигнинов с применением метода главных компонент (МГК) не позволяет однозначно разделить лигнины по их таксономической принадлежности. Автором убедительно показано, что гораздо большей диагностической силой обладают данные тандемной масс-спектрометрии с широкополосной ДАС: в этом случае МГК позволяет не только различить видовой источник лигнина, но и правильно разделить образцы по гораздо более тонким внутривидовым различиям.

Однако автор полученным результатом не удовлетворился и решил применить более продвинутый метод обработки первичных данных MS-Orbitrap-ФИАД для классификационного анализа лигнинов. С точки зрения оппонента, этот блок работ представляет собой одну из наиболее интересных находок диссертанта. В качестве метода обработки первичных данных автор использовал широко известный подход - анализ с помощью дефекта масс Кендрика, однако ключевым моментом для такого анализа стали предложенные в работе новые базовые звенья. В результате автору впервые удалось установить структуру высокомолекулярных олигомеров в составе природного лигнина на основе обработки масс-листа MS-Orbitrap-ФИАД. Разработанный подход был блестяще использован автором как для демонстрации преобладающих структурных элементов в составе высокомолекулярных компонентов лигнина на примере лигнина можжевельника.

**Глава 6** посвящена демонстрации применимости разработанных методов и подходов для установления молекулярного состава и структуры неизвестных лигнинов на примере трех малоизученных лигнинов травянистых растений (крапива, осока) и флэзмы березы. Данный блок работ продиктован как теоретическими, так и практическими задачами. Это связано с тем, что травянистые растения представляют собой новое сырье



для биотехнологий, которое привлекает пристальное внимание ввиду высокой скорости роста травянистых растений и продуктивности биомассы. При этом флоэма березы (или луб, внутренняя часть коры, по которой распределяются фотосинтезированные питательные вещества от листьев во все органы деревьев) представляет собой многотоннажный отход, ценный растительный отход, который не находит широкого применения из-за отсутствия сведений о его химическом составе. Следует отметить, что в этой части работы автор применил двумерную спектроскопию ЯМР (HSQC) для верификации заключений о природе структурных элементов, сделанных на основе МС-МС экспериментов для диоксанлигнина осоки. Привлечение метода ЯМР позволило показать абсолютно доминирующий характер  $\beta$ -O-4 связи для формирования димеров в структуре лигнина осоки (до 80%) и минорный характер пинорезинольной связи, что не характерно для лигнинов древесных пород.

Выполненный блок работ лег в основу **пятого и шестого положений** защищаемой диссертации:

«Сочетание ФИАД-МС высокого разрешения на основе орбитальной ионной ловушки с методами визуализации химического состава на молекулярном уровне (диаграммы ван Кревелена) и сравнения масс-спектров с применением метода главных компонент позволяет осуществлять классификацию лигнинов по ботаническому происхождению и выявлять особенности молекулярного состава различных препаратов лигнина».

«Применение концепции дефектов масс Кендрика и фенилпропановых структур в качестве базовых единиц Кендрика позволяет изучать молекулярный состав и структуры лигнинных олигомеров в расширенном диапазоне молекулярных масс».

**Научная новизна.** Проведенное исследование характеризуется несомненной научной новизной. Автором впервые выполнены систематические исследования по оптимизации ионизации методом ФИАД, которые позволили предложить диоксан в качестве эффективного допанта.

Впервые установлено, что для получения структурных фрагментов, характерных для нативного лигнина, энергия ионизации активированной соударениями активации не должна превышать 10 эВ. Это позволило предложить новый способ экспрессного определения содержания синрингильных, гваяцильных и п-гидроксифенильных структурных единиц в препаратах лигнина методом MS-Orbitrap-ФИАД. Разработан новый подход к идентификации высокомолекулярных лигнинных олигомеров на основе оригинального подхода к определению базовых структурных единиц при построении диаграмм дефектов масс Кендрика. Предложен новый метод классификационного анализа лигнина по признаку «ботаническое происхождение» на основе данных тандемной масс-спектрометрии ФИАД-МС ДАС. На основании совместного анализа методами ФИАД МС и спектроскопии ЯМР впервые предложены структуры лигнина осоки.

**Практическая значимость полученных результатов** заключается в возможности их применения для экспрессной классификации и идентификации химического состава лигнина в различных источниках возобновляемого сырья, а также для аналитического сопровождения технологий переработки биомассы высших растений, утилизации технических лигнинов и контроля качества лигносодержащих продуктов.

**Можно заключить, что сформулированная цель работы автором достигнута, поставленные задачи выполнены. Представленные научные положения, выводы и рекомендации являются обоснованными.** Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертации.

Тем не менее, по работе можно сделать **следующие замечания:**

1. В обзоре литературы на стр. 19 автор приводит данные в процентах о содержании функциональных групп в лигнине. При этом не понятно, к чему относятся указанные проценты.

2. На стр. 69 автор указывает, что полученные методом масс-спектрометрии величины среднечисловой молекулярной массы оказались в

2–3 раза ниже по сравнению с результатами эксклюзионной хроматографии. При этом никаких объяснений на этот счет не приводит.

3. Для минимизации процессов дефрагментации в качестве оптимальной энергии соударения предложено значение 10 эВ. А почему не 5 или 7 эВ? Значение 10 было минимальным для исследованного диапазона

4. При обработке данных как МСВР ФИАД, так и столкновительной тандемной МС ДАС автор уделяет большое внимание поиску «разностных» фрагментов, который осуществляет практически «вручную». Почему для этих целей не использовался алгоритм расчета разностей в МС спектре?

5. В результате классификационного анализа МС данных для лигнинов по источнику происхождения сделаны тривиальные выводы: например, что присутствие пара-гидроксифенильного фрагмента характерно для лигнина травянистых растений. В то же время автор не приводит никаких описательных статистик для лигнинов разного происхождения, например, по найденным соотношениям S/G и H/G, которые могли бы лечь в основу базы данных для идентификации лигнинов.

6. В работе все диаграммы Ван Кревелена приведены в не традиционном виде: по оси X отложены значения H/C, по оси Y - O/C. Это затрудняет восприятие полученных визуальных образов. Хотелось бы видеть обобщение полученных данных в виде приложения с диаграммами Ван Кревелена для всех исследованных лигнинов.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.4.2 – «Аналитическая химия» (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно

приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Пиковской Илья Иванович заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.2 – «Аналитическая химия».

Официальный оппонент:

доктор химических наук,

г.н.с. кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза  
Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Перминова Ирина Васильевна



«5» ноября 2022 г.

Контактные данные:

тел.: +7(495)939-55-46, e-mail: iperminova@gmail.com

Специальность, по которой официальным оппонентом  
защищена диссертация: 02.00.02 "Аналитическая химия"

Адрес места работы:

119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 3,  
кафедра медицинской химии и тонкого органического синтеза  
Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова.  
Тел.: +7(495)939-55-46; e-mail: iperminova@gmail.com

