

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА**

На правах рукописи



**ПИКОВСКОЙ ИЛЬЯ ИВАНОВИЧ**

**АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНОГО СОСТАВА ПРИРОДНОГО ЛИГНИНА  
МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ НА ОСНОВЕ ОРБИТАЛЬНОЙ ИОННОЙ  
ЛОВУШКИ С ФОТОИОНИЗАЦИЕЙ ПРИ АТМОСФЕРНОМ ДАВЛЕНИИ**

Специальность – 1.4.2 – Аналитическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата химических наук

Москва 2022

Работа выполнена в ФГАОУ ВО «Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова»

**Научный руководитель: Косяков Дмитрий Сергеевич**

*Кандидат химических наук, доцент*

*директор Центра коллективного пользования научным оборудованием «Арктика» ФГАОУ ВО «Северный (Арктический) федеральный университет имени М. В. Ломоносова»*

**Официальные оппоненты: Бродский Ефим Соломонович**

*Доктор химических наук*

*Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, старший научный сотрудник*

**Перминова Ирина Васильевна**

*Доктор химических наук*

*МГУ имени М. В. Ломоносова, Химический факультет, Кафедра медицинской химии и тонкого органического синтеза, главный научный сотрудник*

**Темердашев Азамат Зауалевич**

*Доктор химических наук*

*ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», Кафедра аналитической химии, старший научный сотрудник*

Защита диссертации состоится 16 ноября 2022 года в 15 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.014.5 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские Горы, д.1, стр.3, МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, аудитория 446.

E-mail: dissovet02.00.02@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д.27) и на сайте АИС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/472591689/>

Автореферат разослан «23» сентября 2022 г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат химических наук



И.А. Ананьева

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Лигнин является вторым по распространённости биополимером в природе и составляет до трети биомассы растений. Согласно современным тенденциям «зеленой» химии, он считается перспективным возобновляемым источником широкого круга ароматических соединений и сырьем для производства различных полимерных материалов, сорбентов, поверхностно-активных веществ, комплексообразующих агентов, антиоксидантных препаратов. Использование лигнина сдерживается лабильностью его химического состава и структуры, а также многообразием входящих в состав макромолекул биополимера структурных фрагментов, обуславливающим исключительную сложность молекулярного состава как самих препаратов лигнина, так и продуктов их деполимеризации.

Преодоление указанных проблем тесно связано с решением комплекса аналитических задач, охватывающих такие аспекты, как характеристика сложных смесей лигнинных олигомеров на молекулярном уровне, установление структуры макромолекул биополимера, определение структурных фрагментов различных типов, классификация препаратов лигнина различного происхождения на основе их молекулярного состава. Проведение таких исследований предполагает применение наиболее информативных методов аналитической химии, которые приходят на смену применявшимся ранее для изучения лигнинов химическим деградиационным методам, основанным на реагентной или термической деполимеризации макромолекул в различных условиях и анализе смесей образующихся мономерных продуктов (нитробензольное окисление, тиацидолиз, пиролитическая газовая хроматография). Наряду с двумерной спектроскопией ЯМР, наибольшими перспективами для анализа лигнинов обладают методы масс-спектрометрии высокого разрешения (МСВР) с ионизацией при атмосферном давлении, успешно применяемые для исследования различных биомолекул и являющиеся основой таких отраслей науки, как протеомика, гликомика, гуминомика и пр. Среди них следует выделить масс-спектрометрию на основе орбитальной ионной ловушки (Orbitrap), являющуюся современной и доступной альтернативой технике ионного циклотронного резонанса для решения задач характеристики молекулярного состава сложных объектов. В сочетании с фотоионизацией при атмосферном давлении (ФИАД) данный метод позволяет получать высокоинформативные масс-спектры лигнинов. Несмотря на значительный прогресс в применении масс-спектрометрических методов для анализа лигнинов, достигнутый в последние годы, методологические основы таких исследований до сих пор остаются слабо проработанными, а их создание и совершенствование является важной задачей современной аналитической химии.

**Целью настоящей работы** является 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 необходимо решение следующих **задач**:

1. Изучить влияние различных параметров (природа допанта, температура ионного источника, скорость подачи реагентов) на эффективность фотохимической ионизации лигнина при атмосферном давлении;
2. Определить оптимальные условия проведения масс-спектрометрического анализа и регистрации масс-спектров лигнина;
3. Разработать подход к определению содержания в препаратах лигнина структурных единиц различных типов, основанный на применении активированной соударениями диссоциации лигнинных олигомеров в широком диапазоне молекулярных масс;
4. Разработать способ экспрессной классификации лигнинов по их происхождению на основе молекулярного состава методом масс-спектрометрии высокого разрешения;
5. Разработать подход к масс-спектрометрическому изучению молекулярного состава и структуры лигнинных олигомеров в расширенном диапазоне молекулярных масс, основанного на применении концепции дефектов масс Кендрика;
6. Провести апробацию разработанных подходов на препаратах малоизученных лигнинов.

### **Научная новизна работы**

Показано, что максимальная эффективность ионизации лигнина достигается с применением высокоосновного апротонного растворителя диоксана в качестве допанта в режиме фотохимической ионизации при атмосферном давлении.

Предложен новый способ экспрессного определения содержания синрингильных, гваяцильных и *n*-гидроксифенильных структурных единиц в препаратах лигнина, основанный на одновременной активированной соударениями диссоциации всех ионов-предшественников лигнинных олигомеров в широком диапазоне  $m/z$ . Достоверность получаемых результатов подтверждена путём их сравнения с результатами двух независимых методов: пиролитической газовой хроматографии/масс-спектрометрии и нитробензольным окислением.

Предложен новый подход к определению элементных составов высокомолекулярных лигнинных олигомеров на основе концепции дефектов масс Кендрика при использовании фенилпропановых структурных единиц в качестве базовых звеньев макромолекул.

Предложен способ экспрессной классификации лигнинов по их ботаническому происхождению на основе сравнения тандемных масс-спектров ФИАД-МС с применением метода главных компонент. Продемонстрирована перспектива применения данного подхода для более глубокой дифференциации биополимера внутри отдельных классов на примере лигнинов травянистых растений и лиственных пород древесины.

Показана применимость разработанных методов для анализа малоизученных лигнинов травянистых растений и флоэмы березы. На основании комплементарного анализа методами ФИАД-МС и спектроскопии ЯМР предложены структуры олигомеров лигнина осои.

**Практическая значимость** полученных результатов заключается в возможности их применения для экспрессной классификации и характеристики химического состава лигнинов как возобновляемого сырья, а также для аналитического сопровождения существующих и разрабатываемых технологий переработки биомассы растений, утилизации технических лигнинов и контроля качества лигносодержащих продуктов.

**На защиту выносятся следующие положения:**

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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 п-гидроксифенильных структурных единиц лигнина.
5. 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.
6. 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.

**Степень достоверности** подтверждается применением современных высокоточных инструментальных методов анализа - масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения, а также надёжными средствами проведения эксперимента, осуществлением обработки полученных результатов методами математической статистики и интерпретацией результатов с использованием современного программного обеспечения, а также сравнением с другими методами анализа.

### **Соответствие паспорту научной специальности**

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.4.2 – Аналитическая химия по областям исследований:

- методы химического анализа (химические, физико-химические, атомная и молекулярная спектроскопия, хроматография, рентгеновская спектроскопия, масс-спектрометрия, ядерно-физические методы и др.);
- анализ природных веществ.

### **Публикации**

По материалам 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 в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.2 – «Аналитическая химия».

### **Гранты**

Диссертационная работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант «Аспиранты» №19-33-90043), РНФ (грант № 21-73-20275), а также государственного задания Минобрнауки РФ № 0793-2020-0007.

### **Апробация работы**

Результаты работы представлены на Международной конференции «15th European Workshop on lignocellulosics and pulp» (2018, Авейро, Португалия), VII, VIII, IX Всероссийской конференции с международным участием "Масс-спектрометрия и её прикладные проблемы" (2018, 2019, 2021 г.г., Москва), XI Международной конференции Petromass-2018 (2018, Блед, Словения), IV Международной научной конференции "Современные тенденции развития химии и технологии полимерных материалов" (2018, Санкт-Петербург), VIII, IX Международной конференции "Физикохимия растительных полимеров" (2019 и 2021 г.г., Архангельск), XXI Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (2019, Санкт-Петербург).

### **Личный вклад автора**

Личный вклад автора заключался в поиске, систематизации и анализе литературных данных по теме работы; формулировании цели исследования, постановке задач, планировании и проведении экспериментов; обработке и интерпретации полученных результатов, обобщении результатов работы, а также в

подготовке к публикации результатов проведенных исследований. Во всех опубликованных работах вклад автора является определяющим. Совершенствование подхода к анализу природных лигнинов методом масс-спектрометрии высокого разрешения с фотохимической ионизацией при атмосферном давлении проводилось соискателем совместно с научным руководителем [Kosyakov D.S., et al. *Analytica Chimica Acta*. 2021. V. 1179. 338836.], [Pikovskoi I.I., et al. *Journal of Analytical Chemistry*. 2021. V. 76. № 14. P. 1610–1617]. Вклад соискателя в данных трудах составляет 1/2. Исследование малоизученных лигнинов травянистых растений проводилась совместно с А.В. Фалёвой и И.С. Шавриной [Faleva A.V., et al. *Polymers*. 2022. V. 14. № 5. P. 964 – 979], [Pikovskoi I.I., et al. *Journal of Analytical Chemistry*. 2019. V. 74. № 14. P. 1412–1420], [Pikovskoi I.I., et al. *Russian Chemical Bulletin, International Edition*. 2020. V. 69. № 10. P. 2004–2012]. Стоит отметить, что в данных работах соискатель апробировал разработанные подходы для молекулярного анализа и характеристики структуры малоизученных природных лигнинов. Вклад автора в данных научных трудах составляет 2/5. Все экспериментальные исследования были проведены, используя ресурсы (в том числе закупленные автором реактивы из личных грантов) и оборудование ЦКП НО «Арктика».

### **Структура и объем работы**

Диссертация состоит из следующих основных элементов: введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждений (представлены в четырех главах), общих выводов и списка цитируемой литературы. Материал изложен на 163 страницах машинописного текста, содержит 53 рисунка и 27 таблиц, в списке цитируемой литературы 199 источников.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

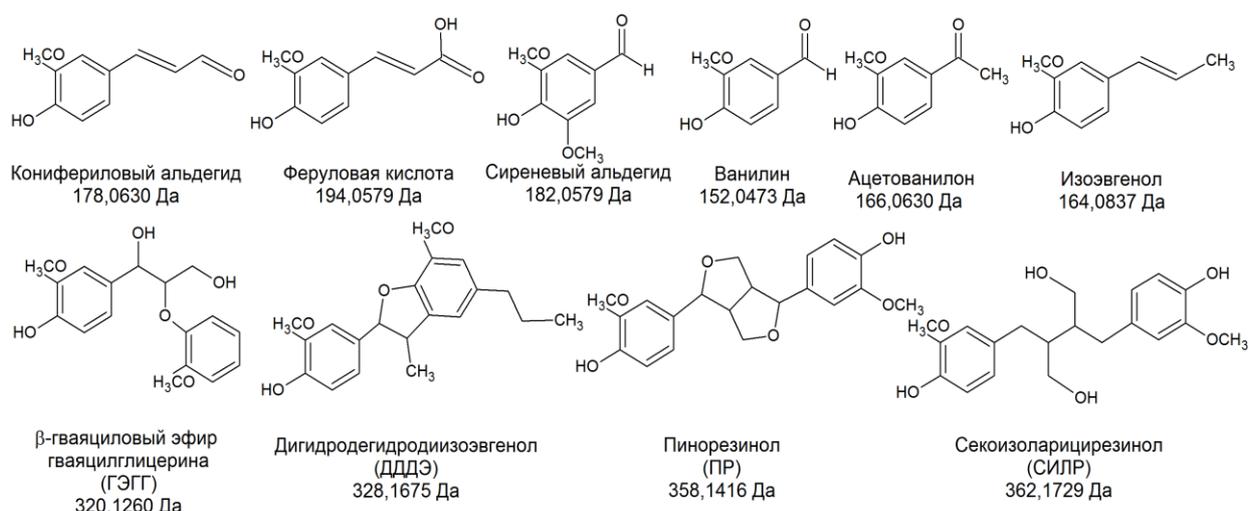
**Во введении** сформулирована актуальность выбранной темы, обозначены цель исследования и его задачи, обоснована научная новизна работы и её практическая значимость.

**Первая глава посвящена** обзору литературных данных, которые включают в себя общие сведения о структуре и физико-химических свойствах лигнина, процессах его биосинтеза в растениях. Рассмотрены основные методы выделения и особенности препаратов лигнина из различных растительных материалов. Основное внимание уделено существующим аналитическим методам анализа химического состава и изучения структуры макромолекул лигнина, в том числе с использованием масс-спектрометрии с различными видами ионизации. На основе анализа литературных данных сделаны выводы, подтверждающие актуальность темы диссертационной работы и обосновывающие постановку цели и задач исследования.

**Вторая глава** включает описание используемых в работе материалов и оборудования. Отдельно выделены объекты исследования – модельные соединения и препараты лигнина различного происхождения, дана их характеристика.

В качестве основного оборудования для масс-спектрометрического анализа использовалась ВЭЖХ-МС система, состоящая из гибридного масс-спектрометра QExactive Plus (Thermo Scientific, США) с квадрупольным масс-фильтром и масс-анализатором на основе орбитальной ионной ловушки, оснащённой источником ионов Ion Max и системой ФИАД с криптоновой лампой (энергия кванта 10,0 и 10,6 эВ), а также жидкостного хроматографа LC-30 «Nexera» (Shimadzu, Япония). Молекулярные массы лигнинов определяли методом эксклюзионной хроматографии с использованием ВЭЖХ-системы LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония). Элементный состав определяли с использованием СНNS-анализатора EuroEA-3000 (EuroVector, Италия). Соотношение сиригильных, гваяцильных, и *n*-гидроксифенильных структурных единиц (S/G/H) определяли методом пиролитической газовой хроматографии - масс-спектрометрии, с использованием ГХ-МС системы, состоящей из газового хроматомасс-спектрометра GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu, Япония) и пиролизера EGA/PY-3030D (Frontier Lab, Япония). Для характеристики выделенных препаратов лигнина использовали методы одномерной и двумерной спектроскопии ядерного магнитного резонанса с использованием ЯМР-спектрометра AVANCE III 600 МГц (Bruker, Германия).

В качестве модельных соединений использовали 6 мономерных (изоэвгенол, кониферилловый альдегид, феруловая кислота, ацетованилон, ванилин и сиреневый альдегид) и 4 димерных фенольных соединения (рис. 1): β-гваяциловый эфир гваяцилглицерина (ГЭГГ), секоизоларицирезинол (СИЛР), пинорезинол (ПР), дигидродегидродиизоэвгенол (ДДДЭ). Все соединения (за исключением ДДДЭ, синтезированного по известной методике) были приобретены у компаний Sigma-Aldrich (Германия) и Fluka (Швейцария).

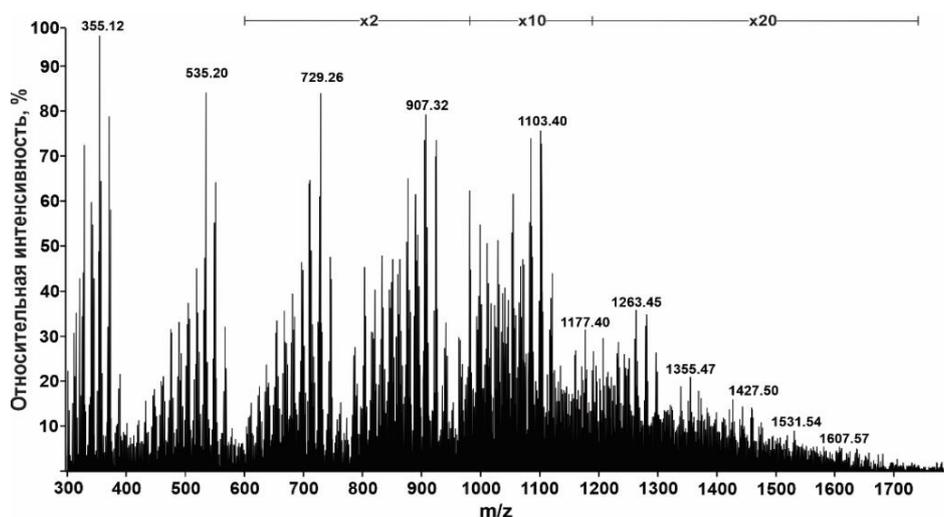


**Рисунок 1.** Структурные формулы и моноизотопные массы модельных соединений

В качестве объектов исследования использовали тридцать малоизменённых препаратов диоксанлигнина хвойной и лиственной древесины различных пород, соломы злаковых растений и трав, а также мхов, выделенных из растительного сырья методом Пеппера.

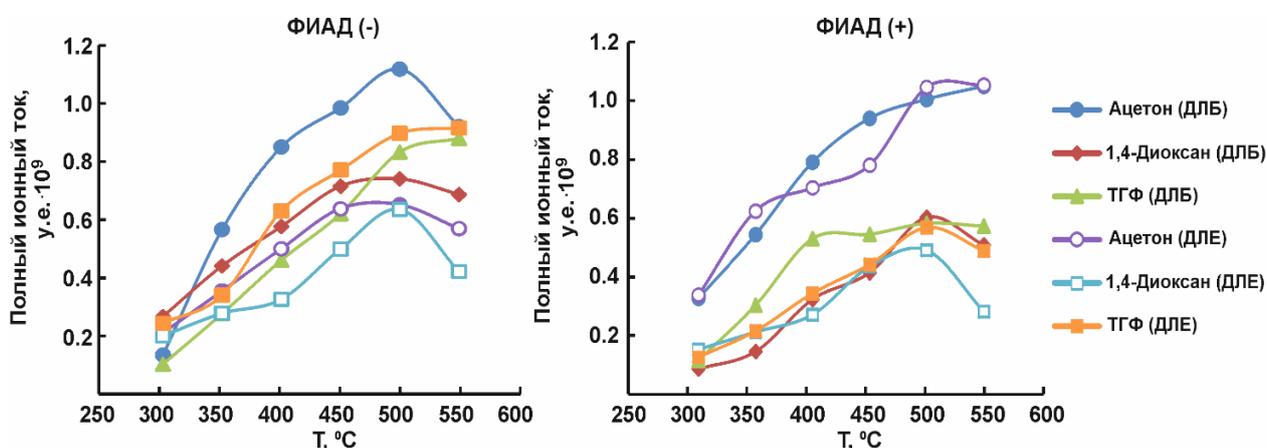
**Третья глава** («Совершенствование подхода к анализу природных лигнинов методом масс-спектрометрии высокого разрешения с фотохимической ионизацией при атмосферном давлении») посвящена исследованию влияния природы допанта на эффективность ионизации и масс-спектры лигнина, оптимизации параметров ионного источника и величины разрешающей силы масс-анализатора, изучению фрагментации различных структурных единиц макромолекул лигнина в условиях ФИАД.

Влияние природы допанта на эффективность ФИАД. Эксперименты на модельных соединениях и препаратах лигнина показали, что применение бездопантной фотоионизации (непосредственное поглощение УФ-излучения молекулами аналитов или кластерами метанола, ацетонитрила и воды) не позволяет достичь приемлемого уровня сигналов в масс-спектрах. Использование высокоосновных апротонных растворителей с низким потенциалом ионизации (<10 эВ) в качестве допантов обеспечивает эффективное генерирование множества положительно и отрицательно заряженных частиц различных типов при поглощении излучения Кг лампы с последующим протонированием/депротонированием молекул аналитов (раздел «Механизм фотоионизации лигнина»). Применение в качестве растворителей/допантов ацетона, 1,4-диоксана и тетрагидрофурана с добавкой 10% воды (для повышения растворимости лигнина) позволяет получить масс-спектры биополимера, характеризующиеся высокой интенсивностью сигналов и содержащие в своём составе тысячи пиков лигнинных олигомеров, которые объединяются в группы в зависимости от степени полимеризации (рис. 2). Все три исследованных допанта демонстрируют сравнимую эффективность и обеспечивают ионизацию лигнинных олигомеров с молекулярными массами до 1500–1800 Да.



**Рисунок 2.** Масс-спектр препарата диоксанлигнина ели, полученный в режиме ФИАД (–) с использованием 1,4-диоксана в качестве допанта

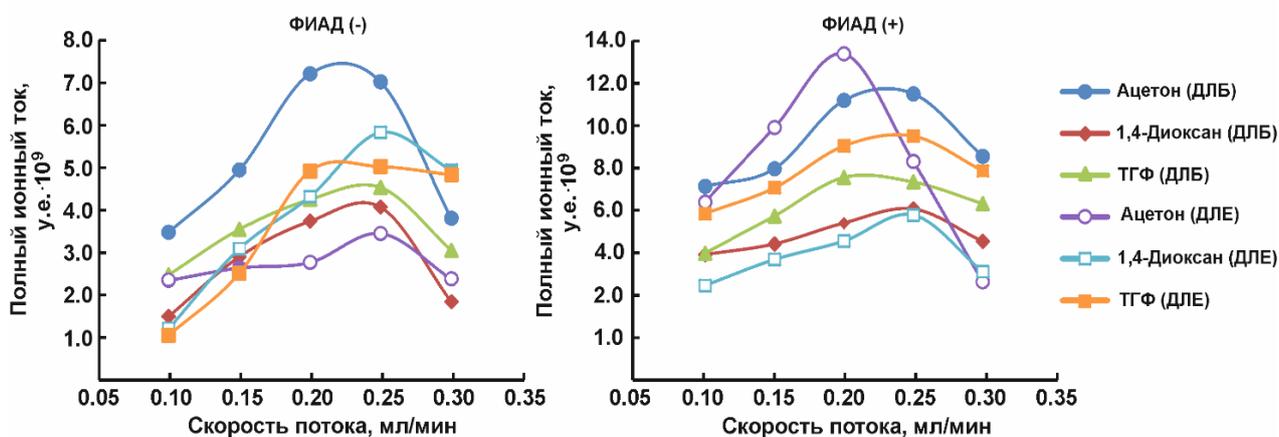
Оптимизация условий ФИАД. Температура источника является важнейшим фактором, определяющим энергию взаимодействия аналитов с допантом и процессы переноса протона. Установлено, что с ростом температуры источника увеличиваются интенсивности сигналов аналитов, которые достигают своих максимальных значений в диапазоне температур 500–550 °С (рис. 3). Дальнейшее снижение полного ионного тока обусловлено развитием процессов деградации лигнинных веществ.



**Рисунок 3.** Зависимости полного ионного тока от температуры источника

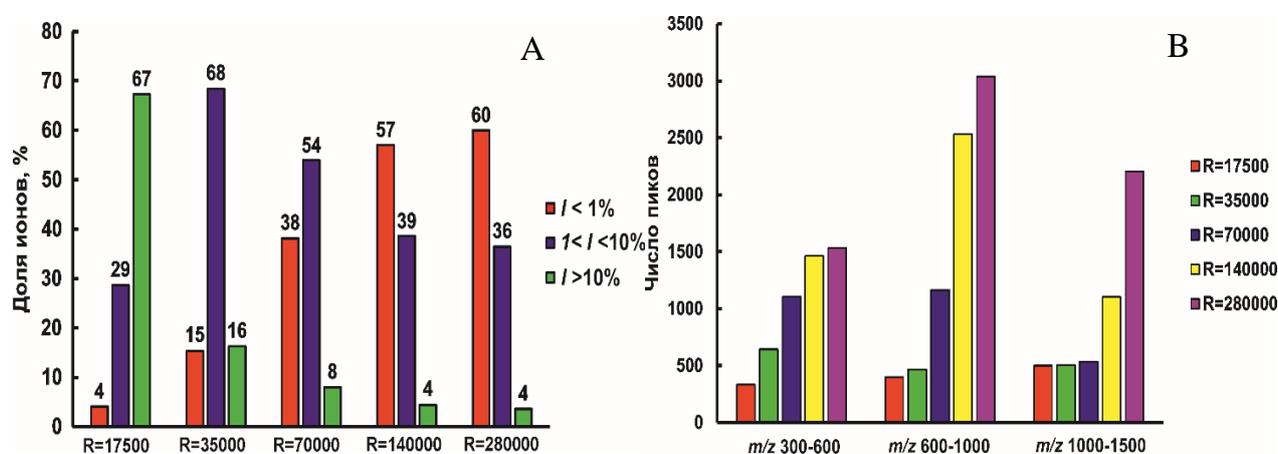
Эффективность ФИАД зависит от потока массы в ионный источник, при этом наблюдается выраженная экстремальная зависимость полного ионного тока от скорости потока раствора лигнина (рис. 4). Максимальная интенсивность сигналов достигается при скоростях потока 0,20–0,25 мл/мин. На скоростях свыше 0,25 мл/мин эффективность ионизации падает за счет процессов рекомбинации ионов и кластеризации молекул допанта.

Среди исследуемых допантов 1,4-диоксан отличается более низким (в 2–2,5 раза) уровнем фонового сигнала в масс-спектрах, обеспечивает менее выраженную фрагментацию лигнинных веществ в источнике ионов и может быть рекомендован как предпочтительный допант для ФИАД.



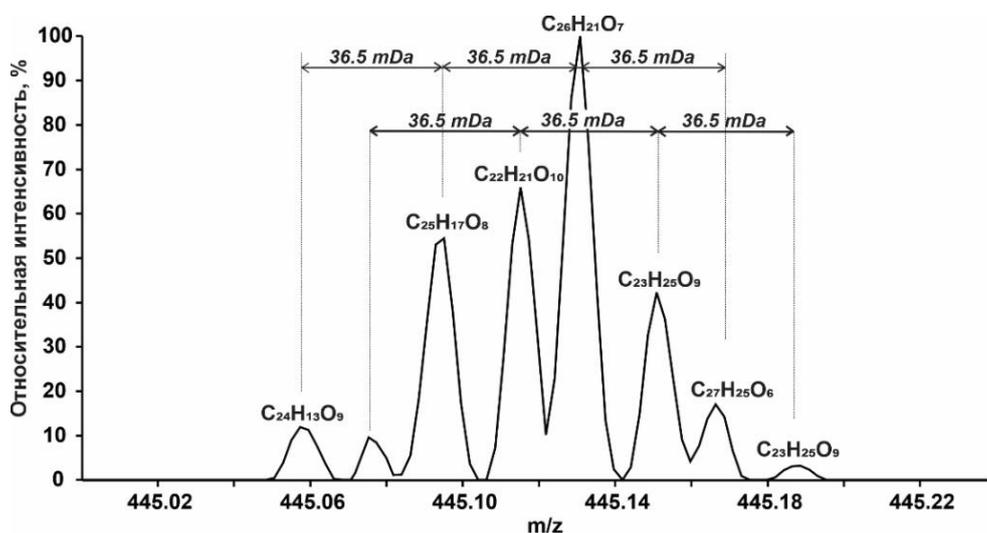
**Рисунок 4.** Зависимости полного ионного тока от скорости потока

Роль разрешающей способности масс-анализатора. Присутствие в лигнинах множества изобарных соединений с одинаковыми номинальными массами обуславливает необходимость применения масс-спектрометрии высокого и сверхвысокого разрешения. Сравнение получаемых масс-спектров на различных уровнях спектрального разрешения ( $R$ ) показало, что общее количество детектируемых пиков в диапазоне  $m/z$  300–1500 изменяется практически в 3 раза – от 1500 до 6800 при увеличении  $R$  от 17 500 до 280 000 (рис. 5В). Основной вклад в прирост количества обнаруживаемых лигнинных олигомеров вносят пики с относительной интенсивностью  $I_{отн} < 1\%$ , в то время как доля высокоинтенсивных пиков снижается (рис. 5А) за счёт разрешения отдельных компонентов, входящих в их состав. Закономерно, что эффект дискриминации изобарных ионов при высокой разрешающей способности масс-анализатора наиболее выражен для высоких молекулярных масс.



**Рисунок 5.** Распределение ионов, детектируемых при различной разрешающей способности масс-анализатора на основе орбитальной ионной ловушки, по интенсивности (А) и числу (В) сигналов в масс-спектре лигнина

Тонкая структура масс-спектров высокого разрешения лигнина представляет собой набор кластеров из 6–10 однозарядных изобарных ионов с  $\Delta m/z = 0,0365$ . Данная величина обусловлена наличием серий олигомеров, различающихся степенью ненасыщенности (двойная связь,  $\Delta m/z = 2,0157$ ), а также «заменой» метильной группы на гидроксильную ( $\Delta m/z = 1,9792$ ):  $2,0157 - 1,9792 = 0,0365$ . Дополнительным элементом тонкой структуры, в большей степени характерным для более крупных олигомеров, является наличие пар молекул, отличающихся по элементному составу на 4 атома углерода и 3 атома кислорода (+4C–3O).



**Рисунок 6.** Фрагмент тонкой структуры масс-спектра хвойного лигнина ( $R=70000$ )

Установлено, что разрешающая способность масс-анализатора на уровне 70000 позволяет проводить скрининговые исследования препаратов лигнина и определять молекулярный состав наиболее распространённых олигомеров, дающих интенсивные сигналы в масс-спектрах ФИАД, а также низкомолекулярных (<600 Да) фракций лигнина. Для детального исследования молекулярного состава лигнина требуется достижение спектрального разрешения на уровне 280 000.

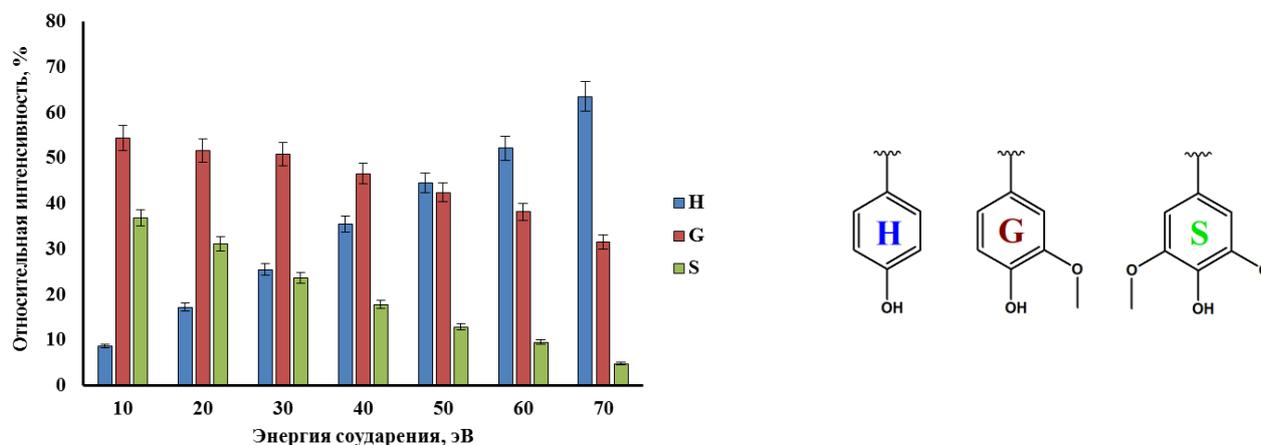
Фрагментация аналитов в источнике ионов. Анализ масс-спектров ФИАД (–) мономерных модельных соединений показал, что основные пути их фрагментации в источнике ионов связаны с протеканием процессов деметилирования, а в случае феруловой кислоты – декарбоксилирования. Три допанта демонстрируют близкие доли фрагментных ионов в спектрах, не превышающие по относительной интенсивности 15%. В условиях ФИАД (+) преобладает потеря  $H_2O$  и  $CO_2$ .

Изучение масс-спектров модельных димерных соединений (рис. 1) позволило оценить возможность частичной деполимеризации лигнина в ионном источнике за счёт разрыва связей между фенилпропановыми структурными единицами лигнина. Если в условиях ФИАД (–) наблюдаются интенсивные сигналы депротонированных молекул  $[M-H]^-$ , то в случае ФИАД (+) преобладание в масс-спектре сигнала иона  $[M+H]^+$  характерно только для ДДЭ. С другой стороны, ФИАД (+) обеспечивает более высокую стабильность связей между структурными фрагментами макромолекулы. Так, наиболее распространённая в структуре лигнина и лабильная простая эфирная связь  $\beta$ -O-4 подвергается деградации на  $\sim 20\%$ , в то время как в условиях ФИАД (–) общие интенсивности сигналов димерных и мономерных фрагментов в масс-спектрах ГЭГГ примерно одинаковы. Наибольшей стабильностью отличается углерод-углеродная ( $\beta$ - $\beta$ ) связь – СИЛР является единственным из исследуемых димеров, устойчивых в условиях ФИАД (–). Несмотря на преимущества ФИАД (+) с точки зрения минимизации фрагментации аналитов, недостатком данного режима ионизации является существенно подавление сигналов олигомеров в области высоких молекулярных масс (>1 кДа). В связи с этим, наиболее полная характеристика

химического состава препаратов лигнина может быть получена с применением ФИАД (–).

**Глава 4** («Разработка подхода к экспрессной характеристике состава мономерных фрагментов макромолекул лигнина методом диссоциации, активированной соударениями») посвящена изучению процессов активированной соударениями диссоциации (ДАС) олигомеров лигнина и созданию на этой основе оригинального подхода к определению относительного содержания сингильных (S), гваяцильных (G) и *n*-оксифенильных (H) структурных единиц лигнина методом тандемной масс-спектрометрии с использованием широкополосной ДАС.

Широкополосная ДАС ионов-предшественников в диапазоне  $m/z$  300–1000 позволяет получить набор мономерных ( $m/z$  90–250) ионов-продуктов, соответствующих S, G, H структурным фрагментам макромолекул лигнина. Установлено, что относительные интенсивности их сигналов в получаемых тандемных масс-спектрах сильно зависят от величины энергии соударений (рис. 7). Её увеличение приводит к активному протеканию побочных процессов деметилирования и деметоксилирования, т.е. последовательного превращения S-структур в структуры G и H-типов и, как следствие, искажению получаемых соотношений S/G/H. Для минимизации данного эффекта и обеспечения приемлемого выхода мономеров в ходе ДАС оптимальная величина энергии соударения составляет 10 эВ.



**Рисунок 7.** Влияние энергии соударений на интенсивность пиков мономерных структур H, G и S-типов в тандемных масс-спектрах лигнина березы, полученных методом широкополосной ДАС ( $m/z$  300–1000,  $n=3$ ,  $P=0,95$ )

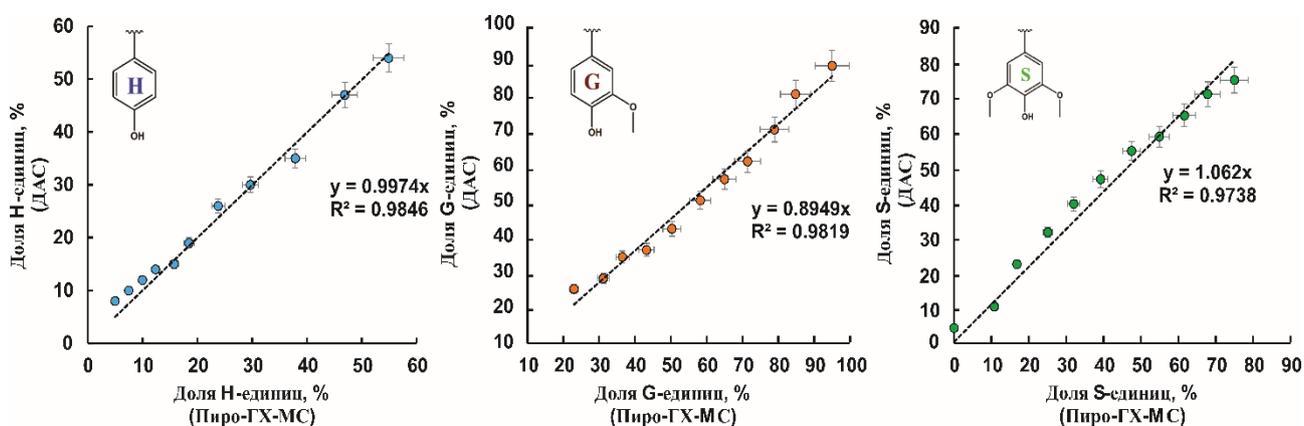
Правильность получаемых методом ФИАД-МС/МСВР величин соотношений S/G/H оценивали для широкого круга препаратов лигнина путем их сопоставления с результатами, полученными независимыми методами нитробензольного окисления с последующим хроматографическим определением образующихся ароматических альдегидов и пиролитической газовой хроматографии – масс-спектрометрии (Пиро-ГХ-МС). В первом случае (табл. 1), полученные двумя методами содержания структур H, G и S-типов хорошо коррелируют друг с другом, при этом в ряде случаев

наблюдаются существенные различия, которые могут быть обусловлены несовершенством и сложностью химического деградиционного метода.

**Таблица 1.** Сравнение S/G/H соотношений для различных лигнинов, полученных методами нитробензольного окисления и ФИАД-МС/МСВР (n=3, P=0,95)

Лигнин	Нитробензольное окисление			ФИАД-МС/МСВР		
	H, %	G, %	S, %	H, %	G, %	S, %
Ель	8 ± 1	92 ± 2	2 ± 0.5	8 ± 2	85 ± 3	7 ± 3
Сирень	4 ± 1	27 ± 2	69 ± 2	5 ± 2	36 ± 4	59 ± 5
Крапива	10 ± 2	45 ± 1	45 ± 2	6 ± 2	53 ± 4	41 ± 6
Абрикос	4 ± 2	20 ± 3	76 ± 3	7 ± 3	30 ± 3	63 ± 6
Ива	3 ± 1	32 ± 3	65 ± 4	5 ± 1	40 ± 4	55 ± 3
Кипрей	31 ± 4	42 ± 1	27 ± 5	33 ± 2	52 ± 4	15 ± 3
Яблоня	2 ± 2	34 ± 2	64 ± 1	3 ± 1	45 ± 3	52 ± 4
Кукуруза	5 ± 2	49 ± 1	46 ± 2	3 ± 2	61 ± 4	36 ± 5

Сравнение результатов анализа 11 модельных смесей препаратов лигнинов\* лиственных, хвойных и травянистых растений, полученных с использованием ФИАД-МС/МСВР и наиболее распространённым в настоящее время методом Пиро-ГХ-МС демонстрирует линейные корреляционные зависимости ( $R^2 > 0,97$ ) с угловым коэффициентом, близким к 1 (рис. 8).



**Рисунок 8.** Корреляционные зависимости результатов определения гваяцильных, сирингильных и *n*-гидроксифенильных структурных единиц лигнина методами Пиро-ГХ-МС и ФИАД-МС/МСВР (n=3, P=0,95)

Это позволяет рассматривать ФИАД-МС/МСВР в качестве нового альтернативного метода определения содержания S, G, и H структурных единиц в составе лигнина, отличающегося высокой информативностью и экспрессностью (продолжительность аналитического цикла не превышает 5 мин).

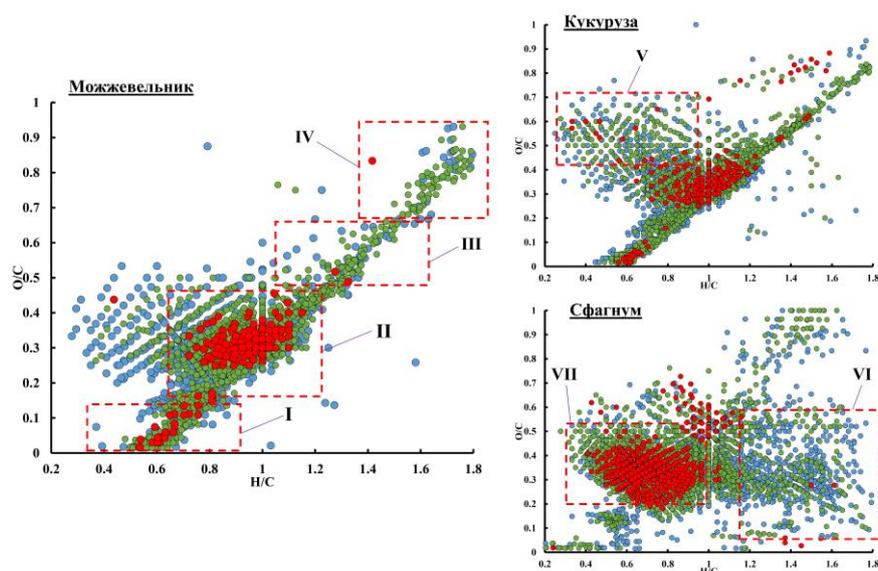
\* Модельные смеси представляли собой препараты лигнина, полученные путем смешивания в определенных соотношениях 2-х максимально различных по своему составу лигнина для получения набора полимеров с разным содержанием H-, G-, S структурных единиц

**Глава 5** («Визуализация химического состава лигнинов как сложных объектов и их классификация с применением хемометрических методов») посвящена методам математической обработки масс-спектрометрических данных с целью наглядной визуализации химического состава различных лигнинов и их классификации.

Поскольку лигнин является объектом сложного состава, его характеристика на молекулярном уровне должна опираться не только на решение частных задач идентификации и определения отдельных олигомеров, но и на получение и хемометрическом анализе т.н. «образов» химического состава, отражающих вклад всех детектируемых в препаратах лигнина соединений.

Метод ван Кревелена. Диаграммы ван Кревелена (ДВК) представляют собой способ визуализации химического состава сложных химических смесей путём построения графика зависимости элементных соотношений Н/С и О/С для каждого соединения в смеси. Принадлежность большинства лигнинов к СНО-классу значительно упрощает масс-спектрометрическое установление элементных составов олигомеров лигнина на основе их точных масс. Учитывая достигаемую точность определения величин  $m/z$  на уровне  $\sim 1$  ppm, надёжное установление брутто-формул анализов возможно для молекулярных масс до  $\sim 1$  кДа.

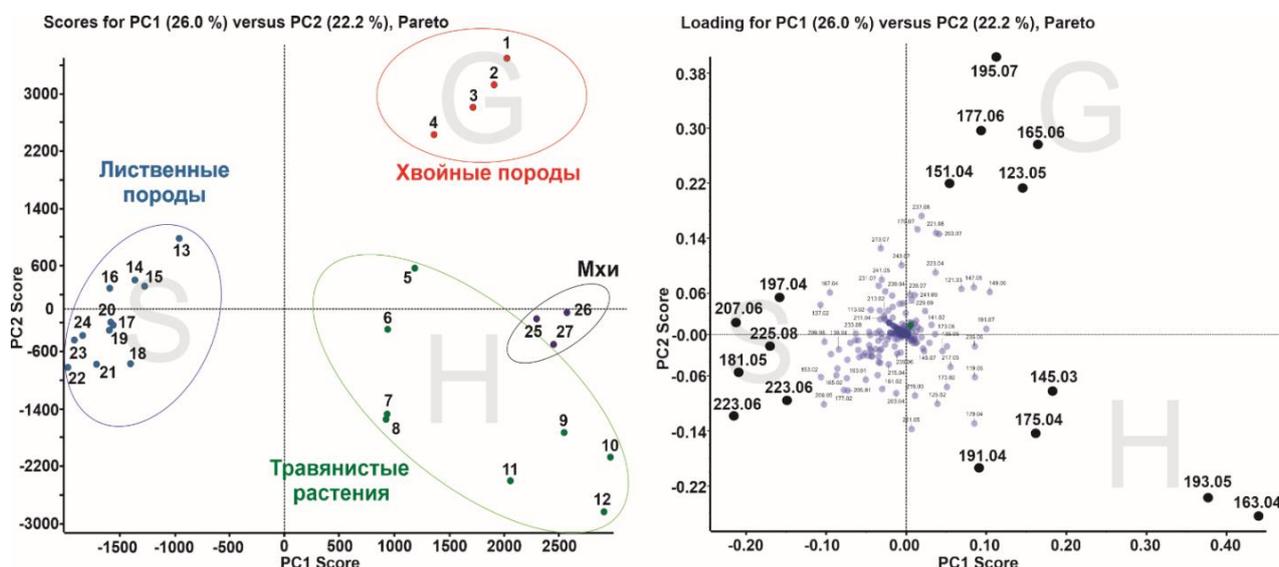
На ДВК для большинства препаратов лигнина можно выделить 4 основные области (рис. 9). Основная масса детектируемых соединений лежит в области элементных составов II ( $H/C = 0,6-1,2$ ;  $O/C = 0,2-0,6$ ), соответствующей типичным олиголигнолам с усреднённой брутто-формулой структурного звена  $C_{10}H_{10}O_3$ . Пики, соответствующие структурам на основе гваяцилглицерина, находятся на диаграммах в области  $H/C = 1,0-1,4$  и  $O/C = 0,5-0,7$  (область III). В области IV сосредоточены соединения, соответствующие сигналам лигноуглеводных комплексов ( $H/C = 1,5-1,8$  и  $O/C = 0,7-1,0$ ), а область I характерна для сильно ненасыщенных структур с низким содержанием кислорода ( $H/C = 0,3-0,6$ ;  $O/C = 0,0-0,1$ ).



**Рисунок 9.** Диаграммы ван Кревелена диоксанлигнина можжевельника, кукурузы и сфагнума. Цвет точек соответствует относительной интенсивности пика в масс-спектре: 0,1–1% (синий), 1–10% (зелёный), 10–100% (красный)

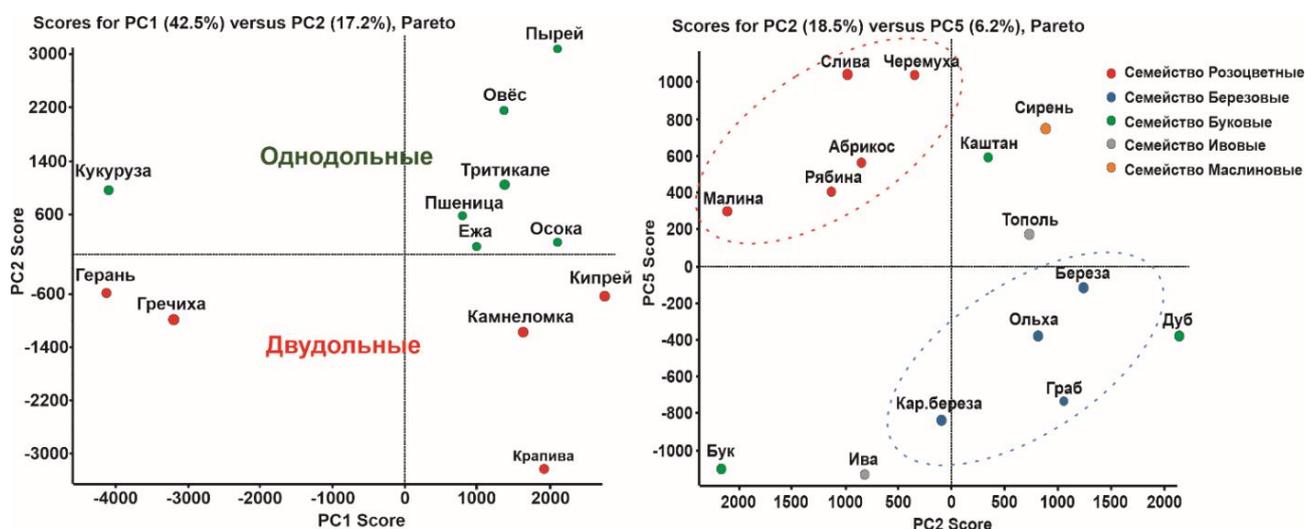
Одним из преимуществ ДВК является возможность визуального сравнения химических составов различных препаратов лигнина и отслеживание их трансформации в различных процессах. Представленные на рис. 9 ДВК диоксанлигнинов сфагнома, кукурузы и можжевельника существенно отличаются друг от друга, что свидетельствует о возможности экспрессной характеристики исследуемых препаратов. Так, особенностью ДВК лигнина кукурузы является наличие значительного количества олигомеров с повышенным содержанием кислорода (область V), которые располагаются в области элементных соотношений  $O/C = 0,4-0,7$ ;  $H/C = 0,2-0,8$  и характерные для ароматических кислот, содержащихся в травянистых растениях. Для препарата диоксанлигнина сфагнома характерно наличие области VI ( $O/C = 0,1-0,5$ ;  $H/C = 1,2-1,8$ ), которая относится к соединениям, представляющим собой жирные и терпеновые кислоты. Положение на диаграмме области VII с наиболее интенсивными сигналами в масс-спектре говорит о высоком содержании полифенольной фракции в составе лигноподобных соединений мха.

Метод анализа главных компонент. Более детальное сравнение масс-спектров высокого разрешения и надёжная классификация препаратов лигнина могут быть реализованы с применением метода анализа главных компонент. При этом наибольшей информативностью отличаются тандемные масс-спектры в диапазоне  $m/z$  90–250, получаемые в результате широкополосной ДАС ионов-предшественников с  $m/z$  300–1000 при величине энергии соударения 10 эВ. Визуализация полученных результатов на диаграммах счетов и нагрузок позволила выявить основные различия в сложных тандемных масс-спектрах диоксанлигнинов растений различного таксономического происхождения. Так, на графике счетов (рис. 10) можно выделить 4 области, где сосредоточены представители лигнинов хвойных (1–4), лиственных (13–24), травянистых (5–12) и моховидных растений (25–27). График нагрузок (рис. 10) показывает, что ионы с  $m/z$  151,0400; 123,0451; 165,0558 и 195,0664 наиболее характерны для лигнинов древесины хвойных пород и относятся к эмпирическим формулам  $C_8H_8O_3$ ,  $C_7H_8O_2$ ,  $C_9H_{10}O_3$  и  $C_{10}H_{12}O_4$ , соответствующие 4-гидрокси-3-метоксибензальдегиду, 2-метоксифенолу, 1-(4-гидрокси-3-метоксифенил)этанону и 3-гидрокси-1-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-1-пропанону. Продукт-ионы с  $m/z$  207,0663; 181,0508; 223,0600 соответствуют препаратам лигнина лиственных пород и имеют элементные составы  $C_{11}H_{12}O_4$ ,  $C_9H_{10}O_4$  и  $C_{11}H_{12}O_5$  соответственно. Они могут быть отнесены к синаповому альдегиду, сиреневому альдегиду и синаповой кислоте. Особенностью лигнинов, выделенных из травянистых растений, является наличие в тандемных масс-спектрах интенсивных сигналов ионов с  $m/z$  195,0506 и 163,0389, которые соответствуют феруловой и *n*-кумаровой кислотам.



**Рисунок 10.** Диаграмма счетов (Score) и нагрузок (Loading) для тандемных масс-спектров различных препаратов лигнина

Применение метода главных компонент для анализа МС/МС спектров лигнинов травянистых растений и лиственных пород древесины (рис. 11) позволил провести более глубокую классификацию по их классам и семействам.



**Рисунок 11.** Классификация лигнинов травянистого происхождения и древесины лиственных пород методом главных компонент

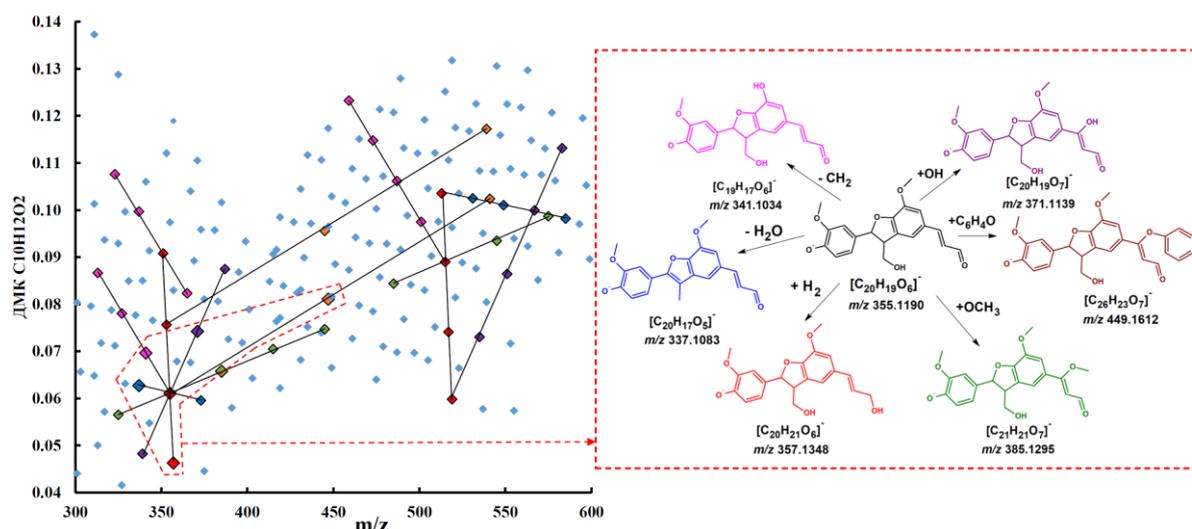
Так на диаграмме наблюдается классификация лигнинов, выделенных из однодольных и двудольных растений. Значительную роль в этом разделении играет соотношение *n*-кумаровой и феруловой кислот. Для однодольных растений в тандемном масс-спектре преобладающим ионом является феруловая кислота, а для двудольных – *n*-кумаровая. Для лигнинов представителей лиственных пород древесины наибольшее различие наблюдается для семейства розоцветные и семейства березовые несмотря на то, что МС/МС спектры для таких лигнинов имеют максимально схожий как качественный состав, так и соотношения интенсивностей

преобладающих пиков (с интенсивностью более 5%). Различия в минорных содержаниях различных ионов (в основном кумариновых структур) позволило разделить данные лигнины после их математической обработки МС/МС спектров.

Таким образом, характеристика МС/МС-спектров лигнинов с применением метода анализа главных компонент является эффективным способом классификации лигнинов по их ботаническому происхождению.

Метод Кендрика. Учитывая особенности структуры лигнина в качестве базовых структурных единиц, для расчётов дефектов масс, впервые были использованы фенилпропановые структурные звенья.

Расчётные значения дефектов масс для всех образующихся ионов соотносились со значениями  $m/z$  для улучшения дискриминации олигомеров с различной степенью полимеризации. Масштабирование отдельных участков такого графика (рис. 12) позволяет находить закономерности в распределении ионов внутри масс-спектра, а также устанавливать ряды гомологичных соединений, отличающихся на ту или иную функциональную группу лигнина.



**Рисунок 12.** Визуализация фрагмента масс-спектра хвойного лигнина в «модифицированной» диаграмме дефектов масс Кендрика. Цветные точки на диаграмме соответствуют ряду гомологов отличающихся: на  $H_2$  (красные);  $OCH_3$  (зеленые);  $C_6H_4O$  (оранжевые);  $O$  (фиолетовые);  $CH_2$  (сиреневый);  $H_2O$  (синий).

Одно из основных преимуществ использования концепции дефектов масс Кендрика – возможность идентификации олигомеров с высокими массами, для которых правильное определение достоверных элементных составов на основе точной массы затруднительно. Как видно из таблицы 2, идентификация серии гомологичных соединений, отличающихся на различное число структурных блоков  $C_{10}H_{12}O_4$  в масс-спектре хвойного лигнина, значительно облегчается путем преобразования в массу Кендрика с последующим пересчётом дефекта масс. Разницы между величинами дефектов масс (ДМК) для данной серии соединений имеют близкие значения, иными словами, это означает, что каждый член данной серии имеет один и тот же «добавочный структурный элемент». В низких массах (<700 Да) точность определения

элементных составов достаточно высока (при допустимом отклонении экспериментально значения  $m/z$  от расчетного на уровне 5 ppm формируется лишь 1 молекулярная формула), что позволяет определить структурную разницу между близлежащими элементами данной серии. Выявление гомологических рядов с использованием концепции Кендрика позволяет определить элементные составы олигомеров с высокими массами.

**Таблица 2.** Определение элементных составов олигомеров с высокими массами на основе выявления гомологических рядов с использованием концепции Кендрика

$m/z$ (эксп.)	[M–H] <sup>–</sup> (эксп)	Масса Кендрика, Да	ДМК	[M–H] <sup>–</sup> (практ.)
317,0467	C <sub>19</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	316,9286	0,071	C <sub>19</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>
513,1205	C <sub>29</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub>	512,9294	0,071	C <sub>29</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub>
709,1946	C <sub>39</sub> H <sub>33</sub> O <sub>13</sub>	708,9305	0,070	C <sub>39</sub> H <sub>33</sub> O <sub>13</sub>
905,2695	C <sub>42</sub> H <sub>49</sub> O <sub>22</sub>	904,9324	0,070	C <sub>49</sub> H <sub>45</sub> O <sub>17</sub>
1101,343	C <sub>52</sub> H <sub>61</sub> O <sub>26</sub>	1100,937	0,069	C <sub>59</sub> H <sub>57</sub> O <sub>21</sub>
1297,417	C <sub>44</sub> H <sub>81</sub> O <sub>43</sub>	1296,934	0,069	C <sub>69</sub> H <sub>69</sub> O <sub>25</sub>

Кроме того, графики ДМК не ограничивается использованием только блоков C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>, их можно адаптировать с использованием других функциональных блоков. Олигомеры, различающиеся определенной функциональной группой (ОН, СН<sub>2</sub>, ОСН<sub>3</sub>, СО) или количеством двойных связей, также можно проследить на диаграммах, где они будут располагаться на прямых линиях, но при этом иметь разные углы наклона (рис.12).

**Глава 6** («Молекулярный анализ и характеристика структуры природных лигнинов») посвящена апробации разработанных подходов для анализа малоизученных лигнинов травянистых растений на примере осоки двудомной и крапивы, а также изучении молекулярных составов диоксанлигнина березы, выделенных из различных типов ткани растения - ксилемы и флоэмы.

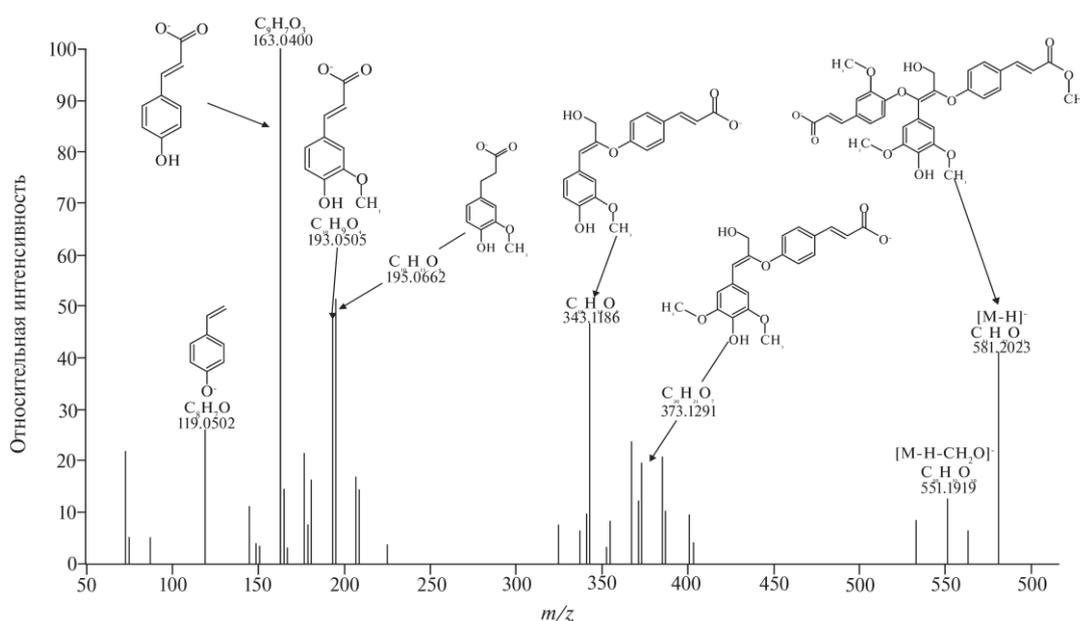
Установлено, что ключевую роль в формировании лигнина травянистых растений играют структуры оксикоричных кислот: кумаровой, кофейной и феруловой, которые являются преобладающим ионами в tandemных масс-спектрах (таблица 3).

Второй по распространённости группой мономеров после кислот являются ароматические продукты деградации полимера, не имеющие пропановой боковой цепи. Прежде всего, к ним относится соединение с брутто-формулой C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O, которое, наиболее вероятно, представляет собой 4-винилфенол, но может быть также ацетофеноном или кумараном, поскольку соответствующие структуры весьма характерны для лигнинов. В больших количествах обнаруживаются также гваяцильные структуры – гваякол, ванилин, ванилиновый спирт. В области более низких масс (< 100 Да) среди продуктов ДАС преобладают остатки трех кислот – глиоксалевой (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), гликолевой (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>3</sub>) и пировиноградной (C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>O<sub>3</sub>), образующиеся при отщеплении боковых цепей фенилпропановых структур.

**Таблица 3.** Основные фрагменты, образующиеся в ходе ДАС депротонированных молекул диоксанлигнина крапивы и осоки (ионы-предшественники с  $m/z$  300–1000, энергия соударений 10 эВ)

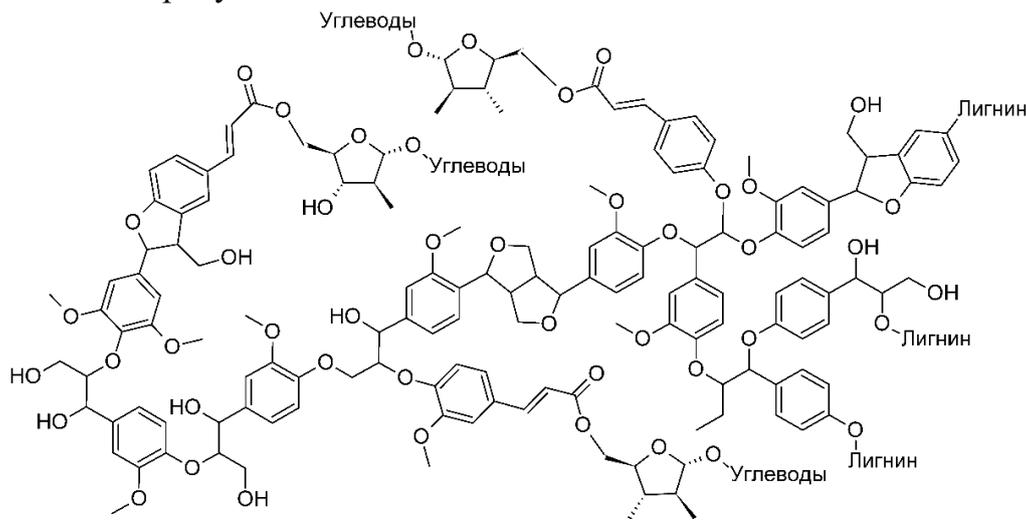
Предполагаемые структуры	[M-H] <sup>-</sup>	$m/z$ (эксп.)	$\Delta$ , ppm	осока	крапива
				И <sub>отн.</sub> , %	И <sub>отн.</sub> , %
Фенол	[C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O] <sup>-</sup>	93,0344	-2,41	10	5
Гидроксиметилфуран	[C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	113,0245	1,08	83	37
Ацетофенон	[C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O] <sup>-</sup>	119,0503	0,55	40	47
Гваякол	[C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	123,0453	0,89	10	11
4-Метоксибензальдегид	[C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	135,0441	1,01	13	13
2,3- Дигидроксибензальдегид	[C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	137,0233	0,76	10	10
Ванилин	[C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	151,0404	2,02	30	20
<b><i>n</i>-Кумаровая кислота</b>	[C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	163,0403	1,02	<b>100</b>	<b>100</b>
2,3-Диметоксибензальдегид	[C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	165,0558	0,74	27	20
4-Метоксикоричная кислота	[C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	177,0558	0,43	24	17
<b>Кофейная кислота</b>	[C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	179,0350	0,35	<b>30</b>	<b>40</b>
Сиреневый альдегид	[C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	181,0507	0,41	18	17
<b>Феруловая кислота</b>	[C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	193,0509	1,51	<b>80</b>	19
Дигидроферуловая кислота	[C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	195,0667	1,93	15	24

Для детальной характеристики структурных единиц лигнина крапивы записывали МС/МС-спектры (рис. 13) отдельных ионов-предшественников (ширина окна изоляции квадрупольного масс-фильтра 0,4 Да). Полученные МС/МС спектры (рис. 13) демонстрируют характерное для лигнинов отщепление метильных групп и формальдегида, а также разрыв связей между структурными единицами с высвобождением мономерных фрагментов. Их наиболее интенсивные пики с  $m/z$  163,0401 и 193,0506 соответствуют *n*-кумаровой и феруловой кислотам. На спектре тримера обнаруживается также интенсивный пик с  $m/z$  195,0662, который может быть отнесён к структуре дигидроферуловой кислоты.



**Рисунок 13.** Масс-спектр продуктов активированной соударениями диссоциации тримера с  $m/z$  581,2023 с предполагаемыми путями их фрагментации (энергия соударений 30 эВ)

В силу естественных ограничений масс-спектрометрического подхода, не позволяющих получать надёжную информацию о связях между структурными фрагментами макромолекул, для решения комплексной характеристики структуры лигнина осои двудомной использовались в тандеме методы МСВР и двумерной спектроскопии ЯМР. Используя полученные знания о преобладающих мономерных компонентах в изучаемом лигнине с применением разработанного метода, а также данных об основных типах связи, в том числе связи лигнин-полисахариды, был предложен возможный вариант структуры типичного олигомерного фрагмента макромолекулы лигнина осои, который может быть выражен формулой, представленной на рисунке 14.



**Рисунок 14.** Предполагаемая структура макромолекулы лигнина осои

Метод ФИАД-МСВР впервые позволил получить ценную информацию о химическом составе и строении малоизученного лигнина березовой флоэмы, содержащейся в коре, которая является многотоннажным побочным продуктом деревообработки и перспективным сырьем для биопереработки. Установлено, что лигнины флоэмы и ксилемы березы характеризуются аналогичным набором основных структурных элементов из-за идентичности предшественников (монолигнолов), участвующих в их формировании как в склереидах флоэмы, так и в волокнах ксилемы. Основной отличительной особенностью лигнина флоэмы является преобладание гваяцильных структур над синригильными, которая обеспечивает более высокую степень конденсации за счет образований связей С-С, включающих 5-е положение в ароматическом фенилпропановом ядре. Сложность химического состава диоксанового лигнина флоэмы, также связано с наличием в его составе флавоноидов (конденсированных дубильных веществ) и липидов (жирные кислоты), которые можно удалить во время предварительного щелочного гидролиза растительного сырья. Применение разработанного подхода ФИАД-МС/МСВР для ионов-предшественников с молекулярной массой 300–1000 Да позволило обнаружить среди полученных мономерных фрагментов углеводы. Фрагменты пентоз с брутто-формулой  $C_5H_{10}O_5$  ( $m/z$  149,0451 для  $[M-H]^-$ ) отличаются наиболее интенсивными сигналами в тандемном масс-спектре. Это указывает на возможность увеличения содержания

лигноуглеводных комплексов в лигнине флоэмы. Напротив, флавоноиды и их характерные фрагменты не были обнаружены среди продуктов широкополосной ДАС (в диапазоне ионов-предшественников  $m/z$  500–1200) лигнина флоэмы. Это свидетельствует о том, что они присутствуют в изучаемых препаратах лигнина в виде низкомолекулярных примесей, не входящих в состав макромолекул лигнина. Состав мономерных продуктов ДАС олигомеров лигнина полностью подтверждает вывод о значительном преобладании гваяцильных структур лигнина флоэмы по сравнению с препаратом, выделенным из ксилемы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Масс-спектрометрия с фотохимической ионизацией при атмосферном давлении является перспективным методом исследования природного полимера лигнина. Высокоосновные апротонные растворители, такие как 1,4-диоксан, ацетон и тетрагидрофуран, обладают высокой растворяющей способностью по отношению к лигнину и способны выступать в качестве реагентов (допантов) для фотоионизации, позволяя генерировать как протонированные, так и депротонированные молекулы олигомеров лигнина в диапазоне молекулярных масс до 1,4–1,8 кДа. Использование 1,4-диоксана в качестве допанта предпочтительней из-за низкого уровня фоновых сигналов этого растворителя в условия масс-спектрометрического анализа. Зависимости температуры источника ионов и расхода раствора (допанта) от эффективности ионизации олигомеров лигнина экстремальны, проходят через максимум при 500 °С и 200–250 мл/мин. ФИАД/МСВР в режим регистрации отрицательно заряженных ионов обеспечивает более высокую чувствительность в области высокой молекулярных масс по сравнению с ФИАД (+), однако он характеризуется повышенной фрагментацией наиболее распространённых эфирных связей между фенилпропановыми фрагментами лигнина. Комбинация ФИАД с масс-спектрометрией высокого разрешения Orbitrap позволяет получать масс-спектры лигнинов хвойной и лиственной древесины, травянистых растений с разрешённой тонкой структурой и содержащие сигналы до 3000 олигомеров (димеры-декамеры). Применение математических подходов обработки сложных масс-спектров позволяет экспрессно охарактеризовать молекулярный состав лигнина, оценить структурные особенности различных лигнинов, а в ряде случаев – провести их классификацию. Применение метода диссоциации, активированной соударениями в широком диапазоне масс ионов-предшественников, может быть альтернативой имеющимся трудоемким и времязатратным деградиационным методам оценки преобладающих структурных звеньев в лигнине. Все это может быть использовано для комплексной характеристики лигнинов на молекулярном уровне и отслеживания изменений химического состава биополимеров в различных процессах.

## ВЫВОДЫ

В диссертационной работе были получены следующие научные результаты:

1. Для получения высокоинформативных масс-спектров природного лигнина предложен подход, основанный на допированной фотохимической ионизации при атмосферном давлении в сочетании с Orbitrap масс-анализатором. Наибольшая эффективность ионизации и получение высококачественных масс-спектров лигнинов в диапазоне  $m/z$  300–2000 достигается при использовании в качестве допанта смеси 1,4-диоксан:вода (9:1), температуре источника ионов 500 °С и скорости потока подвижной фазы 0,20–0,25 мл/мин.
2. Установлено, что частичная фрагментация олигомеров лигнина в режиме ФИАД-МС протекает преимущественно с разрывом простых эфирных  $\beta$ -O-4 связей между фенилпропановыми структурными единицами, а также за счёт процессов деметилирования, дегидратации и декарбоксилирования. Применение ФИАД в режиме детектирования отрицательно заряженных ионов обеспечивает большую стабильность структурных звеньев макромолекул лигнина и большую интенсивность сигналов в области высоких молекулярных масс ( $> 1$  кДа).
3. Впервые для структурных исследований лигнина предложен подход, основанный на получении тандемных масс-спектров широкого круга ионов-предшественников в режиме диссоциации, активированной соударениями, в широком диапазоне молекулярных масс ионов-предшественников. На этой основе разработан способ экспрессного определения относительного содержания гваяцильных, сингильных и *p*-гидроксифенильных звеньев в составе лигнина. Способ отличается исключительной простотой пробоподготовки и анализа и снижением продолжительности аналитического цикла на порядки по сравнению с используемыми в настоящее время химическими деградиационными методами и пиролитической ГХ-МС.
4. Показана возможность изучения структуры лигнинных олигомеров по данным масс-спектрометрии высокого разрешения на основе модифицированной концепции дефектов масс Кендрика. Для анализа хвойных лигнинов в качестве базового звена Кендрика рекомендовано использование структуры 4-(2-гидроксипропил)-2-метоксифенола, что позволяет наиболее эффективно выделять гомологические ряды лигнинных олигомеров и надёжно устанавливать на этой основе элементные составы и структуры олигомеров в области высоких молекулярных масс ( $> 1000$  Да).
5. Разработанные подходы были апробированы при решении задач анализа лигнинов травянистых растений и флоэмы березы. Показана ключевая роль оксикоричных кислот в формировании структур олигомеров лигнина травянистых растений, предложены структурные формулы типичных олигомеров лигнинов крапивы и осоки. Показана перспективность сочетания масс-спектрометрии высокого разрешения с фотоионизацией при атмосферном давлении и двумерной спектроскопии ЯМР как взаимодополняющих методов для максимально полной структурной характеристики лигнинов.

**Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:**

**Научные статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.2 – «Аналитическая химия»:**

1. Kosyakov D.S., **Pikovskoi I.I.**, Ul'yanovskii N.V. Dopant-assisted atmospheric pressure photoionization Orbitrap mass spectrometry – an approach to molecular characterization of lignin oligomers // *Analytica Chimica Acta*. 2021. V. 1179. 338836. (Импакт-фактор Web of Science – 6.558, **Q1**), 50%.
2. Faleva A.V., **Pikovskoi I.I.**, Pokryshkin S.A., Chukhchin D.G., Kosyakov D.S. Features of the Chemical Composition and Structure of Birch Phloem Dioxane Lignin: A Comprehensive Study // *Polymers*. 2022. V. 14. № 5. P. 964 – 979. (Импакт-фактор Web of Science – 4.329, **Q1**), 40%.
3. **Пиковской И.И.**, Косяков Д.С., Шаврина И.С., Ульяновский Н.В. Изучение лигнина крапивы (*Urtica dióica*) методом масс-спектрометрии на основе орбитальной ионной ловушки с фотоионизацией при атмосферном давлении // *Масс-спектрометрия*. 2019. № 1. С. 237–243. Импакт-фактор RSCI – 0.391. (перевод: **Pikovskoi I.I.**, Kosyakov D.S., Shavrina I.S., Ul'yanovskii N.V. Study of Nettle (*Urtica dióica*) Lignin by Atmospheric Pressure Photoionization Orbitrap Mass Spectrometry // *Journal of Analytical Chemistry*. 2019. V. 74. № 14. P. 1412–1420. Импакт-фактор Web of Science – 1.069, **Q4**), 40%.
4. **Пиковской И.И.**, Косяков Д.С., Фалёва А.В., Шаврина И.С., Кожевников А.Ю., Ульяновский Н.В. Изучение лигнина осоки (*Cárex*) методами масс-спектрометрии высокого разрешения и спектроскопии ядерного магнитного резонанса // *Известия Академии наук. Серия химическая*. 2020. № 10. С. 2004–2012. Импакт-фактор RSCI – 1.222. (перевод: **Pikovskoi I.I.**, Kosyakov D.S., Faleva A.V., Shavrina I.S., Kozhevnikov A.Yu., Ul'yanovskii N.V. Study of the sedge (*Cárex*) lignin by high-resolution mass spectrometry and NMR spectroscopy // *Russian Chemical Bulletin, International Edition*. 2020. V. 69. № 10. P. 2004–2012. Импакт-фактор Web of Science – 1.222, **Q3**), 40%.
5. **Пиковской И.И.**, Ульяновский Н.В., Горбова Н.С., Косяков Д.С. Изучение лигнина методом масс-спектрометрии на основе орбитальной ионной ловушки с фотоионизацией при атмосферном давлении: роль спектрального разрешения // *Масс-спектрометрия*. 2021. № 1. С. 20–27. Импакт-фактор RSCI – 0.391. (перевод: **Pikovskoi I.I.**, Ul'yanovskii N.V., Gorbova N.S., Kosyakov D.S. Study of Lignin by Atmospheric Pressure Photoionization Orbitrap Mass Spectrometry: Effect of Spectral Resolution. // *Journal of Analytical Chemistry*. 2021. V. 76. № 14. P. 1610–1617. Импакт-фактор Web of Science – 1.069, **Q4**), 50%.

### **Иные публикации:**

6. Kosyakov D.S., **Pikovskoi I.I.**, Ul'yanovskii N.V., Shavrina I.S., Gorbova N.S. Characterization of lignins by high-resolution Orbitrap mass spectrometry with atmospheric pressure photoionization // 15th European Workshop on lignocellulosics and pulp. 2018. P. 59–62.
7. Косяков Д.С., Ульяновский Н.В., Аникеенко Е.А., **Пиковской И.И.** Новые подходы в масс-спектрометрии лигнина // VII Всероссийская конференция с международным участием "Масс-спектрометрия и её прикладные проблемы". 2017. С. 123.
8. Kosyakov D.S., Ul'yanovskii N.V., **Pikovskoi I.I.** Ultrahigh-resolution Orbitrap mass spectrometry as a tool for study of natural and industrial lignins // XI Международная конференции Petromass-2018. 2018. С. 80–84.
9. Косяков Д.С., **Пиковской И.И.**, Ульяновский Н.В., Шаврина И.С., Ипатова Е.В. Новые подходы в исследовании лигнина методом масс-спектрометрии высокого разрешения с фотоионизацией при атмосферном давлении // Сборник тезисов IV Международной научной конференции "Современные тенденции развития химии и технологии полимерных материалов". 2018. С. 83–85.
10. Косяков Д.С., Ульяновский Н.В., Аникеенко Е.А., **Пиковской И.И.**, Горбова Н.С. Масс-спектрометрические методы изучения структуры лигнинов // Материалы VI Международной конференции «Физикохимия растительных полимеров». 2017. С. 114–116.
11. **Пиковской И.И.**, Косяков Д.С., Шаврина И.С., Ульяновский Н.В. Разработка приемов масс-спектрометрического анализа природных лигнинов с применением фотоионизации при атмосферном давлении // Сборник тезисов XXI Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. 2020. Т. 4. С. 300.
12. **Пиковской И.И.** Разработка подходов к исследованию структуры лигнина методом масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения // Сборник тезисов докладов участников V Всероссийского молодежного научного форума «Наука будущего – наука молодых». 2020. С. 42.
13. **Пиковской И.И.**, Косяков Д.С., Шаврина И.С., Ульяновский Н.В. Изучение лигнина крапивы (*Urtica dióica*) методом масс-спектрометрии на основе орбитальной ионной ловушки с фотоионизацией при атмосферном давлении // Материалы VIII Международной конференции «Физикохимия растительных полимеров». 2019. С. 110–114.
14. **Пиковской И.И.**, Косяков Д.С., Ульяновский Н.В., Шаврина И.С. Изучение лигнинов методом масс-спектрометрии высокого разрешения с фотохимической ионизацией при атмосферном давлении // Материалы VIII Всероссийской конференции с международным участием «Масс-спектрометрия и её прикладные проблемы». 2019. С. 176–179.
15. **Пиковской И.И.**, Косяков Д.С., Шаврина И.С., Попова Ю.А., Фалёва А.В. Экспрессный подход определения класса лигнина и принадлежности к определенному семейству растений, основанный на хемометрическом анализе

масс-спектрометрических данных // Материалы IX Международной конференции «Физикохимия растительных полимеров». 2021. С. 161–165.

16. **Пиковской И.И.**, Косяков Д.С. Применение графиков дефектов масс Кендрика для анализа структуры масс-спектров хвойного лигнина // Материалы IX Международной конференции «Физикохимия растительных полимеров». 2021. С. 166–169.
17. **Пиковской И.И.**, Косяков Д.С., Шаврина И.С., Ульяновский Н.В. Разработка подхода к экспрессной характеристике состава мономерных фрагментов макромолекул лигнина методом диссоциации, активированной соударениями. Материалы IX Всероссийской конференции с международным участием «Масс-спектрометрия и её прикладные проблемы». 2021. С. 116.

*Соискатель выражает искреннюю признательность научному руководителю к.х.н., доц., Дмитрию Сергеевичу Косякову за помощь на всех этапах выполнения диссертационной работы; научному сотруднику, к.х.н. Фалёвой А.В. за помощь в структурных исследованиях лигнина методом двумерной спектроскопии ЯМР; коллективу ЦКП НО «Арктика» за поддержку, теплую атмосферу и отзывчивость.*